

Electroforesis de las Proteínas Séricas en la Fase Aguda de la Enfermedad de Chagas Experimental en Ratones Blancos (*Mus Musculus*)*

Lic. Pedro Mármol León

INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas es una tripanosomiasis endémica, ampliamente distribuida en las zonas rurales del Continente Americano desde los Estados Unidos de Norte América hasta Argentina y Chile. La importancia de su estudio radica en el hecho, de que constituye un problema de salud pública por sus altos índices de morbilidad y mortalidad en la población rural de América Latina, durante las edades más productivas de la vida.

En el año de 1960, un grupo de estudio de la Organización Mundial de la Salud^{1 2} estimó en 35.000.000, el número de personas expuestas a la infección y en 7.000.000 el número de enfermos, y los estudios realizados en áreas de alta endemicidad

* Tesis presentada ante la Ilustre Universidad de Los Andes para optar al doctorado en bioanálisis.

revelan que aproximadamente el 10% de sus habitantes presentan formas graves de cardiopatía chagásica. Estos hechos han despertado una gran preocupación por el estudio de dicha enfermedad, dirigida hacia el mejor conocimiento de la etiología del agente causal, patogenia, clínica, procedimientos de diagnóstico, epidemiología y profilaxia.

El agente etiológico es el **Trypanosoma cruzi** Chagas, 1909, flagelado polimorfo en su evolución, con aspectos diversos en el vector y el hospedador vertebrado. En el insecto transmisor se encuentra bajo la forma de tripanosoma, leishmania, critidia y tripanosoma metacíclico. En el hospedador vertebrado se presenta en la sangre bajo la forma de tripanosoma y en las células bajo la forma de leishmania. Se sabe que en la mayoría de los casos de infección humana la transmisión se efectúa por penetración a través de la piel o mucosas de las formas metacíclicas del **Trypanosoma cruzi** encontradas en las deyecciones de los triatomos; sin embargo, las experiencias realizadas por Díaz Ungria^{3 4 5}, en relación con el mecanismo de transmisión bucal de la infección experimental en perros, ratas, ratones y cobayos, a partir de heces positivas de **Rhodnius prolixus** Stal, 1859, hacen pensar en la importancia que podría tener en la infección humana este mecanismo de transmisión.

En la naturaleza, el **Trypanosoma cruzi** ha sido encontrado principalmente en insectos hemípteros, de la subfamilia **Triatominae**. Según la Organización Mundial de la Salud¹, hasta el año 1960 se habían descrito cerca de 90 especies de triatomos, la mayoría en la Región Neotropical, donde se extienden desde cerca del paralelo 43 de latitud Norte, hasta cerca del paralelo 49 de latitud Sur, sin embargo, sólo en el Continente Americano se han encontrado especies de triatomos infectados en condiciones naturales por el **Trypanosoma cruzi** y muy pocas de estas especies tienen importancia epidemiológica, condicionada principalmente por su densidad y por su adaptación a la vivienda humana.

En relación con los vectores^{1 2} más importantes, llama la atención la amplia distribución del **Triatoma infestans** (Klug, 1834), diseminado en Brasil, Argentina, Uruguay, Chile, Para-

guay, Bolivia y Perú, con índices de infección que varían generalmente del 20 al 30%.

Otros transmisores importantes en América son: en Centro América y Méjico, **Triatoma dimidiata**, **Triatoma pallidipennis**, **Triatoma phyllosoma** y **Rhodnius pallesi**; en Venezuela, Colombia y Guayana Francesa, **Rhodnius prolixus**.

En Venezuela, según Guerrero y cols.⁶, **Rhodnius prolixus** se encuentra en todas las regiones del país, desde 0 a más de 2.000 metros sobre el nivel del mar, excepto, en el Estado Nueva Esparta, Península de Paraguaná y una pequeña faja costera. Considera el mismo autor que es la especie más importante como vector de la enfermedad de Chagas en el país, debido a su gran domiciliaridad y elevado grado de infectabilidad para el **Trypanosoma cruzi**.

En estudios recientes, Díaz Ungría⁷ logró infectar perros mediante la ingestión de moscas alimentadas con heces de **Rhodnius prolixus** positivas a **Trypanosoma cruzi** con resultados positivos aún doce horas después de la alimentación de la mosca.

Desde los trabajos de Chagas⁸, quien resaltó la gran importancia epidemiológica de los reservorios y vectores silvestres del **Trypanosoma cruzi**, se han realizado numerosas investigaciones en diferentes países latinoamericanos sobre los reservorios extrahumanos, demostrando que muchas especies de animales silvestres son portadores del parásito en condiciones naturales, lo que ha permitido establecer el origen primitivo de la enfermedad, al comienzo exclusivo de los animales silvestres, con posterior adaptación al hombre y animales domésticos; investigaciones posteriores por diversos autores⁹⁻³² han demostrado la infección en gran variedad de animales silvestres mediante el hallazgo de tripanosomas semejantes o idénticos al **Trypanosoma cruzi**. Al lado de los reservorios silvestres, cuya importancia como fuente de infección para el hombre parece pequeña, ha llamado la atención el papel que desempeñan los reservorios domésticos, principalmente el perro, que por su íntima convivencia con el hombre, constituye en el medio rural el reservorio doméstico más importante de la enfermedad de Chagas.

En la lucha contra la infección chagásica, ocupa un lugar de singular importancia la evaluación de los procedimientos de diagnóstico, especialmente las técnicas de laboratorio y su utilidad depende del período en que se encuentra la infección. Estas técnicas, pueden ser directas cuando su objetivo es demostrar la presencia del parásito o su aislamiento; e indirectas basadas en las reacciones de inmunidad que nos habla del poder antigénico del **Trypanosoma cruzi**.

Entre los métodos de diagnóstico directo se encuentran:

a) **Examen de sangre periférica** al fresco entre lámina y laminita o por extendidos y gotas gruesas coloreados. Este método recomendado en la fase aguda, debido al elevado porcentaje de casos en el cual es posible encontrar parásitos en la sangre; no siempre es útil, ya que, según Pifano³³, una vez iniciado el proceso agudo, época en que es posible evidenciar el parásito, estos disminuyen progresivamente hasta desaparecer o circular en escaso número, debido a su paso a la sangre en una forma discontinua o irregular, una vez que la enfermedad ha pasado a su fase crónica, por lo que concluye que su valor en esta fase es limitado, debido al escaso porcentaje (3.18%) de positividad que aporta; Mazza³⁴ y Díaz³⁵ no obtienen positividad y consideran despreciable este método para el diagnóstico en la fase crónica de la enfermedad; Soto, R. y T. de Soto³⁶, en 120 casos crónicos sólo encuentran uno positivo.

b) **Métodos de concentración:** Flores y cols.³⁷, usando la técnica de Strout obtienen 19.7% de positividad en la fase aguda; Soto, R. y T. de Soto³⁶, no encuentran positivos en 30 pacientes chagásicos crónicos. Con la técnica de Martín Leboef-Robaud, Remacciotti y cols.³⁸, obtienen 12% de positividad y la consideran superior al examen al fresco y por gota gruesa.

c) **Prueba del chipo:** Díaz Ungría³⁹ obtiene resultados negativos en 8 casos de Chagas crónico, iguales resultados obtiene Soto, R. y T. de Soto³⁶, en 30 casos crónicos; sin embargo, Díaz Ungría³⁹ recomienda la prueba, en la infección experimental con buenos resultados, inclusive uno o dos meses después de la inoculación.

d) **Hemocultivo:** Pifano³³, Soto, R. y T. de Soto³⁶ y Pedreira de Freitas⁴⁰ empleando diferentes medios de cultivo obtienen resultados negativos o con porcentajes de positividad muy bajos, en pacientes con Machado-Guerreiro positivo, lo que demuestra la poca utilidad de este método en la fase crónica de la enfermedad.

e) **Inoculación:** Se utilizan animales sensibles (cachorros de perros, ratones blancos jóvenes y acres). Este método aporta buenos resultados en la fase aguda; en la fase crónica su valor es despreciable debido a su escasa positividad. Pedreira de Freitas⁴⁰, en ratones blancos inoculados con sangre total obtuvo 0.6% de positividad; Pifano³³ inoculando perros con la sangre de 40 pacientes chagásicos crónicos obtuvo 12.5% de positividad.

f) **Xenodiagnóstico:** Según Pifano³³, es el método de escogencia para demostrar la presencia del **Trypanosoma cruzi** en la sangre periférica y obtiene con esta prueba 33.8% de positividad; Maekelt⁴¹, de 155 casos obtuvo 16.8% de positividad; Soto, R. y T. de Soto⁴² encuentran en 30 casos de Chagas crónico 23.3% de positividad; Soto, R.⁴³ en 100 pacientes chagásicos crónicos diagnosticados por el Machado-Guerreiro obtiene 16% de positividad.

De los métodos indirectos o serológicos el que aporta mejores resultados en la fase crónica es la Reacción de Fijación del Complemento empleada por primera vez por Guerreiro y Machado⁴⁴ ya que posee una especificidad y una sensibilidad muy grande. Con esta prueba Freitas⁴⁵, obtiene 97.3% de positividad en pacientes chagásicos comprobados parasitológicamente y siempre negativa en personas sanas o portadoras de otras enfermedades.

Se emplean otras pruebas como: la Inmunofluorescencia, la cual según Alvarez y cols.⁴⁶, aporta resultados similares a la Fijación del Complemento; Reacción de Hemoaglutinación, la cual según Cerisola y cols.⁴⁷, aporta iguales resultados que la Fijación del Complemento y la Inmunofluorescencia, a partir del quinto mes de la evolución de la enfermedad.

En trabajos recientes de Scorza y cols.⁴⁸ y de Perruolo, G.⁴⁹, con el Dye Test o Reacción Anticritidia, han obtenido resultados hasta un 100% de positividad en sueros de pacientes chagásicos crónicos.

Revisando la amplia bibliografía existente sobre la enfermedad de Chagas, nos llamó la atención el escaso número de investigaciones realizadas sobre la electroforesis de las proteínas séricas en pacientes chagásicos y particularmente en animales de experimentación inoculados con **Trypanosoma cruzi**.

Conocida la utilidad y valor diagnóstico de las alteraciones proteicas en las diversas enfermedades y con el deseo de contribuir al conocimiento de las probables alteraciones proteicas existentes en la enfermedad de Chagas experimental en su fase aguda; realizamos un estudio sobre la electroforesis en cinta de papel empleando el suero de ratones blancos (*Mus musculus*) inoculados con **Trypanosoma cruzi**, lo cual constituye el objeto del presente trabajo.

MATERIAL Y METODOS

Cepa empleada.— La cepa de **Trypanosoma cruzi** empleada tiene origen humano, es la conocida como Cepa Y, aislada por Silva y Nussenzweig⁵⁰ de un caso de enfermedad de Chagas y que mantenemos en nuestro laboratorio a través de inoculación intraperitoneal de sangre en ratones jóvenes, la cual según Carvalho y cols.⁵¹ se muestra altamente virulenta para estos animales, produciendo regularmente infecciones graves en todos los ratones inoculados que presentan alta parasitemia y mueren en más de 95% de los casos; además está dotada de intenso histotropismo, particularmente reticulotropismo.

Animales de experimentación empleados.— Utilizamos en nuestras experiencias 30 ratones blancos (*Mus musculus*) aparentemente sanos y 41 inoculados de 18 a 22 días de edad; ambas series de ratones mantenidos en las mismas condiciones ambientales.

El procedimiento empleado para la inoculación y obtención de los sueros fue el siguiente:

1) Utilizamos la prueba del Chipo³⁹, para lo cual hicimos picar ninfas de **Rhodnius prolixus** en 5º estadio evolutivo a ratones inoculados.

2) Una vez que las ninfas se alimentaron hasta la repleción total, retiramos la sangre ingerida por ellas por punción abdominal e inoculamos un lote de 8 ratones por vía intraperitoneal a la dosis de 0.1 cc. para cada uno.

3) Los animales inoculados fueron examinados entre el cuarto y sexto día después de la inoculación para la investigación de tripanosomas en sangre tomada de la cola.

4) Cada siete días sacrificábamos el lote para la obtención de los sueros e inoculábamos nuevos ejemplares a partir de la sangre tomada de uno de ellos y mezclada con heparina para evitar la coagulación.

5) La sangría de los animales se hizo cada siete días por corte de los vasos axilares previa anestesia, y la muestra se obtuvo mediante el uso de tubos capilares no heparinizados de 75 mm. de largo por 1.1-1.2 mm. de diámetro interno, de los empleados para microhematócritos.

6) Los tubos capilares llenos de sangre, hasta aproximadamente dos tercios de su longitud, se dejaron en reposo hasta la coagulación de la sangre e inicio de la retracción del coágulo. Se cerraron por el calor y se centrifugaron por cuatro minutos en microcentrífuga.

7) Con la ayuda de una sierra seccionamos los tubos un poco por encima de la capa de glóbulos blancos, para evitar que el suero se mezclara con los hematíes. Los sueros envasados en pequeños tubos plásticos se conservaron en congelación hasta el momento de realizar la electroforesis, la cual fue practicada antes del mes, para evitar posibles modificaciones de las proteínas.

Las proteínas séricas se investigaron por fraccionamiento electroforético, empleando un buffer de veronal a Ph 8.6 y fuerza iónica de 0.075 con un tiempo de migración de 16 a 18 horas, utilizando el equipo Spinco-Beckman con célula de migración en V. invertida y densitómetro Analytrol modelo R.B.⁵².

RESULTADOS

En la primera serie (ratones sanos), el análisis matemático estadístico nos ofreció los siguientes resultados:

	Albúmina %	Globulina Alfa 1-%	Globulina Alfa 2-%	Globulina Beta %	Globulina Gamma %
Media	66.4	1.2	8.12	21.6	2.0
Desvío					
Patrón	12.1	0.42	4.03	9.17	1.4
Error					
Standard	±2.21	±0.07	±0.73	±1.67	±0.26
Coefic. de Var.	18.2	35.0	49.6	42.4	70.0
Cif. Límites					
Normales	42.2-90.6	0.36-2.04	0.06-16.1	3.3-3.9	0.0-4.8

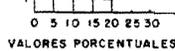
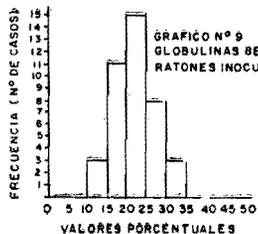
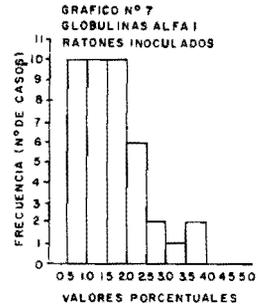
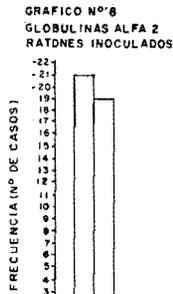
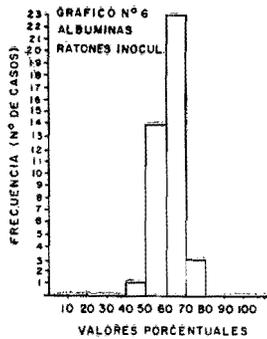
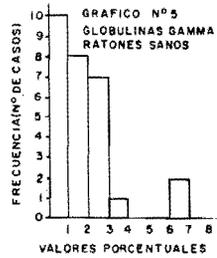
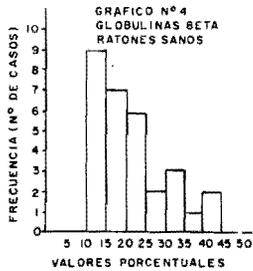
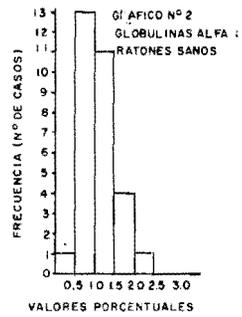
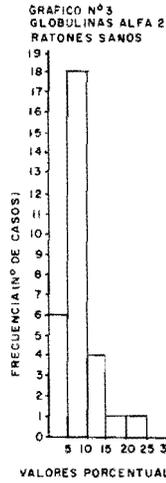
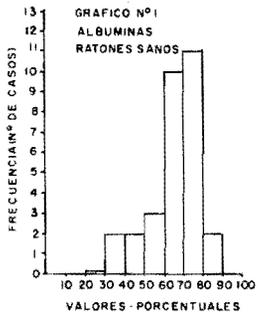
Los gráficos 1, 2, 3, 4 y 5 nos muestran los histogramas de distribución de frecuencia para cada una de las fracciones.

El análisis matemático estadístico de la segunda serie (ratones inoculados) aportó los siguientes resultados:

	Albúmina %	Globulina Alfa 1-%	Globulina Alfa 2-%	Globulina Beta %	Globulina Gamma %
Media	62.1	1.6	9.9	22.1	4.0
Desvío					
Patrón	6.2	0.79	2.39	5.05	3.3

Los gráficos 6, 7, 8, 9 y 10 nos muestran los histogramas de distribución de frecuencia para cada una de las fracciones.

Las fotos A y B muestran los proteinogramas de ratones sanos e inoculados.



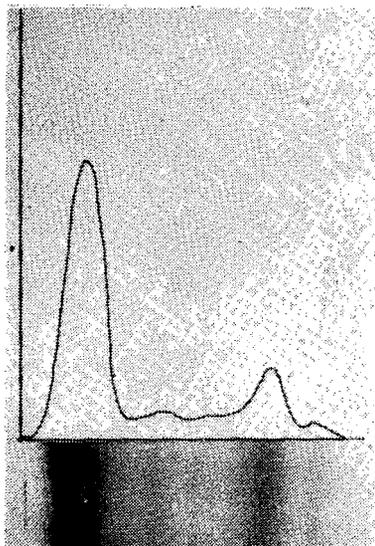


Foto A.— Proteinograma de ratones sanos.

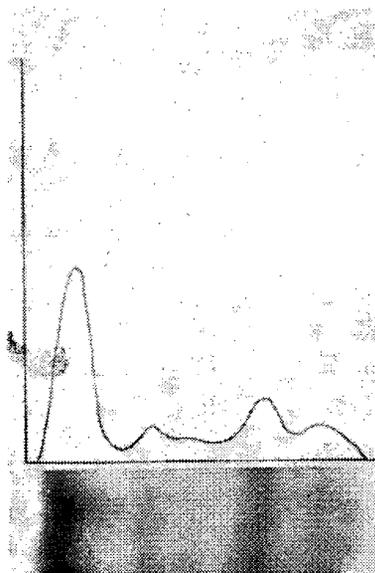


Foto B.— Proteinograma de ratones inoculados.

Electroforesis de las proteínas séricas en la fase aguda de la enfermedad de Chagas experimental en ratones blancos (*Mus musculus*).

COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

Existe una gran discrepancia entre los diferentes autores con respecto al tenor normal de los componentes de las proteínas plasmáticas en los animales de laboratorio, así, las cifras encontradas por algunos autores es variable, lo que se debe según Kozma y Goldstein⁵³ a: los diversos métodos empleados, posibles diferencias de sexo, edad y especialmente de las condiciones ambientales; de allí que el mencionado autor recomienda no tomar en cuenta los promedios de las diversas tablas existentes sino determinar los proteinogramas individualmente en cada animal antes de someterlo a cualquier trabajo experimental, para poder apreciar alteraciones patológicas.

Los valores obtenidos por nosotros en los ratones sanos, no concuerdan con los resultados obtenidos por Kozma y Goldstein⁵³ en lo referente a las globulinas, ya que en la serie de ratones sanos estudiados el valor de las Gamma globulinas estuvo siempre por debajo de las Globulinas Alfa 2 y Beta, mientras los citados autores, obtienen cifras más o menos equivalentes en las fracciones Alfa 2, Beta y Gamma.

Es de hacer notar que los autores en referencia emplearon ratones de seis meses de edad y el método electroforético fue diferente al utilizado por nosotros.

Del estudio comparativo de las dos series de ratones (sanos e inoculados), podemos apreciar las siguientes alteraciones:

Albúminas: No obtuvimos valores ni altos ni bajos en relación con las cifras límites normales (ver gráficos 1 y 6). El Test de Student demostró que la probabilidad es menor que 0.1 y mayor de 0.05. No hay diferencia significativa entre las dos series.

Globulina Alfa 1: No obtuvimos valores bajos en relación con las cifras límites normales, en cambio, en 11 casos o sea el 26.8% estuvieron por encima (ver gráficos 2 y 7). El Test de Student demostró que la probabilidad es menor que 0.01 y mayor de 0.001. Hay diferencia significativa entre las dos series.

Globulina Alfa 2: No obtuvimos valores bajos en relación con las cifras límites normales, y sólo un caso, o sea el 2.4% estuvo por encima, pero el 85.3% de los casos está por encima del promedio (ver gráficos 3 y 8). El Test de Student demostró una probabilidad menor que 0.05 y mayor de 0.001. Sí hay diferencia significativa entre las dos series.

Globulina Beta: No obtuvimos valores altos ni bajos en relación con las cifras límites normales (ver gráficos 4 y 9). El Test de Student demostró que la probabilidad es menor que 0.8 y mayor de 0.7. No hay diferencia significativa entre las dos series.

Globulina Gamma: No hay valores bajos; pero el 31.70% (13 casos) está por encima de las cifras límites normales y 28 casos o sea el 68.29% está por encima del promedio (ver gráficos 5 y

10). El Test de Student demostró que la probabilidad es menor que 0.01 y mayor de 0.001. Hay diferencias significativas entre las dos series.

Del estudio anterior se deduce que las alteraciones sufridas en las diversas fracciones de las proteínas séricas en la enfermedad de Chagas aguda en el ratón blanco (*Mus musculus*) son comparables a las modificaciones de las proteínas séricas de los humanos lo que concuerda con los trabajos de Salum y cols.⁵⁴, Pinto y cols.⁵⁵, Chattas y cols.⁵⁶, Ferreira y cols.⁵⁷.

Estas modificaciones se aprecian a nivel de las globulinas Alfa 1, Alfa 2 y Gamma que presentan valores altos en relación con las cifras límites normales.

RESUMEN

Se practicaron determinaciones de proteínas séricas por electroforesis en cinta de papel en 30 ratones aparentemente sanos y 41 inoculados con la Cepa Y de **Trypanosoma cruzi**.

Se utilizó el equipo Spinco-Beckman con célula de emigración en V invertida y densitómetro Analytrol R.B.

Se encuentran modificaciones significativas en las fracciones de las globulinas Alfa 1, Alfa 2 y Gamma las cuales muestran valores por encima de los límites normales. No se encuentran diferencias significativas en las Albúminas y Globulinas Beta. Se discuten los resultados obtenidos y sus relaciones con los hallados por otros autores en casos humanos.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — Organización Mundial de la Salud. Serie de Informes Técnicos. N° 202. Enfermedad de Chagas. Informe de un Grupo de Estudio, 1960.
- 2 — PESSOA, P. S. Parasitología Médica, sexta edición, Livraria Editora Guanabara, Koohgan S.A. Río de Janeiro, 1963.
- 3 — DIAZ-UNGRIA, C. Transmisión experimental del *Trypanosoma cruzi* en los vertebrados. I. Contaminación bucal a partir de he-

- ces de *Rhodnius prolixus* infectados. Rev. Vet. Venez. 16(95): 341-352, 1964.
- 4 — DIAZ-UNGRIA, C. Transmisión experimental del *Trypanosoma cruzi* en los vertebrados. II. Camino que sigue el tripanosoma en el organismo de los vertebrados, cuando se les contamina por vía bucal. Rev. Vet. Venez. 17(96): 3-13, 1964.
 - 5 — DIAZ-UNGRIA, C. La contaminación por vía buco-gástrica y ocular en los tripanosomas. Resumen y nuevas experiencias. Rev. Univ. del Zulia. 4: 45-77, 1966.
 - 6 — GUERRERO, L., GUZMAN, M. y DOMINGUEZ, M. Campaña contra la Enfermedad de Chagas. *Kasmera*. 2(3): 47-97, 1965.
 - 7 — DIAZ-UNGRIA, C. Papel del Veterinario en la lucha contra la Enfermedad de Chagas. Bol. Of. San. Panam. LXVII (6): 497-506, 1969.
 - 8 — CHAGAS, C. Sobre um tripanosoma del Tatú, *Tatusia novemcinctus*, transmitido pelo *Triatoma geniculata*. Posibilidade de ser o Tatú um depositario de *Trypanosoma cruzi* no mundo exterior. Nota Previa. Brasil. Med. 26: 305-306, 1912.
 - 9 — BARRETTO, M. P. Estudos sobre reservatorios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XVI. Contribuicao para o estudo dos focos naturais da Tripanosomiasis americana con especial referencia a região nordeste do estado de Sao Paulo - Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. I. (2): 23, 1967.
 - 10 — PIFANO, F. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas en el Estado Yaracuy. Separata de la revista de Sanidad y Asistencia Social. 6(2): 303-316, 1941.
 - 11 — BARRETTO, M. P. e cols. Estudos sobre reservatorios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*, XI. Observacoes sobre um foco natural da tripanosomiasis americana no municipio de Ribeirao Preto. Sao Paulo. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 8(3): 103-112, 1966.
 - 12 — MAZZA, S., MIYARA, S. y SANJURJO, H. Comprobación de animales domésticos y de nuevas especies de mamíferos silvestres portadores de *Trypanosoma cruzi* en los alrededores de Ciudad Mendoza. IX. Reun. Soc. Arg. de Pato. Trop. MEPR. pág. 548-559, 1935.
 - 13 — BARRETTO, M. P. e SIQUEIRA, A. F. Infeccao natural da *Lutreolina crassicaudata crassicaudata* pelo *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 4(6): 358-365, 1962.
 - 14 — BARRETTO, M. P. *Trypanosoma* semelhantes ao *T. cruzi* en animales silvestres e sua identificacao com o agente etiológico da Doença de Chagas. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 7(5): 305-315, 1965.

- 15 — BARRETTO, M. P. e cols. Estudos sobre reservatorios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. VI. Infecção natural do roedor *Akodon arviculoides*. Cursor por tripanossomo semelhante ao *T. cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 7(2): 72-81, 1965.
- 16 — DEANE, L. M. Sobre un tripanossomo de tipo cruzi encontrado num rato silvestre no estado do Pará. Rev. Brasil. Malariol. e doencas Tropicais. XII (2): 87-102, 1962.
- 17 — CORREA, F. M. e BARRETTO, M. P. Estudos sobre reservatorios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. III. Infecção natural do marsupial *Marmosa agilis agilis* por tripanossomo semelhantes ao *T. cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 6(4): 166, 1964.
- 18 — FERRIOLLI, F. e BARRETTO, M. P. Estudos sobre reservatorios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. IX. Infecção natural do *Rattus rattus* (Lin. 1758) por tripanossomo semelhante ao *T. cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 7(3): 169-179, 1965.
- 19 — FERRIOLLI, F. e BARRETTO, M. P. Estudos sobre reservatorios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XIV. Infecção natural da *Prea Cavia aperea aperea* por Tripanossomo semelhante ao *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 8(6): 267-276, 1966.
- 20 — ALBUQUERQUE, R. D. R. & BARRETTO, M. P. Estudos sobre reservatorios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXXII. Infecção natural do *Simio Callicebus nigriformis* (Spix 1823) pelo *T. cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 11(2): 115-122, 1969.
- 21 — ALBUQUERQUE, R. D. R. e BARRETTO, M. P. Estudos sobre reservatorios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXVI. Infecção natural do rato d'água *Nectomys squamipes squamipes* (Brants, 1827) pelo *T. cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 10(4): 229-237, 1968.
- 22 — SIQUEIRA, A. F., FERRIOLLI, E. e BARRETTO, M. P. Estudos sobre reservatorios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XVI. Infecção natural do Ourico, *Coendou insidiosus insidiosus* por tripanossomo semelhante ao *T. cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 9(2): 155-162, 1962.
- 23 — DEANE, L. M. Novo hospedeiro de *Trypanossomo* dos tipos cruzi e rangeli encontrados no Estado do Pará. O marsupial *Metachirops opossum opossum*. Rev. Brasil. Biol. e doencas tropicais. Vol. X. Nº 4. pág. 531-541, 1958.
- 24 — DEANE, L. M. Tripanosomídeos de mamíferos da região amazônica. I. Alguns flagelados encontrados na sangue de mamíferos silvestres do Estado de Pará. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 3(1): 15-28, 1961.
- 25 — BARRETTO, M. P. Reservatorios e vetores do *Trypanosoma cruzi* no Brasil. Sep. Rev. Goiana Med. 9 supl. 37-76. 1963.

- 26 — FERREIRA, L. C. e DEANE, L. M. Novo depositario silvestre do *Schizotrypanum cruzi* (Chagas 1909): a irara *Tayra barbara*. *Brasil. Med.* 52: 1159-1161, 1938.
- 27 — COURA, J. R. Tripanossomo do complexo cruzi em reservatorios silvestres no estado de Guanabara. Estudo de sua patogenicidade. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 8(3): 25-113, 1966.
- 28 — DEANE, L. M. e JANSEN, G. Encontros de *Schizotrypanum cruzi* em marsupiais da especie *Marmosa Cinerea*. *Brasil Med.* 53: 265-266, 1939.
- 29 — SOTO, S. T. de y SOTO U., R. Infección natural de la *Dasyprocta azarae azarae* por un trypanosoma semejante al *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Fac. Med. Maracaibo.* Vol. I. N° 2. pp. 15-25- 1968.
- 30 — FERRIOLLI, E. & BARRETTO, M. P. Estudos sobre reservatorios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*, XXIX. Infeccao natural da *Nasua nasua solitaria* Schinz 1821, pelo *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 10(6): 354-363. 1968.
- 31 — TORRES, M. Algums fatos que interesan á epidemiología da Molestia de Chagas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 7, 1915.
- 32 — MAYER, H. F. y ALCATRAZ, I.— Investigaciones sobre Esquistotripanosis en perros y gatos de la zona suburbana de Resistencia. *Anales del Instituto de Medicina Regional.* Vol. 4. N° 1. pp. 9-17, 1954.
- 33 — PIFANO, F. El diagnóstico Parasitológico de la Enfermedad de Chagas en su fase crónica. Estudio comparativo entre la gota gruesa, el xenodiagnóstico, el hemocultivo y las inoculaciones experimentales en animales sensibles. *Arch. Venez. Pat. Trop. y Paras. Med.* II(2): 121-146. 1954.
- 34 — MAZZA, S.— Métodos diagnósticos de la Enfermedad de Chagas; valor y oportunidad de cada uno de ellos. *Separata de Actas y Trabajos del VI Congreso Nacional de Medicina.* Córdoba. Tomo III. 7 págs., 1939.
- 35 — DIAS, E. Le xenodiagnóstico appliqué a la Trypanosomiase americaine. *Ext. Comp. Rend. Soc. de Biol.* Tomo CXVIII, pp. 287, 1934. Río de Janeiro.
- 36 — SOTO, R. y T. de SOTO. Diagnóstico Parasitológico de la Enfermedad de Chagas. *El Graduado.* Organo de la Oficina de Posgrado de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia. Año I. N° 2. Septiembre 1970.
- 37 — FLORES, M. TREJOS, A., PAREDES, A. y RAMOS, A. El método de concentración de Strout en el diagnóstico de la fase aguda de la Enfermedad de Chagas. *Bol. Chil. de Para.* Vol. 21. N° 2, pp. 38-39, 1966.
- 38 — RAMACCIOTTI, F., CRISCUOLO, E., TRILLA, C. T. de PAOLASSO, R. y ROCCA, J. Investigación de *Schizotrypanum cruzi*

- por la técnica de Martin Loeboeuf-Roubaud. Primera Conferencia Nacional de Enfermedad de Chagas, pp. 117-118, 1953.
- 39 — DIAZ-UNGRIA, C., GALLARDO, Z. M. y YEPEZ, S. Uso de la prueba del chipo en las investigaciones sobre Trypanosoma cruzi. Rev. Iber. Para. Vol. 26. N° 2, pp. 193-201, 1966.
 - 40 — PEDREIRA de FREITAS, J. L. Contribuicao para o estudo do diagnostico da molestia de Chagas por processos de laboratorio. Tese. Fac. Med. Univ. Sao Paulo, 1947.
 - 41 — MAEKELT, G. A. Un procedimiento modificado de Xenodiagnóstico para la Enfermedad de Chagas. Arch. Venez. de Med. Trop. y Para. Med. Vol. IV. (2): 277-287, 1962.
 - 42 — SOTO, U. R. y T. de SOTO, S. Valor del Xenodiagnóstico en la fase crónica de la Enfermedad de Chagas. Rev. Fac. Med. Maracaibo. Vol. I. N° 1. pp. 23-30, 1968.
 - 43 — SOTO, U. R. El Xenodiagnóstico. Experiencia personal en 100 casos de Enfermedad de Chagas crónica. Kasmera, Vol. 3. N° 3. pp. 167-225, 1970.
 - 44 — GUERREIRO, C. y MACHADO, A. Da reacao de Bordet e Gengou na molestia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. Brasil. Med. 27(23): 225-226, 1913.
 - 45 — PEDREIRA de FREITAS, J. L. Referido por Pessoa, B. S. Parasitología Médica. VI edición, Livraria Editora Guanabara, Koogan S. A. Rio de Janeiro, 1963.
 - 46 — ALVAREZ, M., CERISOLA, J. A. y ROHWEDDER, R. W. Test de Inmunofluorescencia para diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Bol. Chile. Paras. Vol. 23. (1-2); 4-9, 1968.
 - 47 — CERISOLA, J. A., ALVAREZ, M., LUGONES, H. y REBOSOLAN, J. B. Sensibilidad de las reacciones serológicas para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Bol. Chile. Paras. 24 (1-2): 2-8, 1969.
 - 48 — SCORZA, J. V., ALVAREZ, A., RAMOS, I., DAGERT, C., VASQUEZ, A. D. y TORREALBA, J. F. Nuevo método rápido para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas en su fase crónica. (Aplicación del "Dye test" de Sabin y Feldman). Arch. Venez. Med. Trop. y Paras. Méd. Vol. III. (1): 121-135, 1959.
 - 49 — PERRUOLO, G. Valor de la prueba del Dye Test (Reacción anticrithidia) en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas crónica. Tesis Doctoral. pp. 5-18, Mérida-Venezuela, 1970.
 - 50 — SILVA, L. H. P. y NUSSENZWEIGE, V. "Sobre uma cepa de Trypanosoma cruzi altamente virulenta para o camundongo branco". Separata da Folia Clin. et Biol. 20(3): 191-208, 1953.
 - 51 — CARVALHEIRO, J. e COLLARES, E. Estudos sobre o comportamento, em camundongos, de uma amostra altamente virulenta de "Trypanosoma cruzi" (amostra Y), após passagens em

- triatomíneos, ratos e culturas. Rev. Brasil. Biol. 25(2): 169-175, 1965.
- 52 — SPINCO MODEL, R. Instructions Manual Rim 4. p. 48.
- 53 — KOSMA, C. y GOLDSTEIN, C. Determinación de proteinograma normal por método electroforético en papel en animales de laboratorio. Act. Cien. Venez. XI, 2-3, 58-62, 1960.
- 54 — SALUM, J., LACAZ, S. P., BORGES, C., RASSI, A. y REZENDE, J. Electroforese das Proteínas Séricas na fase aguda Doença de Chagas. Rev. Goiana Méd. 5: 13-21, 1959.
- 55 — PINTO, C. y FALCAO, P. Electroforese na Doença de Chagas. Rev. Brasil. de Med. XV. 8: 536-539, 1958.
- 56 — CHATTAS, A., ZAMUR, R. y MACHADO, H. Estudio electroforético de las proteínas del suero en niños afectados de Enfermedad de Chagas. Rev. Med. de Córdoba, 46: 293-297, 1958.
- 57 — FERREIRA, P. M. y ELEJALDE, P. Estudo electroforetico das proteínas séricas na da forma crónica da Doença de Chagas. Bras. Medico. 74(6-9): 108-116, 1960.