

KASMER Vol. 20 (1-4) 1992  
Universidad del Zulia  
Facultad de Medicina  
Maracaibo-Venezuela

**ESTUDIOS SOBRE *Trypanosoma rangeli* TEJERA, 1920.  
XI- ENSAYO DE PROTECCION EN RATAS "WISTAR"  
y *Proechymis* sp.**

**STUDIES ON *Trypanosoma rangeli* TEJERA, 1920.  
XI- PROTECTION TRIALS IN "WISTAR" RATS  
AND *Proechymis* sp.**

*Elsa Nieves\**  
*Néstor Añez\*\**

**Trabajo financiado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de los Andes. Proyecto C-194-82.**

**RESUMEN**

El seguimiento sistemático del curso de la infección primaria y la respuesta a sucesivas reinfecciones por *Trypanosoma rangeli* en ratas "Wistar" y *Proechymis* sp., reveló un comportamiento similar del parásito en ambos modelos vertebrados, observándose durante la primo-

\* Instructor Grupo de Investigaciones Parasitológicas "J.F. Torrealba". Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

\*\* Profesor Titular del Grupo de Investigaciones Parasitológicas "J.F. Torrealba". Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes, Mérida, 5101. Venezuela.

infección una parasitemia relativamente baja y de corta duración en todos los animales.

Se observa una protección activa contra *T. rangeli* en ambos modelos a partir de la segunda reinfección con el parásito, evidenciada por ausencia de parásitos sanguíneos y detección de anticuerpos circulantes.

Se discuten aspectos epidemiológicos sobre estos hallazgos.

Ensayos de protección pasiva por transferencia de suero inmune y células esplénicas como factores inmunológicos en ratas "Wistar" demostró un muy corto período de protección sólo en los animales que recibieron simultáneamente suero inmune y células esplénicas. Se especulan las posibles causas de esta efímera protección.

Palabras claves:

**Trypanosoma rangeli**, Primoinfección, reinfección, transferencia factores.

#### ABSTRACT

Frequent observations on the course of prime-infection and reinfections by *Trypanosoma rangeli* in "Wistar" rats and *Proechymis* sp., revealed a similar behaviour of the parasite in both vertebrate models.

During the prime-infection a relatively low parasitaemia and a short patent period, was observed in all the animals.

An active protection against *T. rangeli* after the second reinfection, was observed in both models. This was evidenced by the absence of blood parasites and the detection of circulating antibodies.

The epidemiological significance of this findings, is discussed.

Passive protection trials carried out in "Wistar" rats by transferring immune serum and spleen cells as immunological factors, demonstrated a protective short period only in those animals injected with both factors. The possible cause of this ephemeral protection, is speculated.

Keywords.

**Trypanosoma rangeli**, Prime-infection, reinfection, transferring factors.

## INTRODUCCION

D'Alessandro<sup>1</sup> afirma que el hospedador vertebrado parece desarrollar una inmunidad tal ante *Trypanosoma rangeli*, que cuando cesa la primo infección el mismo se torna resistente a nuevas reinfecciones como producto de las exposiciones a picaduras por triatominos infectados.

Esta afirmación fue confirmada por Añez et al.<sup>2</sup> utilizando un aislado venezolano de *T. rangeli* en los modelos *Mus musculus* y *Didelphis marsupialis*, observando que cuando la infección primaria desaparece después de desarrollar un curso con bajas parasitemias, de duración relativamente corta, se implanta una resistencia a futuras reinfecciones después de la segunda exposición ante el parásito. Los autores explican el fenómeno como el resultado de una acción sinérgica de una respuesta en el sitio de deposición de los parásitos y la posible intervención de anticuerpos circulantes anti-*T. rangeli*.

En el presente estudio se pretende corroborar estos resultados utilizando dos nuevos modelos de mamíferos a saber: *Rattus norvegicus* y *Proechymis* sp., con la finalidad de observar si *T. rangeli* tiene un comportamiento común en diferentes hospedadores vertebrados. Asimismo, se realizan ensayos de protección pasiva mediante la transferencia de ciertos factores inmunológicos que como el suero inmune y las células esplénicas podrían conferir cierta inmunidad a los animales receptores.

## MATERIALES Y METODOS

### *Animales experimentales.*

*Trypanosoma rangeli*. El aislado utilizado se identifica como M/CAN/VE/82 PERRO-82. Detalles sobre su origen y mantenimiento son dados en Añez et al.<sup>3</sup>

Triatominos: Ninfas de V estadio y adultos de *Rhodnius prolixus* infectados en las glándulas salivares, fueron utilizados para producir infecciones en los lotes de animales experimentales. La detección de infección en las glándulas salivares de cada espécimen de *R. prolixus*, fue llevado a cabo por la técnica de salivación sobre porta-objetos de vidrio.<sup>4</sup>

*Modelos vertebrados:*

**Rattus norvegicus:** Ejemplares machos de la cepa "Wistar", juveniles de 30 días y adultos de 120 días, fueron utilizados en los diversos experimentos.

**Proechymis sp.:** Se utilizaron especímenes machos jóvenes procedentes de un área no endémica para la parasitosis estudiada.

*Técnicas y procedimientos:*

**Infección:** Todos los animales fueron expuestos a la picadura de 10 ejemplares de **R. prolixus**, infectados en las glándulas salivares. El curso de la infección fue seguido, estimando los niveles de parasitemia interdiario en cada animal, utilizando el método de Pizzi<sup>5</sup> modificado por Brener<sup>6</sup>.

**Reinfecciones:** Una vez superada la infección primaria, los animales fueron expuestos a reinfecciones sucesivas según el siguiente esquema: A los 32, 72 y 93 días las ratas juveniles; a los 60 y 110 días las ratas adultas y a los 50, 100 y 140 días los ejemplares de **Proechymis sp.**

*Detección de anticuerpos circulantes:*

Previo a la infección todos los animales fueron sangrados por el plexo retro orbital según Lumsden et al.<sup>7</sup>, para obtener suero como controles negativos en la detección de anticuerpos anti **T. rangeli**. En éstos, y en los sueros de animales sometidos a la infección, la determinación de títulos de anticuerpos circulantes fue realizada utilizando la técnica de aglutinación directa (TAD), empleando como antígeno cultivos de **T. rangeli** de 8 días a una concentración final de 0.8 D.O., según O.M.S.<sup>8</sup> Tales determinaciones fueron hechas a los 10, 20 y 30 días después de la primo-infección y sucesivas reinfecciones. Títulos de 1/16 y 1/32 se consideraron positivos para ratas y **Proechymis**, respectivamente.

*Ensayos de protección pasiva por transferencia de factores inmunológicos:*

Los factores inmunológicos ensayados fueron suero inmune inactivado (S.I.I.) y células esplénicas sensibilizadas (C.E.S.), obtenidos de ratas donadoras que habían sido sometidas a 4 reinfecciones con **T. ran-**

geli y las cuales presentaban títulos de anticuerpos circulantes equivalentes a 1/128.

#### *Obtención de células esplénicas:*

Los bazos de las ratas muertas por sangramiento total, fueron homogeneizados en mortero de porcelana con medio salino frío, obteniéndose una suspensión de células. La misma fue centrifugada a 3000 rpm por 10 min. a 4° C y lavadas 2 veces en el mismo medio. Previo al uso se determinó la concentración por contajes de células en cámara de Neubauer, ajustándose las concentraciones a ser utilizadas.

En los experimentos fueron utilizados 3 lotes de ratas. En el primero cada rata recibió por vía intravenosa (I.V.) una dosis de 0.6 ml. de S.I.I.; las ratas del segundo lote fueron inyectadas por vía intraperitoneal (I.P.) con 10<sup>8</sup> C.E.S. y el tercer grupo recibió simultáneamente ambos factores, en las mismas dosis y vías que las indicadas para los dos grupos anteriores.

Los grupos controles quedaron constituidos por lotes de 3 ratas para cada experiencia, las cuales fueron dosificadas en forma similar al grupo experimental con suero y células esplénicas provenientes de ratas donadoras sanas.

Una vez inyectadas con los factores indicados, grupos de 5 ratas para cada lote experimental y sus respectivos controles, fueron expuestos a la picadura infectante de *R. prolixus* a los 2 días post-transferencia, similarmente, grupos de 2 ratas fueron expuestos 15 días después de la transferencia de los factores inmunológicos utilizados.

En todos los casos fueron realizados exámenes de sangre interdiario para detectar parasitemias, obteniéndose, además, muestras de suero para detección de títulos de anticuerpos circulantes a los 10, 20 y 30 días post-exposición a la picadura, como se indicó anteriormente. Asimismo, todos los animales fueron sometidos a 3 reinfecciones sucesivas a los 40, 130 y 170 días después de superar la primo-infección, siguiéndose las determinaciones de niveles de anticuerpos según el esquema indicado.

**Análisis estadístico.**- Para determinar la significancia estadística de los títulos de anticuerpos detectados durante el curso de la infección primaria y sucesivas reinfecciones en los modelos vertebrados utilizados, fue realizado un análisis de varianza adaptado a microcomputadoras.<sup>9</sup>

## RESULTADOS

I. Curso de la infección primaria, respuesta a las reinfecciones y detección de anticuerpos circulantes en ratas "Wistar" y *Proechymis* sp. infectados con *T. rangeli*.

Estimaciones frecuentes del nivel de parásitos sanguícolas llevadas a cabo en 16 ratas juveniles, 8 adultos y 4 ejemplares de *Proechymis* sp. infectados con *T. rangeli*, revelaron en las primeras una tendencia similar en la curva de parasitemia, caracterizada por un incremento en el día 4 y un descenso progresivo hasta los días 12 y 18 post-infección. En las muestras correspondientes a los *Proechymis*, se observó una parasitemia relativamente baja en comparación con la detectada en las ratas, manteniéndose estos valores a lo largo del curso de la infección, el cual fue ligeramente mayor que el observado en el grupo de ratas.

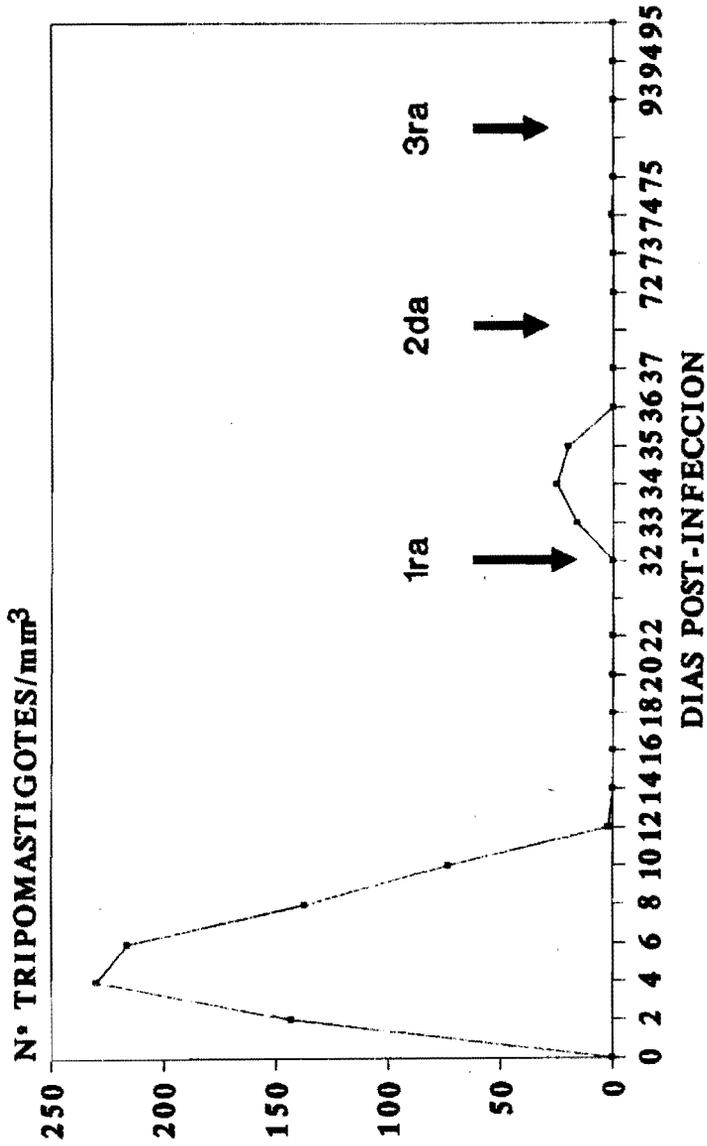
Todos los animales superaron el curso de la infección primaria, no observándose muerte alguna, ni comportamiento distinto a los controles sanos, por un período de 20 días de observación después de la desaparición de la parasitemia.

Observaciones diarias llevadas a cabo en muestras de sangre de cada uno de los animales que habían sido expuestos a las reinfecciones, revelaron un escaso número de parásitos circulantes durante los 3 primeros días siguientes a la primera reinfección. La búsqueda de parásitos en sangre después de las dos reinfecciones siguientes, resultó infructuosa.

Los niveles de parasitemia promedio estimadas durante el curso de la infección primaria y sucesivas reinfecciones en los dos lotes de ratas y en los ejemplares de *Proechymis* sp., se detallan en las Figs. 1-3.

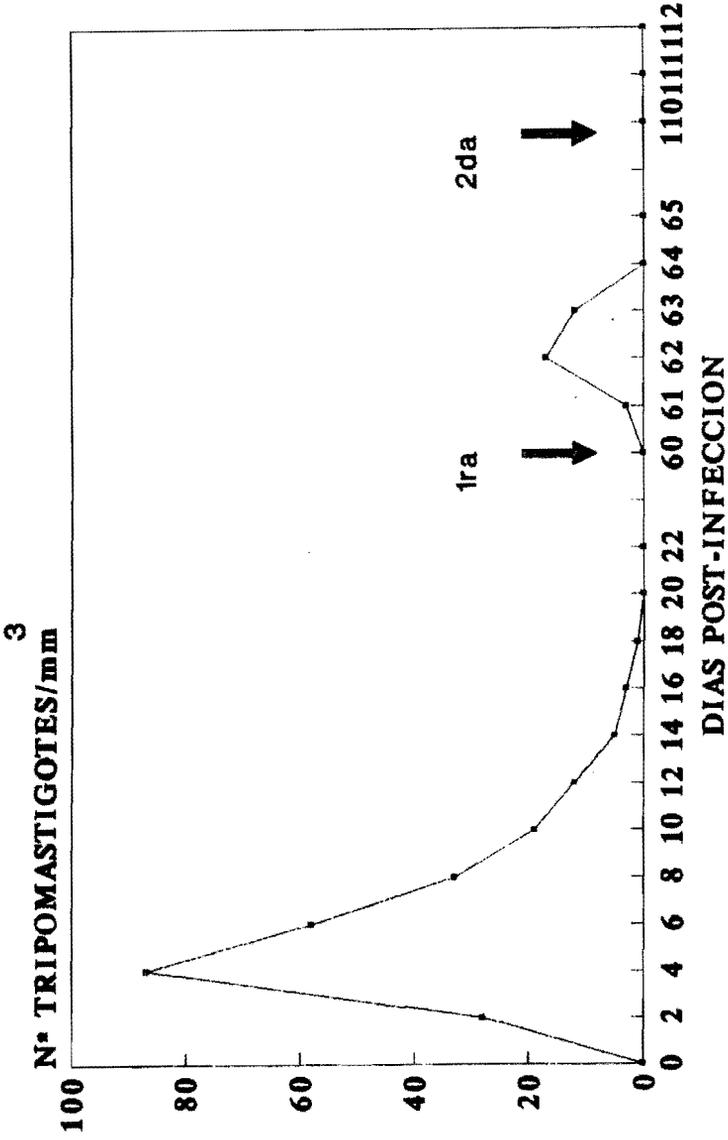
Aunque en niveles relativamente bajos, en todos los casos se detectaron anticuerpos circulantes anti *T. rangeli*. En la Tabla I, se muestran los títulos promedios detectados en los diferentes lotes de los modelos animales utilizados a diferentes períodos de la primo-infección y sucesivas reinfecciones.

**Fig.1. CURSO DE LA INFECCION Y RESPUESTA  
A LAS REINFECCIONES POR *Trypanosoma  
rangeli* EN RATAS "WISTAR" JUVENILES\***



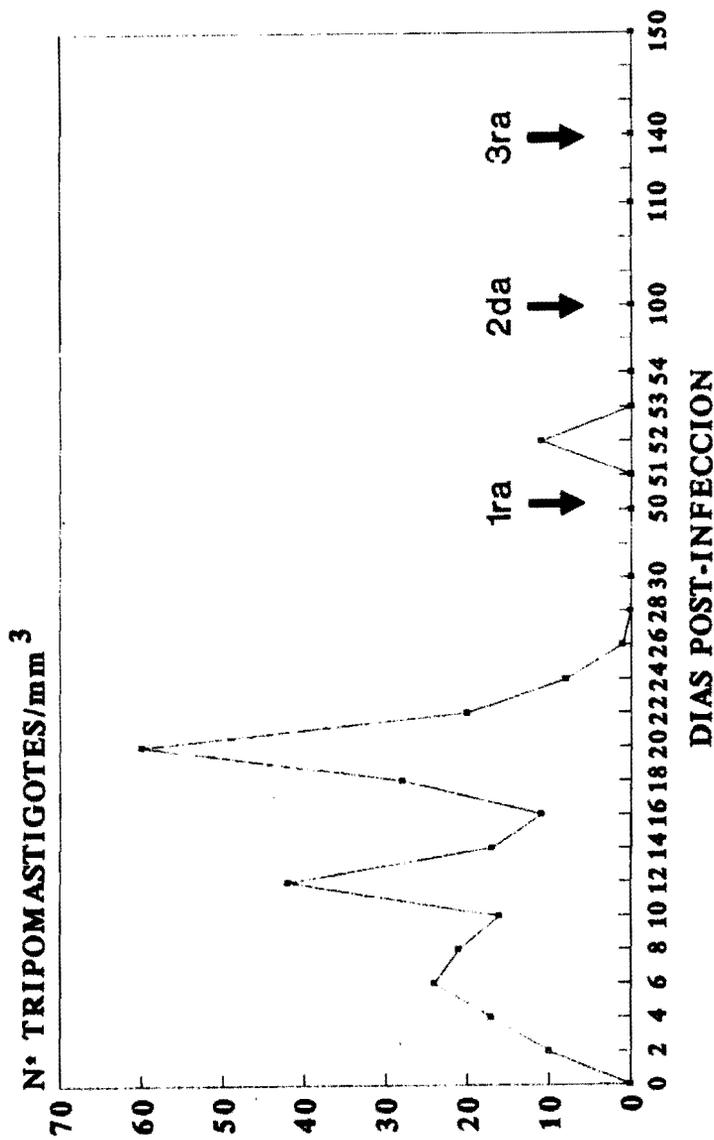
\*: FLECHAS INDICAN FECHAS REINFECCIONES

**Fig.2.CURSO DE LA INFECCION Y RESPUESTA  
A LAS REINFECCIONES POR *Trypanosoma  
rangeli* EN RATAS "WISTAR" ADULTAS \***



\*:FLECHAS INDICAN FECHAS REINFECCIONES

**Fig.3. CURSO DE LA INFECCION Y RESPUESTA  
A LAS REINFECCIONES POR *Trypanosoma  
rangeli* EN *Proechymis* sp.\***



\*:FLECHAS INDICAN FECHAS REINFECCIONES

TABLA I.- TITULOS DE ANTICUERPOS PROMEDIO DETECTADOS DURANTE EL CURSO DE LA INFECCION PRIMARIA Y SUCESIVAS REINFECCIONES POR *Trypanosoma rangeli* EN DOS MAMIFEROS\*

MODELOS VERTEBRADOS	INFECCION PRIMARIA: DIAS DE OBSERVACION			DIAS DE OBSERVACION DURANTE REINFECCIONES									
				PRIMERA		SEGUNDA		TERCERA					
	10	20	30	10	20	30	10	20	30				
RATAS JUVENILES	32	512	128	512	256	128	128	1024	64	128	256	256	128
RATAS ADULTAS	-	32	16	32	32	64	16	32	32	32	NR	NR	NR
<i>Proechymis sp.</i>	32	32	64	64	128	128	128	128	128	128	64	128	128

\*: - : Negativo

N.R.: No realizado

La comparación estadística entre los niveles de anticuerpos detectados durante la primo-infección y sucesivas reinfecciones, reveló que en *Proechymis* y ratas adultas los títulos observados durante las reinfecciones fueron significativamente mayores que los presentes en la infección primaria ( $P < 0.05$ ), hecho éste no observado en el grupo de ratas juveniles, las cuales presentaron en general niveles similares en cualquier período de la infección. Asimismo, la comparación de títulos presentes durante las reinfecciones no reveló diferencias significativas en ninguno de los modelos utilizados.

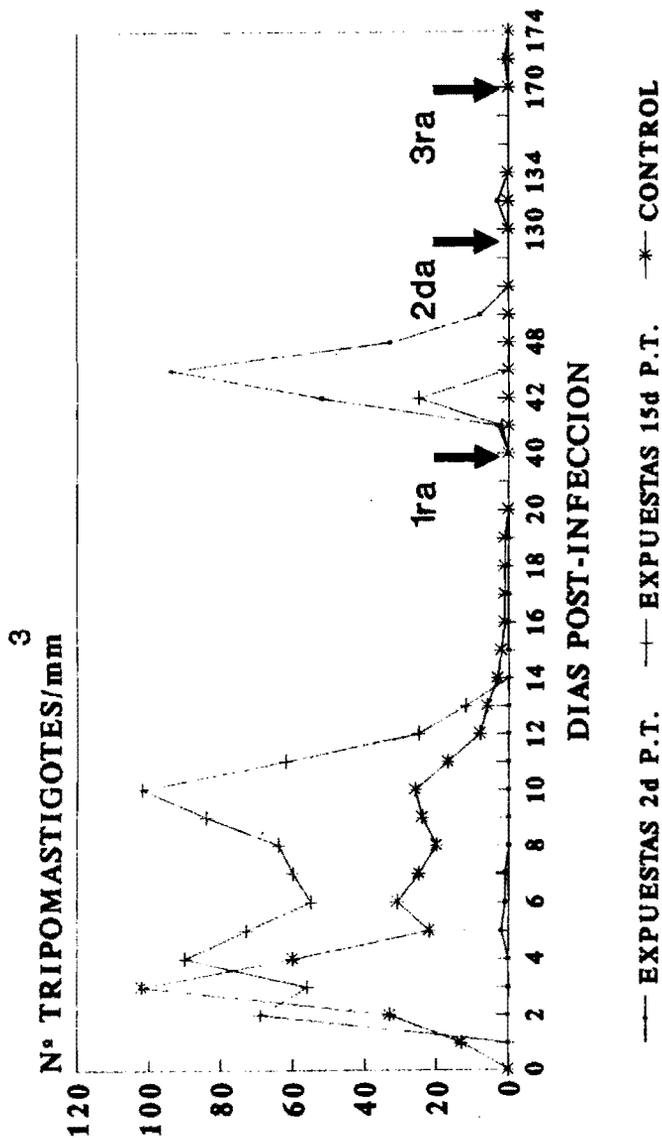
Al comparar estadísticamente los títulos de Ac.-anti *T. rangeli* presentes a los 10, 20 y 30 días después de la infección primaria y las 2 primeras reinfecciones en los 3 modelos vertebrados utilizados, se observó que a los 10 días de la primo-infección no hubo diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, a los 10 días de la primera y segunda reinfecciones los niveles de Ac. en las ratas juveniles fueron significativamente mayores que los detectados en ratas adultas y *Proechymis* ( $P < 0.05$ ), diferencias éstas también observadas a los 20 días de la primo-infección. En ningún caso fueron detectadas diferencias significativas a los 30 días, ni tampoco entre la comparación de los títulos observados durante la tercera reinfección entre ratas juveniles y *Proechymis* en las fechas antes mencionadas.

II. Ensayos de protección pasiva contra *T. rangeli* por transferencia de factores inmunológicos a ratas "Wistar".

La evaluación continua, mediante estimaciones de niveles de parasitemia y títulos de anticuerpos circulantes, de las pruebas de protección pasiva contra *T. rangeli*, llevadas a cabo mediante la transferencia de SII, C.E.S. y la mezcla de ambos, a ratas "Wistar" expuestas a la infección por *T. rangeli* a los 2 y 15 días post-transferencia, reveló que, aparte del corto período de protección observado en el lote de ratas, expuestas 48 horas post-transferencia de la mezcla suero inmune-células esplénicas, ningún otro esquema metodológico logró mostrar protección contra *T. rangeli*.

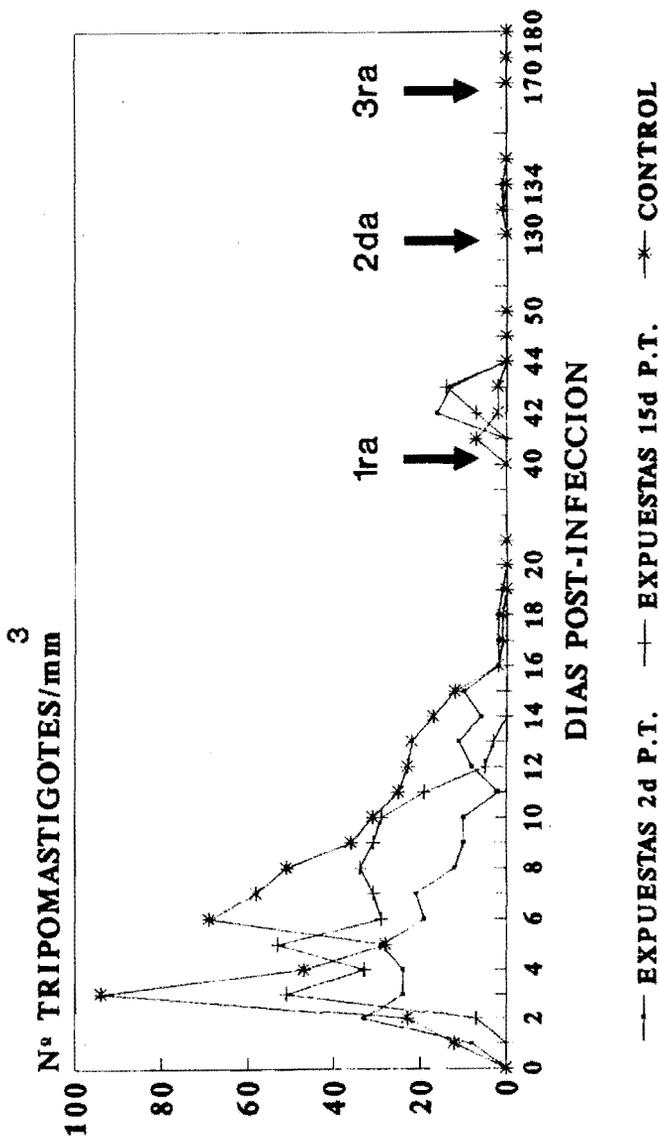
Los resultados de las parasitemias estimadas durante la infección primaria y las 3 sucesivas reinfecciones en lotes de ratas a las cuales les fueron transferidas SII, CES y la mezcla de ambos factores inmunológicos, se muestra en las Figs. 4, 5 y 6, respectivamente. Asimismo, la Tabla II, detalla los títulos de anticuerpos anti *T. rangeli*, detectados a di-

**Fig.4.CURSO DE LA INFECCION Y RESPUESTA  
A LAS REINFECCIONES POR *Trypanosoma  
rangeli* EN RATAS INYECTADAS CON S.I.I.\***



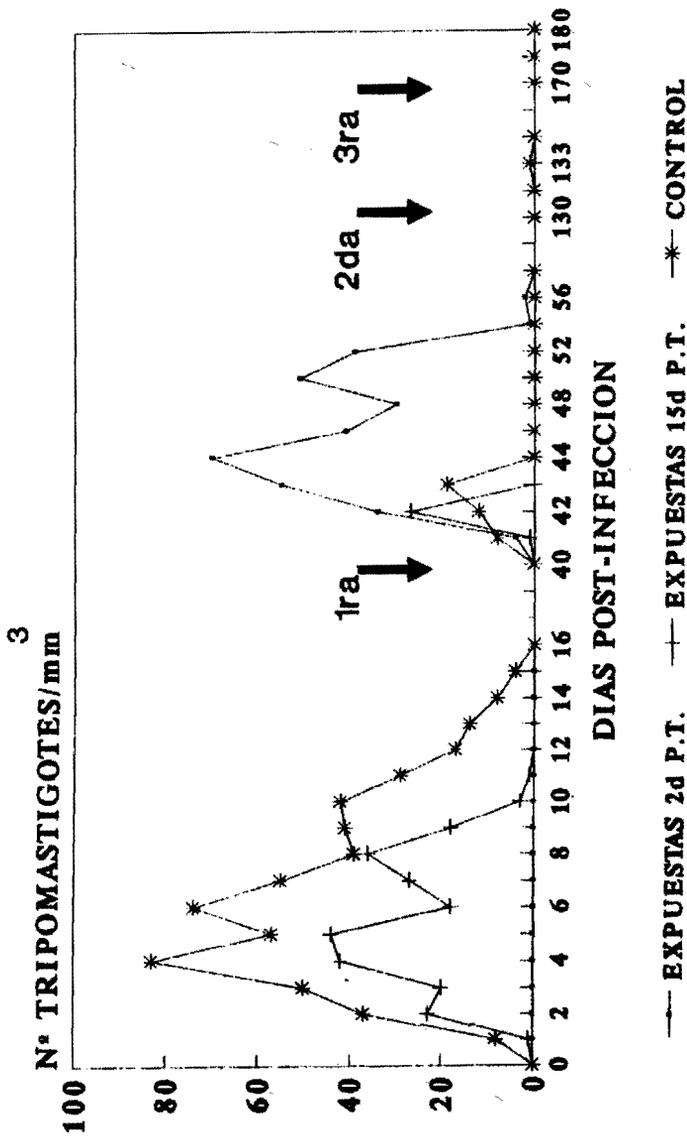
\*:SUERO INMUNE INACTIVADO;d P.T.:DIAS  
POST-TRANSFERENCIA;FLECHA:REINFECCION

**Fig.5. CURSO DE LA INFECCION Y RESPUESTA  
A LAS REINFECCIONES POR *Trypanosoma  
rangeli* EN RATAS INYECTADAS CON C.E.S.\***



\*:CELULAS ESPLENICAS SENSIBILIZADAS  
FLECHAS Y d P.T.IDEM Fig.4

**Fig.6.CURSO DE LA INFECCION Y RESPUESTA  
A LAS REINFECCIONES POR *Trypanosoma  
rangeli* EN RATAS INYECTADAS CON SI Y CES**



SI, CES, d P.T. Y FLECHAS IDEM Figs. 4 Y 5.

**TABLA II.- TITULOS DE ANTICUERPOS EN RATAS "WISTAR" EXPUESTAS A LA INFECCION POR  
*Trypanosoma rangeli* 2 Y 15 DIAS POST-TRANSFERENCIA DE LOS FACTORES  
SUERO INMUNE INACTIVADO Y CELULAS ESPLENICAS SENSIBILIZADAS**

RATAS EXPUESTAS DIAS POST- TRANSFERENCIA	AC. DURANTE PRIMO INFECCION		AC. DURANTE REINFECCIONES:						FACTOR TRANSFERIDO		
			PRIMERA		SEGUNDA		TERCERA				
	DIAS	DIAS	DIAS	DIAS	DIAS	DIAS	DIAS	DIAS			
2	-	-	32	16	-	64	64	32	32	32	CELULAS
15	-	16	16	16	-	64	32	-	64	128	ESPLENICAS
CONTROL	-	32	64	128	64	256	64	64	128	128	SENSIBILIZADAS (CES)
2	-	16	128	256	32	64	128	64	128	128	SUERO
15	-	16	-	16	16	32	128	16	32	128	INMUNE
CONTROL	-	32	32	64	64	128	128	64	128	256	INACTIVADO (SII)
2	-	-	-	16	64	16	16	64	64	64	64
15	-	16	128	128	32	128	128	128	128	64	16
CONTROL	-	16	64	128	64	128	64	64	256	128	CES + SII

ferentes períodos y curso de la infección en ratas inyectadas con SII y CES. En la misma se observan títulos relativamente bajos aunque constantes, los cuales oscilan entre 1/16 y 1/256. La comparación estadística entre los niveles de anticuerpos detectados entre los animales experimentales y los controles no reveló diferencias significativas.

## DISCUSION

En el presente estudio queda demostrado que cuando ejemplares de ratas "Wistar" y *Proechymis* sp. son expuestos a la picadura de especímenes de *R. prolixus* infectados con *T. rangeli* en las glándulas salivares, se desarrolla una primo-infección caracterizada por presentar un bajo número de parásitos circulantes durante un período relativamente corto, que oscila entre los 12 y 18 días en ratas y 26 días en *Proechymis*. Asimismo, se constata que los animales que han superado la infección primaria al ser expuestos sucesivamente a nuevas infecciones, muestran invariablemente escasos parásitos circulantes durante los 3 primeros días de la primera re-infección, adquiriendo una estable resistencia después de la segunda re-infección, evidenciada por una ausencia de parásitos en el torrente sanguíneo y la detección de títulos de anticuerpos circulantes.

Estos hallazgos corroboran las observaciones de Añez et al.<sup>2</sup> en los modelos ratón y *Didelphis* sp. bajo las mismas condiciones experimentales, permitiendo especular que *T. rangeli* es un parásito que pudiera desencadenar una respuesta similar en el hospedador mamífero, independientemente de su posición en la escala zoológica.

Nuestras observaciones pudieran explicarse con los mismos argumentos empleados por Añez et al.<sup>2</sup> quienes sostienen que la razón de la escasa parasitemia observada durante la primera reinfección del vertebrado y los resultados negativos detectados en sucesivas reinfecciones, podría interpretarse como el producto de la acción sinérgica de una respuesta celular en el sitio de la infección contra los metacíclicos infectantes depositados por el vector<sup>10</sup> y la posible acción de anticuerpos contra las formas sanguíneas del parásito, a juzgar por la permanencia de títulos de anticuerpos detectados, los cuales aunque bajos ejercen una acción contra el parásito.

La interpretación epidemiológica de estos resultados parece apoyar las observaciones de Scorza (comunicación personal) quien afirma que en poblaciones humanas que habitan en regiones endémicas para esta tripanosomiasis, del centro y occidente de Venezuela, la patencia de *T. rangeli* se observa primordialmente en niños de hasta 10 años, aun cuando se detectan títulos de anticuerpos circulantes en el resto de los grupos etarios.

Por otra parte, las observaciones anteriormente detalladas parecieran reafirmar los señalamientos de Herbig-Sandreuter<sup>1 1</sup>; Añez<sup>1 2</sup> y Hubsch et al.<sup>1 3</sup>; quienes sostienen que *T. rangeli* es un parásito que no tiene etapa proliferativa alguna en el hospedador vertebrado, argumento, entre otros, utilizado por Añez<sup>1 2</sup> como fuerte evidencia para reubicar taxonómicamente a este parásito en el subgénero *Tejeraia*.

Como era de esperarse, dada la condición heterocigota de los animales experimentales, los ensayos de protección pasiva por transferencia de factores inmunológicos a ratas "Wistar" expuestas a la infección por *T. rangeli* a los 2 y 15 días post-transferencia, demostraron que en ningún caso la inyección intravenosa de 0,6 ml de suero inmune ni la inyección intraperitoneal de  $10^8$  células esplénicas provenientes de ratas activamente protegidas contra *T. rangeli*, confirieron protección a los animales receptores de los factores cuando se expusieron a la picadura infectante de *R. prolixus*. Esta afirmación se hace, basados en la observación del curso de la parasitemia en ambos lotes de animales receptores, la cual presentó valores similares a los observados en las ratas controles que recibieron factores de ratas sanas y/o a aquellos animales expuestos a una infección primaria por *T. rangeli*.

En el caso de los animales que recibieron simultáneamente ambos factores, sólo aquéllos expuestos a la infección por *T. rangeli* a los 2 días post-transferencia mostraron una protección, evidenciada por la ausencia de parásitos circulantes durante los 30 días de observación. Sin embargo, el lote de ratas expuestas a la infección a los 15 días post-transferencia, se comportó de manera similar a la descrita para los animales controles. (Fig. 6). A pesar de la protección observada en el lote de ratas expuestas a la infección por *T. rangeli* 2 días después de la transferencia, se puede afirmar que la misma es de naturaleza pasiva y de muy corta duración, a juzgar por la no detección de títulos de anticuerpos a los 10 días y por el resultado obtenido en aquéllas que ha-

biendo recibido los mismos factores se infectaron al ser expuestas a los 15 días post-transferencia. Este hecho parece reforzarse al observar las respuestas a las reinfecciones en el grupo de ratas aparentemente protegidas a la primera exposición a *T. rangeli*, detectándose durante la primera reinfección parasitemias similares a las observadas durante el curso de la infección primaria de animales normales.

Varias podrían ser las causas a especularse para explicar la efímera protección contra *T. rangeli* observada en la rata "Wistar": i. La capacidad que pudiera tener este modelo animal para catabolizar rápidamente los anticuerpos séricos inoculados, fenómeno previamente observado en ratas "Fisher" receptoras de suero inmune anti-*T. cruzi*,<sup>14</sup> ii. La falta de desarrollo de memoria inmunológica como consecuencia de la transferencia de estos factores, lo cual se evidencia por la ausencia de títulos de anticuerpos circulantes en las ratas problemas y desarrollo de una parasitemia durante la primera reinfección. iii. La insuficiencia de la dosis de los factores recibidos para producir una respuesta adecuada, y iv. La condición heterocigota de los animales experimentales. Esto plantea, a su vez, la posibilidad de que aumentando las cantidades de los factores de transferencia y utilizando modelos homocigotos la protección pudiera ser de más larga duración.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración del Dr. J. Péfaur por la donación de los ejemplares jóvenes de *Proechymis* sp., Dr. V. Márquez por el asesoramiento en el tratamiento estadístico, Lic. M. Castro y Sra. Maritza Rondón por su ayuda técnica y la Srta. Irlanda Márquez por tipiar el manuscrito.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- D'ALESSANDRO, A. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. In: Biology of the Kinetoplastida, Lumsden, W.H.R. & Evans, D.A. ed. Academic Press, London, New York, 1:328-393, 1976.
- 2.- AÑEZ, N. VELANDIA, J. & RODRIGUEZ, A.M. Estudios sobre *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VIII. Respuesta a las reinfecciones en dos mamíferos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 80:149-153, 1985.
- 3.- AÑEZ, N., NIEVES, E. & CAZORLA, D. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IX. Course of infection in different stages of *Rhodnius prolixus*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 82:1-6, 1987.
- 4.- AÑEZ, N. Detection of *Trypanosoma rangeli* by salivation of infected *Rhodnius prolixus* on glass slides. Ann. Trop. Med. & Parasitol. 74:561-562, 1980.
- 5.- PIZZI, T. La inmunología de la Enfermedad de Chagas. Tesis Univ. Chile. Santiago, 1957.
- 6.- BRENER, Z. Contribuição ao estudo da terapeutica experimental da doença de Chagas. Thesis Fac. Farmacia Univ. Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 1961.
- 7.- LUMSDEN, W.H.R., HERBERT, W.J. & McNEILLAGE, G.J.C. Techniques with Trypanosomes. Ed. Churchill, Livingstone. Edinburgh. London, 1973.
- 8.- O.M.S. Chagas disease serology specification and evaluation methods for immunological reagents. Health Technology Development Program. Tropical Disease Program, 1984.
- 9.- MARQUEZ, V. Análisis de varianza en Microcomputadores. (Sistema computacional para métodos estadísticos). Mimeografiado 86-01, 248 pp. Universidad de Los Andes, Facultad de Economía, Instituto de Estadística Aplicada y Computación, Mérida, Venezuela, 1986.
10. AÑEZ, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. I. Deposition, migration and growth of *T. rangeli* in two mammals. Parasitological Tropics, Sp. Public. No. 1:19-25. Soc. Protozool. Allen Press. Kansas, 1981.
- 11.- HERBIG-SANDREUTER, A. Further studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. Acta Tropica, 14:193-207, 1957.

12.- AÑEZ, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IV. A reconsideration of its systematic position. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 77:405-415, 1982.

13.- HUBSCH, R., CHIECHIE, N., LIENDO, H. & MAURY, J. Estudio de la parasitemia y búsqueda de *Trypanosoma (H) rangeli* en los tejidos de ratones infectados. Bol. Dir. Malariol. & San. Amb. 25:100-107, 1985.

14.- RODRIGUEZ de ROJAS, A.M. Contribution a l'étude de la reponse immune a *Trypanosoma cruzi* chez le rat "Fischer". These, Univ. des Sciences et Techniques Lille, 138 pp. 1981.