



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES**

“Determinación de proteínas de fase aguda y marcadores de estrés oxidativo, en perros seropositivos a *Trypanosoma cruzi*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

PRESENTA

M. en C. PILAR ELIANA RIVADENEIRA BARREIRO

COMITÉ DE TUTORES

Tutor Académico: Dr. en C. Roberto Montes de Oca Jiménez

Tutores Adjunto: PhD. Juan Carlos Vázquez Chagoyán

PhD. Silvia Martínez Subiela.

El Cerrillo Piedras Blancas, Estado de México. Abril 2022



ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
	2.1. Enfermedad de Chagas: Situación mundial.....	7
	2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
	2.3 Vectores de la enfermedad de Chagas.....	10
	2.4 Principales reservorios de <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
	2.5 Patogenia y fases de la enfermedad de Chagas.....	12
	2.6 Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas.....	13
	2.7 Formas de transmisión de la enfermedad de Chagas.....	14
	2.7.1 Transmisión a través de vectores.....	14
	2.7.2 Transmisión oral.....	15
	2.7.3 Transmisión por transfusión sanguínea.....	16
	2.7.4 Transmisión por trasplante de órganos.....	17
	2.7.5 Transmisión congénita.....	17
	2.8 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
	2.9. Rutas de invasión de <i>Trypanosoma cruzi</i> y respuesta inmune del hospedador.	18
	2.10 Diagnóstico de la enfermedad de Chagas.....	22
	2.11 Tratamiento de la enfermedad de Chagas.....	23
	2.12 Otras enfermedades transmitidas por vectores.....	24
	2.12.1 Ehrlichiosis.....	25
	2.12.2 Anaplasmosis.....	26

2.12.3	Dirofilariosis	27
2.12.4	Enfermedad de Lyme.....	29
2.12.5	Diagnóstico de ETV	29
2.12	Proteínas de fase aguda.....	31
2.12.1	Proteína C Reactiva	33
2.12.2	Haptoglobina	33
2.12.3	Ferritina	34
2.12.4	Paraoxonasa-1.....	34
2.13	Estudio de las PFA en enfermedades transmitidas por vectores en perros	34
2.14	Marcadores de estrés oxidativo	36
2.14.1	Estudio de marcadores de estrés oxidativos en perros	37
III.	JUSTIFICACIÓN.....	39
IV.	HIPÓTESIS	41
V.	OBJETIVOS.....	42
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
6.1	Área de estudio	43
6.2	Población de estudio.....	44
6.3	Recolección de muestras sanguíneas	44
6.4	Pruebas serológicas para la detección de anticuerpos anti <i>T. cruzi</i>	45
6.5	Detección de otras enfermedades transmitidas por vectores.	46
6.6	Determinación de proteínas de fase aguda	46
6.7	Marcadores de estrés oxidativo	47
6.8	Análisis estadístico	48

VII.	RESULTADOS	49
	7.1 Detección de anticuerpos anti <i>Trypanosoma cruzi</i>	49
	7.2 Detección de otras enfermedades caninas transmitidas por vectores	49
	7.3 Evaluación de proteínas de fase aguda.....	53
	7.3.1 Concentración de proteínas de fase aguda en perros seroreactivos (grupo 1) y seronegativos (grupo 2) a <i>Trypanosoma cruzi</i>	54
	7.3.2 Concentración de proteínas de fase aguda en perros seroreactivos a <i>Trypanosoma cruzi</i> con (grupo 1b) y sin coinfecciones (grupo 1a).....	55
	7.3.3 Concentración de proteínas de fase aguda en perros seronegativos a <i>Trypanosoma cruzi</i> (grupo 2) vs perros seroreactivos a <i>Trypanosoma cruzi</i> sin coinfecciones (grupo 1a)	57
	7.3.4 Concentración de proteínas de fase aguda en perros seronegativos a <i>Trypanosoma cruzi</i> (grupo 2) vs perros seroreactivos a <i>Trypanosoma. cruzi</i> con coinfección (grupo 1b).....	58
	7.4 Marcadores de estrés oxidativo	59
	7.4.1 Marcadores de estrés oxidativo en los distintos grupos de estudio	59
VIII.	DISCUSIÓN.....	62
IX.	CONCLUSIONES.....	73
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Concentración de proteínas de fase aguda (PON-1, ferritina, CRP y Hp), por grupo de estudio.</i>	54
Tabla 2. <i>Evaluación de marcadores de estrés oxidativo por grupo de estudio.</i>	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Área de estudio en la zona costera de Ecuador.</i>	43
Figura 2. <i>Perros seroreactivos y seronegativos a Trypanosoma cruzi.</i>	49
Figura 3. <i>Frecuencia de agentes patógenos de enfermedades transmitidas por vectores en perros seroreactivos a Trypanosoma cruzi en las comunidades de Colón y Abdón Calderón.</i>	50
Figura 4. <i>Coinfecciones de perros seroreactivos a Trypanosoma cruzi procedentes de la comunidad Colón.</i>	51
Figura 5. <i>Coinfecciones de perros seroreactivos a Trypanosoma cruzi, procedentes de la comunidad Abdón Calderón.</i>	52
Figura 6. <i>Coinfecciones de perros seroreactivos a Trypanosoma cruzi, procedentes de las comunidades de Colón y Abdón Calderón.</i>	53
Figura 7. <i>Concentración sérica de las proteínas de fase aguda en perros seroreactivos y seronegativos a Trypanosoma cruzi.</i>	55
Figura 8. <i>Concentración sérica de las proteínas de fase aguda en perros seroreactivos a Trypanosoma cruzi, con y sin coinfección.</i>	56
Figura 9. <i>Concentración sérica de las proteínas de fase aguda en perros seronegativos a Trypanosoma cruzi vs perros seroreactivos a Trypanosoma cruzi sin coinfección.</i>	57
Figura 10. <i>Concentración sérica de las proteínas de fase aguda en perros seronegativos a Trypanosoma cruzi vs perros seroreactivos a Trypanosoma cruzi con coinfección.</i>	58
Figura 11. <i>Concentración de marcadores de estrés oxidativo, en perros seroreactivos a Trypanosoma cruzi vs perros seronegativos a Trypanosoma cruzi.</i>	60

Figura 12. *Concentración de marcadores de estrés oxidativo, en perros seronegativos a Trypanosoma cruzi vs perros seroreactivos a Trypanosoma cruzi con coinfección..... 61*

ABREVIATURAS

AGP: Alfa-1 Glicoproteína ácida

AHG: Anaplasmosis humana granulocítica

AOPP: Productos de oxidación avanzada de proteínas

CRP: Proteína C Reactiva

CUPRAC: Capacidad antioxidante reductora del ion cobre

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

ETV: Enfermedades transmitidas por vectores

FOX: Oxidación ferrosa en xilenol naranja

FRAP: Capacidad de reducción férrica del plasma

Hp: Haptoglobina

IFN: Interferón

IL: Interleucinas

INCOSUR: Iniciativa del Cono Sur

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

NK: Natural killer

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PFA: Proteínas de fase aguda

PON-1: Paraoxanasa-1

RFA: Respuesta de fase aguda

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SAA: Amiloide A sérico

TAC: Capacidad antioxidante total

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TGF: Factor de crecimiento transformador

Th: T helper

Th2: T helper 2

TNF: Factor de necrosis tumoral

RESUMEN

Algunas enfermedades transmitidas por vectores como garrapatas, mosquitos, flebótomos y triatominos que tienen como principal reservorio a los perros, son relevantes en medicina veterinaria y en salud pública, porque muchas de ellas tienen carácter zoonótico. Dentro de estas enfermedades tenemos la enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*), ehrlichiosis (*Ehrlichia canis* / *Ehrlichia ewingii*), anaplasmosis (*Anaplasma phagocytophilum* / *Anaplasma platys*), dirofilariosis (*Dirofilaria immitis*) y la enfermedad de Lyme (*Borrelia burgdorferi*). El diagnóstico de estas enfermedades puede dificultarse porque existen fases que son asintomáticas o con signos clínicos comunes. Actualmente la determinación de proteínas de fase aguda y marcadores de estrés oxidativo se utilizan en algunas enfermedades de humanos y animales, y también podrían ser de ayuda para el diagnóstico, monitorización y pronóstico de las enfermedades zoonóticas del presente trabajo. Los objetivos de esta investigación fueron: 1. Determinar la seroreactividad contra *Trypanosoma cruzi* en dos comunidades de Portoviejo, Ecuador; 2. Detectar las frecuencias de coinfecciones transmitidas por vectores en perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi*; y 3. Determinar las concentraciones de proteínas de fase aguda (proteínas C reactiva, haptoglobina, ferritina y paraoxanasa-1) y marcadores de estrés oxidativo (tiol, capacidad antioxidante total y capacidad antioxidante reductora del ion cobre) en perros con infección natural por *Trypanosoma cruzi*, con y sin coinfección. Para el diagnóstico de *Trypanosoma cruzi* se utilizaron dos métodos de ELISA y para la detección de la ehrlichiosis, anaplasmosis, dirofilariosis y enfermedad de Lyme, se usó el test de IDEXX SNAP 4Dx. Para determinar la concentración de la proteína C reactiva y ferritina se utilizó un ensayo

inmunoturbidimétrico; la concentración de haptoglobina se midió usando un método colorimétrico comercial validado en perros; para la determinación de la concentración sérica de paraoxanasa-1 se usó un método espectrofotométrico. Para determinar el estrés oxidativo, se utilizaron métodos espectrofotométricos automatizados, previamente validados en perros. Se formaron los siguientes grupos: Grupo 1. Perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* (n: 45), este grupo se subdividió en dos subgrupos: 1a sin coinfección (n: 22) y 1b con coinfección (n: 23); Grupo 2. Perros seronegativos a *Trypanosoma cruzi* (n: 40). La seroreactividad a *Trypanosoma cruzi* fue de 57.14% y 33.33% en perros de las comunidades de Colón y Abdón Calderón respectivamente. Las frecuencias de infecciones en animales seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* fueron: 48% *Ehrlichia canis* / *Ehrlichia ewingii*; 28% *Anaplasma phagocytophilum* / *Anaplasma platys*, 12% *Dirofilaria immitis* y 0% *Borrelia burgdorferi*. Se observó que paraoxanasa-1 disminuyó en perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* con y sin coinfección, mientras que ferritina aumentó en perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* con coinfección. Se encontró disminución de tiol y de la capacidad antioxidante reductora del ion cobre, en perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* y en perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* con coinfección. Con base en los resultados obtenidos, podemos concluir que existe una alta prevalencia de perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* en Portoviejo que presentaron coinfección con otros hemoparásitos y variaciones de paraoxanasa-1, ferritina, tiol y de la capacidad antioxidante reductora del ion cobre. Esta información podría ser usada para el diagnóstico, manejo clínico, prevención y control de estas enfermedades en la zona de estudio.

ABSTRACT

Some vector-borne diseases such as ticks, mosquitoes, sandflies and triatomines, whose main reservoir are dogs, are relevant both in Veterinary Medicine and public health because many of them are zoonotic in nature. Among these diseases we have Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*), ehrlichiosis (*Ehrlichia canis* / *Ehrlichia ewingii*), anaplasmosis (*Anaplasma phagocytophilum* / *Anaplasma platys*), heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) and Lyme disease (*Borrelia burgdorferi*). The process of diagnosing these diseases can be difficult because there are phases that are asymptomatic or with common clinical signs among other diseases. Currently, the determination of acute phase proteins and oxidative stress markers are used in the diagnosis, monitoring, and prognosis of human and animal diseases and could be of help both for the diagnosis and for the monitoring of the indicated zoonoses. Due to this knowledge gap, this research focused on the following objectives: 1. To determine the seroreactivity against *Trypanosoma cruzi* in two communities of Portoviejo, Ecuador; 2. Detect the frequencies of vector-borne coinfections in dogs seroreactive to *Trypanosoma cruzi*; and 3. To determine the concentrations of acute phase proteins (C-reactive proteins, haptoglobin, ferritin and paraoxanase-1) and oxidative stress markers (thiol, total antioxidant capacity and copper ion reducing antioxidant capacity) in dogs with natural infection with *Trypanosoma cruzi*, with and without coinfection. The research was carried out in two communities in the coastal zone of Ecuador. Two ELISA methods were used for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and the IDEXX SNAP 4Dx test was used for the detection of ehrlichiosis, anaplasmosis, heartworm disease, and Lyme disease. To determine the concentration of C-reactive protein and ferritin, an immunoturbidimetric assay was used;

Haptoglobin concentration was measured using a commercial colorimetric method validated in dogs; a spectrophotometric method was used to determine the serum concentration of paraoxanase-1. Automated spectrophotometric methods, previously validated in dogs, was used to determine oxidative stress. The following groups were formed: Group 1. Dogs seroreactive to *Trypanosoma cruzi* (n: 45). This group was subdivided into two subgroups 1a (n: 22) without coinfection and 1b (n: 23) with coinfection. Group 2. Dogs seronegative to *Trypanosoma cruzi* (n: 40). The seroreactivity to *Trypanosoma cruzi* was 57.14% and 33.33% in dogs from the communities of Portoviejo called Colón and Abdón Calderón, respectively. The frequencies of infections in animals seroreactive to *Trypanosoma cruzi* were: 48% *Ehrlichia canis* / *Ehrlichia ewingii*; 28% *Anaplasma phagocytophilum* / *Anaplasma platys*, 12% *Dirofilaria immitis* and 0% *Borrelia burgdorferi*. It was determined that paraoxanase-1 decreased in *Trypanosoma cruzi* seroreactive dogs with and without coinfection, while ferritin increased in *Trypanosoma cruzi* seroreactive dogs with coinfection. Decreased thiol and copper ion reducing antioxidant capacity were found in dogs seroreactive to *Trypanosoma cruzi* and in dogs seroreactive to *Trypanosoma cruzi* with coinfection. Based on the results obtained, this research concludes that there is a high prevalence of dogs seroreactive to *Trypanosoma cruzi* in Portoviejo that presented coinfection with other haemoparasites and variations of paraoxanase-1, ferritin, thiol, and the reducing antioxidant capacity of the copper ion. This information could be used for the diagnosis, clinical management, prevention, and control of these diseases in the study area.

I. INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) es el agente causal de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, una antropozoonosis tropical desatendida que afecta aproximadamente a 7 millones de personas a nivel mundial y es considerada endémica de América Latina (Euzébio *et al.*, 2021; WHO, 2021). Ha sido reportada en Canadá, Estados Unidos y Latinoamérica, siendo esta última la región con mayor impacto sanitario (Euzébio *et al.*, 2021; WHO, 2021). *T. cruzi* infecta a un amplio rango de hospederos, dentro de los que destacan el humano y distintas especies de mamíferos, siendo el perro y la zarigüeya (*Didelphis marsupialis*) los principales reservorios de la enfermedad en el ciclo doméstico y selvático respectivamente (Cantillo *et al.*, 2020).

La enfermedad de Chagas en sus inicios fue enzoótica, y afectaba solamente a animales salvajes (Chao *et al.*, 2020). El desequilibrio ecológico y el aumento de la migración de personas permitió el contacto de humanos y animales domésticos con los focos naturales de infección de *T. cruzi* convirtiéndose en una zoonosis (Chao *et al.*, 2020). La movilidad de las personas seroreactivas a *T. cruzi*, de países endémicos a países no endémicos, ha ocasionado que la enfermedad sea detectada en otros continentes (Antinori *et al.*, 2017; WHO, 2021). Los efectos de las alteraciones ambientales provocadas por el cambio climático, así como la mencionada movilidad humana, han originado que estas y otras enfermedades transmitidas por vectores (ETV), estén presentes y tiendan a aumentar (Maggi y Kramer, 2019).

La enfermedad de Chagas presenta una fase aguda seguida de una fase crónica, separadas por un período indeterminado durante el cual el paciente está relativamente asintomático. La

fase aguda se caracteriza por una activa infección, inflamación y daño miocárdico. La manifestación clínica más importante de esta enfermedad es la miocarditis crónica, donde los síntomas de cardiopatía pueden aparecer años o décadas después de la infección inicial. Al menos el 30% de los infectados desarrollarán lesiones irreversibles del corazón, esófago o colon (Zingales, 2018). La enfermedad de Chagas es una de las principales causas de morbilidad cardiovascular y muerte prematura en América Latina (Lidani *et al.*, 2019).

Existen otras ETV que constituyen un riesgo para la salud de humanos y animales (WHO, 2020), como son la ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii*), anaplasmosis (*Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*), enfermedad de Lyme (*Borrelia burgdorferi*) y dirofilariosis (*Dirofilaria immitis*), todas ellas de naturaleza zoonótica (Maggi y Kramer, 2019). Los vectores como mosquitos, garrapatas y triatominos, pueden ser portadores de estos patógenos, y los transmiten entre vertebrados de distintas especies (Maggi y Kramer, 2019). La sintomatología de estas enfermedades abarca desde signos comunes como fiebre, letargia, anorexia, pérdida de peso, afecciones cardíacas, palidez de mucosas, hemorragia; hasta signos menos frecuentes como linfadenomegalia, esplenomegalia, poliartritis, tos, signos nerviosos y dificultad para respirar (Gianfrancesco *et al.*, 2019; Malik *et al.*, 2005; Society, 2018).

El diagnóstico de las ETV realizado exclusivamente en base a signos clínicos, no es completamente confiable, debido a las similitudes que podrían aparecer en varias patologías; por lo que se requiere de pruebas con alta sensibilidad y especificidad para confirmar o descartar su diagnóstico. Algunas pruebas serológicas y la reacción en cadena de la

polimerasa (PCR), constituyen las pruebas de elección para determinar el agente infectante en un hospedero sospechoso de padecer alguna de las ETV (Maggi y Kramer, 2019).

En la clínica médica veterinaria, es cada vez más frecuente el uso de pruebas que permitan detectar las enfermedades en pacientes asintomáticos, o antes de que los signos clínicos se inicien, ya que el abordaje terapéutico temprano podría ayudar en el tratamiento y pronóstico. Estudios realizados en perros, han reportado que las proteínas de fase aguda (PFA), ayudan al diagnóstico, pronóstico, detección de etapas subclínicas de la enfermedad, y seguimiento de la evolución de enfermedades crónicas (Cray, 2012).

Las PFA han sido utilizadas e investigadas ampliamente, tanto en medicina humana como veterinaria, debido a que constituyen marcadores tempranos de procesos biológicos que ocurren en enfermedades, como resultado de una respuesta de fase aguda (Carretón *et al.*, 2017; Eckersall, 1995; Karnezi *et al.*, 2016; Martínez-Subiela *et al.*, 2014b; Martínez-Subiela *et al.*, 2011; Méndez *et al.*, 2014).

La respuesta de fase aguda forma parte de la reacción del sistema inmunológico innato del organismo, ante procesos infecciosos, inflamatorios, traumáticos y neoplásicos (Carretón *et al.*, 2017; Cerón *et al.*, 2014; Eckersall, 1995; Thomas *et al.*, 2018); y esta respuesta implica una serie de modificaciones en las concentraciones de PFA. La cinética de estas proteínas, varía de acuerdo a las características de cada una de ellas; de manera que existe un grupo cuyos niveles de concentración aumentan en el organismo como respuesta a la fase aguda (PFA positivas, entre ellas la proteína C reactiva, haptoglobina y ferritina), y otro grupo en el cual disminuyen los niveles de concentración (PFA negativas, como la albúmina y paraoxonasa-1) (Cerón *et al.*, 2005; Cray, 2012). Además de evaluar las proteínas de fase

aguda, también es necesario medir los marcadores de estrés oxidativo, porque el estrés podría estar involucrado en la patología de algunas enfermedades (Gutteridge y Halliwell, 2018).

Normalmente los antioxidantes endógenos contrarrestan el daño oxidativo que ocurre sobre algún fenómeno biológico, pero si no lo hacen, se inicia el proceso de estrés oxidativo (Sies, 2015), que se puede definir como un desequilibrio entre las reacciones oxidantes y antioxidantes, con preponderancia de las oxidantes (Gutteridge y Halliwell, 2018). Entre los biomarcadores adecuados para medir la respuesta antioxidante se encuentran tiol (Rubio *et al.*, 2020), la capacidad antioxidante total (TAC) (Bartosz, 2010), y un indicador indirecto que es la capacidad antioxidante reductora del ion cobre (CUPRAC) (Apak *et al.*, 2005; Rubio *et al.*, 2020). El estrés oxidativo está implicado en el desarrollo de insuficiencia cardíaca, por lo que la identificación de cambios en biomarcadores de estrés oxidativo podría mejorar la comprensión del daño cardíaco en pacientes crónicos chagásicos (Wen *et al.*, 2014).

Se consideran que las técnicas tradicionales de diagnóstico (hematología, serología, citología y aislamiento), son las primeras opciones para detectar las ETV. Sin embargo, las PFA y los marcadores de estrés oxidativo, podrían jugar un papel importante en la patogenia de la enfermedad de Chagas y las otras ETV, especialmente cuando muchas de ellas pueden coexistir y encontrarse en diferentes fases.

A pesar de que se ha diagnosticado la enfermedad de Chagas en humanos, y siendo el perro el principal reservorio (Enriquez *et al.*, 2013) y centinela (de Sousa *et al.*, 2021; Enriquez *et al.*, 2014), no hay reportes de la presencia de *T. cruzi* en caninos en las comunidades de Colón y Abdón Calderón pertenecientes al cantón Portoviejo en Ecuador. Diversas ETV han sido

detectadas en perros de Colón (Morán-Loor, 2006); sin embargo, no se han realizado investigaciones de la enfermedad de Chagas. Las zonas de estudio seleccionadas están localizadas en áreas rurales y poseen condiciones climáticas que favorecen la reproducción de vectores como triatominos (Costales *et al.*, 2015), mosquitos (Cevallos *et al.*, 2018) y garrapatas (Enríquez *et al.*, 2020). Por otra parte, las condiciones socioeconómicas de la población determinan que los perros no cuenten con cuidados médicos veterinarios adecuados y deambulen libremente por las calles, patios, terrenos baldíos, áreas agrícolas y corrales de animales (Rivadeneira *et al.*, 2021).

Al ser el perro el modelo biológico más adecuado para estudiar la enfermedad de Chagas (de Lana y Giunchetti, 2021; Guedes *et al.*, 2009), los resultados obtenidos de PFA y marcadores de estrés oxidativo, podrían utilizarse para futuros estudios en humanos y perros. Adicionalmente la detección de *T. cruzi* y otras ETV en perros de Colón y Abdón Calderón, permitiría obtener indicadores que se podrían utilizar para mejorar los programas de control y erradicación de vectores, con la finalidad de reducir la incidencia de las ETV en la región.

El presente trabajo fue diseñado para determinar las concentraciones de PFA y marcadores de estrés oxidativo en perros diagnosticados con infección natural con *T. cruzi*; sin embargo, al realizar la toma de muestras de perros con dueños en las comunidades de Colón y Abdón Calderón, Portoviejo, Ecuador, se descubrió que muchos de estos animales podían tener coinfecciones de otras ETV. De ahí que los objetivos iniciales del estudio se modificasen para determinar las concentraciones de PFA y marcadores de estrés oxidativo en perros diagnosticados con infección natural con *T. cruzi*, que presentaban o no coinfección con otras

ETV, procedentes de estas comunidades consideradas zonas endémicas de la enfermedad de Chagas en humanos (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2019).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Enfermedad de Chagas: Situación mundial

Se cree que el origen de la enfermedad de Chagas ocurrió hace 8,000-6,000 millones de años en la región de los Andes, con el inicio del sedentarismo y la domesticación de animales y plantas, llegando posteriormente a otras zonas de América (Chao *et al.*, 2020; Dias y Coura, 1997).

T. cruzi es el agente causal de la enfermedad de Chagas, cuyo nombre fue dado por ser Carlos Chagas quien la describió por primera vez en 1909 (Chagas, 1909), y posteriormente describió el vector y las manifestaciones clínicas de la enfermedad. *T. cruzi* se transmite principalmente a personas y animales domésticos por medio de insectos hematófagos denominados triatominos, siendo *Triatoma infestans* uno de los vectores responsables. Los nombres comunes de los triatominos varían de acuerdo a cada país; por ejemplo, en Ecuador se denomina chinchorro, barbeiro en Brasil, chinche besucona en México, chinche picuda en Colombia, chipo en Venezuela, vinchuca en Argentina, Chile, Uruguay, y kissing bug en Estados Unidos (Schofield y Galvão, 2009).

Existen aproximadamente 6 - 7 millones de personas infectadas con *T. cruzi* en el mundo y la enfermedad se ha reportado principalmente en América Latina (Echeverría y Morillo, 2019), zona en la cual se han realizado acciones a través del control de vectores y otros mecanismos para disminuir la infección. Sin embargo, la movilidad de personas con la enfermedad, procedentes de países endémicos, ha ocasionado que esté presente en lugares no endémicos como Estados Unidos (Bern, 2015), Canadá (Plourde *et al.*, 2017), países de

Europa como España, Italia, Francia, Suiza y Reino Unido (Antinori *et al.*, 2017), África (Clément *et al.*, 2020), países del Mediterráneo Oriental y del Pacífico Occidental (Euzébio *et al.*, 2021; WHO, 2021).

La enfermedad de Chagas es una de las 20 enfermedades desatendidas, que afectan a personas que viven principalmente en zonas tropicales (Hotez *et al.*, 2020). Los gobiernos de los países afectados, han tomado medidas para controlar de manera más adecuada esta enfermedad; sin embargo, estas acciones no han sido suficientes para disminuir su presencia (Hotez, 2017). En países europeos, a pesar que la enfermedad no es endémica, se han adoptado medidas gubernamentales como fumigaciones a vectores y diagnóstico en hospitales públicos para controlar la transmisión de la enfermedad (Requena *et al.*, 2014).

Las mayoría de las personas afectadas con esta enfermedad son originarias principalmente de América Latina; sin embargo, el movimiento de poblaciones infectadas procedentes de regiones endémicas, ha permitido la presencia de esta enfermedad fuera del continente americano (WHO, 2021). Antes de 1990, ya se conocía el alto costo social y económico que representaba la enfermedad de Chagas en los países endémicos. Por ejemplo, en 1991 los gobiernos de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay elaboraron y ejecutaron un plan que tenía como principales objetivos la eliminación del vector intradomiciliario y evitar la transmisión por medio de transfusiones sanguíneas, que dió resultados positivos (PAHO, 2002). La prevalencia en humanos antes de la implementación de estas medidas en Argentina estaba entre 49.6% - 58.7% (Wisnivesky *et al.*, 1985); y actualmente se reportan prevalencias mucho menores (9.26%) (Colussi *et al.*, 2021). En perros las prevalencias en América Latina fluctúan entre el 10% – 30% (Gurtler y Cardinal, 2015).

En Ecuador la enfermedad de Chagas ha sido reportada en 20 de las 24 provincias, y desde 2013 a 2019, se han confirmado 439 casos en humanos, de los cuales el 75.40% estaban en fase crónica y el 24.60% en fase aguda. Se ha reportado un incremento estacional de casos entre los meses de noviembre a febrero y de abril a junio, principalmente en provincias de la costa y suroeste del país. Se han detectado muestras seroreactivas a *T. cruzi* mediante cribado en bancos de sangre en Ecuador, y debido a la poca cultura de las personas de ser donantes de sangre, existe la posibilidad de que la seroreactividad en la población sea mayor (Morales, 2021).

2.2 *Trypanosoma cruzi*

Es un parásito que pertenece al orden *Kinetoplastida* y a la familia *Trypanosomatidae*, que durante su ciclo de vida posee varias formas que pueden identificarse por microscopía óptica en preparaciones teñidas con Giemsa (Zuma *et al.*, 2021). En *T. cruzi* se pueden identificar las siguientes formas: (a) Amastigote, también conocida como esferomastigote, micromastigote, forma aflagelada o forma leishmanial. (b) Epimastigote, fusiforme de 20 a 40 μm . (c) Tripomastigote que tiene una longitud aproximada 25 μm y un diámetro de 2 μm , éste puede ser observado en las células de los tejidos, en la sangre del hospedador vertebrado, en el intestino posterior y heces del vector (Zuma *et al.*, 2021).

T. cruzi no es una sola especie sino que corresponde a dos subgrupos genéticos altamente divergentes designados como linajes 1 y 2. El linaje 1 predomina en el ciclo doméstico, mientras que el linaje 2 se presenta principalmente en el ciclo selvático (Ramírez, 2020). Las poblaciones de *T. cruzi* son complejas y se han informado siete unidades discretas de tipificación (DTU) denominadas del I al VI y Tcbat (Zingales, 2018).

2.3 Vectores de la enfermedad de Chagas

Los triatomíneos son insectos hematófagos vectores de la enfermedad de Chagas, pertenecientes al orden Hemiptera, suborden Heteroptera, familia *Reduviidae* y subfamilia *Triatominae* (de Oliveira *et al.*, 2018). Existen 152 especies de triatomíneos (pertenecientes a 18 géneros) capaces de actuar como potenciales vectores de *T. cruzi* (da Rosa *et al.*, 2017). Los triatomíneos tienen hábitos hematófagos nocturnos y presentan una fase de huevo, cinco estadios ninfales y la fase adulta (Jurberg y Galvão, 2006). La tasa de infectividad puede variar entre las especies de chinches triatomíneos y se ha demostrado que, aunque las especies domésticas son de inmensa importancia en la transmisión del parásito, los vectores silvestres tienen niveles más altos de infectividad (de Oliveira *et al.*, 2018).

En Ecuador se ha reportado la presencia del vector en 18 de las 24 provincias, especialmente en Manabí y El Oro (Grijalva *et al.*, 2015; Villacís *et al.*, 2014). Se han identificado 17 especies de triatomíneos, de los cuales *Triatoma dimidiata* (*T. dimidiata*) y *Rhodnius ecuadoriensis* (*R. ecuadoriensis*) son considerados los principales vectores de la enfermedad, encontrándose *T. dimidiata* en áreas domésticas y peridomésticas (Morales, 2021), mientras que, *R. ecuadoriensis* se encuentra en zonas peridomésticas y selváticas (Suárez *et al.*, 2010). Es importante mencionar que un alto porcentaje (49%) de estos vectores en zonas endémicas de Ecuador, se encuentran infectados con *T. cruzi* (Costales *et al.*, 2015; Grijalva *et al.*, 2012; Villacís *et al.*, 2015).

En México, la mayoría de los triatomíneos viven en nidos terrestres, arbóreos y en cuevas, los cuales sobreviven fácilmente en hábitats con mamíferos silvestres, domésticos y humanos (Martínez-Ibarra *et al.*, 2010; Medina-Torres *et al.*, 2010; Ramsey *et al.*, 2012). Se ha

encontrado que 19 especies invaden domicilios y sólo 12 especies silvestres se encuentran ocasionalmente en asociación con humanos (Ramsey *et al.*, 2015). Todas las especies de vectores de *T. cruzi* epidemiológicamente relevantes en México se han recolectado durante todo el año en paisajes antropogénicos (Ramsey *et al.*, 2012).

Entre las causas más importantes de la introducción de especies de triatomíneos silvestres en ambientes domésticos, se encuentran la fragmentación del hábitat y la disminución del alimento, que condicionan a los triatomíneos a ingresar a zonas domiciliarias (Cardozo *et al.*, 2021). El tipo de material de construcción de las casas, constituye uno de los principales factores de riesgo asociados a la presencia de los vectores en los hogares (Medina-Torres *et al.*, 2010). Adicionalmente, la presencia de materiales de construcción en zonas peridomiciliarias, que actúan como escondites para los triatomíneos o la presencia de animales domésticos cerca de los hogares, también constituyen factores de riesgo (Grijalva *et al.*, 2017; Grijalva *et al.*, 2015).

2.4 Principales reservorios de *Trypanosoma cruzi*

Todos los mamíferos pueden ser reservorios de *T. cruzi*, sin embargo, se considera que los más eficaces en la cadena epidemiológica son los mamíferos de los órdenes Primates, Didelphimorphia, Chiroptera y Carnivora. Se han reportado aproximadamente 180 especies de mamíferos que pueden infectarse naturalmente con *T. cruzi*, de los cuales unos actúan como reservorios de la enfermedad en el ciclo selvático y otros en el ciclo doméstico (Jansen *et al.*, 2018).

En el ciclo doméstico, el reservorio de mayor importancia es el perro, mientras que en el ciclo selvático han sido reportadas algunas especies de mamíferos, tales como ratones (Añez

y Crisante, 2021), ratas (Gherzi *et al.*, 2020), zorros (Santos *et al.*, 2018), ardillas (Ocaña-Mayorga *et al.*, 2018), mapaches (Majeau *et al.*, 2020), armadillos (Orozco *et al.*, 2016), capibaras (Ferrer *et al.*, 2021), murciélagos (Austen y Barbosa, 2021) y zarigüeyas (Rodríguez-Monguí *et al.*, 2019), esta última especie considerada como uno de los principales reservorios de la enfermedad en este ciclo (Álvarez *et al.*, 2018).

2.5 Patogenia y fases de la enfermedad de Chagas

Durante la primera fase de la enfermedad, la afectación del miocardio es causada principalmente por la invasión de parásitos al tejido cardíaco, que desencadena una severa respuesta inmunitaria e inflamatoria (Hidron *et al.*, 2010). La invasión de los amastigotes al corazón se asocia con necrosis coagulativa de los cardiomiocitos y degeneración hialina de las fibras musculares, que pueden dar lugar a zonas microisquémicas entre las arterias coronarias (Strasen *et al.*, 2014).

Los modelos experimentales han demostrado que pueden aparecer cambios en la microvasculatura, debido a una combinación de trombos plaquetarios oclusivos y una mayor producción de citocinas e inmunomoduladores, que promueven vasoespasmos y agregación plaquetaria. Estas alteraciones pueden conducir a una dilatación del ventrículo izquierdo, con frecuencia asociada a aneurismas apical e inferobasal (Echeverría y Morillo, 2019).

La fase crónica se caracteriza por miocitólisis e infiltración linfocítica miocardio. La inflamación cardíaca y el daño tisular subsiguiente están orquestados por la infiltración y activación de varias células inmunitarias, incluidos polimorfonucleares neutrófilos, monocitos, macrófagos, polimorfonucleares eosinófilos, mastocitos, células natural killer

(NK) y células T y B en el miocardio. Después de una lesión tisular, los monocitos y macrófagos en el tejido, experimentan cambios fenotípicos y funcionales marcados, y actúan como reguladores de la reparación, regeneración y fibrosis de los tejidos. La alteración de las funciones de los macrófagos residentes, así como la producción incontrolada de citocinas inflamatorias, factores de crecimiento y la generación ineficaz de una respuesta antiinflamatoria, pueden provocar una reparación inadecuada, una lesión persistente e insuficiencia cardíaca (Lafuse *et al.*, 2021).

A medida que la respuesta inmunitaria adaptativa provocada por el parásito controla la infección, a menudo no logra eliminar el parásito. Además, variables como la carga parasitaria durante la fase aguda, el serotipo del parásito, la respuesta inmune y la presencia o ausencia de reinfección, pueden influir en la afectación cardíaca durante la etapa crónica (de Bona *et al.*, 2018).

2.6 Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas se presenta en dos fases: aguda y crónica. La fase inicial aguda tiene una duración aproximada de dos meses posterior a la infección; durante esta fase la carga parasitaria en la sangre es alta, pero en la mayoría de los casos los síntomas están ausentes o son leves (Echeverría y Morillo, 2019). Los primeros signos visibles pueden ser lesiones en la piel (chagoma) o la hinchazón en un ojo (signo de Romana), incluso pueden desarrollar miocarditis severa con degeneración, necrosis e infiltración de células inflamatorias (Pino *et al.*, 2021).

En la etapa crónica uno de los principales órganos afectados es el corazón donde un 20% – 30% de los humanos reactivos a *T. cruzi* puede padecer insuficiencia cardíaca y muerte (Mills, 2020). Dentro de la fase crónica, existe la etapa indeterminada en donde la carga parasitaria en sangre es tan baja que sólo puede ser detectada mediante técnicas serológicas (Echeverría y Morillo, 2019). En esta fase no existen signos clínicos evidentes o patognomónicos de la enfermedad, ni alteraciones que puedan ser diagnosticadas mediante métodos clínicos (Bern, 2015). El 30% de los pacientes desarrollan trastornos cardíacos y el 10% pueden sufrir alteraciones digestivas (megacolon y megaesófago) y neurológicas, que pueden conducir a la muerte (Rassi y de Rezende, 2012; WHO, 2021). La miocarditis y la hipertrofia de los cardiomiocitos, pueden originar insuficiencia cardíaca terminal (Bern, 2015).

2.7 Formas de transmisión de la enfermedad de Chagas

2.7.1 Transmisión a través de vectores

Esta transmisión se realiza a través de vectores de la subfamilia Triatominae y constituye una de las principales formas de transmisión de *T. cruzi* en los países latinoamericanos, donde la enfermedad de Chagas es endémica (WHO, 2021). El vector de *T. cruzi* es hematófago, pero también se puede alimentar de insectos (Sandoval *et al.*, 2004) y plantas (Díaz-Albiter *et al.*, 2016). Se han reportado aproximadamente unas 152 especies de triatominos, pero sólo unas pocas son capaces de transmitir el parásito de forma eficiente. Los más relevantes son los géneros *Triatoma* (*Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma brasiliensis*), *Rhodnius* (*Rhodnius prolixus*, *Rhodnius ecuadoriensis*) y *Panstrongylus* (*Panstrongylus megistus*, *Panstrongylus rufotuberculatus*, *Panstrongylus howardi*, *Panstrongylus geniculatus*) (Abad-Franch *et al.*, 2001; Antinori *et al.*, 2017; Grijalva *et al.*, 2017).

Esta transmisión se realiza a través de las heces del vector, y es por tanto una transmisión estercolaria, cuya probabilidad de contagio a seres humanos es baja (Nouvellet *et al.*, 2013) en comparación con la reportada en zarigüeyas (Rodríguez-Monguí *et al.*, 2019) y perros (Hodo *et al.*, 2019; Nouvellet *et al.*, 2013). Factores como la cantidad de heces defecada cerca de la zona de la picadura del vector, el hecho de que el hospedador debe rascarse para llevar las heces infectadas a la herida y el estado inmunitario del hospedador, hacen que la transmisión vectorial, no siempre ocurra (Rabinovich *et al.*, 1990).

2.7.2 Transmisión oral

Al ingresar *T. cruzi* por vía oral, los tripomastigotes metacíclicos atraviesan la mucosa del estómago e invaden las células nucleadas no fagocíticas (Yoshida, 2008) y las células dendríticas (Van Overtvelt *et al.*, 1999). El parásito se puede transmitir al consumir alimentos o jugos contaminados con heces de triatomíneos, carne o sangre de reservorios, alimentos y bebidas contaminados con secreciones de animales que contienen tripomastigotes metacíclicos. Los tripomastigotes metacíclicos expresan algunas glicoproteínas de superficie (gp82 y gp90) que les permite unirse e invadir el epitelio de la mucosa gástrica y modular la invasión. Posteriormente los tripomastigotes se diferencian en amastigotes y se replican convirtiéndose en tripomastigotes nuevamente e infectando más células (Velásquez-Ortiz y Ramírez, 2020). Después de 3 a 22 días desde la ingestión, la infección oral se caracteriza por manifestaciones más graves que las asociadas a la transmisión vectorial: fiebre prolongada, miocarditis aguda con insuficiencia cardíaca y en algunos casos, meningoencefalitis, con una mortalidad que puede llegar hasta el 33% de los infectados (Filigheddu *et al.*, 2017).

La disminución de las fuentes de alimentación del vector en estado selvático, ocasionada por la destrucción de su nicho ecológico, ha originado la presencia de triatomos en los domicilios, por lo que sus hábitos nocturnos, la falta de protección de los alimentos, la capacidad de *T. cruzi* de mantenerse vivo durante varias horas en líquidos y la falta de conocimiento de esta transmisión en personas de comunidades en riesgo, podrían provocar la contaminación de los alimentos (Cardoso *et al.*, 2006; Monsalve-Lara *et al.*, 2021). En los perros, la infección oral sucede con frecuencia a partir de la ingestión de triatomos infectados (Arce-Fonseca *et al.*, 2017).

2.7.3 Transmisión por transfusión sanguínea

La infección por transfusión sanguínea constituye una de las principales rutas de transmisión en países no endémicos y es un problema de salud pública a nivel mundial. En la actualidad, ésta es la segunda causa de transmisión de la enfermedad de Chagas, incluso en países que cuentan con medidas sanitarias de control (Coura, 2015). Los factores de riesgo están relacionados con la prevalencia de la enfermedad en la población de donantes y con la cantidad de transfusiones que se realicen en una misma persona. Por esta razón los gobiernos necesitan implementar medidas profilácticas, que permitan el control de la enfermedad a largo plazo. Por ejemplo, realizar cribados en los bancos de sangre usando dos técnicas para descartar falsos negativos, y educar a la población y a médicos sobre la enfermedad (Antinori *et al.*, 2017; Schmunis, 1999). Se estima que la probabilidad de transmisión a través de transfusión sanguínea en Latinoamérica es muy variable (10-20%), siendo Bolivia uno de los países más afectados (Antinori *et al.*, 2017; Schmunis *et al.*, 1998; Schmunis, 1999).

2.7.4 Transmisión por trasplante de órganos

A pesar que los principales órganos diana en la infección por *T. cruzi* son el corazón, el sistema gastrointestinal y el sistema nervioso (Rassi *et al.*, 2010), el parásito puede ser encontrado en cualquier otro órgano (Latzke *et al.*, 2017). Por lo tanto, cualquier tejido proveniente de una persona seropositiva a *T. cruzi*, constituye un potencial riesgo de contagio. Sin embargo, existen factores que también influyen, como por ejemplo la carga parasitaria y el tejido u órgano que va a ser transplantado (Kun *et al.*, 2009).

2.7.5 Transmisión congénita

La transmisión congénita de la enfermedad de Chagas es poco frecuente, siendo Venezuela el primer país donde se reportó un caso en 1949 (Carlier y Truyens, 2010). Actualmente, la migración continua de personas procedentes de países endémicos de Latinoamérica, ha ocasionado que la enfermedad esté presente en países no endémicos, constituyendo un problema de salud pública, que pone en riesgo la vida del recién nacido (Howard *et al.*, 2014). Se estima que la probabilidad de transmisión congénita es muy variable en las distintas áreas geográficas, con un rango entre 2.7% a 5%, siendo en los países endémicos, donde existe una mayor tasa de transmisión (Howard *et al.*, 2014; Klein *et al.*, 2021).

2.8 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo de vida de *T. cruzi* se realiza en un animal invertebrado y uno vertebrado. El triatomino infectado con *T. cruzi* es expulsado en las heces del vector, en forma de tripomastigotes metacíclicos (fase infectiva) (Murillo, 2019), para posteriormente ingresar a un hospedador vertebrado, a través de las mucosas y heridas de piel.

Los tripomastigotes metacíclicos al ingresar al organismo hospedador, invaden las células y se alojan inicialmente en vacuolas parasitóforas y luego son liberados en el citoplasma de las células del hospedero, donde se diferencian en amastigotes (forma replicativa) (Murillo, 2019). Estos amastigotes proliferan durante 5 a 6 días, y posteriormente se diferencian en tripomastigotes sanguíneos, los cuales son liberados a la sangre y linfa, e infectan ganglios, músculos y otros tejidos.

Los tripomastigotes son ingeridos por los triatomíneos a partir de animales infectados, y en la parte anterior del intestino se diferencian en epimastigotes, y en el recto logran finalmente diferenciarse en tripomastigotes metacíclicos (Tyler y Engman, 2001).

2.9. Rutas de invasión de *Trypanosoma cruzi* y respuesta inmune del hospedador

La piel lesionada constituye la principal ruta por donde ingresa *T. cruzi* al hospedero. Romaña (1943) demostró que las mucosas y la piel con solución de continuidad permitían el inicio de la infección.

La infección por vía oral es una de las vías más comunes en animales domésticos y silvestres (de Noya y Gonzalez, 2015). Los tripomastigotes metacíclicos que ingresan por esta vía, invaden células en la mucosa del estómago, donde son fagocitadas por macrófagos y células dendríticas (Van Overtvelt *et al.*, 1999). Este proceso provoca una respuesta inflamatoria, con presencia de células mononucleares, polimorfonucleares y posteriormente predominio de células mononucleares (linfocitos B) con producción de IgA e IgG (Hoft *et al.*, 1996). Luego se producen citocinas, interferón (IFN) γ y factor de necrosis tumoral (TNF) α , que ayudan a controlar la infección durante la fase aguda (de Meis *et al.*, 2009; Moretti *et al.*,

2002); sin embargo, esta acción inmunitaria no es suficiente para eliminar a *T. cruzi* del organismo. La respuesta inflamatoria exacerbada podría provocar que otras zonas de la mucosa gástrica, se destruyan, permitiendo que el parásito se disemine a otros lugares del organismo (Hoft *et al.*, 1996). Puede ocurrir que el antígeno en la mucosa gastrointestinal o en el tejido linfoide asociado al intestino, origine una tolerancia, en particular para las respuestas de las células T, un proceso mediado en gran medida por las citocinas, factor de crecimiento transformador (TGF) e interleucina (IL) - 10, para contrarrestar el daño tisular (Mestecky *et al.*, 2007), lo cual también favorece la diseminación del parásito. Por otra parte las células T CD8⁺ activadas mediante la presentación de antígenos por células dendríticas de las placas de Peyer o de nódulos linfáticos mesentéricos, expresan integrinas en su superficie que le confieren la capacidad de permanecer en los tejidos del intestino y actuar contra el parásito en esta región (Mora *et al.*, 2005).

Una vez que *T. cruzi* infecta los tejidos del hospedero, durante la fase aguda se produce una respuesta inmunitaria, que generalmente es eficaz para controlar la carga parasitaria; sin embargo, no es suficiente para frenar la infección y los parásitos persisten en los tejidos del hospedador durante muchos años, casi siempre de forma asintomática (Araújo y Castro, 2000).

Otro modo de ingreso de *T. cruzi* lo constituye la mucosa conjuntival, en donde los tripomastigotes metacíclicos, invaden y se replican a través del conducto nasolagrimal y la cavidad nasal. Después de que el parásito se replica dentro de las células, se dirigen hacia los nódulos linfáticos, para posteriormente diseminarse a otros tejidos (Giddings *et al.*, 2006).

La primera barrera de defensa está constituida por el sistema inmune innato, el cual está compuesto principalmente por un sistema de complemento y un conjunto de proteínas de fase aguda, que actúan como respuesta al daño tisular o a procesos inflamatorios. Las células que participan son macrófagos, células NK y células dendríticas, que reconocen a los microorganismos, presentan el antígeno del parásito y permiten la liberación de citocinas como interleucinas IL-1, IL-6, IL-12 y TNF- α , confiriendo la capacidad de iniciar una respuesta específica adquirida (Abbas *et al.*, 2020).

Cuando *T. cruzi* ingresa por la piel con solución de continuidad, 4 ó 5 días después aparece un infiltrado de células polimorfonucleares neutrófilos, linfocitos y macrófagos en el sitio de inoculación. Se ha demostrado que la carga parasitaria inicial en la fase aguda, influye en la posterior activación del sistema inmune durante la fase crónica (Marinho *et al.*, 1999).

El desarrollo de la forma cardíaca en la enfermedad crónica, está relacionada con una respuesta T helper (Th) 1 que ocurrió durante la fase aguda de la enfermedad. Por otra parte inmediatamente después de la infección, puede ocurrir una respuesta Th1 y Th2, que puede conllevar al desarrollo de una fase indeterminada (Guedes *et al.*, 2009). La infección desencadena una respuesta inmune predominantemente de tipo Th1, tanto en el miocardio como periféricamente. Esta respuesta se caracteriza por la expresión del factor de transcripción de células Th1, Tbet y la producción de citocinas Th1 (IFN- γ , IL-2, IL-12 y TNF- α), que se acompañan de citocinas asociadas con Th2 (proteína de unión GATA-3, IL-4 e IL-10) y respuestas Th17 (IL-17) (Bonney *et al.*, 2019). En los individuos con infección crónica, que presentan enfermedad cardíaca, se producen niveles más altos de IFN- γ , TNF- α e IL-6 y niveles más bajos de IL-4 e IL-10, que aquellos en la fase indeterminada. Esto

promueve la diferenciación y proliferación de Th1 en las células T CD4⁺, lo que conduce a la activación de las respuestas antiparasitarias por las células T CD8⁺ y los macrófagos (Guedes *et al.*, 2010).

Dentro del compartimento de células T CD4⁺, tanto la inmunidad Th1 como la Th17 protegen contra la infección por *T. cruzi*, aunque también pueden contribuir a la inflamación y aumentar la gravedad de las lesiones cardíacas. Los niveles de IFN- γ , IL-2 e IL-10 pueden estar asociados a riesgos de arritmia y muerte súbita en pacientes con Chagas, y los niveles elevados de IL-2 se correlacionan más fuertemente con un alto riesgo de muerte (Bonney *et al.*, 2019).

La exposición a cepas de baja virulencia de *T. cruzi* desencadena la regulación positiva del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II en las células dendríticas, lo que conduce a una mayor producción de IL-6, IL-12 y TNF- α , que promueven la activación y proliferación de células Th y células T efectoras. Por el contrario, algunas cepas de parásitos logran altos niveles de virulencia que son capaces de estimular células dendríticas, para regular una baja la expresión de moléculas del MHC de clase I y II, al tiempo que aumentan la expresión de IL-10 y TGF- β (Gil-Jaramillo *et al.*, 2016).

Algunos mecanismos desconocidos modulan la producción de IL-2 por parte de las células T, hacia una concentración baja al principio de la enfermedad por mecanismos desconocidos, y permanece así durante la fase crónica de la enfermedad. La IL-2 activa las células NK, las células T CD4⁺, T CD8⁺ y puede ser necesaria para el desarrollo de la inmunidad; por tanto, la IL-2 puede ser una citoquina clave implicada en promover o regular negativamente las respuestas inmunitarias (Nihei *et al.*, 2021).

La infección por *T. cruzi* también desencadena la producción de una serie de autoanticuerpos potencialmente perjudiciales. Los anticuerpos de las personas con infección crónica pueden unirse a los miocitos cardíacos y causar daño a través de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, lo que conlleva a la liberación de creatinfosfoquinasa (Bonney *et al.*, 2011). Los altos niveles de autoanticuerpos que reaccionan de forma cruzada con la miosina cardíaca (anti-B13) y los receptores β -adrenérgicos (anti- β 1AR y anti-p2 β), están relacionados con la gravedad de la enfermedad en pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica, siendo más abundantes en aquellos que experimentan miocardiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca sistólica. Los autoanticuerpos también pueden contribuir a cambios patológicos en el corazón al interrumpir la conducción eléctrica (Rodeles *et al.*, 2016).

2.10 Diagnóstico de la enfermedad de Chagas

El diagnóstico en la fase aguda se puede realizar a través de técnicas moleculares como PCR (en suero sanguíneo, biopsias del hospedero o del material intestinal del triatomino) (Herrera *et al.*, 2021), o con métodos parasitológicos directos e indirectos. Entre los métodos directos, están la visualización del parásito por medio de frotis de sangre, la observación directa en sangre fresca (Álvarez *et al.*, 2018), y la observación directa del parásito en material intestinal del vector (Herrera *et al.*, 2021). El examen microscópico en tubos de microhematocrito a través del método rotatorio, se ha propuesto como la técnica de oro para el diagnóstico de enfermedad de Chagas aguda y congénita. (Álvarez *et al.*, 2018; Vera-Ku *et al.*, 2019). Los métodos indirectos incluyen xenodiagnóstico y cultivo celular (Álvarez *et al.*, 2018).

En la fase crónica de la enfermedad, los métodos más adecuados tienen fundamento serológico y dentro de estos tenemos ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunofluorescencia indirecta (IFI), hemaglutinación indirecta y Western blot (Álvarez *et al.*, 2018).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el uso de dos pruebas basadas en distintos principios inmunológicos, (hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta o ELISA) para el diagnóstico de la enfermedad, y si existiesen resultados discordantes, se debe realizar una tercera técnica (Otani *et al.*, 2009; WHO, 2002).

2.11 Tratamiento de la enfermedad de Chagas

A pesar que la enfermedad de Chagas fue descubierta hace más de 100 años, se han realizado pocos avances con respecto a la terapia farmacológica, probablemente porque al ser una enfermedad asociada a la pobreza, a las grandes industrias farmacéuticas no les ha interesado invertir en la misma (Cohen *et al.*, 2014). Actualmente el nifurtimox y benznidazol son los dos únicos fármacos que están disponibles para ser usados en la etapa de fase aguda; sin embargo, están siendo estudiadas nuevas moléculas cuya eficacia necesita ser comprobada para ser utilizadas oficialmente como nuevo fármaco para el tratamiento de esta enfermedad (Scarim *et al.*, 2018), y que no provoquen los efectos secundarios que el nifurtimox y benznidazol ocasionan. Se ha utilizado como tratamiento alternativo para la eliminación del parásito, nanopartículas de plata (nanoxilanos) que contienen 81% de xilano y 19% de plata; estas nanopartículas causaron la muerte de *T. cruzi* por inducción del mecanismo de necrosis (Brito *et al.*, 2020).

2.12 Otras enfermedades transmitidas por vectores

Las enfermedades transmitidas por vectores (ETV), constituyen un grupo de enfermedades cuyos agentes etiológicos son propagados por una gran variedad de insectos hematófagos, como mosquitos, flebotomos, garrapatas y triatomos. Estas enfermedades por lo general están ligadas a la pobreza, donde las malas condiciones socioeconómicas, perpetúan la enfermedad. Además, factores como el cambio climático, la agricultura y ganadería intensiva, los movimientos migratorios de personas y la deforestación, han ocasionado que estas patologías se propaguen en zonas urbanas, periurbanas y rurales (WHO, 2020).

Se ha señalado al efecto de dilución como un mecanismo de dispersión de patógenos, inhibida frente a la biodiversidad de hospedadores (Keesing *et al.*, 2010). De manera que las medidas de preservación de los ecosistemas, permiten que ciertos patógenos se mantengan limitados a ciertos hospederos selváticos. Adicionalmente, se debe considerar la posibilidad de que los perros se pueden convertir en reservorios domésticos de enfermedades zoonóticas, y por lo tanto también en centinelas de ETV. Un diagnóstico apropiado y oportuno de estas patologías en esta especie, permitirán resolver y tomar medidas adecuadas de control, para evitar la propagación a los humanos.

En la década de los 50 y 60, en algunos países se logró detener la propagación de muchas de estas enfermedades, a través del control de vectores; esto ocasionó que las ETV, dejaran de ser de importancia para la salud pública, lo que a su vez provocó un nuevo rebrote de las enfermedades y sus vectores. Actualmente, el control de vectores es una de las medidas más eficaces, para contener estas patologías (WHO, 2020); sin embargo, esta medida debe

complementarse con el control de la enfermedad en los perros (Castillo-Neyra *et al.*, 2015). Varias ETV afectan a los perros de distintas zonas en Ecuador, entre ellas están: la enfermedad de Chagas, ehrlichiosis, anaplasmosis y dirofilariosis (Adams *et al.*, 2016; Morán-Loor, 2006; Rivadeneira *et al.*, 2021).

La coinfección con múltiples ETV en perros, podría ser más frecuente en áreas endémicas (Bowman *et al.*, 2009). Un estudio serológico retrospectivo realizado en América del Norte y el Caribe, detectó exposición a cinco patógenos transmitidos por vectores en perros (Quorollo *et al.*, 2014). Yancey *et al.* (2014) identificaron que el 16,5% de las muestras de perros de Estados Unidos eran seropositivas para más de un patógeno. En Argelia, las coinfecciones por *A. phagocytophilum* fueron más altas en perros callejeros que en perros que poseían tutores (Azzag *et al.*, 2015). La coinfección con *Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*) y *A. phagocytophilum* se describe con frecuencia en perros, probablemente porque los patógenos son transmitidos por garrapatas Ixodides y se mantienen en ciclos selváticos con el mismo reservorio de roedores (El-Hamiani *et al.*, 2021).

2.12.1 Ehrlichiosis

El agente causal de la ehrlichiosis es *Ehrlichia* spp., una bacteria intracelular obligada que afecta principalmente a células hematopoyéticas. En perros, *Ehrlichia canis* (*E. canis*) provoca la ehrlichiosis monocítica canina, que fue inicialmente descrita en 1935 (Donatien y Lestoquard, 1935), teniendo como principal vector biológico a la garrapata marrón del perro, *Rhipicephalus sanguineus* (*R. sanguineus*) (Dantas-Torres, 2010). La infección puede presentarse en forma aguda, subclínica o crónica. Muchos perros en etapa aguda, logran

sobreponerse, pero otros desarrollan una etapa crónica que podría tener consecuencias irreversibles a nivel medular debido a la presencia de pancitopenia (Mylonakis *et al.*, 2019). Los signos clínicos generales incluyen fiebre súbita, malestar general, mialgias y artralgias (Sainz *et al.*, 2015).

La ehrlichiosis es una enfermedad zoonótica que ha sido detectada en humanos (Echeverri *et al.*, 2021) y en bancos de sangre (Bouza *et al.*, 2017). En perros de América los rangos de prevalencia fluctúan entre el 5.2% al 56.75%, y se ha reportado en Estados Unidos, Canadá (Evason *et al.*, 2019; Gettings *et al.*, 2020; Little *et al.*, 2021), México (Ojeda-Chi *et al.*, 2019), Paraguay (Pérez *et al.*, 2019), Colombia (Pesapane *et al.*, 2019) y en Ecuador (Adams *et al.*, 2016; Morán-Loor, 2006; Rivadeneira *et al.*, 2021).

2.12.2 Anaplasmosis

Anaplasma spp., es una bacteria intracelular obligada que produce la anaplasmosis, enfermedad que afecta a perros y humanos, y que invade principalmente leucocitos y plaquetas (Dolz *et al.*, 2013). En humanos produce la anaplasmosis granulocítica humana (Ismail *et al.*, 2010); y en perros, *A. phagocytophilum* y *A. platys*, provocan la anaplasmosis granulocítica canina y la anaplasmosis trombocítica respectivamente (Sainz *et al.*, 2015). Las garrapatas del género *Ixodes* y *Amblyomma*, son consideradas los vectores de *Anaplasma phagocytophilum*. Los signos clínicos de estas enfermedades consisten en fiebre, letargia, inapetencia, vómitos, diarrea, y los cambios hematológicos y bioquímicos incluyen anemia, trombocitopenia, leucopenia, aumento de enzimas hepáticas, hipoalbuminemia e hipergammaglobulinemia (Dolz *et al.*, 2013; Sainz *et al.*, 2015).

A. phagocytophilum infecta y sobrevive dentro de los polimorfonucleares neutrófilos al evadir la respuesta inmunitaria específica. Además, la compleja interacción entre la bacteria y el sistema inmunológico del hospedador infectado contribuye a inducir lesiones inflamatorias. Pueden producirse coinfecciones con otros patógenos transmitidos por garrapatas, especialmente con *B. burgdorferi*, lo que complica la presentación clínica, el diagnóstico y la respuesta al tratamiento. Debido a su proximidad a los humanos, los perros son potenciales centinelas de la transmisión de patógenos transmitidos por vectores (El-Hamiani *et al.*, 2021).

Puede identificarse una fase aguda con signos clínicos que aparecen durante la fase bacteriémica y con una duración variable de 1 a 14 días (promedio de 3 días) (Eberts *et al.*, 2011). La infección crónica por *A. phagocytophilum* no se ha demostrado en perros infectados naturalmente (Hovius *et al.*, 2018); por el contrario, los estudios experimentales mostraron una infección persistente en perros durante más de varios meses hasta casi un año (Contreras *et al.*, 2018; Nair *et al.*, 2016). La prevalencia de la enfermedad en perros de Latinoamérica y Norteamérica, fluctúa entre 7.3% a 22% (Adams *et al.*, 2016; Little *et al.*, 2021; Pérez *et al.*, 2019; Pesapane *et al.*, 2019). En Estados Unidos se ha reportado un aumento de casos de esta enfermedad de 1.4 a 3.0 casos/millón de personas (Dahlgren *et al.*, 2011).

2.12.3 Dirofilariosis

La dirofilariosis, es una enfermedad de interés en salud pública muy frecuente en América, que se transmite por diferentes especies de mosquitos (*Culex* spp., *Aedes* spp., y *Anopheles*

spp., entre otros) (McCall *et al.*, 2008). El agente causal de la dirofilariosis canina en América es *Dirofilaria immitis* (*D. immitis*), un gusano que se aloja en las arterias pulmonares y el corazón de las mascotas afectadas, causando enfermedad pulmonar severa, insuficiencia cardíaca y daños en otros órganos del cuerpo (Carretón *et al.*, 2014). En humanos puede originar nódulos en los pulmones (Dantas-Torres y Otranto, 2013) y es una enfermedad que debe ser considerada en viajeros, debido a los riesgos de contagio que tienen al llegar a países donde se reporta la enfermedad (Diaz, 2015).

Los cambios inflamatorios asociados con la enfermedad aparecen cuando los parásitos mueren, ya sea de forma natural o como consecuencia de un tratamiento farmacológico específico. El reciente "redescubrimiento" de la presencia de endosimbiontes bacterianos pertenecientes al género *Wolbachia* con *D. immitis*, ha llevado a un cambio revolucionario en la interpretación de los estudios relacionados con los gusanos filariales y en particular de la patogenia de la infección (Sironi *et al.*, 1995). Existe una relación entre la intensidad de la respuesta humoral a *D. immitis* y el estado parasitológico de perros con dirofilariosis. Marcos-Atxutegi *et al.* (2004) realizaron una investigación en perros infectados de forma natural y reportaron que los perros con microfilaremia presentan una mayor respuesta de anticuerpos IgG frente a antígenos de *D. immitis* y *Wolbachia* que en infecciones caninas sin microfilarias.

La prevalencia de la dirofilariosis en perros en Latinoamérica, fluctúa entre 1.63% y 60% (Maggi y Kramer, 2019). En algunos países del mundo la prevalencia ha disminuido, por ejemplo en el norte de Italia disminuyó del > 40% (Guerrero *et al.*, 1989) a 8% (Gettings *et*

al., 2020); mientras que en las islas Canarias (España) la disminución fue del 30% al 19% (Montoya-Alonso *et al.*, 2010) y en Japón del 46% al 23% (Oi *et al.*, 2014).

2.12.4 Enfermedad de Lyme

La enfermedad de Lyme o borreliosis es una enfermedad zoonótica causada por *B. burgdorferi*, transmitida por la garrapata *Ixodes scapularis*, siendo las principales afectaciones poliartritis, insuficiencia renal y arritmia cardíaca (Summers *et al.*, 2005). La artritis es consecuencia de una respuesta inmune proinflamatoria exacerbada durante la fase de infección, que persiste en el período pos-infeccioso. Esta respuesta se caracteriza por altas cantidades de IFN - γ y cantidades inadecuadas de la citoquina antiinflamatoria IL-10. Las consecuencias de esta respuesta proinflamatoria desregulada en la membrana sinovial incluyen reparación tisular alterada, daño vascular, procesos autoinmunes y citotóxicos (Lochhead *et al.*, 2021). En la enfermedad de Lyme, existe una mayor permeabilidad vascular, que conlleva a una mayor respuesta inflamatoria y migración de *B. burgdorferi*, lo que da como resultado más complicaciones en las manifestaciones clínicas (Grab *et al.*, 2007).

2.12.5 Diagnóstico de ETV

El diagnóstico de ehrlichiosis y anaplasmosis, se puede realizar a través de la observación de mórulas en frotis de sangre periférica. Es una técnica económica, pero la visualización de las mórulas, no siempre es fácil y pueden ser confundidas con otro tipo de inclusiones. También existen pruebas serológicas, pero se debe tener en cuenta que los anticuerpos se presentan después de dos semanas del inicio de los signos clínicos y éstos pueden durar hasta 8 meses.

Otras opciones usadas para el diagnóstico de la ehrlichiosis y anaplasmosis, son las técnicas moleculares como PCR, que detecta el ADN de la bacteria y mediante la secuenciación, se puede determinar la especie (Dolz *et al.*, 2013; Sainz *et al.*, 2015).

Para el diagnóstico de la dirofilariasis en perros, se recomienda realizar pruebas anualmente, especialmente en zonas endémicas de la enfermedad. Entre las pruebas más utilizadas se encuentra el test de Knott, que detecta las microfilarias, y las pruebas de antígenos (ELISA e inmunocromatografía), que detectan una proteína liberada por la hembra adulta de *D. immitis* (Society, 2018). Una de las limitaciones de algunas pruebas serológicas radica en la posible reactividad cruzada entre los antígenos de *D. immitis* y de otros parásitos como áscaridos y anquilostomas (Ciucă *et al.*, 2016). En humanos se ha informado que la mayoría de las personas expuestas a la infección por *D. immitis* producen anticuerpos contra la proteína de superficie de *Wolbachia*. Dado que *Wolbachia* está presente en muchas ocasiones en infestaciones con *D. immitis*, la presencia de anticuerpos contra la proteína de superficie de *Wolbachia*, sería muy sugestiva de exposición a *Dirofilaria* spp. en humanos que viven en áreas endémicas (Cabrera *et al.*, 2018). También se pueden utilizar técnicas moleculares como PCR, que detecta el ADN del *D. immitis* (Tahir *et al.*, 2017). Otros métodos complementarios son los estudios radiográficos, que permiten visualizar alteraciones cardiopulmonares, y la ecocardiografía que permite observar las dirofilarias adultas y las patologías cardíacas (Society, 2018).

El diagnóstico de enfermedad de Lyme, puede confirmarse mediante cultivo o PCR; sin embargo, la recuperación de los microorganismos por cultivo se ve afectada por la baja sensibilidad y la necesidad de un medio de cultivo especializado y períodos de incubación

prolongados (Speck *et al.*, 2007). Además, la detección del ADN de *B. burgdorferi* mediante PCR se ve obstaculizada por el bajo número de espiroquetas en las muestras clínicas. Por lo tanto, proporcionar evidencia indirecta de infección mediante la detección de anticuerpos formados contra las espiroquetas es, hasta la fecha, el método de laboratorio más común para detectar la enfermedad de Lyme en perros (Oldenburg *et al.*, 2020). La evaluación de ELISA basado en diferentes antígenos mostraron una sensibilidad y especificidad de 94.4% y 99.6% respectivamente, para el antígeno C6 (Levy *et al.*, 2002), mientras que otro grupo de investigadores informó una sensibilidad y especificidad de 98.6% y 91.9% respectivamente, para ELISA con péptidos sintéticos (Jacobson *et al.*, 1996).

2.12 Proteínas de fase aguda

La respuesta de fase aguda (RFA) es un proceso fisiológico que se produce como mecanismo de defensa de un organismo ante un daño o lesión y en el que inicialmente participan células como macrófagos, monocitos y células dendríticas. Esta respuesta forma parte del sistema inmunitario innato, en el que también está involucrada la formación de citocinas proinflamatorias, las cuales estimulan los hepatocitos, para producir proteínas de fase aguda (Cray, 2012). La presencia de citocinas, también producen una serie de cambios a nivel nervioso y endócrino, que dan como resultado la producción de glucocorticoides y de leucocitos (Borghetti *et al.*, 2009).

Las proteínas de fase aguda (PFA) son proteínas séricas que se presentan como respuesta de fase aguda ante un proceso inflamatorio (Baumann y Gauldie, 1994); las variaciones de las concentraciones de estas proteínas en la sangre, se producen por diversas causas como

infecciones, inflamaciones, estrés, desórdenes inmunológicos, procesos neoplásicos, traumatismos e infecciones parasitarias (Cray, 2012).

La síntesis de las PFA se da principalmente en el hígado y su producción está controlada por las citocinas (IL1, IL6 y TNF- α); sin embargo, se ha encontrado que algunos órganos como por ejemplo los pulmones, intestinos y el tejido adiposo, también pueden sintetizar algunas de estas proteínas (Kaneko *et al.*, 2008). En medicina veterinaria su cuantificación ha permitido obtener información útil para la detección de enfermedades subclínicas, el diagnóstico, monitorización de niveles de estrés, seguimiento de procesos inflamatorios crónicos y pronóstico de varias enfermedades (Cerón *et al.*, 2008; Cray, 2012; Eckersall y Schmidt, 2014).

Las PFA se clasifican en positivas y negativas, según la respuesta ante un estímulo. Entre las PFA positivas tenemos a la proteína C reactiva (CRP), haptoglobina (Hp), amiloide A sérico (SAA), alfa-1 glicoproteína ácida (AGP) y ceruloplasmina, cuyos valores aumentan al producirse el estímulo; y entre las PFA negativas tenemos la albumina, paraoxonasa-1 (PON-1), transferrina, cuyos valores disminuyen después de un estímulo (Cerón *et al.*, 2005; Heinrich *et al.*, 1990).

Adicionalmente, las PFA se dividen en función de la magnitud del aumento en principales, moderadas y de respuesta menor (Murata *et al.*, 2004). Las PFA principales, son aquellas que pueden aumentar de 10 a 1000 veces su valor dentro de las 24 a 48 horas del estímulo; las PFA moderadas pueden aumentar de 5 a 10 veces, después de tres días del estímulo y las PFA de respuesta menor, son aquellas que aumentan a menos del doble (Cray, 2012). En el

perro, la CRP y SAA, son proteínas de fase aguda mayores ya que aumentan hasta 1000 veces su concentración normal, mientras que la ceruloplasmina, AGP, fibrinógeno, y Hp son proteínas que aumentan su concentración 2 o 3 veces su valor (Cray, 2012; Martínez-Subiela *et al.*, 2001).

2.12.1 Proteína C Reactiva

Esta proteína fue llamada así por su capacidad para unirse al polisacárido C de *Pneumococcus pneumoniae* (Pepys, 1981). Su principal función es defender al hospedero contra los patógenos, eliminando células apoptóticas y necróticas, protegiéndolo contra la inflamación y el daño tisular (Volanakis, 2001). La elevación de los valores de CRP, ha sido asociada con mayores probabilidades de mortalidad, aumento del tiempo de hospitalización y es considerada una de las principales PFA en perros (Cray, 2012). Se ha observado aumento de CRP en suero sanguíneo de perros, en infecciones ocasionadas por *Bordetella bronchiseptica*, *E. canis*, *Escherichia coli* y en enfermedades como babesiosis, leishmaniosis, leptospirosis, parvovirus y tripanosomiasis (Cerón *et al.*, 2005).

2.12.2 Haptoglobina

La Hp es una PFA que se encuentra en el plasma de todos los mamíferos, se une a la hemoglobina libre e inhibe la actividad oxidativa en lípidos y proteínas, protegiendo a los tejidos de este daño. La síntesis de Hp no sólo se realiza en el hígado, sino también en los pulmones y adipocitos (Dobryszcka, 1997; Friedrichs *et al.*, 1995). En perros es considerada una PFA moderada (Conner *et al.*, 1988) y puede usarse como marcador de diagnóstico/pronóstico de inflamación (Martínez-Subiela *et al.*, 2002). La Hp puede elevarse

por la acción de glucocorticoides y por esta razón puede utilizarse como prueba de tamizaje para el síndrome de Cushing (Martínez-Subiela *et al.*, 2004).

2.12. 3 Ferritina

Es una proteína que almacena el hierro intracelular y sus concentraciones séricas no solo varían por las reservas de hierro en el organismo, sino también por afectaciones clínicas patológicas presentes en humanos y en animales (Eijk, 1998; Martínez-Subiela *et al.*, 2014b).

2.12.4 Paraoxonasa-1

Es una PFA sintetizada en el hígado y su función principal es la disminución de productos resultantes de la peroxidación de lípidos (Mackness *et al.*, 1991). Desempeña un papel importante en la respuesta inflamatoria vascular (Martinelli *et al.*, 2013), actúa en procesos contra el envenenamiento por organofosforados (James, 2006), y también es usado como biomarcador de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, inflamación y enfermedades hepáticas (Cerón *et al.*, 2014).

2.13 Estudio de las PFA en enfermedades transmitidas por vectores en perros

Los perros son considerados centinelas de la enfermedad de Chagas y constituyen el modelo biológico más adecuado para el estudio de esta patología en el hombre (de Lana y Giunchetti, 2021; Guedes *et al.*, 2012). En humanos se han estudiado las PFA en esta enfermedad (López *et al.*, 2006; Medrano-Mercado *et al.*, 1996); sin embargo, en perros solamente se ha estudiado en infección por *Trypanosoma brucei* (Ndung'u *et al.*, 1991).

En la ehrlichiosis monocítica canina, se producen cambios significativos de la CRP, Hp, ferritina y PON-1 (Karnezi *et al.*, 2016). En la ehrlichiosis canina, la CRP, AGP, Hp, sirven como marcadores útiles para establecer en qué fase clínica de la enfermedad está el paciente y permiten evaluar el daño producido por *E. canis* (Mylonakis *et al.*, 2011; Rikihisa *et al.*, 1994).

En la dirofilariosis, la CRP y Hp, podrían funcionar como biomarcadores tempranos de la respuesta inflamatoria (Carretón *et al.*, 2017); es así que la CRP muestra un aumento significativo, mientras que la albúmina y la PON-1 muestran una disminución en su concentración (Méndez *et al.*, 2014). La respuesta al tratamiento de esta enfermedad también ha sido evaluada, mostrando una disminución de CRP y Hp en perros con respuesta favorable al tratamiento (Méndez *et al.*, 2015).

En la leishmaniosis ocurre un aumento en la concentración de CRP, Hp y ferritina y la disminución de PON-1 y albúmina (Martínez-Subiela *et al.*, 2014b; Martínez-Subiela *et al.*, 2011; Martínez-Subiela *et al.*, 2002); además se han usado las PFA para evaluar la respuesta al tratamiento (Martínez-Subiela *et al.*, 2003; Martínez-Subiela *et al.*, 2016).

En la babesiosis canina, causada por *Babesia canis*, se produce un aumento en la concentración de CRP, SAA y disminución de PON-1. Adicionalmente, estas proteínas son usadas para el seguimiento de una respuesta al tratamiento (Matijatko *et al.*, 2007; Milanović *et al.*, 2020).

2.14 Marcadores de estrés oxidativo

Se puede definir al estrés oxidativo como una alteración del equilibrio prooxidante – antioxidante, a favor del primero, en células y tejidos. El estrés oxidativo podría ser consecuencia de la disminución de las enzimas antioxidantes, de los niveles antioxidantes o de los defectos de la maquinaria antioxidante para expresar genes antioxidantes (Sies, 2015). Actualmente se define al estrés oxidativo, como una interrupción en la señalización y el control redox (reacción de oxidación-reducción) (Apak *et al.*, 2018).

Los prooxidantes son compuestos de origen endógeno o exógenos, que pueden provocar daño oxidativo a macromoléculas biológicas involucradas en diferentes enfermedades, entre las cuales tenemos a las especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Kehrer y Klotz, 2015; Rubio y Cerón, 2021). Los antioxidantes son proteínas, enzimas o moléculas de menor tamaño, naturales o sintéticas, que inhiben o retardan el daño oxidativo causado por oxidantes fisiológicos (ROS, RNS y radicales libres), y entre estos tenemos vitaminas como el ácido ascórbico, α -tocoferol y enzimas como glutatión peroxidasa y catalasa (Apak *et al.*, 2018). Un biomarcador de estrés oxidativo se define como cualquier sustancia, estructura, o proceso que puede medirse en el cuerpo, que podría predecir el resultado de una enfermedad (WHO, 2001).

Uno de los métodos o ensayos individuales utilizados para evaluar el estrés oxidativo lo constituye la medición de tiol libre en suero, y su nivel circulante puede reflejar el estado de redox sistémico, siendo susceptibles de modulación terapéutica (Koning *et al.*, 2016).

TAC es un ensayo global que determina el balance entre los antioxidantes y los oxidantes en las muestras biológicas y a su vez se puede medir a través de diferentes ensayos. Uno de estos

ensayos es CUPRAC, que mide la facultad de los antioxidantes de una muestra de suero, en presencia de un agente quelante, de reducir el Cu^{2+} a Cu^{1+} , formando un complejo estable.

El estrés oxidativo también está implicado en el desarrollo de insuficiencia cardíaca, por lo que la identificación de cambios en biomarcadores de estrés oxidativo involucrado en la enfermedad de Chagas podría proporcionar mayor comprensión del daño cardíaco en pacientes crónicos chagásicos (Wen *et al.*, 2014). El empleo de estas moléculas indicadoras de estrés oxidativo involucradas en los procesos de infección constituyen una alternativa para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

2.14.1 Estudio de marcadores de estrés oxidativos en perros

Bottari *et al.* (2016) realizaron un estudio en perros infectados naturalmente con *E. canis*, donde se evaluó el perfil oxidativo de productos de oxidación avanzada de proteínas (AOPP), y la capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP), encontrándose elevación del estado oxidante, especialmente en fase aguda, ocurriendo lo contrario en la fase subclínica. En otro estudio en perros infectados naturalmente con *E. canis*, se determinaron marcadores de estrés oxidativo en fase clínica y subclínica de la enfermedad y se observó lo siguiente: disminución significativa de CUPRAC, FRAP y tiol en ehrlichiosis subclínica en comparación con perros sanos; en cambio las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y oxidación ferrosa en xilenol naranja (FOX) no mostraron diferencias significativas; además, se observó un aumento significativo de ROS en perros con ehrlichiosis clínica y subclínica en comparación con perros sanos (Rubio *et al.*, 2017c).

Se han realizado varios estudios relacionados con biomarcadores de estrés oxidativo en otras enfermedades. En perros con enfermedad inflamatoria intestinal idiopática, se evaluó un

panel de biomarcadores antioxidantes, donde se pudo observar una disminución de TAC (medida por los ensayos TEAC, CUPRAC) y tiol, mientras que el valor de FRAP no disminuyó (Rubio *et al.*, 2017b). En un estudio comparativo entre perros atópicos y perros sanos, se encontró que los valores de TEAC, CUPRAC y tiol fueron más bajos en perros atópicos, mientras que los valores de FRAP y FOX aumentaron significativamente (Almela *et al.*, 2018). Los perros con leishmaniosis sintomática presentaron valores más bajos de FRAP comparados con perros sanos (Rubio *et al.*, 2017a). En perros con dirofilariosis, no se encontraron variaciones en la concentración de glutatión peroxidasa y TAC al ser comparados con perros sanos (Carretón *et al.*, 2017).

III. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a la OMS la enfermedad de Chagas, cuyos vectores son los triatominos, es considerada una enfermedad desatendida y asociada a la pobreza, especialmente en Latinoamérica. La migración y otros factores como la donación de sangre y el transplante de órganos, han permitido que países no endémicos, detecten la enfermedad en su población.

A nivel mundial existen personas que están infectadas por *T. cruzi*, y a pesar de los esfuerzos de organismos internacionales como la OMS, en cooperación con países del Cono Sur, Centroamérica y la Comunidad Andina, por controlar la enfermedad, aún persiste en algunos lugares. Uno de los principales problemas para controlar la enfermedad, reside en que en la transmisión y propagación interactúan varias especies de triatominos y varios hospederos, tanto en el ciclo silvestre, como en el doméstico, en el cual el perro es el principal reservorio.

Actualmente se han desarrollado varios mecanismos para prevenir y controlar la enfermedad entre los cuales se encuentran el control de vectores, cribado universal en los bancos de sangre, cribado de órganos donados para transplantes, desarrollo de actividades de información a personas en riesgo y que estas tengan acceso al diagnóstico, siendo este último aspecto, un mecanismo que detecta la enfermedad cuando los signos clínicos están presentes y ausentes. El diagnóstico temprano en humanos y perros, y el tratamiento oportuno de personas con riesgo de contraer la enfermedad, eventualmente permitirá disminuir los daños provocados por *T. cruzi*.

Las proteínas de fase aguda y los marcadores de estrés oxidativo, son moléculas séricas que aumentan o disminuyen su valor, ante un proceso infeccioso o inflamatorio, en fase clínica y

subclínica. El estudio de las proteínas y marcadores de estrés oxidativo, ha sido aplicado tanto en medicina humana como en veterinaria, en una gran diversidad de enfermedades, pero se requiere ampliar más las investigaciones en la enfermedad de Chagas sola o en coinfección con otras ETV. Conocer esta información en pacientes infectados, probablemente permitirá prevenir el daño producido por la respuesta inflamatoria de la enfermedad en la fase aguda, reducir el costo médico y evitar la disminución de productividad que implica esta enfermedad principalmente en la fase crónica.

El estudio de las PFA y marcadores de estrés oxidativo en la enfermedad de Chagas con y sin coinfección con otras ETV, ayudará al diagnóstico de las mismas y permitirá implementar medidas de control, que logren disminuir el impacto que tiene esta enfermedad en la salud pública y en la economía de las comunidades afectadas.

IV. HIPÓTESIS

La medición de los niveles de las proteínas de fase aguda y marcadores de estrés oxidativo en perros infectados naturalmente con *Trypanosoma cruzi*, con y sin coinfección con *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi* y *Dirofilaria immitis* ayudará en el diagnóstico y prevención de la enfermedad de Chagas.

V. OBJETIVOS

General

Determinar las concentraciones de proteínas de fase aguda y marcadores de estrés oxidativo en perros infectados naturalmente con *Trypanosoma cruzi*, con y sin coinfección con *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi* y *Dirofilaria immitis*.

Específicos

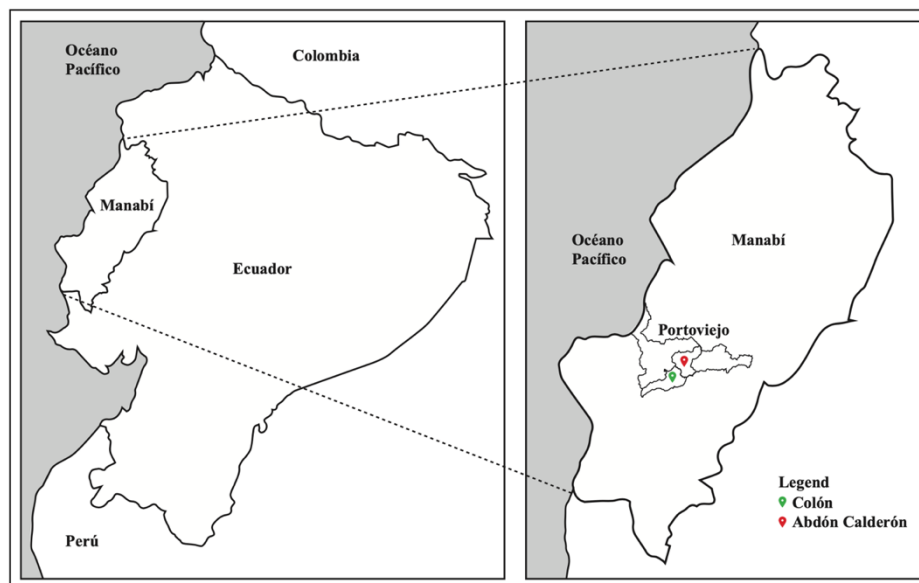
1. Determinar la seroreactividad frente a *Trypanosoma cruzi* en perros de las comunidades de Colón y Abdón Calderón, en Portoviejo, Ecuador.
2. Establecer la frecuencia de coinfección de enfermedades transmitidas por vectores en perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* con *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi* y *Dirofilaria immitis*, en las comunidades de Colón y Abdón Calderón, en Portoviejo, Ecuador.
3. Determinar las concentraciones de proteínas de fase aguda y marcadores de estrés oxidativo en perros con infección natural por *Trypanosoma cruzi* con o sin coinfección con *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi* y *Dirofilaria immitis*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área de estudio

El presente estudio fue realizado en las comunidades de Colón y Abdón Calderón del cantón Portoviejo. La ciudad de Portoviejo está ubicada en la provincia de Manabí, en la zona costera de Ecuador (Figura 1). Es una región agrícola, que posee un clima cálido, con dos estaciones: invierno (época de lluvias) y verano (época seca), con un promedio de temperatura de 24°C, humedad relativa de 76.2% y precipitaciones anuales que fluctúan entre 500 y 823 mm (Gobierno Autónomo Descentralizado del cantón Portoviejo, 2011).

Figura 1. Área de estudio en la zona costera de Ecuador.



Nota. Ubicación de las comunidades de Colón y Abdón Calderón, en Portoviejo, Manabí. Ecuador.

6.2 Población de estudio

La provincia de Manabí es una zona endémica de la enfermedad de Chagas en humanos, por lo cual el Ministerio de Salud Pública, continuamente lleva a cabo campañas de prevención, a través del control de vectores, con la finalidad de reducir la incidencia de esta enfermedad (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2019).

Se recolectaron un total de 144 muestras de suero sanguíneo de perros de las comunidades Colón (84) y Abdón Calderón (60), para evaluar la seroreactividad contra *T. cruzi*. El muestreo fue realizado por conveniencia y el único criterio de inclusión fue tener el consentimiento de los tutores de las mascotas para la toma de la muestra sanguínea.

En un inicio de la investigación se tenía previsto detectar solamente la seroreactividad contra *T. cruzi*; sin embargo, en el primer muestreo en Colón, se sospechó de la presencia de otras ETV. Tres meses después se regresó al lugar de estudio para recolectar muestras de los perros seroreactivos a *T. cruzi* y estudiar estas otras enfermedades. No todos los perros seroreactivos a *T. cruzi* fueron localizados en la segunda visita.

Para el estudio de las concentraciones de PFA y marcadores de estrés oxidativo se utilizaron 30 muestras sanguíneas procedentes de Colón y 55 procedentes de Abdón Calderón.

6.3 Recolección de muestras sanguíneas

Se realizó el rasurado y desinfección de la zona de la vena yugular para extraer sangre. Se recolectó 1 mL de sangre para hemograma y 5 mL de sangre para bioquímica sanguínea. Para obtener el suero sanguíneo se procedió a centrifugar la muestra a 1500 xg durante 10 minutos y se congeló a -80°C hasta su procesamiento.

6.4 Pruebas serológicas para la detección de anticuerpos anti *T. cruzi*

Para la detección de anticuerpos frente a *T. cruzi*, se utilizaron dos pruebas de ELISA (Accutrack, Laboratorios Lemos S.R.L. Buenos Aires, Argentina): Chagas Recombinante microELISA Test (proteína recombinante) y Chagas microELISA Test System (trypomastigotes lisados). El proceso fue realizado siguiendo las especificaciones del fabricante, con modificaciones para su uso en perros (Aparicio *et al.*, 2011).

Las muestras se diluyeron 1/100 en una solución que contenía PBS 1X – 0.05% Tween-20 y leche descremada al 3%; 200 µL de estas muestras se transfirieron por duplicado a una placa de 96 pozos. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37°C y posteriormente se dejaron a temperatura ambiente por 20 minutos. Las placas se lavaron 6 veces, con 300 µL de solución buffer y se agregaron 100 µL de conjugado peroxidasa-anticuerpo de inmunoglobulinas (IgG) de perro (Bethyl Laboratories Inc., Texas, Estados Unidos), diluido en buffer (1:5000). Las placas se incubaron por 30 minutos a 37°C y se conservaron a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Posteriormente se agregaron en cada pozo 100 µL de solución de TMB (Kirkegaard & Perry Labs) y peróxido de hidrógeno previamente homogenizado. Las muestras fueron incubadas durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se detuvo la reacción con 100 µL de ácido sulfúrico (1 M). La lectura se realizó a 450 nm usando el lector Epoch microplate reader and Gene 5 (v.2.0) software (Biotek, VT, USA). El punto de corte fue calculado como el promedio de las lecturas de los negativos más 0.1 de densidad óptica. El kit de diagnóstico recombinante establece una zona gris (donde la prueba no se puede considerar reactiva ni no

reactiva) y corresponde a la DO 450 nm \pm 10% por arriba y por abajo del punto de corte. Esta metodología fue usada en ambas pruebas de ELISA.

6.5 Detección de otras enfermedades transmitidas por vectores.

Los sueros sanguíneos fueron evaluados con el kit SNAP 4Dx Plus, que detecta anticuerpos frente a *E. canis*, *E. ewingii*, *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *B. burgdorferi* y antígenos contra *D. immitis*. Las muestras se conservaron en congelación y antes de iniciar el procesamiento se mantuvieron a temperatura ambiente (18-25°C) durante 30 minutos y posteriormente se centrifugaron. Con la pipeta del kit, se vertieron 3 gotas de la muestra en un tubo de ensayo y se añadieron 4 gotas de conjugado y se homogenizó invirtiendo el tubo 5 veces. El SNAP 4Dx Plus se colocó sobre una superficie horizontal y en el pocillo del kit se añadió el contenido del tubo de ensayo. Una vez que la muestra fluyó por la ventana de resultados y en cuanto apareció el color en el círculo de activación se procedió a presionar el activador con firmeza para que quede nivelado con el cuerpo del dispositivo. Los resultados fueron leídos después de 8 minutos.

6. 6 Determinación de la concentración de proteínas de fase aguda

Para determinar el perfil de PFA se utilizaron 85 muestras de suero sanguíneo. Las PFA que se evaluaron fueron: proteína C reactiva, haptoglobina, ferritina y paraoxanasa-1.

Para la determinación de CRP se utilizó un ensayo inmunoturbidimétrico (CRP OSR6147 Olympus Life and Material Science Europe GmbH, Hamburg, Germany) que usa anticuerpos de cabra antiproteína C reactiva humana, previamente validado en perros (Muñoz-Prieto *et al.*, 2017).

Las concentraciones de Hp se midieron utilizando un método colorimétrico comercial validado en perros, que se fundamenta en la unión de esta proteína a la hemoglobina (Tridelta Phase range haptoglobin kit; Tridelta Development Ltd) (Martínez-Subiela y Cerón, 2005).

Las concentraciones de ferritina se midieron utilizando un ensayo inmuniturbidimétrico que utiliza anticuerpos policlonales (Tina-quant Ferritin, Boehringer Mannheim). Este ensayo fue validado previamente para ser usado en perros (Martínez-Subiela *et al.*, 2014b).

Para la determinación de la concentración sérica de PON-1 se utilizó un método descrito por Tvarijonaviciute en 2012 (Tvarijonaviciute *et al.*, 2012). Para la determinación final de todas las PFA se usó un analizador automático de bioquímica (Olympus AU600; Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, Germany).

Se formaron los siguientes grupos:

Grupo 1. Perros seroreactivos a *T. cruzi* (n: 45). Este grupo se subdividió en dos subgrupos 1a (n: 22) sin coinfección y 1b (n: 23) con coinfección.

Grupo 2. Perros seronegativos a *T. cruzi* (n: 40).

6.7 Determinación de la concentración de marcadores de estrés oxidativo

Para medir las concentraciones séricas de tiol se utilizó un método espectrofotométrico modificado (Costa *et al.*, 2006; Jocelyn, 1987). Para determinar las concentraciones de CUPRAC se utilizó un método automatizado previamente validado en perros, que utiliza como quelante la sal disódica del ácido batocuproindisulfónico (Rubio *et al.*, 2016c). Las concentraciones de TAC fueron evaluadas utilizando un método espectrofotométrico validado para ser usado en perros (Rubio *et al.*, 2016a).

6.8 Análisis estadístico

Se determinó que los datos numéricos de las PFA poseen una distribución no paramétrica, utilizando la prueba omnibus D'Agostino & Pearson. Se realizó la prueba de ANOVA de una vía, junto con la prueba LSD de Fisher no corregida, para comparar los valores de las PFA obtenidas en perros seronegativos a *T. cruzi* (grupo 2) frente a los perros seroreactivos a *T. cruzi* con (grupo 1b) y sin coinfecciones (grupo 1a).

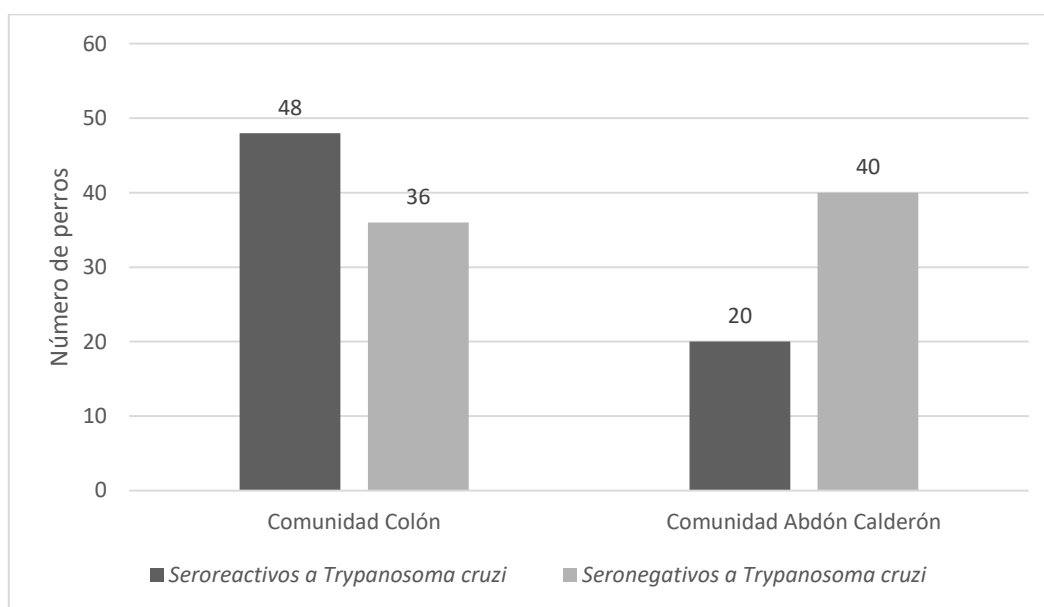
Se utilizó la prueba t de Student para datos no pareados para comparar las concentraciones de PFA entre perros seroreactivos a *T. cruzi* (grupo 1) vs perros seronegativos a *T. cruzi* (grupo 2) y también para comparar los perros seroreactivos a *T. cruzi*, con (grupo 1a) y sin coinfección (grupo 1b). Un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., CA, USA).

VII. RESULTADOS

7.1 Detección de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi*

De las 84 muestras sanguíneas de perros procedentes de la comunidad Colón, 48 (57.14%) fueron seroreactivas a *T. cruzi*. De las 60 muestras procedentes de la comunidad Abdón Calderón, 20 (33.33%) fueron seroreactivas a *T. cruzi* (Figura 2).

Figura 2. Perros seroreactivos y seronegativos a *Trypanosoma cruzi*.



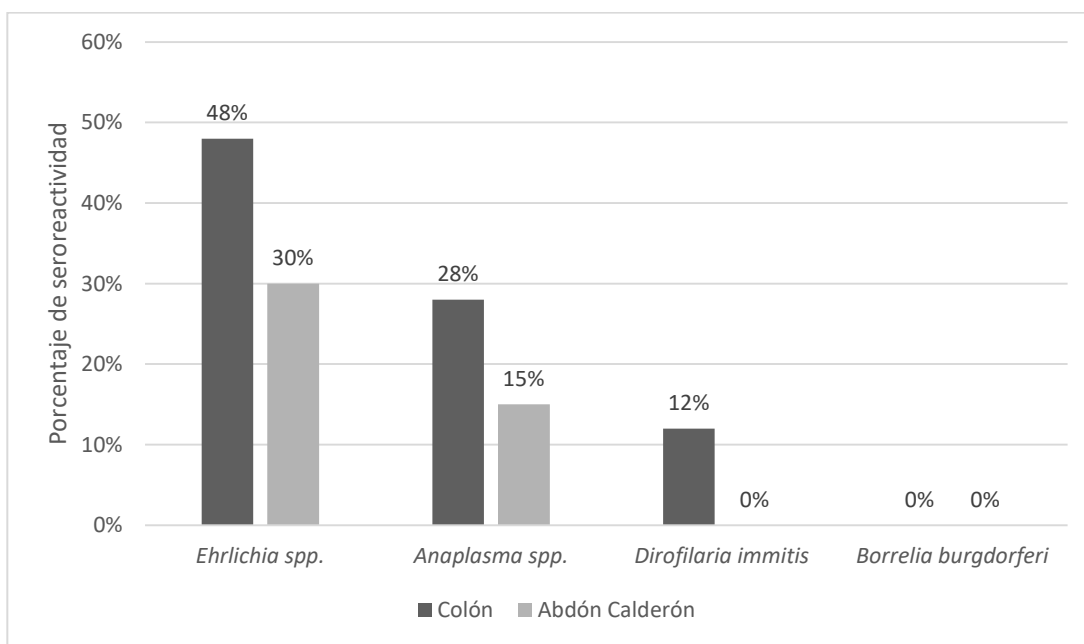
Nota. El gráfico muestra el número de perros seroreactivos y seronegativos a *Trypanosoma cruzi*, procedentes de las comunidades Colón y Abdón Calderón de Portoviejo.

7.2 Detección de otras enfermedades caninas transmitidas por vectores

De los 25 perros seroreactivos a *T. cruzi*, procedentes de la comunidad Colón, 64% (16/25) presentó adicionalmente un agente infeccioso de ETV. La frecuencia de cada agente infeccioso fue la siguiente: 48% (12/25) *E. canis* / *E. ewingii*, 28% (7/25) *A. phagocytophilum*

/ *A. platys*, 12% (3/25) *D. immitis* y 0% (0/25) *B. burgdorferi*. De los 20 perros seroreactivos a *T. cruzi*, procedentes de la comunidad Abdón Calderón, 30% de los perros (6/20) resultaron seroreactivos para otro agente infeccioso. La frecuencia para cada agente etiológico fue la siguiente: 30% (6/20) *E. canis* / *E. ewingii*, 15% (3/20) *A. phagocytophilum* / *A. platys*, 0% (0/20) *D. immitis* y 0% (0/20) *B. burgdorferi* (Figura 3).

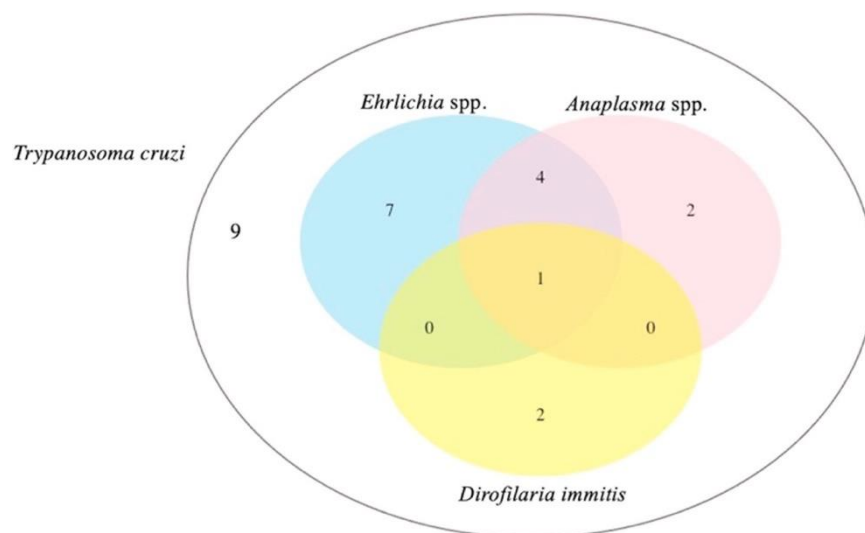
Figura 3. Frecuencia de agentes patógenos de enfermedades transmitidas por vectores en perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* en las comunidades de Colón y Abdón Calderón.



Nota. La figura muestra el porcentaje de seroreactividad a *Ehrlichia spp.*, *Anaplasma spp.*, *Dirofilaria immitis* y *Borrelia burgdorferi*, en 25 perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* procedentes de la comunidad Colón y 20 perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* procedentes de la comunidad de Abdón Calderón.

Los perros seroreactivos a *T. cruzi* de la comunidad Colón, presentaron coinfecciones con uno o más patógenos. Se observó que el 44% (11/25) tenía al menos un patógeno adicional, de los cuales el 28% (7/25) estaban coinfectados con *Ehrlichia* spp., 8% (2/25) con *Anaplasma* spp. y 8% (2/25) con *D. immitis*. Se encontró triple infección en el 16% (4/25) de los animales, todos ellos infectados con *T. cruzi*, *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma* spp. Solo un animal (4%) estaba infectado con cuatro patógenos, es decir, *T. cruzi*, *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. y *D. immitis* (Figura 4).

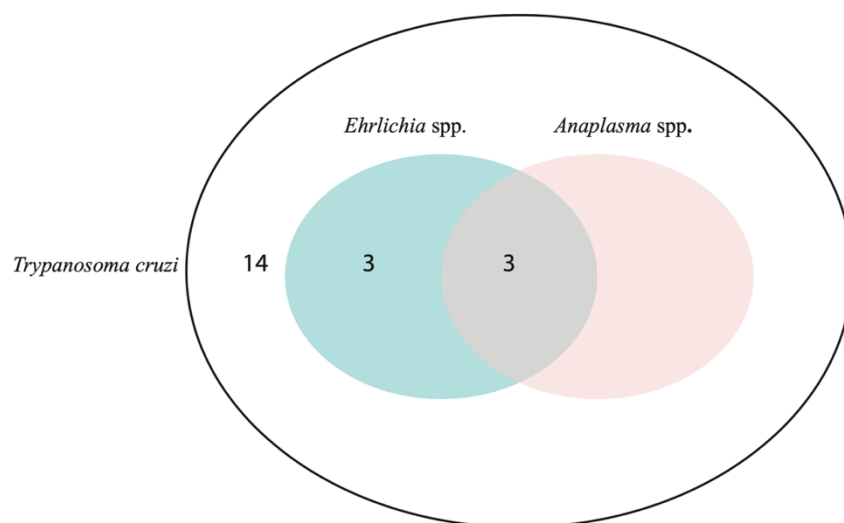
Figura 4. Coinfecciones de perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* procedentes de la comunidad Colón.



Nota. Diagrama de Venn, donde se observan las coinfecciones de perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi*, en 25 perros procedentes de la comunidad Colón. El gráfico muestra la coinfección con uno, dos o tres patógenos.

Los perros seroreactivos a *T. cruzi* de la comunidad Abdón Calderón, presentaron coinfecciones con uno o más patógenos. Se observó que el 15% (3/20) tenían *Ehrlichia* spp., y el 15% (3/20) presentaron coinfecciones con *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma* spp. (Figura 5).

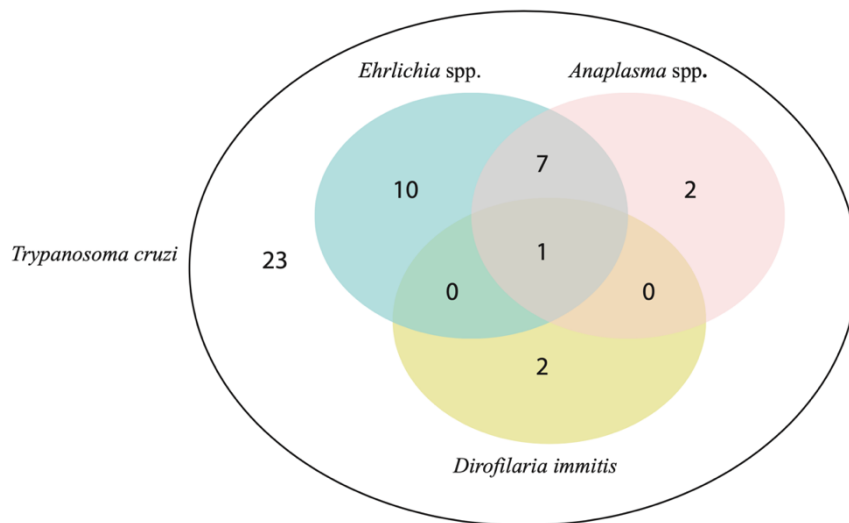
Figura 5. Coinfecciones de perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi*, procedentes de la comunidad Abdón Calderón.



Nota. Diagrama de Venn, donde se observan las coinfecciones de perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi*, en 20 perros de la comunidad Abdón Calderón. El gráfico muestra la coinfección con uno o dos patógenos.

A continuación se muestran las coinfecciones unificadas de las comunidades de Colón y Abdón Calderón (Figura 6).

Figura 6. Coinfecciones de perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi*, procedentes de las comunidades de Colón y Abdón Calderón.



Nota. Diagrama de Venn, donde se observan las coinfecciones de perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi*, en perros de las comunidades de Colón y Abdón Calderón. El gráfico muestra la coinfección con uno, dos o tres patógenos.

7.3 Determinación de la concentración de proteínas de fase aguda

El siguiente cuadro resume los principales valores estadísticos para PON-1, ferritina, CRP y Hp por cada uno de los grupos estudiados.

Tabla 1. Concentración de proteínas de fase aguda (PON-1, ferritina, CRP y Hp), por grupo de estudio.

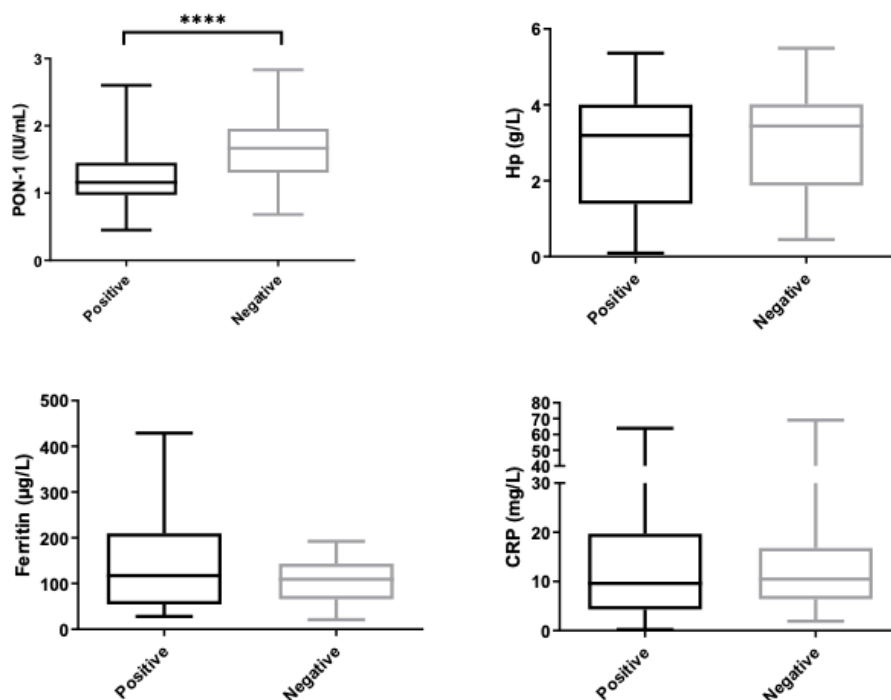
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1a	Grupo 1b
PFA	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)	Mediana (Min-Max)
PON-1 (IU/ml)	1.16 (0.45-2.6)	1.665 (0.68-2.83)	1.095 (0.52-2.6)	1.24 (0.45-1.86)
Ferritina (µg/L)	117.4 (28.1-428.8)	109.3 (21-192.1)	64.5 (28.1-360)	159.9 (29.2-348.8)
CRP (µg/mL)	9.6 (0.2-63.8)	10.5 (1.9-69)	9.6 (1.5-58.5)	10.7 (0.2-63.8)
Hp (g/L)	3.19 (0.09-5.36)	3.44 (0.45-5.49)	3.025 (0.09-5.31)	3.19 (0.56-5.36)

Nota. Se muestran los principales valores estadísticos para PON-1, ferritina, CRP y Hp. Se detallan a continuación los grupos: Grupo 1: Seroreactivos a *Trypanosoma cruzi*; Grupo 2: seronegativos a *Trypanosoma cruzi*; Grupo 1a: Seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* sin coinfección; Grupo 1b: Seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* con coinfección.

7.3.1 Concentración de proteínas de fase aguda en perros seroreactivos (grupo 1) y seronegativos (grupo 2) a *Trypanosoma cruzi*

Los valores de la mediana del grupo 1 para PON-1 (1.16 IU/ml) fueron significativamente más bajos en comparación con los del grupo 2 (1.67 IU/ml) ($P < 0.05$). Para ferritina, CRP y Hp, no se encontraron diferencias significativas cuando se compararon el grupo 1 y grupo 2 ($P > 0.05$) (Figura 7).

Figura 7. Concentración sérica de las proteínas de fase aguda en perros seroreactivos y seronegativos a *Trypanosma cruzi*.



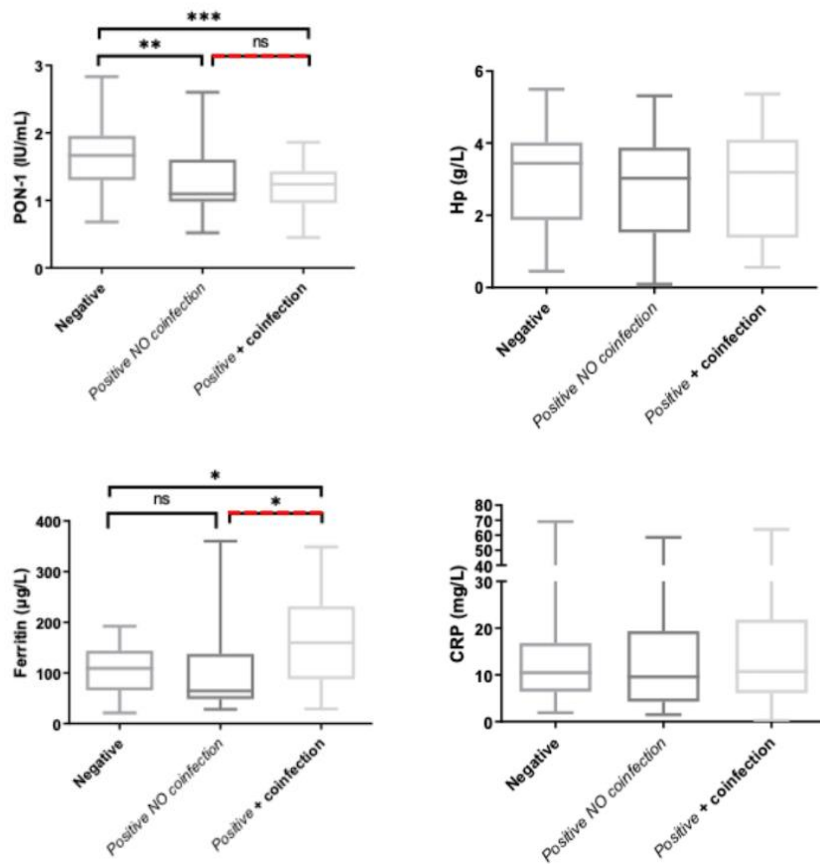
Nota. Concentración sérica de PON-1, ferritina, CRP y Hp en perros seroreactivos y seronegativos a *Trypanosma cruzi*. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre los dos grupos ($P < 0.05$).

7.3.2 Concentración de proteínas de fase aguda en perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* con (grupo 1b) y sin coinfecciones (grupo 1a)

Los valores de la mediana del grupo 1a para la ferritina (64.5 µg/L) fueron significativamente más bajos que los del grupo 1b (159.9 µg/L) ($P < 0.05$), aunque ninguno de los valores de ambos grupos superó el límite superior de los valores de referencia. Por el contrario, para

CRP, Hp y PON-1, no se encontraron diferencias significativas en el grupo 1a, cuando se comparó con el grupo 1b ($P > 0.05$) (Figura 8).

Figura 8. Concentración sérica de las proteínas de fase aguda en perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi*, con y sin coinfección.

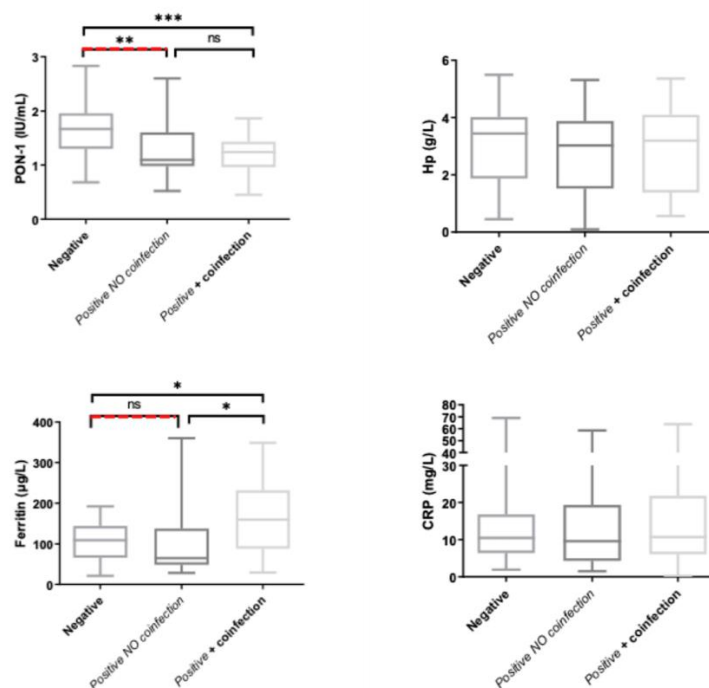


Nota. Concentración sérica de PON-1, ferritina, CRP y Hp en perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi*, con y sin coinfección. Las líneas segmentadas en rojo muestran los grupos comparados y los asteriscos muestran las diferencias significativas entre los dos grupos ($P < 0.05$).

7.3.3 Concentración de proteínas de fase aguda en perros seronegativos a *Trypanosoma cruzi* (grupo 2) vs perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* sin coinfecciones (grupo 1a)

Los valores de la mediana del grupo 2 para PON-1 (1,67 IU / ml) fueron significativamente más altos que los del grupo 1a (1,1 IU / ml) ($P < 0.05$). Por el contrario, para ferritina, CRP y Hp, no se encontraron diferencias significativas al comparar el grupo 2 con el grupo 1a ($P > 0.05$) (Figura 9).

Figura 9. Concentración sérica de las proteínas de fase aguda en perros seronegativos a *Trypanosoma cruzi* vs perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* sin coinfección.

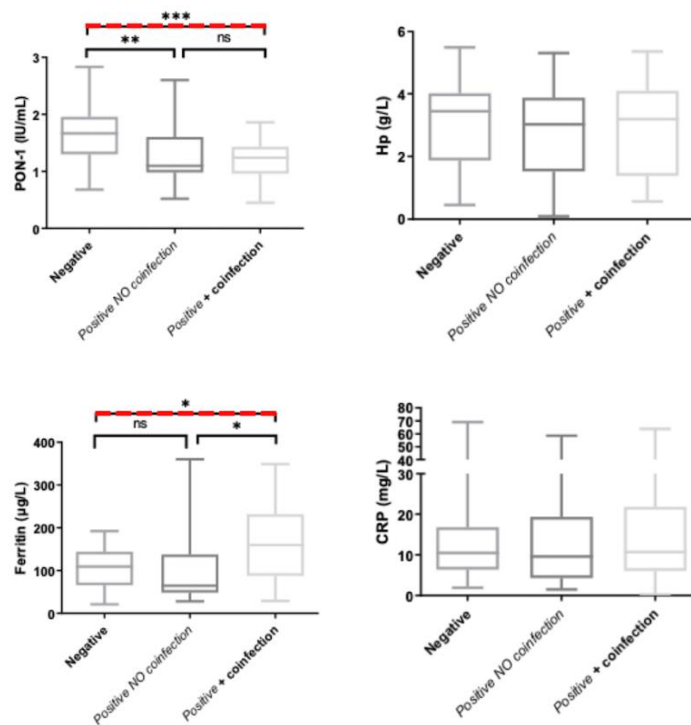


Nota. Concentración sérica de PON-1, ferritina, CRP y Hp en perros seronegativos a *Trypanosoma cruzi* vs perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* sin coinfección. Las líneas segmentadas en rojo muestran los grupos comparados y los asteriscos muestran las diferencias significativas entre los dos grupos ($P < 0.05$).

7.3.4 Concentración de proteínas de fase aguda en perros seronegativos a *Trypanosoma cruzi* (grupo 2) vs perros seroreactivos a *Trypanosoma. cruzi* con coinfección (grupo 1b)

Los valores de la mediana del grupo 2 para PON-1 (1,67 IU/ml) fueron significativamente superiores a los del grupo 1b (1,24 IU/ml) ($P < 0.05$). Los valores de la mediana del grupo 2 para la ferritina (109,3 $\mu\text{g/L}$) fueron significativamente más bajos que los del grupo 1b (159,9 $\mu\text{g/L}$) ($P < 0.05$). Por el contrario, para CRP y Hp, no se encontraron diferencias significativas al comparar el grupo 2 con el grupo 1b ($P > 0.05$) (Figura 10).

Figura 10. Concentración sérica de las proteínas de fase aguda en perros seronegativos a *Trypanosoma cruzi* vs perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* con coinfección.



Nota. Concentración sérica de PON-1, ferritina, CRP y Hp en perros seronegativos a *Trypanosoma cruzi* vs perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* con coinfección. Las líneas

segmentadas en rojo, muestran los grupos comparados y los asteriscos muestran las diferencias significativas entre los dos grupos ($P < 0.05$).

7.4 Marcadores de estrés oxidativo

El siguiente cuadro resume los valores estadísticos para los marcadores de estrés oxidativo, por cada uno de los grupos estudiados.

Tabla 2. *Evaluación de marcadores de estrés oxidativo por grupo de estudio.*

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1a	Grupo 1b
	Mediana	Mediana	Mediana	Mediana
	(Min-Max)	(Min-Max)	(Min-Max)	(Min-Max)
tiol	0.06405	0.0818	0.0694	0.0555
(mmol/L)	(0.0009-0.271)	(0.0033-0.252)	(0.0009-0.271)	(0.0056-0.1509)
CUPRAC	0.2455	0.2773	0.2501	0.2413
(mmol/L)	(0.1511-0.454)	(0.1927-0.5239)	(0.1511-0.454)	(0.1533-0.3291)
TAC	0.2849	0.2872	0.2914	0.2827
(mmol/L)	(0.0917-0.6288)	(0.241-0.5975)	(0.1663-0.6288)	(0.0917-0.3598)

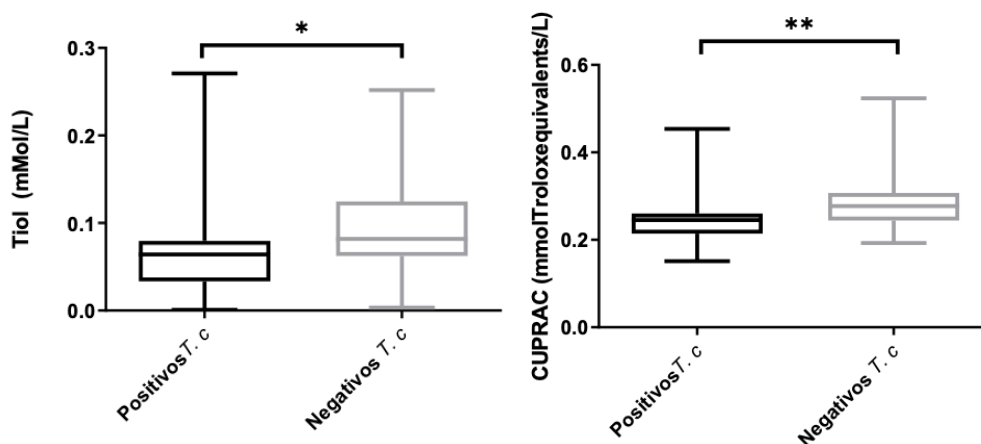
Nota. Se muestran los principales valores estadísticos para tiol, CUPRAC y TAC. Se detallan a continuación los grupos: Grupo 1: Seroreactivos a *Trypanosoma cruzi*; Grupo 2: Seronegativos a *Trypanosoma cruzi*; Grupo 1a: Seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* sin coinfección; Grupo 1b: Seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* con coinfección.

7.4.1 Determinación de la concentración de marcadores de estrés oxidativo en los distintos grupos de estudio

Los perros del grupo 1 mostraron concentraciones significativamente menores de tiol (mediana/percentil 25 – percentil 75) (0.06405/0.03348 – 0.0796 mmol/L $P < 0.05$), y CUPRAC (mediana/percentil 25 – percentil 75) (0.2455/0.2145 – 0.454 mmol/L $P < 0.05$), cuando se compararon con el grupo 2 (mediana/percentil 25 – percentil 75: 0.0818/0.06238

– 0.1248 mmol/L para tiol; 0.2773/0.2443 – 0.3071 mmol/L para CUPRAC) (Figura 11). No hubo diferencias significativas para TAC al comparar estos grupos ($P > 0.05$).

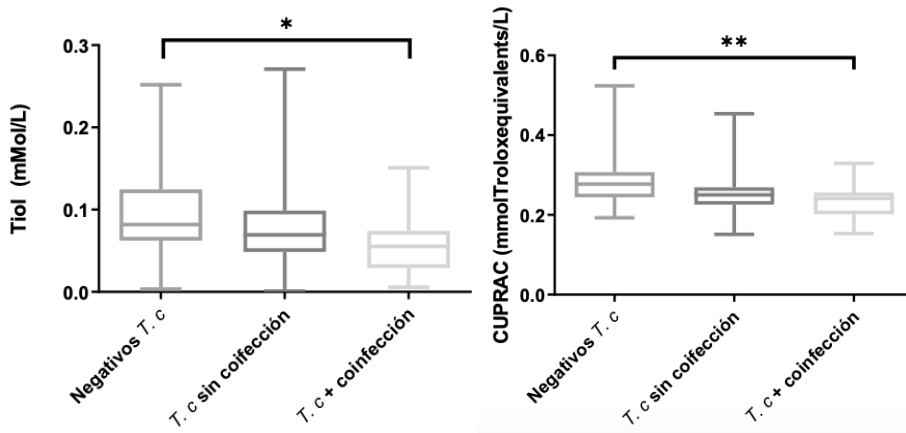
Figura 11. Concentración de marcadores de estrés oxidativo, en perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* vs perros seronegativos a *Trypanosoma cruzi*.



Nota. Concentración sérica de tiol y CUPRAC en perros seronegativos a *Trypanosoma cruzi* vs perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi*. Las asteriscos muestran las diferencias significativas entre los dos grupos ($P < 0.05$).

Los perros del grupo 1b mostraron concentraciones significativamente menores de tiol (mediana/percentil 25 – percentil 75) (0.0555/0.0292 – 0.07415 mmol/L $P < 0.05$), y CUPRAC (mediana/percentil 25 – percentil 75) (0.2413/0.2019 – 0.2563 mmol/L $P < 0.05$), cuando se compararon con el grupo 2 (mediana/percentil 25 – percentil 75: 0.0818/0.06238 – 0.1248 mmol/L para tiol; 0.2773/0.2443 – 0.3071 mmol/L para CUPRAC) (Figura 12). No hubo diferencias significativas para TAC al comparar estos grupos ($P > 0.05$).

Figura 12. Concentración de marcadores de estrés oxidativo, en perros seronegativos a *Trypanosoma cruzi* vs perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* con coinfección.



Nota. Concentración sérica de tiol y CUPRAC en perros seronegativos a *Trypanosoma cruzi* vs perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* con coinfección. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre los dos grupos ($P < 0.05$).

VIII. DISCUSIÓN

En el 2015 se reportó que el 57.5% de triatomíneos en Portoviejo, Ecuador estaba infectado con *T. cruzi* (Villacís *et al.*, 2015); sin embargo, la presencia de este parásito no se había estudiado en perros. La presencia de anticuerpos frente a *T. cruzi* encontrados en los perros de este estudio, podría estar relacionada con la presencia del agente infeccioso en los triatomíneos, situación que es de importancia epidemiológica, al ser considerados los perros como centinelas, reservorios y factor de riesgo de la enfermedad de Chagas en humanos (de Sousa *et al.*, 2021; Gürtler y Cardinal, 2021).

Este es el primer reporte de la presencia de *T. cruzi* en perros de la zona costera de la provincia de Manabí, Ecuador. La prevalencia de infección con *T. cruzi* en perros fue diferente entre las comunidades Colón y Abdón Calderón. La alta prevalencia encontrada en la comunidad Colón (57.14%) es similar a lo reportado en la década de los 80 en Argentina (Lauricella *et al.*, 1989; Wisnivesky *et al.*, 1985), mucho antes de que se implementara el programa de prevención y control de la enfermedad, conocido como Iniciativa del Cono Sur (INCOSUR).

Algo diferente sucedió en la comunidad Abdón Calderón, donde la prevalencia de la enfermedad fue de 33.33%, un valor que se encuentra por arriba del rango reportado en perros (Gurtler y Cardinal, 2015) en países como Ecuador (Rodríguez *et al.*, 2017), Estados Unidos (Hodo *et al.*, 2019), México (Arjona *et al.*, 2017; Galaviz-Silva *et al.*, 2017), Argentina (Giai *et al.*, 2018) y Colombia (Jaimes-Dueñez *et al.*, 2020; Mesa-Arciniegas *et al.*, 2018) (0.91% - 30%).

Las variaciones de prevalencia de *T. cruzi* entre las comunidades de Colón y Abdón Calderón, que poseen condiciones climatológicas similares, podrían deberse a que Colón presenta mayores zonas de deforestación (características del paisaje), es decir que existe mayor riesgo de exposiciones a los vectores, mayor cercanía de los vectores a zonas domiciliarias y por ende mayor atracción de los triatominos por la luz de las viviendas (Leite *et al.*, 2011). Otro factor de riesgo podría ser la disminución de la población de mamíferos silvestres y por lo tanto la disminución de las fuentes de alimentación de los triatominos (Xavier *et al.*, 2012).

Otras ETV de naturaleza zoonótica en perros, como ehrlichiosis, anaplasmosis, dirofilariosis y enfermedad de Lyme, han sido reportadas en Latinoamérica y Norteamérica (Fudge *et al.*, 2020; Gettings *et al.*, 2020; Hodo *et al.*, 2019; Maggi y Kramer, 2019). En esta investigación, en perros seroreactivos a *T. cruzi*, se detectaron coinfecciones con ehrlichiosis, anaplasmosis y dirofilariosis. En la comunidad Colón las prevalencias fueron de 48% para *E. canis* / *E. ewingii*, 28% para *A. phagocytophilum* / *A. platys* y 12% *D. immitis*. En la comunidad Abdón Calderón las prevalencias fueron de 30% para *E. canis* / *E. ewingii* y 15% para *A. phagocytophilum* / *A. platys*.

La prevalencia en Colón para *E. canis* y *E. ewingii* se encontró dentro del rango reportado en Ecuador (37.84% - 77.5%) (Adams *et al.*, 2016; Dávalos y Melchiade, 2018; Jiménez *et al.*, 2020; McCown *et al.*, 2011; Morán-Loor, 2006). La prevalencia en Colón para *A. phagocytophilum* / *A. platys* fue más alta que la reportada en la isla Santa Cruz y Guayaquil (12.1% -25.17%) (Adams *et al.*, 2016; Dávalos y Melchiade, 2018; Jiménez *et al.*, 2020; McCown *et al.*, 2011). Probablemente las variaciones de las prevalencias de ehrlichiosis

(menor en Abdón Calderón) y anaplasmosis (mayor en Abdón Calderón) entre una comunidad y otra estén relacionadas con las diferencias de grados de infestaciones de garrapatas en los perros y la falta de medidas preventivas para el control del ectoparásito (Barrantes *et al.*, 2016; Maggi y Kramer, 2019).

Existen diferencias de prevalencias de ehrlichiosis y anaplasmosis en esta investigación (Ecuador continental) con respecto a una investigación realizada en la isla Santa Cruz – Galápagos (Ecuador insular), donde se reportó 48.3% y 12.1% para *Ehrlichia* spp y *Anaplasma* spp. respectivamente (Jiménez *et al.*, 2020). Históricamente la prevalencia de ehrlichiosis ha sido mayor en Ecuador continental con respecto a Ecuador insular, pero actualmente ocurre lo contrario, y a pesar de que existen reglamentos y regulaciones gubernamentales para controlar la introducción de especies no nativas a Galápagos (SICGAL, 2003), la introducción clandestina e ilegal de perros a las islas podría haber originado este incremento (Karez *et al.*, 2006).

En Ecuador no existen reportes de seroreactividad a *T. cruzi* en coinfección con otras ETV en perros. En nuestro estudio la coinfección de *T. cruzi* con *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma* spp. se encontró en el 16% y 15% en Colón y Abdón Calderón respectivamente. Coinfecciones de *E. canis* y *A. phagocytophylum* sin *T. cruzi* en perros de las ciudades de Manta y Guayaquil se registraron entre 23.33% y 26% (Dávalos y Melchiade, 2018; McCown *et al.*, 2011), mientras que en la isla Santa Cruz el porcentaje fue mucho menor (6.89%) (Jiménez *et al.*, 2020).

Otra enfermedad detectada fue la dirofilariosis canina, donde se encontró que el 12% de los perros muestreados en la comunidad Colón, fueron seroreactivos a *D. immitis*, mientras que

en la comunidad Abdón Calderón no se reportaron casos. Estos resultados son similares a lo que ocurre en varios países, donde la prevalencia varía de 0% a más del 30% (Anvari *et al.*, 2019; Dantas-Torres *et al.*, 2020; Evason *et al.*, 2019; Fudge *et al.*, 2020; Hodo *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2016), mientras que en las islas Galápagos, se reportó un rango de prevalencia entre el 0% al 6,9% (Adams *et al.*, 2016; Jiménez *et al.*, 2020). Es importante considerar que, en las comunidades de estudio, factores como las condiciones climáticas, las características de las áreas geográficas y las actividades humanas influyen para la presencia de los vectores (*Culex* spp. y *Aedes* spp.) que transmiten la dirofilariosis (Cabanova *et al.*, 2018).

Otra ETV investigada fue la enfermedad de Lyme, de la cual no se encontró ningún caso positivo. En América, esta enfermedad se ha reportado en Estados Unidos (Dewage *et al.*, 2019; Fudge *et al.*, 2020; Herrin *et al.*, 2018; Hodo *et al.*, 2019), Canadá (Ogden *et al.*, 2019), México (Movilla *et al.*, 2016; Solís *et al.*, 2018) y Costa Rica (Montenegro *et al.*, 2017), con prevalencias que varían desde <1% hasta 30%, mientras que en Sudamérica, donde la enfermedad no es endémica, se han reportado casos esporádicos en perros y humanos, en Perú (Rubio *et al.*, 2011) y Ecuador (Alarcón *et al.*, 2004) respectivamente. En Ecuador (Adams *et al.*, 2016; Jiménez *et al.*, 2020; McCown *et al.*, 2011) y en Colombia (McCown *et al.*, 2014) no existe evidencia serológica de la enfermedad en perros, ni en animales selváticos (Pesquera *et al.*, 2015). El vector principal de la enfermedad de Lyme es *Ixodes* spp. (Ghosh *et al.*, 2021), aunque se ha reportado que *R. sanguineus* y *Amblyomma mixtum*, especies que se encuentran con frecuencia en Sudamérica podrían ser considerados potenciales vectores (Solís *et al.*, 2018). A pesar de que estos hallazgos y la literatura consultada indican que la enfermedad de Lyme no es endémica en el área, es importante

realizar estudios periódicos en reservorios, vectores y humanos, por la posibilidad de casos importados y por la presencia de *R. sanguineus*.

La zona de estudio reúne las condiciones climáticas idóneas para que coexistan reservorios, vectores y agentes patógenos de todas estas enfermedades reportadas; sin embargo, la distribución de los vectores de las ETV no necesariamente coinciden con la distribución de casos. Estas variaciones pueden estar influenciadas por el comportamiento de los vectores en busca de los hospedadores (Arsnoe *et al.*, 2019), la elección selectiva de hospederos que realizan los vectores, la densidad de los vectores (Ginsberg *et al.*, 2021) y la fragmentación del hábitat (Rivas *et al.*, 2021). En estudios subsecuentes, sería importante investigar la presencia de agentes etiológicos en cada uno de los vectores y corroborar si existe correlación con la presencia de los parásitos en hospederos.

Las dinámicas y concentraciones de las PFA han sido estudiadas en humanos y animales, y constituyen una herramienta importante en el diagnóstico, en la evaluación de la respuesta terapéutica y en el pronóstico de las enfermedades (Cerón *et al.*, 2008). Se han estudiado las PFA en la enfermedad de Chagas en humanos (Calderoni *et al.*, 2006; López *et al.*, 2006; Medrano-Mercado *et al.*, 1996), y en varias enfermedades en perros; sin embargo previo a nuestro estudio, no había reportes de las concentraciones de PFA en perros reactivos a *T. cruzi*, a pesar de que el perro es un modelo biológico adecuado para estudiar la enfermedad de Chagas (de Lana y Giunchetti, 2021; Gurtler y Cardinal, 2015).

PON-1 fue la PFA que mostró más diferencias entre los grupos estudiados, mostrando diferencias estadísticamente significativas al hacerse las siguientes comparaciones entre grupos: perros seroreactivos a *T. cruzi* (grupo 1) vs perros seronegativos a *T. cruzi* (grupo 2),

perros seronegativos a *T. cruzi* (grupo 2) vs perros seroreactivos a *T. cruzi* sin coinfección (grupo 1a) y perros seronegativos a *T. cruzi* (grupo 2) vs perros seroreactivos a *T. cruzi* con coinfección (grupo 1b).

La disminución de la concentración de PON-1 se ha descrito en procesos inflamatorios y en enfermedades como parvovirus, leishmaniosis y pancreatitis aguda (Kocaturk *et al.*, 2015a; Martínez-Subiela *et al.*, 2014b; Tvarijonaviciute *et al.*, 2015). La disminución de PON-1 reportada en este estudio podría relacionarse con la seroreactividad a *T. cruzi*, y con la posible afectación cardíaca, secundaria a la enfermedad y los procesos oxidativos derivados de la misma (Rubio *et al.*, 2020).

La ferritina tuvo diferencias significativas cuando se compararon los siguientes grupos: perros seronegativos a *T. cruzi* (grupo 2) vs perros seroreactivos a *T. cruzi* con coinfección (grupo 1b), y perros seroreactivos a *T. cruzi* con coinfección (grupo 1b) vs perros seroreactivos a *T. cruzi* sin coinfección (grupo 1a). Tanto en el grupo 1a (64.5 µg/L), como en el grupo 1b, las concentraciones de esta proteína, se encontraron dentro del rango de referencia (60 -190 µg/L); sin embargo, hubo un aumento considerable en el grupo 1b (159.9 µg/L), probablemente por la coexistencia de varias enfermedades, como por ejemplo la ehrlichiosis, donde se ha reportado aumento de esta proteína (Bottari *et al.*, 2016; Karnezi *et al.*, 2016).

El estudio de las variaciones de las concentraciones de PON-1 y ferritina encontradas en perros reactivos a *T. cruzi*, para nuestro conocimiento, es el primer reporte de estas PFA en esta especie. En humanos no se han realizado estudios de PON-1 y ferritina en la enfermedad de Chagas; sin embargo se han estudiado otras proteínas (CRP, Alfa-2 macroglobulina y Hp)

en donde se observó un incremento en las concentraciones de CRP y Hp (Calderoni *et al.*, 2006; da Silva *et al.*, 2010; Jorge *et al.*, 2010; Medrano-Mercado *et al.*, 1996). Esto contrasta con lo encontrado en los perros de Portoviejo, donde no se observaron variaciones en las concentraciones de CRP y Hp.

Existen reportes de las variaciones de las PFA en algunas enfermedades en perros. Es así que en la ehrlichiosis monocítica canina, se encontraron variaciones en la concentración de CRP, Hp, ferritina y PON-1 (Karnezi *et al.*, 2016); en la dirofilariosis, se observó aumento de CRP y disminución de PON-1 (Méndez *et al.*, 2014); en la leishmaniosis se ha observado aumento en la concentración de CRP, Hp y ferritina (Martínez-Subiela *et al.*, 2014b; Martínez-Subiela *et al.*, 2011; Martínez-Subiela *et al.*, 2002).

En este estudio, al comparar el grupo de perros sanos con el grupo de perros seroreactivos a *T. cruzi* con y sin coinfección, la Hp no mostró diferencias significativas, posiblemente a la existencia de procesos hemolíticos o hemorrágicos en forma subclínica, que originen la disminución de las concentraciones. Además las concentraciones de Hp encontradas, podrían deberse a que el muestreo se realizó en distintas fases de las enfermedades en la que se encontraban los perros seroreactivos a *T. cruzi*. Al ser un proceso de infección natural, es imposible establecer el momento exacto del inicio de la infección para cada uno de los patógenos y los procesos inmunológicos asociados a las coinfecciones.

El diagnóstico temprano de la enfermedad, podría ayudar a manejar correctamente los brotes que pudiesen aparecer. Por lo tanto, la propuesta del análisis de las PFA, en conjunto con el estudio de factores de riesgo asociados, permitirá complementar el trabajo organizado por el sistema de salud pública. La incorporación de la evaluación de la concentración sérica de

PON-1 y ferritina, podría ser usada como herramienta que complementa el diagnóstico de la enfermedad en perros. La disminución de la concentración de PON-1, podría ser indicativo a la presencia de alguna de las ETV, y si al mismo tiempo se observan concentraciones altas de ferritina se podría sospechar de coinfecciones con ETV.

Las concentraciones séricas de CUPRAC en los perros seroreactivos a *T. cruzi* y de perros seroreactivos a *T. cruzi* con coinfección, fueron significativamente más bajas ($P < 0.05$) que las obtenidas de suero de perros seronegativos a *T. cruzi*. Estos resultados coinciden con los estudios realizados en perros con enfermedad inflamatoria intestinal (Rubio *et al.*, 2016c), perros con ehrlichiosis en fases clínicas y subclínicas (Rubio *et al.*, 2017c), y perros con fallas cardíacas (Rubio *et al.*, 2020), donde se observaron valores disminuidos con respecto a perros sanos. Koutroubakis *et al.* (2004) reportaron una disminución de las concentraciones de TAC (uno de los componente es CUPRAC), en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. El agotamiento de los antioxidantes CUPRAC que se observan en nuestro estudio podría estar relacionado con un papel importante de estos en la patogenia de la enfermedad de Chagas y de las otras ETV.

Se observó una disminución de las concentraciones de tiol en perros seroreactivos a *T. cruzi* y en perros seroreactivos a *T. cruzi* con coinfección. Esto coincide con lo reportado por Rubio *et al.* (2017c) donde se observó una disminución de este biomarcador en perros con ehrlichiosis canina subclínica y clínica. Es probable que esta disminución esté relacionada con el consumo de este biomarcador, que tiene una función protectora frente a la lesión vascular que se produce en infecciones Rickettsiales (Rubio *et al.*, 2017c), debido a que la

coinfección más frecuentemente encontrada en nuestro estudio fue *T. cruzi* más *Ehrlichia* spp., seguida de *T. cruzi* más *Ehrlichia* spp. más *Anaplasma* spp.

Al comparar los diferentes grupos de perros, se encontró que no existen diferencias significativas para TAC. Esto difiere de lo reportado en un estudio realizado en perros con enfermedad inflamatoria intestinal, en donde se observaron valores de TAC significativamente menores, al ser comparados con perros sanos, usando el mismo tipo de ensayo (Rubio *et al.*, 2016a). Se desconoce la razón de estas diferencias, aunque posiblemente influya el hecho de que las patogenicidades de las enfermedades son diferentes y que el tipo de ensayo utilizado tenga poca sensibilidad para detectar diferencias. En varios estudios realizados en perros en donde se ha determinado TAC, con diferentes métodos, se han encontrado resultados contrapuestos, por ejemplo, se observó disminución de TAC posterior a cirugías (Lee y Kim, 2014) y anestesia con isoflurano (Lee, 2013), en leishmaniosis visceral (Almeida *et al.*, 2013) y después de vacunación contra ehrlichiosis monocítica canina (Rudoler *et al.*, 2015); se observó aumento de TAC en sarna demodécica (Martínez-Subiela *et al.*, 2014a) y parvovirus (Kocaturk *et al.*, 2015b), y no hubo diferencias en perros con *Babesia vogeli* (Ciftci *et al.*, 2014), dermatitis atópica (Kapun *et al.*, 2012), sarna sarcóptica (Camkerten *et al.*, 2009), dirofilariosis (Carretón *et al.*, 2017) y enfermedades cardíacas (Hetyey *et al.*, 2007).

Sería recomendable utilizar otros tipos de ensayos para medir TAC en suero de perros seroreactivos a *T. cruzi* con coinfecciones y verificar si persisten estas diferencias. Una de las desventajas de los ensayos de TAC, es que no miden todos los componentes antioxidantes que podrían estar presentes en cada una de las enfermedades de nuestro estudio y por lo tanto

nuestros resultados deben de ser interpretados con cautela, utilizar ensayos integrados y realizar más estudios (Rubio *et al.*, 2016b).

A pesar que los perros adultos son los que mayor probabilidad tienen de presentar las enfermedades estudiadas de una forma crónica, no fue posible determinar la duración de la infección natural. Los resultados en lo que respecta a marcadores de estrés oxidativo y PFA, deberían verificarse en una población mayor y comparar grupos de perros sanos, con grupos de perros que tengan cada una de las enfermedades en forma individual.

Se puede mencionar que, en base a los resultados obtenidos, se recomienda continuar con el programa de control de vectores implementado por el Ministerio de Salud Pública de Ecuador, efectuar controles periódicos en perros para detectar la seroreactividad a *T. cruzi* y otras coinfecciones, realizar programas de educación a la población a través de la concienciación sobre las medidas que se pueden tomar para evitar la propagación del vector y la importancia de la protección de los perros contra la picaduras.

El control de la enfermedad de Chagas en países endémicos, específicamente en Ecuador, constituye una ardua labor que ejecuta el sistema de salud en conjunto con la población en riesgo, tomando en cuenta que el control de vectores por si solo es una medida insuficiente, ya que la transmisión de enfermedades no siempre se realiza por una sola vía, y de que están inmiscuidos varios factores biológicos, ecológicos y socioeconómicos. Debemos indicar también que las acciones antrópicas, como la deforestación, la invasión de espacios selváticos, la extracción de materiales de bosques y selvas para construcción o alimentación, son actividades que alteran el ecotopo, aumentando las posibilidades de contagio de *T. cruzi* y otras enfermedades zoonóticas a humanos y animales.

IX. CONCLUSIONES

- Existe una alta prevalencia de perros seroreactivos a *T. cruzi* en las comunidades de Colón (57.14%) y Abdón Calderón (33.33%), que presentaron coinfección con otros hemoparásitos como *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Dirofilaria immitis*.
- La coinfección que se presentó con mayor frecuencia fue *Trypanosoma cruzi* + *Ehrlichia* spp., seguida de *Trypanosoma cruzi* + *Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp.
- Solo un perro procedente de la comunidad de Colón presentó reactividad a cuatro patógenos (*Trypanosoma cruzi* + *Ehrlichia* spp. + *Anaplasma* spp. + *Dirofilaria immitis*).
- No se encontraron perros seroreactivos a *Dirofilaria immitis* en la comunidad de Abdón Calderón.
- No se encontró seroreactividad para *Borrelia burgdorferi* en ambas comunidades de estudio.
- El estudio de las concentraciones de proteínas de fase aguda, puso en evidencia que PON-1 disminuyó en perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* con y sin coinfección; y la ferritina aumentó en perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* que presentaron coinfección. No hubo diferencias significativas para CRP y Hp.
- En lo concerniente a los marcadores de estrés oxidativo, las concentraciones de tiol y CUPRAC disminuyeron en perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* y perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* con coinfección. No hubo diferencias significativas para TAC.

- Existió estrés oxidativo en perros seroreactivos a *Trypanosoma cruzi* en coinfección con otras enfermedades transmitidas por vectores, debido a que se observaron cambios significativos en los biomarcadores tiol y CUPRAC.
- Las proteínas de fase aguda y biomarcadores de estrés oxidativo, podrían estar asociadas con la enfermedad de Chagas y otras enfermedades transmitidas por vectores, aunque se necesitan más investigaciones para determinar su utilidad.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad-Franch, F., Paucar, A., Carpio, C., Cuba, C. A., Aguilar, H. M., & Miles, M. A., 2001. Biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) in Ecuador: implications for the design of control strategies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(5), 611-620. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000500004>
- Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2020). *Inmunología básica: funciones y trastornos del sistema inmunitario*. Elsevier.
- Adams, D., Rosenberg, D., & Yirui, H., 2016. Prevalence of vector-borne diseases in a sample of client-owned dogs on Santa Cruz in the Galápagos Islands: A pilot study. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 6, 28-30. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2016.11.007>
- Alarcón, T., Santos, R., & Alarcón, T., 2004. Lyme disease, first reported case in Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Neurología*, 13(1-2), 45-51.
- Almeida, B., Narciso, L., Melo, L., Preve, P., Bosco, A., Lima, V., & Ciarlini, P., 2013. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. *The veterinary journal*, 198(3), 599-605. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.08.024>
- Almela, R., Rubio, C., Cerón, J., Ansón, A., Tichy, A., & Mayer, U., 2018. Selected serum oxidative stress biomarkers in dogs with non-food-induced and food-induced atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 29(3), 229-e282. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/vde.12525>
- Álvarez, D., Franyuti, G., Díaz, R., González, A., González, D., & Vázquez, R., 2018. Chagas disease: current perspectives on a forgotten disease. *Revista Médica del Hospital General de México*, 81(3), 154-164. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.hgmx.2016.09.010>
- Antinori, S., Galimberti, L., Bianco, R., Grande, R., Galli, M., & Corbellino, M., 2017. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. *Eur J Intern Med*, 43, 6-15. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.ejim.2017.05.001>

- Anvari, D., Saadati, D., Siyadatpanah, A., & Gholami, S., 2019. Prevalence of dirofilariasis in shepherd and stray dogs in Iranshahr, southeast of Iran. *Journal of Parasitic Diseases*, 43(2), 319-323. <https://doi.org/10.1007/s12639-019-01096-5>
- Añez, N., & Crisante, G., 2021. The tissue specific tropism in *Trypanosoma cruzi*. Is it true? *Acta Trop*, 213, 105736. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105736>
- Apak, R., Capanoglu, E., & Shahidi, F. (2018). *Measurement of antioxidant activity and capacity: Recent trends and applications*. John Wiley & Sons Ltd.
- Apak, R., Güçlü, K., Ozyürek, M., Karademir, S., & Altun, M., 2005. Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: the CUPRAC method. *Free Radical Research*, 39(9), 949-961. <https://doi.org/10.1080/10715760500210145>
- Aparicio, J., Ochoa, L., Zepeda, J., Gupta, S., Dhiman, M., Martinez, J., Montes de Oca, R., Val Arreola, M., Barbabosa, A., Vazquez, J., & Garg, N., 2011. Testing the efficacy of a multi-component DNA-prime/DNA-boost vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(5), e1050. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001050>
- Araújo, T., & Castro, S. (2000). *Doença de Chagas: Manual para experimentação animal*. Editora FIOCRUZ. <https://doi.org/10.7476/9788575413937>
- Arce-Fonseca, M., Carrillo-Sánchez, S., Molina-Barrios, R., Martínez-Cruz, M., Cedillo-Cobián, J., Henao-Díaz, Y., & Rodríguez-Morales, O., 2017. Seropositivity for *Trypanosoma cruzi* in domestic dogs from Sonora, Mexico. *Infect Dis Poverty*, 6(1), 120. <https://doi.org/10.1186/s40249-017-0333-z>
- Arjona, G., Zaragoza, M., Zaragoza, C., García, R., Sánchez, M., Santamaria, E., & Cruz, L., 2017. Antibodies of *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana* and *Leishmania braziliensis* in domiciled dogs in Tabasco, Mexico. *Revista MVZ Córdoba*, 22(2), 5829-5836. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1011>
- Arsnoe, I., Tsao, J., & Hickling, G., 2019. Nymphal *Ixodes scapularis* questing behavior explains geographic variation in Lyme borreliosis risk in the eastern United States. *Ticks Tick Borne Dis*, 10(3), 553-563. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.01.001>

- Austen, J., & Barbosa, A., 2021, Sep 6. Diversity and Epidemiology of Bat Trypanosomes: A One Health Perspective. *Pathogens*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/pathogens10091148>
- Azzag, N., Petit, E., Gandoin, C., Bouillin, C., Ghalmi, F., Haddad, N., & Boulouis, H., 2015. Prevalence of select vector-borne pathogens in stray and client-owned dogs from Algiers. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 38, 1-7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cimid.2015.01.001>
- Barrantes, A., Jimenez, A., Romero, J., & Dolz, G., 2016. Serology, molecular detection and risk factors of *Ehrlichia canis* infection in dogs in Costa Rica. *Ticks Tick Borne Dis*, 7(6), 1245-1251. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.07.006>
- Bartosz, G., 2010. Non-enzymatic antioxidant capacity assays: Limitations of use in biomedicine. *Free Radical Research*, 44(7), 711-720. <https://doi.org/10.3109/10715761003758114>
- Baumann, H., & Gauldie, J., 1994. The acute phase response. *Immunology today*, 15(2), 74-80. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90137-6](https://doi.org/10.1016/0167-5699(94)90137-6)
- Bern, C., 2015. Chagas' disease. *New England Journal of Medicine*, 373(5), 456-466. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1410150>
- Bonney, K., Luthringer, D., Kim, S., Garg, N., & Engman, D., 2019. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 14(1), 421-447. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043711>
- Bonney, K., Taylor, J., Daniels, M., Epting, C., & Engman, D., 2011. Heat-Killed *Trypanosoma cruzi* Induces Acute Cardiac Damage and Polyantigenic Autoimmunity. *PLoS One*, 6(1), e14571. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014571>
- Borghetti, P., Saleri, R., Mocchegiani, E., Corradi, A., & Martelli, P., 2009. Infection, immunity and the neuroendocrine response. *Vet Immunol Immunopathol*, 130(3-4), 141-162. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.01.013>
- Bottari, N., Crivellenti, L., Borin, S., Oliveira, J., Coelho, S., Contin, C., Tatsch, E., Moresco, R., Santana, A., Tonin, A., Tinucci, M., & Da Silva, A., 2016. Iron metabolism and

- oxidative profile of dogs naturally infected by *Ehrlichia canis*: Acute and subclinical disease. *Microb Pathog*, 92, 26-29. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.11.030>
- Bouza, L., Dolz, G., Solórzano, A., Romero, J., Salazar, L., Labruna, M., & Aguiar, D., 2017. Novel genotype of *Ehrlichia canis* detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica. *Ticks Tick Borne Dis*, 8(1), 36-40. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.012>
- Bowman, D., Little, S., Lorentzen, L., Shields, J., Sullivan, M., & Carlin, E., 2009. Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: Results of a national clinic-based serologic survey. *Veterinary Parasitology*, 160(1), 138-148. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.093>
- Brito, T., Silva, R., Gonçalves, C., da Silva Barbosa, J., Lopes, F., Campos, M., Melo-Silveira, R., Almeida-Lima, J., de Lima Pontes, D., Sousa, M., & Oliveira, H., 2020. Synthesis of Silver Nanoparticle Employing Corn Cob Xylan as a Reducing Agent with Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity. *International journal of nanomedicine*, 15, 965-979. <https://doi.org/10.2147/IJN.S216386>
- Cabanova, V., Miterpakova, M., Valentova, D., Blazejova, H., Rudolf, I., Stloukal, E., Hurnikova, Z., & Dzidova, M., 2018. Urbanization impact on mosquito community and the transmission potential of filarial infection in central Europe. *Parasites & Vectors*, 11(1), 261. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2845-1>
- Cabrera, E., Carretón, E., Morchón, R., Falcón-Cordón, Y., Falcón-Cordón, S., Simón, F., & Montoya-Alonso, J. A., 2018. The Canary Islands as a model of risk of pulmonary dirofilariasis in a hyperendemic area. *Parasitology Research*, 117(3), 933-936. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5774-1>
- Calderoni, D., Andrade, T., & Grotto, H., 2006. Haptoglobin phenotype appears to affect the pathogenesis of American trypanosomiasis. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 100(3), 213-221. <https://doi.org/10.1179/136485906x86356>
- Camkerten, I., Sahin, T., Borazan, G., Gokcen, A., Erel, O., & Das, A., 2009. Evaluation of blood oxidant/antioxidant balance in dogs with sarcoptic mange. *Veterinary Parasitology*, 161(1), 106-109. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.12.019>

- Cantillo, O., Bedoya, S., Xavier, S., Zuluaga, S., Salazar, B., Vélez, A., Carrillo, L., & Triana, O., 2020. *Trypanosoma cruzi* infection in domestic and synanthropic mammals such as potential risk of sylvatic transmission in a rural area from north of Antioquia, Colombia. *Parasite Epidemiology and Control*, 11, e00171. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2020.e00171>
- Cardoso, A., Lescano, S., Amato Neto, V., Gakiya, E., & Santos, S., 2006. Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 48, 287-289. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652006000500009>
- Cardozo, M., Fiad, F., Gastón, Crocco, L., & Gorla, D., 2021. Effect of habitat fragmentation on rural house invasion by sylvatic triatomines: A multiple landscape-scale approach. *PLoS Negl Trop Dis*, 15(7), e0009579. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009579>
- Carlier, Y., & Truyens, C. (2010). Maternal–fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*. In *American Trypanosomiasis* (pp. 539-581). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384876-5.00022-8>
- Carretón, E., Cerón, J., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., Caro-Vadillo, A., & Montoya-Alonso, J., 2017. Acute phase proteins and markers of oxidative stress to assess the severity of the pulmonary hypertension in heartworm-infected dogs. *Parasites & Vectors*, 10(2), 477. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2426-8>
- Carretón, E., Morchón, R., Simón, F., Juste, M. C., Méndez, J. C., & Montoya-Alonso, J. A., 2014. Cardiopulmonary and inflammatory biomarkers in the assessment of the severity of canine dirofilariosis. *Veterinary Parasitology*, 206(1-2), 43-47. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.08.019>
- Castillo-Neyra, R., Chu, L., Quispe-Machaca, V., Ancca-Juarez, J., Malaga Chavez, F. S., Bastos Mazuelos, M., Naquira, C., Bern, C., Gilman, R. H., & Levy, M. Z., 2015. The potential of canine sentinels for reemerging *Trypanosoma cruzi* transmission. *Prev Vet Med*, 120(3-4), 349-356. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.04.014>
- Cerón, J., Eckersall, P., & Martínez-Subiela, S., 2005. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol*, 34(2), 85-99. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2005.tb00019.x>

- Cerón, J., Martínez-Subiela, S., Ohno, K., & Caldin, M., 2008. A seven-point plan for acute phase protein interpretation in companion animals. *Veterinary Journal* 177(1), 6-7. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.001>
- Cerón, J., Tecles, F., & Tvarijonavičiute, A., 2014. Serum paraoxonase 1 (PON1) measurement: an update. *BMC Vet Res*, 10, 74. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-74>
- Cevallos, V., Ponce, P., Waggoner, J., Pinsky, B., Coloma, J., Quiroga, C., Morales, D., & Cárdenas, M., 2018. Zika and Chikungunya virus detection in naturally infected *Aedes aegypti* in Ecuador. *Acta Trop*, 177, 74-80. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.029>
- Chagas, C., 1909. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1, 159-218. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761909000200008&nrm=iso
- Chao, C., Leone, J., & Vigliano, C., 2020, May 1. Chagas disease: Historic perspective. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1866(5), 165689. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165689>
- Ciftci, G., Ural, K., Aysul, N., Cenesiz, S., Guzel, M., Pekmezci, D., & Sogut, M., 2014. Investigation of the 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, total antioxidant and nitric oxide levels of serum in dogs infected with *Babesia vogeli*. *Veterinary Parasitology*, 204(3), 388-391. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.05.002>
- Ciucă, L., Genchi, M., Kramer, L., Mangia, C., Miron, L. D., Prete, L. D., Maurelli, M. P., Cringoli, G., & Rinaldi, L., 2016. Heat treatment of serum samples from stray dogs naturally exposed to *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in Romania. *Veterinary Parasitology*, 225, 81-85. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.05.032>
- Clément, L., Dietrich, M., Markotter, W., Fasel, N. J., Monadjem, A., López-Baucells, A., Scaravelli, D., Théou, P., Pigeault, R., Ruedi, M., & Christe, P., 2020. Out of Africa: The origins of the protozoan blood parasites of the *Trypanosoma cruzi* clade found in bats from Africa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 145, 106705. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106705>

- Cohen, J., Sturgeon, G., & Cohen, A., 2014. Measuring progress in neglected disease drug development. *Clinical therapeutics*, 36(7), 1037-1042. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2014.05.004>
- Colussi, C., Stafuza, M., Nepote, M., & Mendicino, D., 2021. Seroprevalence of Chagas in urban and rural indigenous populations of the south of Gran Chaco. medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.01.11.21249585>
- Conner, J., Eckersall, P., Ferguson, J., & Douglas, T., 1988. Acute phase response in the dog following surgical trauma. *Res Vet Sci*, 45(1), 107-110. [https://doi.org/10.1016/s0034-5288\(18\)30902-0](https://doi.org/10.1016/s0034-5288(18)30902-0)
- Contreras, E., Dowers, K., Moroff, S., & Lappin, M., 2018. Clinical and Laboratory Effects of Doxycycline and Prednisolone in *Ixodes scapularis*-Exposed Dogs With Chronic *Anaplasma phagocytophilum* Infection. *Topics in Companion Animal Medicine*, 33(4), 147-149. <https://doi.org/https://doi.org/10.1053/j.tcam.2018.08.001>
- Costa, C., Santos, R., & Lima, E., 2006. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 42, 345-350. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442006000500006>
- Costales, J., Jara-Palacios, M., Llewellyn, M., Messenger, L., Ocaña-Mayorga, S., Villacis, A., Tibayrenc, M., & Grijalva, M., 2015, Nov. *Trypanosoma cruzi* population dynamics in the Central Ecuadorian Coast. *Acta Trop*, 151, 88-93. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.017>
- Coura, J., 2015. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3), 277-282. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140362>
- Cray, C., 2012. Acute phase proteins in animals. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 105, 113-150. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394596-9.00005-6>
- da Rosa, J., Justino, H., Nascimento, J., Mendonça, V., Rocha, C., de Carvalho, D., Falcone, R., Oliveira, M., Alevi, K., & de Oliveira, J., 2017. A new species of *Rhodnius* from Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *ZooKeys*(675), 1-25. <https://doi.org/10.3897/zookeys.675.12024>

- da Silva, C., Fattori, A., Sousa, A., Mazon, S., Alegre, S., Almeida, E., & Guariento, M., 2010. Determining the C-Reactive Protein Level in Patients With Different Clinical Forms of Chagas Disease. *Revista Española de Cardiología*, 63(9), 1096-1099. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1885-5857\(10\)70215-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1885-5857(10)70215-2)
- Dahlgren, F., Mandel, E., Krebs, J., Massung, R., & McQuiston, J., 2011. Increasing incidence of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* in the United States, 2000-2007. *Am J Trop Med Hyg*, 85(1), 124-131. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0613>
- Dantas-Torres, F., 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*, 3(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-26>
- Dantas-Torres, F., Figueredo, L., Sales, K., Miranda, D., Alexandre, J., da Silva, Y., da Silva, L., Valle, G., Ribeiro, V., Otranto, D., Deuster, K., Pollmeier, M., & Altreuther, G., 2020. Prevalence and incidence of vector-borne pathogens in unprotected dogs in two Brazilian regions. *Parasites & Vectors*, 13(1), 195. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04056-8>
- Dantas-Torres, F., & Otranto, D., 2013, Oct 2. Dirofilariosis in the Americas: a more virulent *Dirofilaria immitis*? *Parasites & Vectors*, 6(1), 288. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-288>
- Dávalos, C., & Melchiade, J. (2018). *Diagnóstico de ehrlichiosis, anaplasmosis, dirofilariosis y enfermedad de Lyme y caracterización de vectores en caninos callejeros del sector Guasmo Sur–Guayaquil* Universidad Central del Ecuador].
- de Bona, E., Lidani, K., Bavaria, L., Omidian, Z., Gremski, L., Sandri, T., & Messias, I., 2018. Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy? [Mini Review]. *Frontiers in Immunology*, 9(1842). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01842>
- de Lana, M., & Giunchetti, R., 2021. Dogs as a model for chemotherapy of Chagas disease and leishmaniasis. *Current Pharmaceutical Design*, 27(14), 1741-1756. <https://doi.org/10.2174/1381612826666201228142703>
- de Meis, J., Morrot, A., Farias-de-Oliveira, D., Villa-Verde, D., & Savino, W., 2009. Differential regional immune response in Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(7), e417. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000417>

- de Noya, B., & Gonzalez, O., 2015, Nov. An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. *Acta Trop*, 151, 94-102. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.06.004>
- de Oliveira, A., Alevi, K., Imperador, C., Madeira, F., & Azeredo-Oliveira, M., 2018. Parasite-Vector Interaction of Chagas Disease: A Mini-Review. *Am J Trop Med Hyg*, 98(3), 653-655. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0657>
- de Sousa, H., Scofield, A., Júnior, P., dos Santos, D., de Sousa, J., Chaves, J., de Jesus, R., Dos Anjos, A., Sarmento, N., Júnior, F., de Nazaré, F., de Farias, D., de Paula Souza, E., R., G., Mendes, A., Riet-Correa, G., & Cerqueira, V., 2021, May. Chagas disease in urban and peri-urban environment in the Amazon: Sentinel hosts, vectors, and the environment. *Acta Trop*, 217, 105858. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105858>
- Dewage, B., Little, S., Payton, M., Beall, M., Braff, J., Szlosek, D., Buch, J., & Knupp, A., 2019, Oct 14. Trends in canine seroprevalence to *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma* spp. in the eastern USA, 2010-2017. *Parasites & Vectors*, 12(1), 476. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3735-x>
- Dias, J., & Coura, J. (1997). *Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral*. SciELO-Editora FIOCRUZ.
- Diaz, J., 2015, Mar-Apr. Increasing risks of human dirofilariasis in travelers. *J Travel Med*, 22(2), 116-123. <https://doi.org/10.1111/jtm.12174>
- Diaz-Albiter, H., Ferreira, T., Costa, S., Rivas, G., Gumiel, M., Cavalcante, D., Pavan, M., Gonzalez, M., de Mello, C., Dillon, V., Bruno, R., Garcia Ede, Lima, M., de Castro, D., Dillon, R., de Azambuja, P., & Genta, F., 2016, Feb 29. Everybody loves sugar: first report of plant feeding in triatomines. *Parasites & Vectors*, 9, 114. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1401-0>
- Dobryszczycka, W., 1997. Biological functions of haptoglobin - New pieces to an old puzzle. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 35(9), 647-654. <https://doi.org/10.1515/cclm.1997.35.9.647>
- Dolz, G., Ábrego, L., Romero, L., Campos-Calderón, L., Bouza-Mora, L., & Jiménez-Rocha, A., 2013. Ehrlichiosis y anaplasmosis en Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, 55, 34-40.

- Donatien, A., & Lestoquard, F., 1935. Existence en Algerie d'une Rickettsia du chien. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 28, 418-419.
- Eberts, M., Vissotto, P., Beall, M., Stillman, B., Chandrashekar, R., & Breitschwerdt, E., 2011. Typical and atypical manifestations of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs. Journal of the American Animal Hospital Association, 47(6), e86-e94. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-5578>
- Echeverri, D., Honeysberg, M., Gouzi, A., & de la Espriella, A., 2021. Human monocytic ehrlichiosis: first report of a pediatric case in Colombia. Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica, 34(1), 41-47. <https://doi.org/10.35366/99827>
- Echeverria, L., & Morillo, C., 2019. American trypanosomiasis (Chagas disease). Infectious Disease Clinics, 33(1), 119-134. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.015>
- Eckersall, P., 1995. Acute phase proteins as markers of inflammatory lesions [journal article]. Comparative Haematology International, 5(2), 93-97. <https://doi.org/10.1007/bf00638925>
- Eckersall, P., & Schmidt, E., 2014. The final hurdles for acute phase protein analysis in small animal practice. Journal of Small Animal Practice, 55(1), 1-3. <https://doi.org/10.1111/jsap.12168>
- Eijk, V., 1998. Regulation of iron metabolism in the acute-phase response: interferon γ and tumour necrosis factor α induce hypoferraemia, ferritin production and a decrease in circulating transferrin receptors in cancer patients. European journal of clinical investigation, 28(7), 520-527. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.1998.00323.x>
- El-Hamiani, S., Daminet, S., Duchateau, L., Elhachimi, L., Kachani, M., & Sahibi, H., 2021. Epidemiological and Clinicopathological Features of *Anaplasma phagocytophilum* Infection in Dogs: A Systematic Review. Frontiers in veterinary science, 8, 686644-686644. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.686644>
- Enriquez, G., Bua, J., Orozco, M., Wirth, S., Schijman, A., Gurtler, R., & Cardinal, M., 2014. High levels of *Trypanosoma cruzi* DNA determined by qPCR and infectiousness to *Triatoma infestans* support dogs and cats are major sources of parasites for domestic transmission. Infection, Genetics and Evolution, 25, 36-43. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.04.002>

- Enriquez, G., Cardinal, M., Orozco, M., Schijman, A., & Gurtler, R., 2013. Detection of *Trypanosoma cruzi* infection in naturally infected dogs and cats using serological, parasitological and molecular methods. *Acta Trop*, 126(3), 211-217. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.03.001>
- Enríquez, S., Guerrero, R., Arrivillaga-Henríquez, J., Araujo, P., Villacrés, E., Enríquez, A., & Benítez-Ortíz, W., 2020. New records of ticks of genus *Amblyomma* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) for Ecuador. *Acta parasitologica*, 65(2), 430-440. <https://doi.org/10.2478/s11686-020-00173-7>
- Euzébio, D., Santos, F., Cruz, D., Varjão, A., Costa, I., Manhães, G., Nascimento, E., Correia, D., & Silva, A., 2021. *Trypanosoma cruzi* vectors and reservoirs in Southern Sergipe. *Rev Soc Bras Med Trop*, 54, e0740. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0740-2020>
- Evason, M., Stull, J. W., Pearl, D. L., Peregrine, A. S., Jardine, C., Buch, J. S., Lailer, Z., O'Connor, T., Chandrashekar, R., & Weese, J. S., 2019. Prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. and *Dirofilaria immitis* in Canadian dogs, 2008 to 2015: a repeat cross-sectional study. *Parasite & Vectors*, 12(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3299-9>
- Ferrer, E., García, H., Bolivar, A., Cañizales, I., Guerrero, R., & Herrera, L., 2021. First molecular detection of *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* and *Leishmania* spp. in capybaras. *Veterinary Parasitology Regional Studies and Reports*, 23, 100516. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100516>
- Filigheddu, M., Górgolas, M., & Ramos, J., 2017. Enfermedad de Chagas de transmisión oral. *Medicina Clínica*, 148(3), 125-131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.medcli.2016.10.038>
- Friedrichs, W., Navarajo-Ashbaugh, A., Bowman, B., & Yang, F., 1995. Expression and inflammatory regulation of haptoglobin gene in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 209(1), 250-256. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1496>
- Fudge, J., Boyanowski, B., Page, B., Liu, S., & Rogovskyy, A., 2020. Serological prevalence of six vector-borne pathogens in dogs presented for elective ovariohysterectomy or castration in the South central region of Texas. *BMC Vet Res*, 16(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02607-w>

- Galaviz-Silva, L., Mercado-Hernandez, R., Zarate-Ramos, J. J., & Molina-Garza, Z. J., 2017, Jul - Sep. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs and small mammals in Nuevo León, México. *Revista Argentina Microbiología*, 49(3), 216-223. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.11.006>
- Gettings, J., Self, S., McMahan, C., Brown, D., Nordone, S., & Yabsley, M., 2020, Mar 30. Local and regional temporal trends (2013-2019) of canine *Ehrlichia* spp. seroprevalence in the USA. *Parasites & Vectors*, 13(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04022-4>
- Gherzi, B., Peterson, A., Gibson, N., Dash, A., Elmayan, A., Schwartzburg, H., Tu, W., Riegel, C., Herrera, C., & Blum, M., 2020. In the heart of the city: *Trypanosoma cruzi* infection prevalence in rodents across New Orleans. *Parasites & Vectors*, 13(1), 577. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04446-y>
- Ghosh, P., Saleh, M., Sundstrom, K., Ientile, M., & Little, S., 2021. *Ixodes* spp. from dogs and cats in the United States: diversity, seasonality, and prevalence of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 21(1), 11-19. <https://doi.org/10.1089/vbz.2020.2637>
- Giai, M., Magaquian, M., & Guevara, M., 2018. Prevalencia de seropositividad de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en caninos de Luján de Cuyo, Argentina. *Higiene y Sanidad Ambiental*, 18(2), 1611-1615.
- Gianfrancesco, M., de Castro, M., Paes, A., Sarita Cruz Aleixo, A., Oba, E., Ferreira, F., Kiomi, R., & Gomes, M., 2019. Evaluation of heart rate variability and behavior of electrocardiographic parameters in dogs affected by chronic Monocytic Ehrlichiosis. *PLoS ONE* 14(5), e0216552. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216552>
- Giddings, O., Eickhoff, C., Smith, T., Bryant, L., & Hoft, D., 2006. Anatomical route of invasion and protective mucosal immunity in *Trypanosoma cruzi* conjunctival infection. *Infection and Immunity*, 74(10), 5549-5560. <https://doi.org/10.1128/IAI.00319-06>
- Gil-Jaramillo, N., Motta, F., Favali, C., Bastos, I., & Santana, J., 2016. Dendritic Cells: A Double-Edged Sword in Immune Responses during Chagas Disease [Review]. *Frontiers in Microbiology*, 7(1076). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01076>

- Ginsberg, H., Hickling, G., Burke, R., Ogden, N., Beati, L., LeBrun, R., Arsnøe, I., Gerhold, R., Han, S., Jackson, K., Maestas, L., Moody, T., Pang, Ross, B., Rulison, E., & Tsao, J., 2021. Why Lyme disease is common in the northern US, but rare in the south: The roles of host choice, host-seeking behavior, and tick density. *PLOS Biology*, 19(1), e3001066. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001066>
- Gobierno Autónomo Descentralizado del cantón Portoviejo. (2011). *Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial del Cantón Portoviejo*. http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdiagnostico/CAPITULO%20I_DIAGNOSTICO_14-11-2014.pdf
- Grab, D., Nyarko, E., Barat, N., Nikolskaia, O., & Dumler, J., 2007. *Anaplasma phagocytophilum* - *Borrelia burgdorferi* Coinfection Enhances Chemokine, Cytokine, and Matrix Metalloprotease Expression by Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(11), 1420-1424. <https://doi.org/doi:10.1128/CVI.00308-07>
- Grijalva, M., Suárez-Dávalos, V., Villacís, A. G., Ocaña-Mayorga, S., & Dangles, O., 2012. Ecological factors related to the widespread distribution of sylvatic *Rhodnius ecuadoriensis* populations in southern Ecuador. *Parasites & Vectors*, 5, 17. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-17>
- Grijalva, M., Villacis, A., Moncayo, A., Ocaña-Mayorga, S., Yumiseva, C., & Baus, E., 2017. Distribution of triatomine species in domestic and peridomestic environments in central coastal Ecuador. *PLoS Negl Trop Dis*, 11(10), e0005970. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005970>
- Grijalva, M., Villacis, A., Ocaña-Mayorga, S., Yumiseva, C., Moncayo, A., & Baus, E., 2015. Comprehensive Survey of Domiciliary Triatomine Species Capable of Transmitting Chagas Disease in Southern Ecuador. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(10), e0004142. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004142>
- Guedes, P., Gutierrez, F., Maia, F., Milanezi, C., Silva, G., Pavanelli, W., & Silva, J., 2010. IL-17 Produced during *Trypanosoma cruzi* Infection Plays a Central Role in Regulating Parasite-Induced Myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis*, 4(2), e604. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000604>
- Guedes, P., Veloso, V., Mineo, T., Santiago-Silva, J., Crepalde, G., Caldas, I., Nascimento, M., Lana, M., Chiari, E., Galvao, L., & Bahia, M., 2012. Hematological alterations during experimental canine infection by *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de*

Parasitologia Veterinária, 21(2), 151-156. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000200015>

Guedes, P. M., Veloso, V. M., Afonso, L. C., Caliari, M. V., Carneiro, C. M., Diniz, L. F., Marques-da-Silva, E. A., Caldas, I. S., Do Valle Matta, M. A., Souza, S. M., Lana, M., Chiari, E., Galvao, L. M., & Bahia, M. T., 2009. Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN-*gamma*, TNF-*alpha*, and low IL-10 production during the acute infection phase. *Vet Immunol Immunopathol*, 130(1-2), 43-52. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.01.004>

Guerrero, J., Vezzoni, A., Ducos, J., Bussieras, J., Rojo, F., Ortega, L., & Otto, G. (1989). Distribution of *Dirofilaria immitis* in selected areas of Europe and South America. *Proceedings of the Heartworm Symposium*,

Gurtler, R., & Cardinal, M., 2015. Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*, 151, 32-50. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.029>

Gürtler, R., & Cardinal, M. (2021). Dogs and their role in the eco-epidemiology of Chagas disease. In *Dog Parasites Endangering Human Health* (pp. 73-106). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-53230-7_5

Gutteridge, J., & Halliwell, B., 2018. Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? *Biochem Biophys Res Commun*, 502(2), 183-186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.045>

Heinrich, P., Castell, J., & Andus, T., 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*, 265(3), 621-636. <https://doi.org/10.1042/bj2650621>

Herrera, L., Aguilar, C., Morocoima, A., Viettri, M., Lares, M., & Ferrer, E., 2021. Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in false negative samples of collected triatomines, xenodiagnosis material, and biopsies of experimentally infected animals. *International Microbiology*, 24(2), 141-147. <https://doi.org/10.1007/s10123-020-00149-7>

Herrin, B., Beall, M., Feng, X., Papes, M., & Little, S., 2018. Canine and human infection with *Borrelia burgdorferi* in the New York City metropolitan area. *Parasites & Vectors*, 11(1), 187. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2774-z>

- Hetyey, C., Manczur, F., Dudás, Z., Reiczigel, J., Ribiczey, P., Vajdovich, P., & Vörös, K., 2007. Plasma Antioxidant Capacity in Dogs with Naturally Occurring Heart Diseases. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 54(1), 36-39. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2007.00911.x>
- Hidron, A., Vogenthaler, N., Santos-Preciado, J., Rodriguez-Morales, A., Franco-Paredes, C., & Rassi Jr, A., 2010. Cardiac involvement with parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 324-349. <https://doi.org/10.1128/CMR.00054-09>
- Hodo, C. L., Rodriguez, J. Y., Curtis-Robles, R., Zecca, I. B., Snowden, K. F., Cummings, K. J., & Hamer, S. A., 2019. Repeated cross-sectional study of *Trypanosoma cruzi* in shelter dogs in Texas, in the context of *Dirofilaria immitis* and tick-borne pathogen prevalence. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(1), 158-166. <https://doi.org/10.1111/jvim.15352>
- Hoft, D., Farrar, P., Kratz-Owens, K., & Shaffer, D., 1996. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infection and Immunity*, 64(9), 3800-3810. <https://doi.org/10.1128/iai.64.9.3800-3810.1996>
- Hotez, P., 2017. Ten failings in global neglected tropical diseases control. *PLoS Negl Trop Dis*, 11(12), e0005896. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005896>
- Hotez, P., Damania, A., & Bottazzi, M., 2020. Central Latin America: Two decades of challenges in neglected tropical disease control. *PLoS Negl Trop Dis*, 14(3), e0007962. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007962>
- Hovius, E., de Bruin, A., Schouls, L., Hovius, J., Dekker, N., & Sprong, H., 2018, 2018/04/12. A lifelong study of a pack Rhodesian ridgeback dogs reveals subclinical and clinical tick-borne *Anaplasma phagocytophilum* infections with possible reinfection or persistence. *Parasites & Vectors*, 11(1), 238. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2806-8>
- Howard, E., Xiong, X., Carlier, Y., Sosa, S., & Buekens, P., 2014. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 121(1), 22-33. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.12396>
- Ismail, N., Bloch, K., & McBride, J., 2010. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clin Lab Med*, 30(1), 261-292. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.10.004>

- Jacobson, R., Chang, Y., & Shin, S., 1996. Lyme disease: laboratory diagnosis of infected and vaccinated symptomatic dogs. *Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)*, 11(3), 172-182. [https://doi.org/10.1016/s1096-2867\(96\)80030-2](https://doi.org/10.1016/s1096-2867(96)80030-2)
- Jaimés-Dueñez, J., Jiménez-Leaño, P., Esteban-Mendoza, M., Moreno-Salcedo, L., Triana-Chávez, O., & Cantillo-Barraza, O., 2020. Epidemiological and clinical characteristics of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs (*Canis lupus familiaris*) from a Chagas Disease-Endemic Urban Area in Colombia. *Prev Vet Med*, 182, 105093. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105093>
- James, R. W., 2006. A long and winding road: defining the biological role and clinical importance of paraoxonases. *Clin Chem Lab Med*, 44(9), 1052-1059. <https://doi.org/10.1515/cclm.2006.207>
- Jansen, A., Xavier, S., & Roque, A., 2018. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasites & Vectors*, 11(1), 502. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3067-2>
- Jiménez, I., Vega Mariño, P., Stapleton, G., Prieto, J., & Bowman, D., 2020. Canine vector-borne disease in domestic dogs on Isla Santa Cruz, Galápagos. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 19, 100373. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100373>
- Jocelyn, P., 1987. Spectrophotometric assay of thiols. *Methods Enzymol*, 143, 44-67. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)43013-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)43013-9)
- Jorge, S., Abreu, C., Guariento, M., & Sonati, M., 2010. Haptoglobin genotypes in Chagas' disease. *Clinical Biochemistry*, 43(3), 314-316. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.09.020>
- Jurberg, J., & Galvão, C., 2006. Biology, ecology, and systematics of Triatominae (Heteroptera, *Reduviidae*), vectors of Chagas disease, and implications for human health. *Biologiezentrum Linz*, 50, 1095-1116.
- Kaneko, J., Harvey, J., & Bruss, M. (2008). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic press.

- Kapun, A., Salobir, J., Levart, A., Kotnik, T., & Svete, A., 2012. Oxidative stress markers in canine atopic dermatitis. *Res Vet Sci*, 92(3), 469-470. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.04.014>
- Karez, C., Patry, M., & Rosabal, P. (2006, 28 February - 10 March). Joint IUCN/UNESCO Mission Report: Galápagos Islands. 30th Session of the World Heritage Committee, UNESCO World Heritage Centre, Vilnius, Lithuania.
- Karnezi, D., Cerón, J., Theodorou, K., Leontides, L., Siarkou, V., Martinez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., Harrus, S., Koutinas, C., Pardali, D., & Mylonakis, M., 2016. Acute phase protein and antioxidant responses in dogs with experimental acute monocytic ehrlichiosis treated with rifampicin. *Vet Microbiol*, 184, 59-63. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.01.007>
- Keesing, F., Belden, L., Daszak, P., Dobson, A., Harvell, C., Holt, R., Hudson, P., Jolles, A., Jones, K., & Mitchell, C., 2010. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature*, 468(7324), 647-652. <https://doi.org/10.1038/nature09575>
- Kehrer, J., & Klotz, L., 2015. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. *Critical Reviews in Toxicology*, 45(9), 765-798. <https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1074159>
- Klein, M., Proaño, A., Noazin, S., Sciaudone, M., Gilman, R., & Bowman, N., 2021. Risk factors for vertical transmission of Chagas disease: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*, 105, 357-373. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.02.074>
- Kocaturk, M., Tvarijonaviciute, A., Martinez-Subiela, S., Tecles, F., Eralp, O., Yilmaz, Z., & Cerón, J., 2015a. Inflammatory and oxidative biomarkers of disease severity in dogs with parvoviral enteritis. *Journal of Small Animal Practice*, 56(2), 119-124. <https://doi.org/10.1111/jsap.12250>
- Kocaturk, M., Tvarijonaviciute, A., Martínez-Subiela, S., Tecles, F., Eralp, O., Yilmaz, Z., & Cerón, J., 2015b. Inflammatory and oxidative biomarkers of disease severity in dogs with parvoviral enteritis. *Journal of Small Animal Practice*, 56(2), 119-124. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jsap.12250>
- Koning, A., Meijers, W., Pasch, A., Leuvenink, H., Frenay, A., Dekker, M., Feelisch, M., de Boer, R., & van Goor, H., 2016. Serum free thiols in chronic heart failure.

- Koutroubakis, I., Malliaraki, N., Dimoulios, P., Karmiris, K., Castanas, E., & Kouroumalis, E., 2004. Decreased Total and Corrected Antioxidant Capacity in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 49(9), 1433-1437. <https://doi.org/10.1023/B:DDAS.0000042242.22898.d9>
- Kun, H., Moore, A., Mascola, L., Frank, S., Gena, L., Kubak, B., Radhakrishna, S., Leiby, D., Herron, R., & Mone, T., 2009. Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, 48(11), 1534-1540. <https://doi.org/10.1086/598931>
- Lafuse, W., Wozniak, D., & Rajaram, M., 2021. Role of Cardiac Macrophages on Cardiac Inflammation, Fibrosis and Tissue Repair. *Cells*, 10(1), 51. <https://doi.org/10.3390/cells10010051>
- Latzke, A., Fernández, P., Chiurciu, C., de la Fuente, J., Caliva, S., Bonisconti, F., & Caeiro, J., 2017. *Trypanosoma cruzi*, organ transplant related. *IDCases*, 10, 60-60. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2017.09.001>
- Lauricella, M., Sinagra, A., Paulone, I., Riarte, A., & Segura, E., 1989. Natural *Trypanosoma cruzi* infection in dogs of endemic areas of the Argentine Republic. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 31(2), 63-70. <https://doi.org/10.1590/s0036-46651989000200001>
- Lee, J., 2013. Evaluation of the total oxidant and antioxidant status of the plasma of dogs anaesthetised with isoflurane. *Veterinary Record*, 173, 96. <https://doi.org/10.1136/vr.101299>
- Lee, J., & Kim, M., 2014. Comparison of oxidative stress status in dogs undergoing laparoscopic and open ovariectomy. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(2), 273-276. <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0062>
- Leite, G., dos Santos, C., & Falqueto, A., 2011. Influence of the landscape on dispersal of sylvatic triatomines to anthropic habitats in the Atlantic Forest. *Journal of Biogeography*, 38(4), 651-663. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2010.02442.x>

- Levy, S., O'Connor, T., Hanscom, J., & Shields, P., 2002, 2002. Utility of an in-office C6 ELISA test kit for determination of infection status of dogs naturally exposed to *Borrelia burgdorferi*. *Veterinary therapeutics : research in applied veterinary medicine*, 3(3), 308-315. <http://europepmc.org/abstract/MED/12447839>
- Lidani, K., Andrade, F., Bavia, L., Damasceno, F., Beltrame, M., Messias, I., & Sandri, T., 2019. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem [Review]. *Frontiers in Public Health*, 7(166). <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>
- Little, S., Braff, J., Place, J., Buch, J., Dewage, B., Knupp, A., & Beall, M., 2021. Canine infection with *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma* spp., and *Ehrlichia* spp. in the United States, 2013–2019. *Parasites & Vectors*, 14(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04514-3>
- Lochhead, R., Strle, K., Arvikar, S., Weis, J., & Steere, A., 2021. Lyme arthritis: linking infection, inflammation and autoimmunity. *Nature Reviews Rheumatology*, 17(8), 449-461. <https://doi.org/10.1038/s41584-021-00648-5>
- López, L., Arai, K., Giménez, E., Jiménez, M., Pascuzo, C., Rodríguez-Bonfante, C., & Bonfante-Cabarcas, R., 2006. C-reactive protein and interleukin-6 serum levels increase as Chagas disease progresses towards cardiac failure. *Revista Española de Cardiología*, 59(1), 50-56. <https://doi.org/10.1157/13083649>
- Mackness, M., Arrol, S., & Durrington, P., 1991. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett*, 286(1-2), 152-154. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80962-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80962-3)
- Maggi, R., & Kramer, F., 2019. A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. *Parasites & Vectors*, 12(1), 145. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3407-x>
- Majeau, A., Pronovost, H., Sanford, A., Cloherty, E., Anderson, A., Balsamo, G., Gee, L., Straif-Bourgeois, S., & Herrera, C., 2020. Raccoons As an Important Reservoir for *Trypanosoma cruzi*: A Prevalence Study from Two Metropolitan Areas in Louisiana. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 20(7), 535-540. <https://doi.org/10.1089/vbz.2019.2559>
- Malik, A., Jameel, M., Ali, S., & Mir, S., 2005. Human granulocytic anaplasmosis affecting the myocardium. *Journal of general internal medicine*, 20(10), C8-C10. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1497.2005.00218.x>

- Marcos-Atxutegi, C., Gabrielli, S., Kramer, L., Cancrini, G., & Simón, F., 2004. Antibody response against *Dirofilaria immitis* and the *Wolbachia* endosymbiont in naturally infected canine and human hosts. Proceedings of the IX European Multicolloquium of Parasitology, 297-302.
- Marinho, C., D'Império, M., Grisotto, M., & Alvarez, J., 1999. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. Infection and Immunity, 67(1), 308-318. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.1.308-318.1999>
- Martinelli, N., Consoli, L., Girelli, D., Grison, E., Corrocher, R., & Olivieri, O., 2013. Paraoxonases: ancient substrate hunters and their evolving role in ischemic heart disease. Adv Clin Chem, 59, 65-100. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405211-6.00003-6>
- Martínez-Ibarra, J., Martínez-Grant, J., Verdugo-Cervantes, M., Bustos-Saldaña, R., & Noguera-Torres, B., 2010. Monitoring triatomid bug (Hemiptera: Reduviidae) presence by sentinel chicken coops in Southern Jalisco State, México. Biomedica, 30(1), 140-145.
- Martínez-Subiela, S., Bernal, L., & Cerón, J., 2003. Serum concentrations of acute-phase proteins in dogs with leishmaniosis during short-term treatment. Am J Vet Res, 64(8), 1021-1026. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2003.64.1021>
- Martínez-Subiela, S., Bernal, L., Tvarijonavičiute, A., Garcia, J., Tecles, & Cerón, J., 2014a. Canine demodicosis: the relationship between response to treatment of generalised disease and markers for inflammation and oxidative status. Veterinary Dermatology, 25(2), 72-e24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/vde.12108>
- Martínez-Subiela, S., & Cerón, J., 2005. Validación analítica de técnicas comerciales para la determinación de haptoglobina, proteína C reactiva y amiloide A sérico en caninos Analytical. Archivos de medicina veterinaria, 37, 61-66. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2005000100009>.
- Martínez-Subiela, S., Cerón, J., Strauss-Ayali, D., Garcia-Martinez, J., Tecles, F., Tvarijonavičiute, A., Caldin, M., & Baneth, G., 2014b. Serum ferritin and paraoxonase-1 in canine leishmaniosis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 37(1), 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2013.10.004>

- Martínez-Subiela, S., Ginel, P., & Cerón, J., 2004. Effects of different glucocorticoid treatments on serum acute phase proteins in dogs. *Vet Rec*, 154(26), 814-817. <https://doi.org/10.1136/vr.154.26.814>
- Martínez-Subiela, S., Pardo-Marín, L., Tecles, F., Baneth, G., & Cerón, J., 2016. Serum C-reactive protein and ferritin concentrations in dogs undergoing leishmaniosis treatment. *Res Vet Sci*, 109, 17-20. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.09.003>
- Martínez-Subiela, S., Strauss-Ayali, D., Cerón, J., & Baneth, G., 2011. Acute phase protein response in experimental canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 180(3-4), 197-202. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.032>
- Martínez-Subiela, S., Tecles, F., Eckersall, P., & Cerón, J., 2002. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet Rec*, 150(8), 241-244. <https://doi.org/10.1136/vr.150.8.241>
- Martínez-Subiela, S., Tecles, F., Parra, M., & Cerón, J., 2001. Acute phase proteins: General concepts and main clinical applications in veterinary medicine. *Anales de Veterinaria*, Vol 17, 97-113. 117.
- Matijatko, V., Mrljak, V., Kiš, I., Kučer, N., Foršek, J., Živičnjak, T., Romić, Ž., Šimec, Z., & Cerón, J., 2007. Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology*, 144(3-4), 242-250. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.10.004>
- McCall, J., Genchi, C., Kramer, L., Guerrero, J., & Venco, L., 2008. Heartworm disease in animals and humans. *Adv Parasitol*, 66, 193-285. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(08\)00204-2](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)00204-2)
- McCown, M., Monterroso, V., & Cardona, W., 2014. Surveillance for *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, and *Dirofilaria immitis* in Dogs From Three Cities in Colombia. *Journal of Special Operations Medicine*, 14(1), 86-90.
- McCown, M., Monterroso, V. H., & Grzeszak, B., 2011. Surveillance of zoonotic and infectious diseases in Ecuador: implications for special operations forces medical operations, personnel, and canines. *Journal of Special Operations Medicine*, 11(3), 61-65.

- Medina-Torres, I., Vazquez-Chagoyan, J., Rodriguez-Vivas, R., & de Oca-Jimenez, R., 2010. Risk factors associated with triatomines and its infection with *Trypanosoma cruzi* in rural communities from the southern region of the State of Mexico, Mexico. *Am J Trop Med Hyg*, 82(1), 49-54. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.08-0624>
- Medrano-Mercado, N., Luz, M., Torrico, F., Tapia, G., Van Leuven, F., & Araujo-Jorge, T., 1996. Acute-phase proteins and serologic profiles of chagasic children from an endemic area in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg*, 54(2), 154-161. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1996.54.154>
- Méndez, J., Carreton, E., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., Ceron, J., & Montoya-Alonso, J., 2015. Acute phase protein response in heartworm-infected dogs after adulticide treatment. *Veterinary Parasitology*, 209(3-4), 197-201. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.036>
- Méndez, J., Carretón, E., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., Cerón, J., & Montoya-Alonso, J., 2014. Acute phase response in dogs with *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Parasitology*, 204(3-4), 420-425. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.05.016>
- Mesa-Arciniegas, P., Parra-Henao, G., Carrión-Bonifacio, Á., Casas-Cruz, A., Patiño-Cuellar, A., Díaz-Rodríguez, K., Garzón-Jiménez, S., Almansa-Manrique, J., Bernal-Rosas, Y., Hernández-Lamus, C., Pedraza-Toscano, A., & Torres-García, O., 2018. *Trypanosoma cruzi* infection in naturally infected dogs from an endemic region of Cundinamarca, Colombia. *Veterinary Parasitology Regional Studies and Reports*, 14, 212-216. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.11.006>
- Mestecky, J., Russell, M., & Elson, C., 2007. Perspectives on Mucosal Vaccines: Is Mucosal Tolerance a Barrier? *The Journal of Immunology*, 179(9), 5633-5638. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.9.5633>
- Milanović, Z., Beletić, A., Vekić, J., Zeljković, A., Andrić, N., Božović, A., Spariosu, K., Radaković, M., Ajtić, J., & Filipović, M., 2020. Evidence of acute phase reaction in asymptomatic dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology*, 282, 109140. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109140>
- Mills, R., 2020. Chagas disease: epidemiology and barriers to treatment. *The American Journal of Medicine*, 133(11), 1262-1265. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.05.022>

- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2019). *Ecuador es el quinto país de la región en adoptar la Estrategia de Eliminación de la Transmisión Materno Infantil de VIH, Sífilis, Hepatitis y Chagas*. <https://www.salud.gob.ec/ecuador-es-el-quinto-pais-de-la-region-en-adoptar-la-estrategia-de-eliminacion-de-la-transmision-materno-infantil-de-vih-sifilis-hepatitis-y-chagas/>
- Monsalve-Lara, J., Liliioso, M., Valença-Barbosa, C., Thyssen, P., Miguel, D., Limeira, C., Gadelha, F., Fontes, F., Pires-Silva, D., & Dornak, L., 2021. The risk of oral transmission in an area of a Chagas disease outbreak in the Brazilian northeast evaluated through entomological, socioeconomic and schooling indicators. *Acta Trop*, 215, 105803. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105803>
- Montenegro, V., Bonilla, M., Kaminsky, D., Romero-Zuniga, J., Siebert, S., & Kramer, F., 2017. Serological detection of antibodies to *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Ehrlichia canis* and of *Dirofilaria immitis* antigen in dogs from Costa Rica. *Veterinary Parasitology*, 236, 97-107. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.02.009>
- Montoya-Alonso, J., Carretón, E., Juste, M. C., Mellado, I., Morchón, R., & Simón, F., 2010. Epidemiological survey of canine heartworm disease on the island of Gran Canaria (Canary Islands – Spain) between 2000 and 2008. *Veterinary Parasitology*, 173(1), 165-168. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.008>
- Mora, J., Cheng, G., Picarella, D., Briskin, M., Buchanan, N., & von Andrian, U., 2005. Reciprocal and dynamic control of CD8 T cell homing by dendritic cells from skin- and gut-associated lymphoid tissues. *The Journal of experimental medicine*, 201(2), 303-316. <https://doi.org/10.1084/jem.20041645>
- Morales, D., 2021. Enfermedad de Chagas en el Ecuador: una revisión sistemática de los aspectos epidemiológicos y entomológicos. *INSPILIP*, 5(1). <https://doi.org/10.31790/inspilip.v5i1.2>
- Morán-Loor, A. (2006). *Prevalencia de Dirofilariasis, Borreliosis y Ehrlichiosis canina mediante la prueba de ELISA, en las parroquias urbanas de Portoviejo, junio - noviembre 2005* [Investigación, Universidad Técnica de Manabí].
- Moretti, E., Basso, B., Cervetta, L., Brigada, A., & Barbieri, G., 2002. Patterns of cytokines and soluble cellular receptors in the sera of children with acute Chagas' disease. *Clinical and Vaccine Immunology*, 9(6), 1324-1327. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.6.1324-1327.2002>

- Movilla, R., Garcia, C., Siebert, S., & Roura, X., 2016. Countrywide serological evaluation of canine prevalence for *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* (*sensu lato*), *Dirofilaria immitis* and *Ehrlichia canis* in Mexico. *Parasites & Vectors*, 9(1), 421. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1686-z>
- Muñoz-Prieto, A., Tvarijonaviciute, A., Escribano, D., Martínez-Subiela, S., & Cerón, J., 2017. Use of heterologous immunoassays for quantification of serum proteins: The case of canine C-reactive protein. *PLoS One*, 12(2), e0172188. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172188>
- Murata, H., Shimada, N., & Yoshioka, M., 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The veterinary journal*, 168(1), 28-40. [https://doi.org/10.1016/s1090-0233\(03\)00119-9](https://doi.org/10.1016/s1090-0233(03)00119-9)
- Murillo, G., 2019. Chagas disease (American trypanosomiasis). *Medicina interna de México*, 34(6), 959-970.
- Mylonakis, M., Cerón, J., Leontides, L., Siarkou, V., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., Koutinas, A., & Harrus, S., 2011. Serum acute phase proteins as clinical phase indicators and outcome predictors in naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(4), 811-817. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0728.x>
- Mylonakis, M., Harrus, S., & Breitschwerdt, E., 2019. An update on the treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *The veterinary journal*, 246, 45-53. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.01.015>
- Nair, A., Cheng, C., Ganta, C., Sanderson, M., Alleman, A., Munderloh, U., & Ganta, R., 2016. Comparative Experimental Infection Study in Dogs with *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *Anaplasma platys* and *A. phagocytophilum*. *PLoS One*, 11(2), e0148239. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148239>
- Ndung'u, J., Eckersall, P., & Jennings, F., 1991. Elevation of the concentration of acute phase proteins in dogs infected with *Trypanosoma brucei*. *Acta Trop*, 49(2), 77-86. [https://doi.org/10.1016/0001-706x\(91\)90055-o](https://doi.org/10.1016/0001-706x(91)90055-o)
- Nihei, J., Cardillo, F., & Mengel, J., 2021. The Blockade of Interleukin-2 During the Acute Phase of *Trypanosoma cruzi* Infection Reveals Its Dominant Regulatory Role

- [Original Research]. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11(1151). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.758273>
- Nouvellet, P., Dumonteil, E., & Gourbière, S., 2013. The improbable transmission of *Trypanosoma cruzi* to human: the missing link in the dynamics and control of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(11), e2505. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002505>
- Ocaña-Mayorga, S., Lobos, S., Crespo-Pérez, V., Villacís, A., Pinto, C., & Grijalva, M., 2018, 2018/10/29. Influence of ecological factors on the presence of a triatomine species associated with the arboreal habitat of a host of *Trypanosoma cruzi*. *Parasites & Vectors*, 11(1), 567. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3138-4>
- Ogden, N., Bouchard, C., Badcock, J., Drebot, M., Elias, S., Hatchette, T., Koffi, J., Leighton, P., Lindsay, L., Lubelczyk, C., Peregrine, A., Smith, R., & Webster, D., 2019. What is the real number of Lyme disease cases in Canada? *BMC Public Health*, 19(1), 849. <https://doi.org/10.1186/s12889-019-7219-x>
- Oi, M., Yoshikawa, S., Ichikawa, Y., Nakagaki, K., Matsumoto, J., & Nogami, S., 2014. Prevalence of *Dirofilaria immitis* among shelter dogs in Tokyo, Japan, after a decade: comparison of 1999-2001 and 2009-2011. *Parasite* 21, 10-10. <https://doi.org/10.1051/parasite/2014008>
- Ojeda-Chi, M., Rodriguez-Vivas, R., Esteve-Gasent, M., Pérez de León, A., Modarelli, J., & Villegas-Perez, S., 2019. *Ehrlichia canis* in dogs of Mexico: Prevalence, incidence, co-infection and factors associated. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 67, 101351. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101351>
- Oldenburg, D., Jobe, D., Lovrich, S., LaFleur, R., White, D., Dant, J., & Callister, S., 2020. Detection of antibodies to decorin-binding protein A (DbpA) and DbpB after infection of dogs with *Borrelia burgdorferi* by tick challenge. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(3), 481-485. <https://doi.org/10.1177/1040638720912394>
- Orozco, M., Enriquez, G., Cardinal, M., Piccinali, R., & Gürtler, R., 2016. A comparative study of *Trypanosoma cruzi* infection in sylvatic mammals from a protected and a disturbed area in the Argentine Chaco. *Acta Trop*, 155, 34-42. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.12.004>

- Otani, M., Vinelli, E., Kirchhoff, L., Del Pozo, A., Sands, A., Vercauteren, G., & Sabino, E., 2009. WHO comparative evaluation of serologic assays for Chagas disease. *Transfusion*, 49(6), 1076-1082. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02107.x>
- PAHO. (2002). *El control de la enfermedad de Chagas en los países del cono sur de América*. https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6001:2011-iniciativa-cono-sur-controlar-eliminar-enfermedad-chagas-incosur&Itemid=4219&lang=en
- Pepys, M., 1981. C-reactive protein fifty years on. *Lancet*, 1(8221), 653-657. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(81\)91565-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(81)91565-8)
- Pérez, S., Pedrozo, R., Bittencourt, P., & Müller, A., 2019. Prevalence, molecular characterization and risk factor analysis of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in domestic dogs from Paraguay. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 62, 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.11.015>
- Pesapane, R., Foley, J., Thomas, R., & Castro, L., 2019. Molecular detection and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from northern Colombia. *Vet Microbiol*, 233, 184-189. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.05.002>
- Pesquera, C., Portillo, A., Palomar, A., & Oteo, J., 2015. Investigation of tick-borne bacteria (*Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. and *Borrelia* spp.) in ticks collected from Andean tapirs, cattle and vegetation from a protected area in Ecuador. *Parasites & Vectors*, 8(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0662-3>
- Pino, A., Medina, G., Gallo, S., Duran, A., Arango, Á., Rodríguez, M., Medina, R., Manrique, F., Forero, J., & Medina, H., 2021. Chagas Cardiomyopathy: From Romanaña Sign to Heart Failure and Sudden Cardiac Death. *Pathogens*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/pathogens10050505>
- Plourde, P., Kadkhoda, K., & Ndao, M., 2017. Congenitally transmitted Chagas disease in Canada: a family cluster. *Canadian Medical Association Journal*, 189(48), E1489-E1492. <https://doi.org/10.1503/cmaj.170648>
- Quorollo, B., Chandrashekar, R., Hegarty, B., Beall, M., Stillman, B., Liu, J., Thatcher, B., Pultorak, E., Cerrito, B., Walsh, M., & Breitschwerdt, E., 2014. A serological survey of tick-borne pathogens in dogs in North America and the Caribbean as assessed by *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys*, *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*,

- and *Borrelia burgdorferi* species-specific peptides. *Infection Ecology & Epidemiology*, 4(1), 24699. <https://doi.org/10.3402/iee.v4.24699>
- Rabinovich, J., Wisnivesky, C., Solarz, N., & Gürtler, R., 1990. Probability of transmission of Chagas disease by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in an endemic area of Santiago del Estero, Argentina. *Bulletin of the World Health Organization*, 68(6), 737.
- Ramsey, J., Gutiérrez, A., Salgado, L., Peterson, A., Sánchez, V., & Ibarra, C., 2012. Ecological Connectivity of *Trypanosoma cruzi* Reservoirs and *Triatoma pallidipennis* Hosts in an Anthropogenic Landscape with Endemic Chagas Disease. *PLoS One*, 7(9), e46013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046013>
- Ramsey, J., Peterson, A., Carmona, O., Moo, D., Nakazawa, Y., Butrick, M., Tun-Ku, E., la Cruz, K., & Ibarra, C., 2015. Atlas of Mexican Triatominae (Reduviidae: Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110, 339-352. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140404>
- Rassi, A., & de Rezende, J., 2012. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious Disease Clinics*, 26(2), 275-291. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>
- Rassi, A., Jr., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A., 2010. Chagas disease. *Lancet*, 375(9723), 1388-1402. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)60061-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(10)60061-x)
- Requena, A., Albajar, P., Angheben, A., Chiodini, P., Gascón, J., & Muñoz, J., 2014. Health policies to control Chagas disease transmission in European countries. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(10), e3245. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003245>
- Rikihisa, Y., Yamamoto, S., Kwak, I., Iqbal, Z., Kociba, G., Mott, J., & Chichanasiriwithaya, W., 1994. C-reactive protein and alpha 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *J Clin Microbiol*, 32(4), 912-917. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.4.912-917.1994>
- Rivadeneira, P., Montes de Oca, R., Vázquez-Chagoyán, J., Martínez, S., Morán, A., Ochoa, L., Zambrano, P., Garg, N., & Varela, J., 2021. *Trypanosoma cruzi* co-infections with other vector borne diseases are frequent in dogs from the pacific coast of Ecuador. *Microb Pathog*, 155, 104884. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104884>

- Rivas, C., Guerrero, J., & Navarro, R., 2021. Deforestation and fragmentation trends of seasonal dry tropical forest in Ecuador: impact on conservation. *Forest Ecosystems*, 8(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s40663-021-00329-5>
- Rodeles, L., Vicco, M., Bontempi, I., Siano, A., Tonarelli, G., Bottasso, O., Arias, P., & Marcipar, I., 2016. Combined analysis of cross-reacting antibodies anti- β 1AR and anti-B13 in advanced stages of Chagas heart disease. *Tropical Medicine & International Health*, 21(12), 1545-1551. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tmi.12791>
- Rodríguez, E., Shinkarenko, L., Peralta, R., Coello, R., & Brito, B., 2017. *Trypanosoma cruzi* en el perro doméstico, reservorio de la enfermedad de Chagas, en áreas norte y sur de la ciudad Pedro Carbo. *RECIMUNDO: Revista Científica de la Investigación y el Conocimiento*, 1(5), 213-234. <https://doi.org/10.26820/recimundo/1.5.2017.213-234>
- Rodríguez-Monguít, E., Cantillo-Barraza, O., Prieto-Alvarado, F., & Cucunubá, Z., 2019. Heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* infection rates in vectors and animal reservoirs in Colombia: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, 12(1), 308. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3541-5>
- Romaña, C., 1943. Contribuição ao conhecimento da patogenia da Tripanosomose Americana:(período inicial da infecção). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 39, 253-264.
- Rubio, A. M., Salas, E. A., & Gómez, G., 2011. Presencia de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* y *Anaplasma* spp. en canes de la ciudad de Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 22, 233-238. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172011000300008&nrm=iso
- Rubio, C., & Cerón, J., 2021. Spectrophotometric assays for evaluation of Reactive Oxygen Species (ROS) in serum: general concepts and applications in dogs and humans. *BMC Vet Res*, 17(1), 226. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02924-8>
- Rubio, C., Hernandez, J., Martinez, S., Tvarijonaviciute, A., Arnao, M., & Ceron, J., 2016a. Validation of three automated assays for total antioxidant capacity determination in canine serum samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 28(6), 693-698. <https://doi.org/10.1177/1040638716664939>

- Rubio, C., Hernandez, J., Martinez, S., Tvarijonaviciute, A., & Ceron, J., 2016b, Aug 15. Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: an update. *BMC Vet Res*, 12(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0792-7>
- Rubio, C., Martinez-Subiela, S., Hernández-Ruiz, J., Tvarijonaviciute, A., & Ceron, J., 2017a. Analytical validation of an automated assay for ferric-reducing ability of plasma in dog serum. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(4), 574-578. <https://doi.org/10.1177/1040638717693883>
- Rubio, C., Martínez-Subiela, S., Hernández-Ruiz, J., Tvarijonaviciute, A., Cerón, J., & Allenspach, K., 2017b. Serum biomarkers of oxidative stress in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *The veterinary journal*, 221, 56-61. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.02.003>
- Rubio, C., Saril, A., Kocaturk, M., Tanaka, R., Koch, J., Cerón, J., & Yilmaz, Z., 2020. Changes of inflammatory and oxidative stress biomarkers in dogs with different stages of heart failure. *BMC Vet Res*, 16(1), 433. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02650-7>
- Rubio, C., Tvarijonaviciute, A., Martinez-Subiela, S., Hernández-Ruiz, J., & Cerón, J. J., 2016c. Validation of an automated assay for the measurement of cupric reducing antioxidant capacity in serum of dogs. *BMC Vet Res*, 12(1), 137. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0760-2>
- Rubio, C., Yilmaz, Z., Martínez, S., Kocaturk, M., Hernández, J., Yalcin, E., Tvarijonaviciute, A., Escibano, D., & Cerón, J., 2017c. Serum antioxidant capacity and oxidative damage in clinical and subclinical canine ehrlichiosis. *Res Vet Sci*, 115, 301-306. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.06.004>
- Rudoler, N., Harrus, S., Martinez, S., Tvarijonaviciute, A., Van Straten, M., Cerón, J., & Baneth, G., 2015. Comparison of the acute phase protein and antioxidant responses in dogs vaccinated against canine monocytic ehrlichiosis and naive-challenged dogs. *Parasites & Vectors*, 8(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0798-1>
- Sainz, A., Roura, X., Miró, G., Estrada, A., Kohn, B., Harrus, S., & Solano, L., 2015. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasites & Vectors*, 8(1), 1-20. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0649-0>
- Sandoval, C., Duarte, R., Gutiérrez, R., Rocha, D., Angulo, V., Esteban, L., Reyes, M., Jurberg, J., & Galvão, C., 2004. Feeding sources and natural infection of *Belminus*

herrerri (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from dwellings in Cesar, Colombia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 99, 137-140. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000200004>

Santos, F., Carvalho, G., Teixeira, W., Rodrigues, L., Martins, C., Miranda, G., de Oliveira, G., Domenis, E., Rogério, M., Perles, L., Elisei, C., Braziliano, G., Jansen, A., & Miraglia, H., 2018. Outcomes of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* infections on health of Southern coati (*Nasua nasua*), crab-eating fox (*Cerdocyon thous*), and ocelot (*Leopardus pardalis*) in the Brazilian Pantanal. PLoS One, 13(8), e0201357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201357>

Scarim, C., Jornada, D., Chelucci, R., de Almeida, L., Dos Santos, J., & Chung, M., 2018. Current advances in drug discovery for Chagas disease. European journal of medicinal chemistry, 155, 824-838. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.06.040>

Schmunis, G., Zicker, F., Pinheiro, F., & Brandling, D., 1998. Risk for transfusion-transmitted infectious diseases in Central and South America. Emerg Infect Dis, 4(1), 5-11. <https://doi.org/10.3201/eid0401.980102>

Schmunis, G. A., 1999. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 94, 93-101. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000700010>

Schofield, C., & Galvão, C., 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. Acta Trop, 110(2-3), 88-100. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.01.010>

SICGAL. (2003). *Reglamento de control total de especies introducidas de la provincia de Galápagos*. Ministerio del Ambiente. https://bioseguridadgalapagos.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2013/12/Reglamento_de_Control_Total_de_Especies_Introducidas_RCTEI.pdf

Sies, H., 2015. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. Redox biology, 4, 180-183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>

Sironi, M., Bandi, C., Sacchi, L., Sacco, B., Damiani, G., & Genchi, C., 1995. Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. Mol Biochem Parasitol, 74(2), 223-227. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-6851\(95\)02494-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-6851(95)02494-8)

- Society, A. H., 2018. Current canine guidelines for the prevention, diagnosis, and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. <https://www.heartwormsociety.org/images/pdf/2018-AHS-Canine-Guidelines.pdf>
- Solís, A., Rodríguez, R., Esteve, M., & Villegas, S., 2018. Detección de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en perros y sus garrapatas en comunidades rurales de Yucatán, México. *Revista de Biología Tropical*, 66(1), 428-437. <https://doi.org/10.15517/rbt.v66i1.27776>
- Speck, S., Reiner, B., Streich, W. J., Reusch, C., & Wittenbrink, M., 2007. Canine borreliosis: A laboratory diagnostic trial. *Vet Microbiol*, 120(1), 132-141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.10.017>
- Strasen, J., Williams, T., Ertl, G., Zoller, T., Stich, A., & Ritter, O., 2014. Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. *Clinical Research in Cardiology*, 103(1), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s00392-013-0613-y>
- Suárez, V., Dangles, O., Villacís, A., & Grijalva, M., 2010. Microdistribution of sylvatic triatomine populations in central-coastal Ecuador. *Journal of Medical Entomology*, 47(1), 80-88. <https://doi.org/10.1093/jmedent/47.1.80>
- Summers, B., Straubinger, A., Jacobson, R., Chang, Y., Appel, M., & Straubinger, R., 2005. Histopathological Studies of Experimental Lyme Disease in the Dog. *Journal of Comparative Pathology*, 133(1), 1-13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2004.11.006>
- Tahir, D., Bittar, F., Barré, H., Sow, D., Dahmani, M., Mediannikov, O., Raoult, D., Davoust, B., & Parola, P., 2017. Molecular survey of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* by new real-time TaqMan® PCR assay in dogs and mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Corsica (France). *Veterinary Parasitology*, 235, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.01.002>
- Thomas, F., Geraghty, T., Simões, P., Mshelbwala, F., Haining, H., & Eckersall, P., 2018. A pilot study of acute phase proteins as indicators of bovine mastitis caused by different pathogens. *Research Veterinary Science*, 119, 176-181. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.06.015>
- Tvarijonaviciute, A., García-Martínez, J., Caldin, M., Martínez-Subiela, S., Tecles, F., Pastor, J., & Ceron, J., 2015. Serum paraoxonase 1 (PON1) activity in acute

- pancreatitis of dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 56(1), 67-71. <https://doi.org/10.1111/jsap.12297>
- Tvarijonavičiute, A., Tecles, F., Caldin, M., Tasca, S., & Cerón, J., 2012. Validation of spectrophotometric assays for serum paraoxonase type-1 measurement in dogs. *Am J Vet Res*, 73(1), 34-41. <https://doi.org/10.2460/ajvr.73.1.34>
- Tyler, K., & Engman, D., 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol*, 31(5-6), 472-481. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00153-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00153-9)
- Van Overtvelt, L., Vanderheyde, N., Verhasselt, V., Ismaili, J., De Vos, L., Goldman, M., Willems, F., & Vray, B., 1999. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. *Infection and Immunity*, 67(8), 4033-4040. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.8.4033-4040.1999>
- Velásquez-Ortiz, N., & Ramírez, J. D., 2020, 2020/10/01/. Understanding the oral transmission of *Trypanosoma cruzi* as a veterinary and medical foodborne zoonosis. *Res Vet Sci*, 132, 448-461. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.07.024>
- Vera-Ku, M., Meza-González, G., Carlier, Y., Truyens, C., & Gamboa-León, R., 2019. Comparison of methodologies for detecting *Trypanosoma cruzi* parasites by microscopic observation of microhematocrit capillary tubes. *Rev Soc Bras Med Trop*, 52. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0505-2018>
- Villacís, A., Grijalva, M., & Catalá, S., 2014. Phenotypic variability of *Rhodnius ecuadoriensis* populations at the Ecuadorian central and southern Andean region. *Journal of Medical Entomology*, 47(6), 1034-1043. <https://doi.org/10.1603/ME10053>
- Villacís, A., Ocaña, S., Lascano, M., Yumiseva, C., Baus, E., & Grijalva, M., 2015. Abundance, natural infection with trypanosomes, and food source of an endemic species of triatomine, *Panstrongylus howardi* (Neiva 1911), on the Ecuadorian Central Coast. *Am J Trop Med Hyg*, 92(1), 187-192. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0250>
- Volanakis, J., 2001. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Mol Immunol*, 38(2-3), 189-197. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00042-6](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00042-6)

- Wang, S., Zhang, N., Zhang, Z., Wang, D., Yao, Z., Zhang, H., Ma, J., Zheng, B., Ren, H., & Liu, S., 2016. Prevalence of *Dirofilaria immitis* infection in dogs in Henan province, central China. *Parasite*, 23, 43. <https://doi.org/10.1051/parasite/2016054>
- Wen, J., Nagajyothi, F., Machado, F., Weiss, L., Scherer, P., Tanowitz, H., & Garg, N., 2014. Markers of oxidative stress in adipose tissue during *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology Research*, 113(9), 3159-3165. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3977-7>
- WHO. (2001). *International Programme on Chemical Safety. Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. Geneva: WHO; 2001.*
- WHO. (2002). *Control of Chagas Disease, Second report of the WHO Expert Committee.* <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42443>
- WHO. (2020). *Enfermedades transmitidas por vectores.* Retrieved junio from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
- WHO. (2021). *La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana).* [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- Wisnivesky, C., Gurtler, R., Solarz, N., Lauricella, M., & Segura, E., 1985, Nov-Dec. Epidemiological role of humans, dogs and cats in the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a central area of Argentina. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 27(6), 346-352. <https://doi.org/10.1590/s0036-46651985000600009>
- Xavier, S., Roque, A., Lima, V., Monteiro, K., Otaviano, J., Ferreira, L., & Jansen, A., 2012. Lower richness of small wild mammal species and Chagas disease risk. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(5), e1647. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001647>
- Yancey, C., Hegarty, B., Qurollo, B., Levy, M., Birkenheuer, A., Weber, D., Diniz, P., & Breitschwerdt, E., 2014. Regional seroreactivity and vector-borne disease co-exposures in dogs in the United States from 2004-2010: utility of canine surveillance. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 14(10), 724-732. <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1592>

- Yoshida, N., 2008. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitol Int*, 57(2), 105-109. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2007.12.008>
- Zingales, B., 2018. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop*, 184, 38-52. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>
- Zuma, A., dos Santos Barrias, E., & de Souza, W., 2021. Basic Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*, 27(14), 1671-1732. <https://doi.org/10.2174/1381612826999201203213527>