



Efecto de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* C1 atenuados por temperatura a la infección experimental en *Mus musculus* BALB/c con formas infectivas del parásito

Effect of *Trypanosoma cruzi* C1 tripomastigotes attenuated by temperature to experimental infection in *Mus musculus* BALB/c with infective forms of the parasite

Yolanda Vértiz Vereau y Hermes Escalante Añorga

¹Tesista, Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú.

²Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT.

RESUMEN

La investigación estuvo orientada a determinar el efecto de los tripomastigotes atenuados por calor de *T. cruzi* a la infección experimental en *Mus musculus* BALB/c con la forma infectiva del parásito; para lo cual, se utilizaron tripomastigotes de *T. cruzi* cepa C1 y ejemplares de *Mus musculus* BALB/c “ratón”. Los tripomastigotes se obtuvieron en Medio Grace a partir de epimastigotes mantenidos en un cultivo axénico en medio bifásico (BHI + 10% de sangre / PYLB), los que fueron atenuados por shock térmico a temperaturas de 37; 37,5; 38; 38,5 y 39°C con tiempos de exposición de 30, 60, 90 y 120 segundos y posteriormente inoculados a 20 ejemplares de *Mus musculus* BALB/c. A los 30 días de la inoculación, se evidenció la presencia del parásito en tres ratones del grupo experimental y en los 17 ratones restantes la ausencia del parásito. Verificada la efectividad de la atenuación, estos parásitos fueron inoculados a 68 ratones del grupo experimental (4 ratones/17 casos positivos) con una dosis de 10⁶ parásitos/0.2 mL al 0, 7, 21 día; mientras que al grupo control comprendido por cuatro ratones sólo se suministró una dosis de 0.2 mL de Medio Grace. Después de los 30 días de inoculación con la forma infectiva del parásito, una semana posterior a la última inmunización, se obtuvo un 96% de supervivencia en los ratones del grupo experimental y 25% de supervivencia en los ratones del grupo control; con lo cual se comprobó que los parásitos atenuados a temperaturas de 37; 37,5; 38; 38,5 y 39°C generan un efecto protector en *Mus musculus* BALB/c.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, tripomastigotes, epimastigotes, cultivo axénico.

ABSTRACT

The research was aimed at determining the effect of the tripomastigotes attenuated by heat of *T. cruzi* to the experimental infection in *Mus musculus* BALB/c with the ineffective form of the parasite, in which case, they were used tripomastigotes of *T. cruzi* strain C1 and specimens of *Mus musculus* BALB/c “mouse”. The tripomastigotes were obtained in Medium Grace from epimastigotes kept in an axenic culture of a biphasic environment (BHI+10% of blood / PYLB), which were attenuated by thermal shock at temperatures of 37; 37.5; 38; 38.5; 39 °C with exposure time of 30, 60, 90 and 120 seconds and subsequently inoculated to 20 specimens of *Mus musculus* BALB/c. After 30 days of inoculation, the presence of the parasite was evident in the 3 mice from the experimental group and in the remaining 17 mice the absence of the parasite. Verified the effectiveness of the attenuation, these parasite were inoculated to 68 mice from the experimental group (4 mice / 17 positive cases) with a dose of 10⁶ parasites/0.2 mL at 0, 7, 21 day; whereas the control group comprised of 4 mice only one dose was supplied of 0.2 mL from Medium Grace. After 30 day of inoculation with the ineffective form of the parasite, a week later to the last immunization, it was obtained 96% survival in the mice from the experimental group and 25% survival in the mice from the control group; whereupon it was proved that the attenuated parasites by temperatures of 37; 37.5; 38; 38.5; 39 °C generate a protective effect in *Mus musculus* BALB/c.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, tripomastigotes, epimastigotes, axenic culture.

INTRODUCCIÓN

Causada por *Trypanosoma cruzi* y transmitida por insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae, la enfermedad de Chagas constituye un serio problema de salud pública porque aproximadamente ocho millones de personas están infectadas, de las cuales, entre 23 y 43 mil personas mueren al año y otras 100 millones están en riesgo de contraer la infección^{1,2}. En el Perú, la zona costera sur (Ica, Arequipa, Moquegua, Tacna) son las zonas donde se han presentado la mayoría de casos de enfermedad de Chagas, siendo *Triatoma infestans* el vector y *Cavia porcellus* "cobayo" el principal reservorio^{3,4}.

La enfermedad de Chagas presenta una fase aguda con síntomas no específicos, seguida de una fase indeterminada que puede durar hasta 10 años y una fase crónica progresiva con patología severa del corazón y/o tracto digestivo^{1,4,5}. En la fase aguda se aprecia activación de sistema inmune, con presencia de citoquinemia, intensa activación de linfocitos T y B, linfadenopatía, esplenomegalia y un intenso proceso inflamatorio difuso o local asociado a la miocitólisis inducida por el parásito. En la fase indeterminada aparecen los IgG específicas y hay ausencia de signos, síntomas y de anomalías del electrocardiograma y el corazón, esófago y colon presentan tamaño normal. En la fase crónica se presenta una reacción inflamatoria fibrótica que daña el músculo cardíaco y la red de conducción y el sistema nervioso entérico^{2,4,5}.

La variabilidad de susceptibilidad del hospedador a *T. cruzi* depende de factores ligados tanto al parásito como al hospedador^{6,7,8}. Una misma línea isogénica de ratón presenta diferentes grados de susceptibilidad a la infección causada por diferentes cepas de *T. cruzi*^{9,10,11}, lo que demuestra que el curso de la infección depende de las características intrínsecas del parásito¹².

En la actualidad, la principal medida de control es el tratamiento con insecticidas de las viviendas y peridomicilios donde habita el insecto vector, metodología especialmente eficiente cuando la propia comunidad participa en la vigilancia epidemiológica¹². Sin embargo, la continua recolonización de las viviendas hace necesario ampliar el marco del control de la transmisión abriendo el desafío del desarrollo de extrategias confluyentes de control y prevención, tales como el desarrollo de una vacuna de agentes terapéuticos efectivos. Una vacuna, ya sea preventiva o terapéutica, contribuiría en gran medida al control de la enfermedad de Chagas mediante la reducción de la infecciosidad del principal reservorio interno del parásito, así como mejorar la atención de los animales que cada vez más se ha detectado como infectados por *T. cruzi*^{13,14}.

Una amplia gama de formulaciones de vacunas han sido evaluadas a lo largo de los años, que van desde los parásitos enteros a purificados o proteínas recombinantes, vectores virales y vacunas de ADN. Intentos iniciales de utilizar parásitos muertos de *T. cruzi* produjeron modestos resultados de protección contra la infección^{15,16}, posiblemente debido a una inmunogenicidad más bien baja. Por otra parte, parásitos vivos atenuados son mucho más inmunógenos y los primeros estudios indican que son capaces de conferir protección significativa contra la infección^{16,17,18}. Del mismo modo, la inmunización con *T. rangeli* en vivo, una relacionada especie de parásito no patógeno en seres humanos, también puede proporcionar cierta inmunidad cruzada reactiva y una protección parcial, posiblemente debido a antígenos homólogos^{19,20}.

Estos enfoques plantean los problemas comúnmente asociados con las vacunas vivas, es decir, la seguridad y los retos asociados con su producción a gran escala y distribución. No obstante, existe un renovado interés en un vivo enfoque de vacuna atenuada y estudios recientes han descrito la generación de mutantes de *T. cruzi* por genes específicos, que puede proporcionar una buena protección contra la infección en los ratones, incluso a través de la administración oral [33-35]. Por tanto, es de gran interés que las formulaciones de vacunas puedan utilizarse tanto para la prevención de la enfermedad de Chagas, así como para la terapia de una infección en curso, siendo esta una herramienta muy flexible para el control de la enfermedad^{21,22,23}. Desde muy diversas perspectivas se ha intentado inducir una respuesta inmune protectora contra *Trypanosoma cruzi*. Ensayos con parásitos vivos atenuados o no proliferativos, muertos intactos u homogeinizados, fracciones subcelulares y macromoléculas purificadas, han demostrado, en el mejor de los casos, protección expresada como mayor sobrevida y menor parasitemia²⁷.

En este artículo se presentan los resultados de una investigación orientada a inducir un efecto protector en ejemplares de *Mus musculus* BALB/c, utilizando tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*

cepa C1 obtenidos en medio Grace y atenuados a temperaturas de 37; 37,5; 38; 38,5 y 39°C con tiempos de exposición de 30, 60, 90 y 120 segundos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

- Cultivo de *T. cruzi* cepa C1 en su forma epimastigote donado por el Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Nacional de San Marcos (Lima, Perú)
- 72 ejemplares machos de *Mus musculus* BALB/c “ratón” de cuatro semanas de edad, adquiridos del Bioterio del Instituto Nacional de Salud (Lima, Perú).

Propagación de la forma epimastigote de *T. cruzi* C1.

Las formas epimastigotes de la cepa C1 de *T. cruzi*, fueron cultivadas en tubos estériles de 20x150 mm con tapa rosca. El cultivo estaba compuesto por un medio Bifásico, conformado por Agar BHI (fase sólida) y medio PYLB (fase líquida). Cada tubo contenía ocho mL de fase sólida, debidamente suplementada con 10% de sangre desfibrinada de conejo o humana¹⁸, la cual se agregó cuando el agar se encontraba a una temperatura entre 40 a 50°C, luego se colocó en plano inclinado hasta solidificar. Mientras que la fase líquida a razón de 11 mL por cada tubo, tenía como aditivo necesario 0.01% de Amikacina (500mg/2mL). Seguidamente, se realizó la siembra de los parásitos, extrayendo 1 mL de inóculo procedente del medio líquido del cultivo de la cepa. Según esta descripción, se obtuvo por cada lote de cultivo, 20 tubos y se mantuvo a 22 +/- 2°C (temperatura óptima de crecimiento del epimastigote) durante 15 días^{24,26}.

Obtención de formas tripomastigote de *T. cruzi*.

Después de los 15 días de incubación, se verificó la presencia de los epimastigotes en cada uno de los tubos a través de observación microscópica de una pequeña gota del cultivo. La fase líquida de cada uno de los tubos fueron traspasados a otros tubos limpios de 13x100 mm. Estos tubos fueron centrifugados a 4000 rpm por cinco minutos con la finalidad de obtener en el sedimento los parásitos y eliminar el sobrenadante. Luego fueron lavados tres veces con PBS estéril pH 7.26 conteniendo 0.5% Bencilpenicilina 10⁶UI/5mL y 0.25% Gentamicina 160mg/2mL y centrifugado a 4000 rpm por cinco minutos. Luego se eliminó el sobrenadante y a partir del pellet, se cambió a tubos limpios y estériles en donde se añadió medio Grace (Sigma Aldrich) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino. Los cultivos fueron mantenidos durante seis días a 22 +/- 2°C y a partir de los tres días se evaluó mediante la observación y búsqueda microscópica de parásitos metacíclicos²⁶.

Atenuación de tripomastigotes de *T. cruzi*.

Luego de la transformación de las formas tripomastigotes, se procedió a la atenuación de dicha forma infectiva sometiendo al parásito a baño maría a temperaturas de 37°C ; 37,5°C; 38°C; 38,5°C y 39°C en tiempos de 30, 60, 90 y 120 segundos por cada temperatura.

Evaluación de la efectividad de la atenuación.

Para comprobar la efectividad de la atenuación se inocularon 20 ejemplares de *Mus musculus* BALB/c (un ejemplar por temperatura/ tiempo), con una dosis de 10⁶ tripomastigotes /0.2 mL que fue monitoreado por recuento en cámara de Neubauer. A partir del segundo día de inoculados se empezó a evaluar el estado de los ratones hasta el día 30. Transcurrido este tiempo se tomó muestras de la parte distal de la cola de cada uno de los ratones y se buscó los parásitos por observación microscópica.

Inmunización con tripomastigotes atenuados en *Mus musculus*.

Luego de evaluar y determinar la ausencia del parásito en sangre de los ratones y comprobar la atenuación de los tripomastigotes, el grupo experimental de *M. musculus* BALB/c comprendido por 17 subgrupos con cuatro ratones cada uno, fue inmunizado con una dosis de 10⁶ tripomastigotes atenuados/0,2 mL por la ruta intraperitoneal (IP)^[41], al mismo tiempo el grupo control comprendido por cuatro ratones, cada uno recibió una dosis de 0.2 mL de Medio Grace. Las inmunizaciones, tanto al grupo experimental como control, se realizaron a los días 0, 7 y 21.

Inoculación con formas tripomastigotes de *T. cruzi* C1 en *Mus musculus*.

Siete días después de la última inmunización se realizó la infección experimental, para lo cual a todos los ratones del grupo control y del grupo experimental se les administró vía intraperitoneal una dosis de 10⁵ tripomastigotes/ 0.2 mL de *T. cruzi* cepa C1 obtenidos de medio Grace y que no fueron atenuados. Después de 30 días de la administración del parásito, se evaluó la supervivencia de los ejemplares y se comprobó la eficacia de la protección.

RESULTADOS

Se encontró que la dosis de 10^5 tripomastigotes metacíclicos, después de un mes, en su mayoría originó un efecto inmunoprotector en los ejemplares experimentales, obteniéndose un 96% de supervivencia (65 de 68) en los ratones inmunizados (grupo experimental). La tasa de supervivencia de los ejemplares inmunizados en comparación al grupo control es notablemente superior, debido al reporte de sobrevivencia del 25% (1 de 4) en los ratones no inmunizados (grupo control). (Tabla 1)

En la Tabla 2 se registró un 100 % de supervivencia(4/4) en 14 casos de ratones experimentales inmunizados con parásitos atenuados a temperaturas comprendidas entre 37°C/120"; 37,5°C/30" a 90"; 38°C/ 30" a 120"; 38,5°C/ 30" a 90"; así como 39 °C/ 30" a 90"; mientras que los parásitos atenuados a 37,5°C/ 120"; 38,5°C/ 120" y 39°C/ 120" sólo lograron un 75% de supervivencia (3/4) al día 30 en los ejemplares experimentales de *Mus musculus*.

Tabla 1. Porcentaje de supervivencia de los ejemplares del grupo control y experimental de *Mus musculus* cepa BALB/c a la infección con tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* cepa C1.

Grupo	N° total de Ejemplares	N° de supervivientes al 30 día/total (%)	
Experimental	68	65/68	96%
Control	4	1/4	25%

p < 0.05

DISCUSIÓN

El conocimiento sobre la fisiopatología de la infección de *T. cruzi* en animales de experimentación ha constituido un avance importante en el estudio de la Enfermedad de Chagas²², ya que los modelos experimentales controlados permiten analizar diferentes parámetros dependientes tanto del hospedador como del parásito, lo que por razones prácticas y éticas no pueden realizarse en humanos.

Con el objeto de estudiar la respuesta inmunológica producida por la inmunización y la inmunoprotección ante el desafío con formas infectantes del parásito; por los resultados obtenidos, se pone de manifiesto que la supervivencia en la mayoría de los casos, fue del 100 % en los grupos inmunizados con tripomastigotes atenuados y del 25 % en el control sin inmunizar. De tal modo, se podría aludir que la inmunización redujo significativamente la parasitemia y mortalidad post-desafío con la forma infectante del parásito.

En la Tabla 1. se observa que 65 de 68 ejemplares del grupo experimental representan un 96% de supervivencia acumulada a los 30 días post infección, mientras que 1 de 4 ratones del grupo control sobrevivió a dicha infección, lo que equivale a una supervivencia significativamente más baja del 25% en el mismo período (aún cuando en las primeras tres semanas, el ejemplar mostró decaimiento y el pelo erizado como expresión de un síndrome de enfermedad) ; lo que demostraría que dicho evento conllevó a una protección en los animales experimentales por la efectividad del tratamiento térmico al que fueron sometidos los tripomastigotes de *T. cruzi*. Sin embargo, se sugiere evaluar mayor número de ratones como controles para lograr un resultado más significativo.

Tabla 2. Número de casos y porcentaje de supervivencia de los ejemplares del grupo experimental de *Mus musculus* inmunizados con tripomastigotes atenuados a diferentes temperaturas y tiempos a la post-infección con tripomastigotes de *T. cruzi* cepa C1.

Grupo experimental			
Temperatura de atenuación (°C)	Tiempo de exposición (segundos)	Supervivencia	
		Casos de ratones vivos al 30 día	Porcentaje (%)
37	120	4/4	100
37,5	30	4/4	100
37,5	60	4/4	100
37,5	90	4/4	100
37,5	120	3/4	75
38	30	4/4	100
38	60	4/4	100
38	90	4/4	100
38	120	4/4	100
38,5	30	4/4	100
38,5	60	4/4	100
38,5	90	4/4	100
38,5	120	3/4	75
39	30	4/4	100
39	60	4/4	100
39	90	4/4	100
39	120	3/4	75

Como todos los ratones fueron infectados con el mismo número de parásitos, se utilizó la muerte o supervivencia como criterio para determinar la inmunoprotección y resistencia de cada grupo de ratones a la infección con 10^5 tripomastigotes metacíclicos. En la Tabla 2 se muestra que el grupo de ratones experimentales, de 4 semanas de edad, presentó un 100% de supervivencia en 14 de 17 casos a los 30 días p.i. mientras los 3 casos restantes, presentaron un 75% de supervivencia en el mismo período. Al día 21 se observó mortalidad 1 de 4 en los ratones inmunizados con tripomastigotes sometidos a 37,5°C por 120 segundos, mientras que 1 de 4 ratones a 38,5 y 39 ° C por 120 segundos presentaron una mortalidad al día 28. Aunque, en los primeros diez días post-infección los ejemplares muertos no presentaron cuadro alguno de parasitemia, lo que si se dejó ver a los 18-20 días (pese a encontrarse bajo las mismas condiciones que el resto de individuos), se presume que dicho evento sucede debido a que no todos los ratones presentaron el mismo cuadro de resistencia y/o su sistema inmunológico fue deficiente, favoreciendo la capacidad infectiva del parásito. Este suceso parece apoyar la sugerencia que la persistencia del parásito es una de las principales causas de la Enfermedad de Chagas^{26,28}.

Desde luego, uno de los aspectos más sorprendentes de la enfermedad es la compleja red de eventos que parece acompañar, tanto el desarrollo de una respuesta inmune protectora como el desarrollo de una respuesta autoinmune que progresa en el transcurso de la infección y/o de la enfermedad. En otras palabras, el elevado porcentaje de supervivencia en los ratones BALB/c, puede explicarse por el temprano desarrollo de una respuesta inmune que logra controlar la infección, pero que secundariamente conduce al desarrollo de hipersensibilidad y luego a un cuadro de autoinmunidad como consecuencia de la autoprotección del hospedero. De esta forma, la obtención de vacunas contra

T. cruzi, es un verdadero desafío, porque podría ser un paso importante en la prevención de la Enfermedad de Chagas en humanos.

CONCLUSIÓN

- Los tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* cepa C1 atenuados a temperaturas con tiempos de exposición de 37°C/120"; 37,5°C/30" a 90"; 38°C/ 30" a 120"; 38,5°C/ 30" a 90"; así como 39 °C/ 30" a 90", lograron generar protección al infectar ejemplares de *Mus musculus* BALB/c encontrando un porcentaje elevado de supervivencia del grupo experimental en relación al grupo control.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rodriguez Coura J, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review: Act Tropica 2010; 115: 5-13
2. Lescure F-X, Le Loup G, Freilij H, Develoux M. Chagas disease: changes in knowledge and management. Lancet Infect Dis 2010; 10: 556-570
3. Hunter Gc, Borrini-Mayori K, Ancca Juarez J, Castillo Neyra R, et la. A field trial of alternative target screening strategies for Chagas disease in Arequipa, Perú. PLoS Neg Trop Dis 2012; 6(1): e1468
4. Vega S, Náquira C. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la Tripanosomiasis americana (Enfermedad De Chagas). 2da ed. Serie de Normas Técnicas N° 26. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional De Salud; 2006.
5. De Lima AR, Arévalo P, Bastidas V, Bolívar V, Navarro MC, Contreras VT. Efecto de las condiciones de mantenimiento de *Trypanosoma cruzi* sobre la calidad de los antígenos para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. Revista de la facultad de ciencias de la salud 2007; 11:20-26.
6. Garg N, Bhatia V. Current status and future prospects for a vaccine against American trypanosomiasis. Expert Rev Vaccines 2005; 4:867-80.
7. Cazorla SI, Frank FM, Malchiodi EL. Vaccination approaches against *Trypanosoma cruzi* infection. Expert Rev Vaccines 2009; 8:921-35.
8. Dumonteil E. Vaccine development against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* species in the post-genomic era. Infect Genet Evol 2009; 9:1075-82.
9. Kjos SA, Snowden KF, Craig TM, Lewis B, Ronald N, Olson JK. Distribution and characterization of canine Chagas disease in Texas. Vet Parasitol 2008; 152:249-56.
10. Garg N, Bhatia V. Current status and future prospects for a vaccine against American trypanosomiasis. Expert Rev Vaccines 2005; 4:867-80.
11. Basombrio MA. *Trypanosoma cruzi*: partial prevention of the natural infection of guinea pigs with a killed parasite vaccine. Exp Parasitol 1990; 71:1-8.
12. Wrightsman RA, Miller MJ, Saborio JL, Manning JE. Pure paraflagellar rod protein protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. Infect Immun 1995; 63:122-5.
13. Miller MJ, Wrightsman RA, Manning JE. *Trypanosoma cruzi*: protective immunity in mice immunized with paraflagellar rod proteins is associated with a T-helper type 1 response. Exp Parasitol 1996; 84:156-166.
14. Frank FM, Petray PB, Cazorla SI, Munoz MC, Corral RS, Malchiodi EL. Use of a purified *Trypanosoma cruzi* antigen and CpG oligodeoxynucleotides for immunoprotection against a lethal challenge with trypomastigotes. Vaccine 2003; 22:77-86.
15. Dumonteil E (2007) DNA Vaccines against Protozoan Parasites: Advances and Challenges. J Biomed Biotechnol 2007: 90520.
16. Zuñiga C, Palau T, Penin P, Gamallo C, de Diego JA. Protective effect of *Trypanosoma rangeli* against infections with a highly virulent strain of *Trypanosoma cruzi*. Trop Med Int Health 1997; 2:482-7.
17. Basso B, Cervetta L, Moretti E, Carlier Y, et al. Acute *Trypanosoma cruzi* infection: IL-12, IL-18, TNF, sTNFR and NO in *T. rangeli*-vaccinated mice. Vaccine 2004; 22:1868-72.
18. Basso B, Moretti E, Fretes R. Vaccination with epimastigotes of different strains of *Trypanosoma rangeli* protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. Mem Inst Oswaldo Cruz 2008; 103:370-4
19. Collins MH, Craft JM, Bustamante JM, Tarleton RL. Oral exposure to *Trypanosoma cruzi* elicits a systemic CD8⁺ T cell response and protection against heterotopic challenge. Infect Immun 2011; 79:3397-406.
20. Zuñiga E, Motran C, Montes CL, Diaz FL, Bocco JL, Gruppi A. *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression: B cells undergo spontaneous apoptosis and lipopolysaccharide (LPS) arrests their proliferation during acute infection. Clin Exp Immunol 2000; 119:507-15.

21. Taibi A, Plumas-Marty B, Guevara-Espinoza A, Schöneck R, Pessoa H, Loyens M, et al. *Trypanosoma cruzi* immunity-induced in mice and rats by trypomastigote excretory-secretory antigens and identification of a peptide sequence containing a T cell epitope with protective activity. *J Immunol* 1993; 151:2676-89.
22. Limon-Flores AY, Cervera-Cetina R, Tzec-Arjona JL, Ek-Macias L, Sánchez-Burgos G, Ramírez-Sierra MJ, et al. Effect of a combination DNA vaccine for the prevention and therapy of *Trypanosoma cruzi* infection in mice: role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Vaccine* 2010; 28:7414-9.
23. Rottenberg ME, Cardoni RL, Moreno M, Segura EL. *Trypanosoma cruzi*: Immune response in mice immunized with parasite antigens. *Exp Parasitol* 1988; 6: 101.
24. De Lima AR, Aparicio A, Berrocal A, Navarro MC, Graterol D, Contreras V. Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* en medio axénico: cambios peptídicos, glicopeptídicos y enzimáticos. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud* 2007; 11(2):39-47.
25. Goicochea MA. Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en las comunidades de Rumiaco y Nuevo Guayaquil, distrito de Callayuc, provincia de Cutervo, departamento de Cajamarca, diciembre 2005 – abril 2006. Tesis de Biólogo Microbiólogo, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2007.
26. Basombrio MA, Besuschio S and Cossio PM. Side effects of immunization with live attenuated *Trypanosoma cruzi* in mice and rabbits. *Infect. Immun* 1982; 36:342-350.
27. Trischamann T, Bloom B. Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 1982; 35: 546-551.
28. Tarleton RI. Parasite persistence in the etiology of Chagas disease. *Int. J. Parasitol* 2001; 31: 550-554.