



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

## TESIS

TÍTULO:

Evaluación de parasitemia, serología, electrocardiografía, ecocardiografía y radiografía en su fase crónica en perros infectados experimentalmente de la Enfermedad de Chagas.

QUE PARA OBTENER TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA:

CUAUHTÉMOC ALONSO GUITIÉRREZ ESPINOZA

ASESORES:

Dr. JUAN CARLOS VÁZQUEZ CHAGOYÁN

Dr. ALBERTO BARBABOSA PLIEGO

M en C. SANDRA DÍAZ GONZÁLEZ VIEYRA



## Contenido

1	Introducción	6
2	Marco Teórico	7
2.1	Enfermedad de Chagas	7
2.2	Agente etiológico	8
2.3	Ciclo biológico del <i>Trypanosoma cruzi</i> en el mamífero	8
2.4	Modos de transmisión de <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
2.4.1	Transmisión vectorial	9
2.4.2	Transmisión por transfusión sanguínea	10
2.4.3	Transmisión congénita	10
2.4.4	Transmisión por trasplante de órganos	10
2.4.5	Transmisión oral	10
2.4.6	Transmisión por accidentes de laboratorio	11
2.5	Diagnóstico	11
2.5.1	Métodos diagnósticos	11
2.5.2	Métodos parasitológicos directos	11
2.5.3	Métodos parasitológicos indirectos	11
2.5.4	Diagnóstico serológico	12
2.5.6	Exámenes complementarios	13
2.5.7	Diagnóstico por imageneología	14
2.6	Fases de la enfermedad de Chagas	15
2.6.1	Fase aguda	15
2.6.2	Manifestaciones locales: signos de puerta de entrada	15
2.6.3	Manifestaciones cardíacas	16
2.6.4	Manifestaciones neurológicas	16
2.6.5	Fase aguda en perros	16
2.6.6	Fase indeterminada en perros	16
2.6.7	Fase crónica en perros	17

2.7	Medidas de control de la enfermedad de Chagas	17
2.8	Tamizaje en bancos de sangre	17
2.9	Uso de quimioterapéuticos	17-18
3	Planteamiento del problema	19
4	Justificación	19
5	Hipótesis	19
6	Objetivo general	19
6.1	Objetivos específicos	19
7	Materiales y métodos	19
7.1	Estrategia general	19
7.2	Pre-infección	20
7.3	Infección	20
7.4	Animales	20
7.5	Parásitos	20
7.6	Serología	21
7.7	Evaluación de parasitemia	22
7.8	Evaluación clínica y cardiovascular	22
7.9	Xenodiagnóstico	26
7.10	Extracción de ADN de tejido digestivo de triatomíneos y sangre de perro	26
7.11	PCR para amplificación del gen mini exón	27
7.12	Identificación de la presencia del parásito en sangre por PCR	27
8	Resultados	28
8.1	Título de capítulo de libro “Enfermedad de Chagas en Perros”	28
8.2	Página frontal del capítulo	28
8.3	Carta de aceptación	29
8.4	Capítulo de libro	30 al 45
8.5	Serología	46
8.6	Evaluación de parasitemia	46

8.7	Gota fresca	46
8.8	Xenodiagnóstico	46
8.9	Aspectos clínicos y alteraciones cardiovasculares	47
8.10	Electrocardiografía	47-48-49
8.11	Radiografía de tórax	51
8.12	Ecocardiografía fase aguda y fase crónica de la enfermedad de Chagas	52-53
8.13	Carga parasitaria	55-56
9	Discusión	56-60
10	Conclusión	60
11	Bibliografía	61 al 64

## Contenido Figuras, Tablas

<b>Figura 1.-</b> Formas del parásito. a) Forma tripomastigote donde (N) corresponde al núcleo, (F) al flagelo y (C) al cinetoplasto; b) amastigote intracelulares de <i>T. cruzi</i> ; y c) formas epimastigotes del <i>T. cruzi</i>	8
<b>Figura.-2</b> Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> , <b>1</b> En el vector las formas de epimastigotes los cuales se replican en el tracto digestivo del triatomino se diferencian a tripomastigote metacíclicos, <b>2</b> los perros se infectan al ingerir los triatominos infectados, <b>3</b> se lleva a cabo la infección de tripomastigotes metacíclicos a células cardíacas y células musculares, <b>4</b> se realiza la diferenciación de tripomastigotes metacíclicos en amastigotes y se replican por fisión binaria, <b>5</b> los amastigotes se diferencian a tripomastigotes sanguíneos los cuales provocan la ruptura de la célula y se liberan a la circulación <b>6</b> infectando nuevas células o <b>7</b> pueden ser ingeridos por el vector, completando así el ciclo de vida del parásito	9
<b>Tabla 1.-</b> Variables electrocardiográficas en los estudios de los perros	22-23
<b>Figura 3.-</b> “Índice Cardiovertebral” o “Vertebral Heart Scale” (VHS) Modificado a partir de “Manual of Canine and Feline Cardiology 4th Ed, Bonagura <i>et al</i> 2008	24
<b>Figura 4.-</b> Tomado de Kittleson & Kienle “Small Animal Cardiovascular” 1Ed 1998.	
<b>Tabla 2.-</b> Variables radiográficas de los estudios en los perros	25
<b>Tabla 3.-</b> Variables ecocardiográficas estudiadas en los perros	25
<b>Figura.5</b> Niveles de IgGT en los grupos de perros estudiados a 120 dPi durante la infección crónica de <i>T. cruzi</i>	26
<b>Figura.6</b> Muestras electrocardiográficas representativas de los grupos: no infectados e infectados durante la fase aguda de la enfermedad.	46
<b>Figura.7</b> Muestras electrocardiográficas representativas de los grupos: no infectados e infectados durante la fase crónica de la enfermedad.	47
<b>Figura.8</b> Muestras electrocardiográficas representativas de los grupos: no infectados e infectados durante la fase crónica de la enfermedad.	48-49
<b>Tabla 4.</b> Porcentaje (%) de anomalías encontradas en el electrocardiograma a través del tiempo, durante la fase aguda de los perros infectados experimentalmente con <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
<b>Tabla 5.</b> Porcentaje (%) de anomalías encontradas en el electrocardiograma a través del tiempo, durante la fase crónica de los perros infectados experimentalmente con <i>Trypanosoma cruzi</i>	50
<b>Figura. 9</b> Cambios electrocardiográficos observados durante la fase aguda y fase crónica de la infección por <i>T. cruzi</i>	50
<b>Figura. 10</b> Alteraciones radiográficas encontradas en los diferentes grupos experimentales durante la fase crónica de la infección	51

<b>Figura. 11.</b> Muestras representativas de radiografías de tórax de perros experimentales.	51
<b>Figura. 12</b> Muestras ecocardiográficas representativas de animales no infectados e infectados durante la fase aguda y fase crónica de la enfermedad.	52
<b>Figura. 13</b> Cambios ecocardiográficos observados durante la fase aguda y fase crónica de la infección por <i>T. cruzi</i>	53-54
Figura. 14. Amplificación del fragmento específico para la PCR-punto final y PCR-anidada en ámpula rectal del vector de los animales infectados durante la fase crónica.	54
Figura. 15 Amplificación del fragmento específico para PCR-punto final y PCR-anidado en sangre de los animales infectados durante la fase crónica.	55

## 1. Introducción

La enfermedad de Chagas es una zoonosis provocada por el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). La tripanosomiasis americana, afecta a 150 especies de 24 familias de mamíferos, el reservorio natural está conformado por fauna silvestre como armadillos, marsupiales, roedores, murciélagos, primates silvestres, además de animales domésticos como perro, gato, incluso ratas y cobayos (Carrada-Bravo, 2004; Rosas *et al.*, 2007). La principal forma de transmisión en América Latina es a través de las heces de los vectores triatomíneos, comúnmente conocidos como chinches besuconas. La enfermedad se encuentra distribuida de manera endémica en 21 países de Latinoamérica y se estima que en la actualidad se encuentran infectadas de 6-7 millones de personas, y que 25 millones más se encuentran en riesgo de adquirir la infección en el mundo (OMS, 2016). A pesar que el vector está confinado a los países endémicos de América la enfermedad se ha reportado en regiones no endémicas del mundo, como Estados Unidos de América, Canadá, y algunos países europeos y del pacífico occidental. Esto obedece a que la infección también se puede adquirir mediante transfusión de sangre, transmisión congénita, transplante de órganos, leche materna y accidentes de laboratorio, no siendo necesaria la presencia del vector en países no endémicos (OPS-OMS 2012, OMS, 2016).

El desarrollo clínico de la enfermedad de Chagas en humanos ha sido descrito, en medicina veterinaria la fase aguda se encuentra insuficientemente descrita, porque normalmente la enfermedad se detecta cuando el paciente ha pasado la etapa aguda de la enfermedad y ya se encuentra en la etapa crónica. Clínicamente a la enfermedad de Chagas se le reconocen dos etapas. La fase aguda; que en más del 50% de los pacientes la infección pasa desapercibida, con síntomas leves y no específicos y en los pacientes restantes puede haber una lesión cutánea (Chagoma) o una hinchazón amoratada de un párpado (signo de Romaña). En esta etapa también se presenta parasitemia, que cuando se identifica es un diagnóstico confirmatorio de la infección. No se han descrito ampliamente los signos cardíacos en esta etapa de la enfermedad. En la etapa crónica de la enfermedad puede existir una parasitemia difícil de detectar, mientras que los parásitos permanecen en el tejido muscular cardíaco, esquelético y liso. De estos pacientes aproximadamente el 30% desarrollarán trastornos cardíacos y 10% alteraciones digestivas, neurológicas o mixtas. Con el tiempo la infección puede causar arritmias cardíacas o insuficiencia cardíaca congestiva (OPS 2012).

La introducción de métodos de imageneología cardiovascular ha mejorado sustancialmente la sensibilidad y la especificidad diagnóstica de las alteraciones estructurales y funcionales de las afecciones cardíacas en pacientes chagásicos. Se han investigado varios métodos de imageneología en pacientes chagásicos con la intención de estudiar su utilidad en el diagnóstico y en el seguimiento, como predictores de morbimortalidad y en resultados de terapéuticos (Acquatella *et al.*, 2013). Pero no se han estudiado detenidamente los cambios fisiopatológicos que ocurren en el corazón durante la fase temprana de la infección porque normalmente cuando ésta se descubre ya han transcurrido algunos días o semanas de que se produjo la infección. El modelo canino es considerado ideal para el estudio de la enfermedad de Chagas en humanos, dado que estas especies desarrollan síntomas y cambios patológicos de la enfermedad similares (Ramírez 2006, Guedes *et al.*, 2009). De ahí que en este trabajo estudiamos la evolución de los cambios cardiovasculares que ocurren a partir del primer día de la infección y hasta por un año, a través de electrocardiografía y ecocardiografía en perros, con el objetivo de que los resultados de estos estudios puedan ser utilizados en futuros estudios de la infección por *T. cruzi* en humanos.

## 2. Marco Teórico

### 2.1 Enfermedad de Chagas

#### Etiología

La enfermedad de Chagas es una zoonosis provocada por el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). La tripanosomiasis americana, afecta a 150 especies de 24 familias de mamíferos, el reservorio natural está conformado por fauna silvestre como armadillos, marsupiales, roedores, murciélagos, primates silvestres, además de animales domésticos como perro, gato, caballo, incluyendo ratas y cobayos. El perro continúa siendo el principal reservorio de la enfermedad en el ámbito doméstico. La principal forma de transmisión en América Latina es a través de las heces de los vectores triatominos, comúnmente conocidos como chinches besuconas, vinchucas, chipochinche gaucha, chirimacha o chinche picuda pito. La enfermedad se encuentra distribuida de manera endémica en 21 países de Latinoamérica y se estima que en la actualidad se encuentran infectadas de 6-7 millones de personas, y que 25 millones más se encuentran en riesgo de adquirir la infección en el mundo. A pesar que el vector está confinado a los países endémicos de América la enfermedad se ha reportado en regiones no endémicas del mundo, como Estados Unidos de América, Canadá, y algunos países europeos y del pacífico occidental. Esto obedece a que la infección también se puede adquirir mediante transfusión de sangre, transmisión congénita, trasplante de órganos, leche materna y accidentes de laboratorio, no siendo necesaria la presencia del vector en estos casos en países no endémicos (OMS, 2016).

Aproximadamente un siglo después de las observaciones realizadas por Carlos Chagas en 1909, y aun con los avances en el control de la enfermedad en países endémicos, ésta enfermedad se mantiene como un proceso mórbido relevante para la salud pública, sobre todo considerándose el contexto de ser una enfermedad desatendida (OPS, 2009).

Desde el punto de vista económico, de esta enfermedad continúa siendo un problema de salud pública considerable, derivado de los costos de atención médica a todos los pacientes, ausentismo en el trabajo, procesos de perpetuación de pobreza familiar en zonas endémicas, baja productividad, así como los costos generados por los programas de control y vigilancia del vector (OMS, 2016).

Anteriormente la enfermedad estaba confinada únicamente en países endémicos, pero en la actualidad debido a la movilidad entre la población de América Latina y el resto del mundo, se ha observado una mayor presentación de la enfermedad en Estados Unidos de América, Canadá, muchos países europeos y algunos del Pacífico Occidental. Esto obedece a que la infección también se puede adquirir mediante transfusión de sangre, transmisión congénita, trasplante de órganos, leche materna, accidentes de laboratorio, no siendo necesaria la presencia del vector en países no endémicos (OPS-OMS 2012, OMS, 2016).

En la evolución natural de la enfermedad de Chagas se distinguen dos fases con presentaciones clínicas, criterios diagnósticos y terapéuticos diferentes. La enfermedad se inicia con una fase aguda caracterizada por síndrome febril infeccioso y parasitemia. En los casos agudos no tratados, la enfermedad progresa hacia la fase crónica, donde un porcentaje grande de personas permanecen asintomáticas (aproximadamente 70%) y sin compromiso clínico (la llamada fase “indeterminada”), pero un grupo desarrolla, después de un periodo que puede ir de 10 a 30 años, lesiones irreversibles, especialmente cardíacas (OPS-OMS 2012).

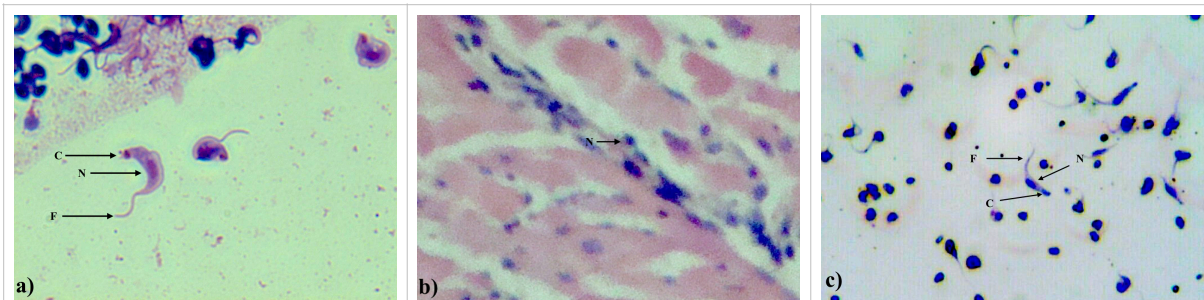
En México, los triatominos fueron reportados por primera vez en 1928 (Hoffman, 1928) y el primer caso fue descrito doce años después (Mazzotti, 1940). La enfermedad es transmitida por unas 120 especies de triatominos, los cuales son hemípteros, estrictamente hematófagos de la familia *Reduviidae*, subfamilia *triatominae* y géneros *rhodnius*, *triatoma* y *panstrongylus* (Rosas *et al.*, 2007). Se tiene el reporte que en

territorio mexicano están presentes 39 especies de triatominos o chinches besuconas, de las cuales 20 son capaces de transmitir la infección natural de *T. cruzi* (Dumonteil, 1999).

## 2.2 Agente etiológico

*Trypanosoma cruzi* presenta formas evolutivas con aspectos morfológicos distintos, en los hospederos y en los insectos vectores. Por microscopía óptica se pueden apreciar estas diferencias en la forma general de la célula, el núcleo, el cinetoplasto, y el flagelo. Los sus distintos tipos de sus tres formas principales se describen a continuación :

- a) Tripomastigote:** cuando se encuentra en la sangre es monomórfico, de aspecto fusiforme, mide de 20-25 $\mu\text{m}$  x 2-4 $\mu\text{m}$ , con núcleo vesiculoso y citoplasma granuloso, con un complejo cinetoplástico posterior, del cual emerge una membrana ondulante, que recorre al parásito y cuyo borde libre lleva un flagelo. Adopta la forma de C o S, es muy móvil y en preparaciones en fresco, de sangre de animales, humanos infectados o de heces del insecto vector, el desplazamiento del parásito se detecta porque mueve a los glóbulos rojos. Se considera que es la forma infectante, no se reproduce y resiste a temperaturas de refrigeración.
- b) Epimastigote:** de aspecto fusiforme, con un complejo cinetoplástico localizado por delante del núcleo o a su nivel, mide 20-40 $\mu\text{m}$  x 2-5 $\mu\text{m}$ , presenta una membrana corta ondulante y un flagelo libre. Este estadio se encuentra en el intestino del vector, donde se reproduce por fisión binaria y también es la forma predominante en el cultivo axénico del parásito.
- c) Amastigote:** con una morfología esférica, muy pequeña, mide de 1.5-4 $\mu\text{m}$  de diámetro, núcleo y complejo cinetoplásmico muy próximos, sin flagelo. Es intracelular, y aparece en grupos formando nidos, en tejidos lesionados lo que facilita su identificación.

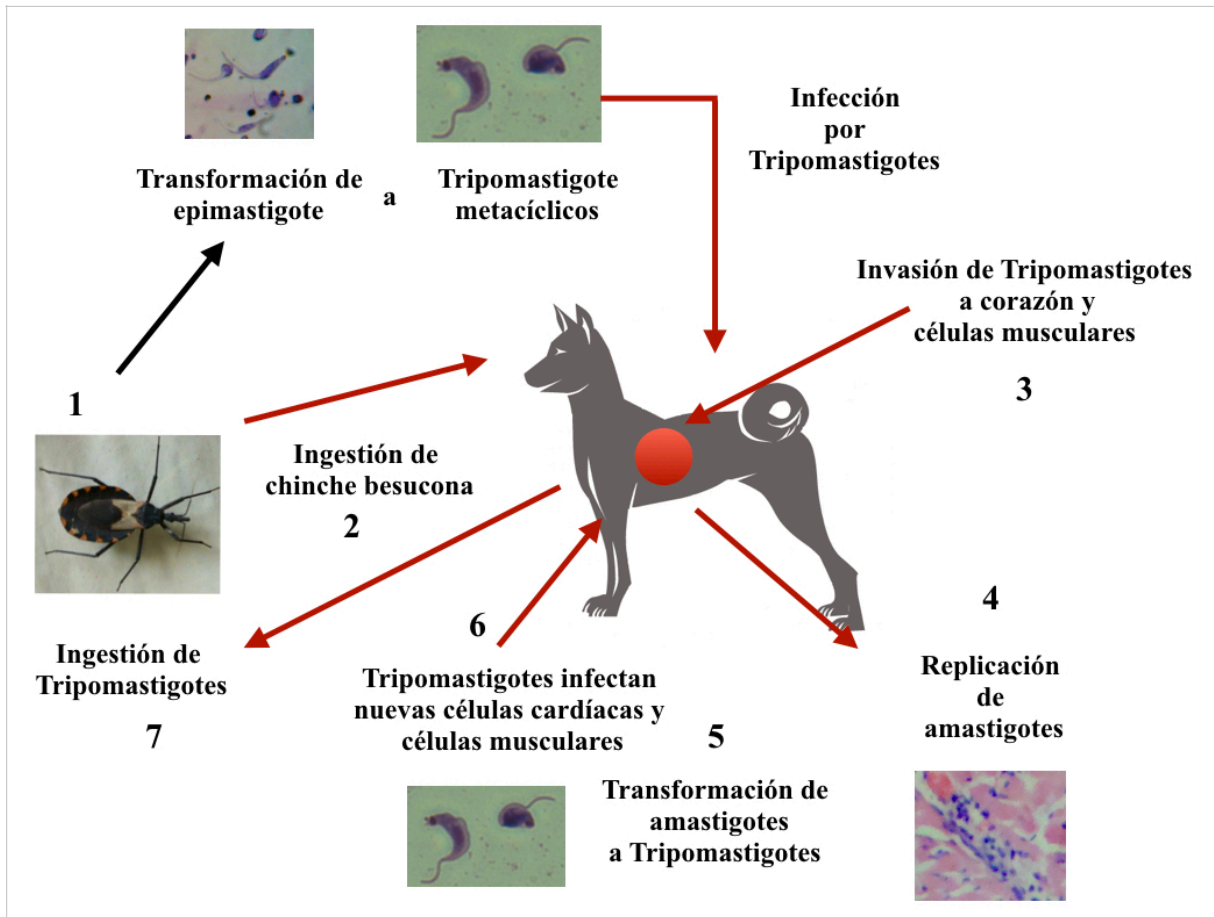


**Figura 1.-** Formas del parásito. a) Forma tripomastigote donde (N) corresponde al núcleo, (F) al flagelo y (C) al cinetoplasto; b) amastigote intracelulares de *T. cruzi*; y c) formas epimastigotes del *T. cruzi*

## 2.3 Ciclo biológico del *Trypanosoma cruzi* en el mamífero

El parásito tiene un ciclo de vida con tres estadios principales que se presentan en dos huéspedes. En el insecto vector, *T. cruzi* se encuentra en la forma de epimastigote y tripomastigote metacíclicos. En el huésped vertebrado, se encuentra como tripomastigote sanguíneo y amastigote (Barr *et al.*, 2014). La transmisión se inicia cuando un vector infectado se alimenta de la sangre del hospedero vertebrado y como reflejo, 20 minutos después defeca, defeca heces contaminadas con tripomastigotes metacíclicos, que son la forma infectiva del parásito. Los tripomastigotes metacíclicos pueden entrar al huésped vertebrado a través de heridas, excoriaciones de la piel o por mucosa intacta, invaden células y se forma una vacuola parasitófora iniciando el ciclo intracelular. Se ha propuesto la infección por ingestión del triatomino infectado, transfusión de sangre, y por la ingestión de leche en perras infectadas (Barr *et al.*, 2014).

En el citoplasma de las células, los parásitos se diferencian en amastigotes y entran en una fase replicativa (por fisión binaria). Una vez que se han replicado, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes sanguíneos, los cuales provocan la ruptura de las células y como consecuencia se liberan en la sangre, para infectar a otras células o también pueden ser ingeridos por el vector. Los tripomastigotes ingeridos por el vector pasan a través del tracto digestivo donde sufren la diferenciación a epimastigotes, los cuales se replican y se dirigen al recto del insecto. En el recto los parásitos se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, completando así el ciclo de vida del parásito (Barr *et al.*, 2014).



**Figura.-2** Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

1 En el vector las formas de epimastigotes los cuales se replican en el tracto digestivo del triatomino se diferencian a tripomastigote metacíclicos, 2 los perros se infectan al ingerir los triatominos infectados, 3 se lleva a cabo la infección de tripomastigotes metacíclicos a células cardíacas y células musculares, 4 se realiza la diferenciación de tripomastigotes metacíclicos en amastigotes y se replican por fisión binaria, 5 los amastigotes se diferencian a tripomastigotes sanguíneos los cuales provocan la ruptura de la célula y se liberan a la circulación 6 infectando nuevas células o 7 pueden ser ingeridos por el vector, completando así el ciclo de vida del parásito

## 2.4 Modos de transmisión de *Trypanosoma cruzi*

### 2.4.1. Transmisión vectorial

En Latinoamérica es un problema de salud pública y continua siendo la principal forma de infección de la enfermedad de Chagas. Ésta ocurre cuando la persona duerme, el vector se alimenta y como acto reflejo defeca en la zona de la picadura, la cual se frota contaminando con las heces infectadas con parásitos en lesiones cutáneas abiertas, como la producida por la propia picadura u otras causas y superficies

vulnerables como conjuntivas oral, ocular. Este comportamiento de los insectos, es probablemente porque se sienten atraídos a la cara de las personas debido a su relativa calidez, o al CO<sub>2</sub> exhalado, o porque la penetración de las mucosas es más fácil para la alimentación (Kirchhoff, 2011).

#### 2.4.2. Transmisión por transfusión sanguínea

Se puede dar por transfusión de sangre completa o sus derivados. Se considera que es la segunda vía de infección, y es la principal forma de transmisión en países no endémicos, (Kirchhoff, 2011). En México y en países en vías de desarrollo, la población campesina que migra a las ciudades industrializadas o turísticas en busca de trabajo dispersa la enfermedad de Chagas por todo el país y aumenta el riesgo de transmisión de *T. cruzi* por transfusión de sangre y sus derivados en las áreas urbanas de mayor atracción para los migrantes campesinos (Guzmán *et al.*, 1998).

#### 2.4.3. Transmisión congénita

Para que se produzca la transmisión vertical debe existir parasitemia en la embarazada. El *T. cruzi* genera en el huésped una infección persistente, por lo cual este parásito puede hallarse en sangre tanto en la fase aguda como en la crónica. Este hecho biológico determina que una embarazada puede transmitir el parásito en cualquier estadio de la infección y que una madre infectada puede dar a luz niños con infección congénita en uno o más embarazos. La infección aguda durante la gestación aumenta el riesgo de transmisión transplacentaria. Para que la infección congénita se pueda dar se sabe que existen factores parasitarios como las cepas de *T. cruzi* o la carga parasitaria de la madre gestante, así como factores del huésped como estado inmunológico y nutricional, la historia obstétrica y fase de la enfermedad materna durante la gestación. El *T. cruzi* invade y se multiplica en las células de Hofbauer de la placenta; los tripomastigotes liberados posteriormente pueden invadir el embrión o el feto. Luego de la infección el feto puede sufrir alteraciones en su viabilidad y/o crecimiento de acuerdo con el momento en que suceda la infección parasitaria. La enfermedad congénita puede producir aborto espontáneo, nacimiento prematuro, retardo en el crecimiento intrauterino y muerte fetal (Rosas *et al.*, 2007).

#### 2.4.4. Transmisión por trasplante de órganos

Está documentado que la transmisión de la infección se puede dar través del trasplante de órganos. Los donantes de órganos con un perfil de riesgo o provenientes de zonas endémicas de la enfermedad de Chagas, deben someterse a pruebas de laboratorio para descartar la infección por *T. cruzi*, ya que existe un riesgo importante de transmitir la infección a través de esta vía. La infección se da en el 13 a 22% de los receptores de trasplante de riñón o hígado, y del 75 al 100% de los receptores de trasplante de corazón (Kransdorf *et al.*, 2014).

#### 2.4.5. Transmisión oral

La transmisión del *T. cruzi* por vía oral tiene carácter habitual en el ciclo endémico primitivo de este parásito, por medio de la ingestión de vectores y reservorios infectados. En el caso del hombre, esta transmisión ocurre de manera circunstancial, mediante alimentos contaminados con el parásito, sobre todo a partir de triatóminos o de sus deyecciones. También puede ocurrir por medio de la ingestión de carne cruda o mal cocida de caza, o de alimentos contaminados por orina o secreción anal de marsupiales infectados, o hasta, mediante hábitos primitivos de la ingestión de triatóminos. Las heces de los triatóminos pueden permanecer algunas horas infectantes en ambiente con elevada humedad, pudiendo, algunos insectos considerados como transportadores secundarios (moscas, cucarachas) contaminar alimentos como patas y aparato bucal de transportadores secundarios, como moscas y cucarachas. En alimentos como la leche o caldo de caña, a la temperatura ambiente, se ha observado que el parásito puede mantenerse activo por veinticuatro horas o más, en estudios experimentales. Aunque, el jugo gástrico de los vertebrados superiores tenga la capacidad de destruir muchos parásitos, una cierta proporción de los mismos es capaz de evadirse de esta acción, mediante mecanismos químicos de

protección externa, o por su penetración a través de la mucosa oral. Las evidencias experimentales disponibles hasta la fecha sugieren que la transmisión oral puede ocurrir a partir de formas de tripomastigotes, epimastigotes y, probablemente, de amastigotes y masas celulares, originarias de mamíferos o vectores contaminados (OPS, 2009).

#### 2.4.6. Transmisión por accidentes de laboratorio

Se puede adquirir la infección de *T. cruzi* por la exposición a triatóminos infectados, contacto con cultivos de sangre provenientes de personas o animales infectados. Así como lesiones provocadas con agujas utilizadas con individuos infectados, o lesiones pre existentes en piel como microabrasiones o mucosas no intactas (Zeldón, 1974). Aproximadamente 60 casos de infección por accidente de laboratorio por *T. cruzi* se han descrito principalmente en Latinoamérica (Tarantola *et al.*, 2005).

### 2.5 Diagnóstico

#### 2.5.1. Métodos diagnósticos

#### 2.5.2. Métodos parasitológicos directos

Los exámenes parasitológicos directos son aquellos en los que la presencia del parásito es detectada mediante observación directa. Están particularmente indicados en el diagnóstico de la fase aguda e incluye los siguientes métodos:

- Gota fresca: es la primera alternativa de diagnóstico directo por ser rápida, simple, bajo costo, efectiva y más sensible que el extendido. El parásito puede ser detectado por su motilidad. El momento en que la infección es detectada más fácilmente por esta vía es cuando el paciente está en estado febril al momento de la toma de la muestra. Se deben buscar parásitos en sangre periférica en fresco sin anticoagulante, entre portaobjeto y cubreobjeto de 22 x 22, examinando inmediatamente, antes de que se seque la gota de sangre sin anticoagulante. Para obtener una monocapa de hematíes que permita observar los rápidos movimientos del parásito refringente entre las células sanguíneas, se recomienda colocar 5 µl de la preparación, deslizar el cubreobjeto y apretarlo contra el portaobjeto con la extremidad roma de un bolígrafo. Una vez visualizado el parásito, se confirma el diagnóstico sin necesidad de practicar otros exámenes. (OPS/OMS, 2012, Rosas *et al.*, 2007).
- Métodos de concentración: consisten en artificios para visualizar el parásito cuando no es rápidamente visible en la gota fresca o no hay una parasitemia elevada.
- Microhematocrito: consiste en obtener uno o más capilares heparinizados, con sangre y someterlos a centrifugación en la microcentrífuga apropiada para microhematocrito. En la interfase entre el empaquetado de glóbulos rojos y el plasma, se encuentra la capa flogística en la que se observan los movimientos del parásito al microscopio con un ocular de 10x y objetivo de 40 aumentos. Alternativamente se puede poner el contenido como si fuese en fresco (Rosas *et al.*, 2007).
- Técnica de Strout: también se emplea para otros hemoflagelados, consiste en la colecta de sangre mínimamente de 3 ml sin anticoagulante, dejando el tubo a 37°C durante dos horas, para la debida formación y retracción del coágulo. Si existen parásitos, migrarán hacia fuera del coágulo. El suero exudado se transfiere a otro tubo, el que se centrifuga cinco minutos a 2000rpm, del sobrenadante se transfiere a un segundo tubo y se somete a centrifugación 10 minutos, aproximadamente 2000 rpm. El sobrenadante, constituido por suero límpido, se decanta y se hace una preparación como de gota fresca, resuspendiendo la última gota del sedimento (Rosas *et al.*, 2007).

#### 2.5.3. Métodos parasitológicos indirectos

Los métodos parasitológicos indirectos son el xenodiagnóstico y el hemocultivo. En la fase aguda de la enfermedad, cuando la parasitemia es importante, la sensibilidad de estos métodos es semejante a la de los métodos directos. En la fase crónica, cuando es difícil la observación de los parásitos en la sangre, estos

métodos son más sensibles que los métodos directos. Sin embargo, dada la escasez de parásitos en sangre en la fase crónica, la posibilidad de dar un diagnóstico positivo es inferior a lo observado en la fase aguda (OPS/OMS, 2012).

- Xenodiagnóstico: usa el triatomino libre de parásito, como medio de reproducción de los parásitos en la sangre. Los insectos criados en laboratorios son colocados en cajas sobre la piel del paciente, dejándolos durante 30 min para que se alimenten de sangre. Después de 30 a 60 días se examina el contenido intestinal de los triatominos en búsqueda de los parásitos en formas de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos. Alternativamente puede realizarse el xenodiagnóstico por un alimentador artificial de chinches, que consiste en que la sangre del paciente que es obtenida por venopunción, heparinizada se coloque en recipientes mantenidos a la temperatura corporal y con membranas finas de látex, a través de las cuales los insectos se alimentan. La sensibilidad varía mucho y depende de la fase en la que se encuentre la enfermedad y el tiempo de infección. En la fase aguda la sensibilidad puede ser del 100% mientras que en la fase crónica en general se acepta que no es mayor del 50% (OPS/OMS, 2012).
- Hemocultivo: se emplean medios líquidos tales como triptosa de infusión de hígado (LIT) o infusión cerebro corazón (BHI). La realización de hemocultivos de forma seriada aumenta la posibilidad de la técnica; sin embargo, la variabilidad en el diagnóstico es importante entre regiones geográficas, lo que probablemente refleja una diferente constitución genética de las cepas de *T. cruzi*, el tiempo en que normalmente el hemocultivo se vuelve positivo es de 30 a 60 días (OPS/OMS, 2012).
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): esta técnica se basa en la amplificación de fragmentos ya sea del ADN del cinetoplasto o del genómico. Con alguna frecuencia, en animales con infección crónica se observan falsos negativos en PCR de punto final. Aunque ésta técnica es muy sensible, la negatividad se puede deber a la ausencia o muy baja presencia de parásitos en sangre por la ocurrencia de una parasitemia intermitente, que depende del ciclo biológico y de los cambios en la relación parásito hospedero en el tiempo. Una forma de mejorar la sensibilidad de esta prueba es hacer un PCR anidado, que significa hacer una nueva reacción de PCR utilizando cebadores internos de la región previamente amplificada, aprovechando que durante la primer reacción de PCR se produjo un incremento significativo de la molécula de ADN diagnóstica, por lo que en la segunda ronda de PCR se producirá una cantidad de ADN que ya puede ser apreciada por los métodos comunes de visualización de ADN (electroforesis en gel de agarosa con tinción fluorescente para ADN). La otra opción es realizar un PCR de tiempo real, que es también una prueba de PCR en un termociclador acoplado a un espectrofluorómetro que detecta fluorescencia tras excitar el fluoróforo (Sybr Green o sondas de ADN) asociado al ADN. Esta prueba es más sensible que el PCR de punto final, sin embargo, es también es sensiblemente más costosa (OPS/OMS, 2012).

#### 2.5.4. Diagnóstico serológico

El diagnóstico serológico se basa en la determinación de IgG o IgM anti-*T. cruzi* con pruebas como ensayo inmunoenzimático (ELISA), inmunofluorescencia indirecta (IFI) o hemoaglutinación indirecta (HAI). Se conocen como pruebas serológicas convencionales a aquellas en las que se utiliza el parásito completo o una mezcla compleja de antígenos del parásito para detectar a los anticuerpos. Por otro lado el diagnóstico serológico es no convencional cuando los antígenos son purificados, recombinantes o se usan péptidos sintéticos. Estas pruebas, son sensibles y específicas pero en ocasiones pueden presentar reacciones cruzadas contra *T. rangeli* o *Leishmania spp* y dar falsos positivos (Murcia *et al.*, 2013).

Ensayo inmunoenzimático (ELISA): permite observar la presencia de anticuerpos antiglobulinas ligados a una enzima que en presencia de su sustrato forma un producto colorido. Por ser una prueba colorimétrica el resultado es definido por la lectura de la absorbancia o densidad óptica. Los resultados alrededor de los puntos de corte, es decir, en muestras que reaccionan con un valor positivo muy bajo se clasifican como indeterminadas y en ese caso la muestra debe ser sometida a su análisis por otras técnicas (OPS, 2010).

Inmunofluorescencia indirecta (IFI): los anticuerpos presentes en el suero del perro infectado con *T. cruzi* son colocados sobre una lámina que contiene el antígeno (formas de epimastigotes de *T. cruzi*) y son revelados a través de anticuerpos anti-globulina canina unida a fluoresceína. El resultado se visualiza en el microscopio de fluorescencia con luz ultravioleta. Se debe considerar que se pueden presentar falsos positivos al presentarse reactividad cruzada con otros parásitos como *Leishmania* spp o *Trypanosoma rangeli* (OPS, 2010).

Hemoaglutinación indirecta (HAI): la superficie de los hematíes son sensibilizados con antígenos de *T. cruzi* adsorbidos, y en presencia de los anticuerpos contra el parásito presentes en el suero del paciente se produce una reacción antígeno-anticuerpo que genera aglutinación de los eritrocitos, la cual puede ser visualizada.

Durante el diagnóstico serológico deben tenerse en cuenta los siguientes aspectos:

- a) Siempre el diagnóstico debe realizarse con dos de estas técnicas.
- b) Si hay disparidad entre ambas pruebas es necesario realizar una tercera reacción para definir el estado de infección.
- c) Se considera que la prueba de ELISA tiene una alta sensibilidad y por lo tanto se recomienda como la primera prueba a realizar en el proceso de confirmación diagnóstica. Falsos negativos pueden ocurrir con la técnica de ELISA y por lo tanto se recomienda que ante un paciente con importantes elementos clínicos y epidemiológicos para sospechar enfermedad de Chagas, se debe continuar con el estudio serológico con la segunda prueba.
- d) En la fase aguda, el uso de la IgG para diagnóstico requiere de dos muestras de sangre que permitan comparar la seroconversión con un intervalo mínimo 21 días entre una muestra y la otra (OPS-OMS, 2012).

#### 2.5.6. Exámenes complementarios

Para la verificación del estado general de los casos de enfermedad de Chagas, en especial de los sistemas usualmente más acometidos, se han propuesto una relación de exámenes de laboratorio complementarios para el acompañamiento de los casos y el manejo clínico de eventuales complicaciones. Se resalta que el inicio del tratamiento teológico no depende de la realización de tales exámenes (OPS, 2009).

Hemograma completo: en personas son observadas leucopenia o leucocitosis discreta, con desvío a la izquierda, anemia hipocrómica, en casos graves plaquetopenia y leucopenia moderadas (OPS, 2009). En enfermedad natural en perros se ha observado en la fase aguda anemia, leucocitosis por neutrofilia, eosinofilia, linfocitosis y monocitosis. Trombocitopenia, leucopenia y/o linfopenia también ha sido reportada. Durante la fase crónica de la infección natural puede no tener anomalías hematológicas (Barr *et al.*, 2014). En perros en la infección experimental durante la fase aguda se ha observado que se presenta anemia, linfopenia y monocitosis, y la parasitemia persiste más allá del día 42 post infección (Quijano-Hernández *et al.*, 2013).

Urianálisis: usado para la evaluación relativa de la función renal; se usa para verificar hemoglobinuria o hematuria en personas (OPS, 2009), en perros no hay conclusiones específicas sobre el uso de este examen en enfermedad de Chagas (Barr *et al.*, 2014).

Bioquímica sanguínea: en personas infectadas por *T. cruzi* las aminotransferasas; aspartato aminotransferasa (AST) y la alanin aminotransferasa (ALT) frecuentemente aparecen elevadas, bilirrubinas totales y fraccionares también pueden estar alteradas, con o sin ictericia visible. El tiempo de protrombina prolongado sugiera daño hepático. En perros la actividad de ALT, AST, creatinina y nitrógeno ureico pueden estar elevadas en perros con infección por *T. cruzi* especialmente aquellos que corren peligro de muerte por miocarditis aguda severa. Rara vez ocurre hipoalbuminemia de moderada a severa con o sin hiperglobulinemia aguda en perros infectados. Los niveles de troponina I se elevan

paulatinamente en los perros infectados alrededor de 10 a 30 mg/ml a los 21 días post infección (Barr *et al.*, 2014).

Electrocardiografía: en personas durante la fase aguda son significativas las señales de sufrimiento miocárdico, con alteraciones de la onda T, aumento en el intervalo PR, taquicardia sinusal y microvoltaje del complejo QRS. También se aprecian extrasístoles ventriculares, bloqueos auriculo-ventriculares de primero segundo y tercer grado, bloqueos de rama anterior izquierda, bloqueo fascicular (Fuenmayor *et al.*, 1997).

Durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas envuelve la presencia de disturbios del ritmo cardiaco con extrasístoles ventriculares, fibrilación atrial y/o disturbios en la conducción con bloqueos completos de rama derecha, bloqueos divisionales de rama izquierda, bloqueos atrioventriculares, alteraciones de la repolarización ventricular (OPS, 2009). Se encuentra documentado la presencia de bloqueos intraventriculares, extrasístoles ventriculares polimorfos, enfermedad del nódulo sinusal. Dentro de las arritmias, la extrasístole ventricular es la más frecuente de la enfermedad seguida por la bradicardia sinusal y la fibrilación auricular (Consenso enfermedad Chagas-Mazza, 2002).

En perros con miocarditis severa por enfermedad de Chagas se han observado taquicardia sinusal, microvoltaje de la onda R, desplazamiento del eje eléctrico medio, inversión de la onda T, arritmias ventriculares y anomalías de la conducción, incluido bloqueo de primer, segundo, tercer grado, así como bloqueo de rama derecha (Barr *et al.*, 2014). En infecciones experimentales en perro las alteraciones electrocardiográficas apreciadas incluyen, desviación del eje eléctrico medio, complejos de bajo voltaje, problemas interventriculares en la conducción, bloqueo auriculoventricular de segundo grado Mobitz tipo II, complejos ventriculares prematuros, alternancia eléctrica de la onda R, anomalías en el segmento ST, bloqueo de rama derecha, bloqueo de rama izquierda, arritmia ventricular y taquicardia ventricular (Aparicio-Burgos *et al.*, 2015, Rodríguez-Morales *et al.*, 2013, Quijano-Hernández *et al.*, 2013).

#### 2.5.7. Diagnóstico por imageneología

Radiografía de tórax: en la forma indeterminada, en la cardíaca y en la digestiva con pequeñas alteraciones, el área cardíaca ha sido reportada como normal en casi todos los casos. Es común el aumento global del área cardíaca de pequeña o moderada intensidad, evolucionando para una cardiomegalia dependiente del grado de la cardiopatía chagásica crónica. En los casos agudos, la cardiomegalia puede ser consecuencia de la miocarditis o derrame pericárdico. Los espacios pleural y pulmonar generalmente no tienen anomalías, pudiendo ocurrir derrame pleural en casos de insuficiencia cardíaca congestiva (OPS, 2009, Rosas *et al.*, 2007).

En perros con enfermedad de Chagas en su fase crónica, la miocarditis puede revelar cardiomegalia o indicios de insuficiencia cardíaca congestiva con edema pulmonar o derrame pleural (Barr *et al.*, 2014).

Ecocardiografía: está comprobado en personas que, en la fase crónica de la enfermedad, los cambios histopatológicos dados por fibrosis hacen que los miocitos remanentes sufran variaciones de hipertrofia compensatoria, lo que lleva en algunos casos a remodelación ventricular, con pérdida de la forma elipsoide del ventrículo izquierdo y tendencia a la esfericidad, y por ende, pérdida de la arquitectura normal (Acquatella y Piras, 1993). Entre las lesiones ultra estructurales que más se observan y describen son los infiltrados linfocitarios con edema de miofibrillas que llevan a un deterioro progresivo tanto de la función sistólica como de la diastólica (Rosas *et al.*, 2007).

Un estudio desarrollado durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas con mayor número de pacientes incluyó 58 sujetos, de los cuales 52% de los pacientes tuvo un ecocardiograma anormal, los hallazgos más relevantes encontrados fueron: derrame pericárdico de moderado a severo, discinesia apical o anterior, dilatación del ventrículo izquierdo, y el 63 % mantenía una fracción de eyección ventricular izquierda normal (Parada *et al.*, 1997).

Los sujetos con miocardiopatía chagásica crónica pueden ser asintomáticos o sintomáticos. La mayor parte de los investigadores combinan los hallazgos clínicos, de electrocardiografía y la presencia o ausencia de cardiomegalia o disfunción sistólica en cuatro grupos de afectación cardiaca progresiva de acuerdo a la combinación de alteraciones presentadas (Rassi *et al.*, 2010).

La ecocardiografía en perros y gatos con enfermedad de Chagas esta poco documentada, lo que permite nuevos estudios en estas áreas del conocimiento.

Los ecocardiogramas de cachorros con miocarditis aguda generalmente están dentro de los límites normales. Las alteraciones ecocardiográficas en perros con enfermedad de Chagas en su fase crónica se ha observado; miocarditis, dilatación ventricular derecha, pérdida de la función ventricular izquierda, disminución de la fracción de eyección, disminución en la fracción de acortamiento, reducción en la pared libre de ventrículo izquierdo (Barr *et al.*, 2014).

Un estudio realizado en Villa de Malinalco, del Estado de México que incluyo un total de 139 perros, de los cuales 30 perros fueron positivos con las técnicas de serología de hemoaglutinación e inmunoensayo ligado a enzimas, se encontraron los siguientes hallazgos ecocardiográficos; aumento del grosor de la pared de ventrículo izquierdo, dilatación de la cavidad de ventrículo derecho, dilatación de la cavidad ventricular izquierda, engrosamiento en algunos casos y adelgazamiento del septo interventricular en otros (Díaz-González *et al.*, 2009).

## 2.6. Fases de la enfermedad de Chagas

### 2.6.1. Fase aguda

La aparición de los síntomas de la enfermedad de Chagas suele iniciar entre 4 y 10 días después de ocurrida la infección, y esta fase dura aproximadamente de 4 a 8 semanas, la cual puede ser asintomática por lo menos en el 90% de los casos, presentándose como una enfermedad febril autolimitante (Rassi *et al.*, 2010; Rosas, *et al.*, 2007). El tratamiento con un fármaco antiparasitario, como benznidazol, usualmente curará la infección aguda y puede prevenir las manifestaciones crónicas, la muerte puede ocurrir ocasionalmente en la fase aguda (< 5-10% de los casos sintomáticos) como resultado de una grave miocarditis o meningoencefalitis, o ambos (Rassi *et al.*, 2010).

### 2.6.2. Manifestaciones locales: signos de puerta de entrada

Las manifestaciones locales, también conocidas como signos de puerta de entrada, incluyen el chagoma de inoculación y el signo de Romaña (Rosas *et al.*, 2007).

El chagoma se ha descrito como una pápula que puede llegar a medir algunos centímetros de diámetro, es eritematosa, dura, indolora o levemente dolorosa; está rodeada por edema que se acompaña de adenopatía satélite y en ocasiones puede llegar a ulcerarse. Se puede localizar en cualquier parte del cuerpo pero ocurre especialmente en partes de la piel que quedan expuestas durante el sueño (Rassi *et al.*, 2010; Rosas *et al.*, 2007).

El signo de Romaña es el edema palpebral unilateral, indoloro, de inicio generalmente súbito, con coloración rojiza de los párpados, congestión conjuntival y adenopatía satélite, usualmente adenopatía preauricular, que ocurre como consecuencia de la deposición de las heces infectadas con tripomastigotes metacíclicos de los triatominos en la conjuntiva o muy cerca de ella, usualmente durante el sueño lo cual, por irritación causada por la picadura, hace que los pacientes inconscientemente se froten sus párpados facilitando la penetración del parásito a través de la mucosa conjuntival (Rassi *et al.*, 2010; Rosas *et al.*, 2007).

En las formas sintomáticas la fiebre es común, aparece temprano y se acompaña de otros síntomas como malestar general, cefalea, astenia y pérdida del apetito. La fiebre puede ser continua o intermitente y o presenta un patrón característico, además de estos síntomas también puede presentarse adenopatías generalizadas, hepatomegalia y esplenomegalia de intensidad leve o moderada, y edema subcutáneo de intensidad variable, que puede localizarse en el rostro o en las extremidades inferiores, y no está relacionado con insuficiencia cardíaca (Rassi *et al.*, 2010; Rosas *et al.*, 2007).

### 2.6.3. Manifestaciones cardíacas

Las manifestaciones corresponden a una miocarditis difusa, la cual generalmente se acompaña de pericarditis serosa y de cierto grado de endocarditis. La miocarditis puede llevar a la insuficiencia cardíaca global, con manifestaciones similares a las encontradas por la insuficiencia cardíaca por otras causas. La fase clínica evidentemente, se presenta por lo general en niños menores de 10 años y en su mayoría con formas benignas, con una tasa de mortalidad entre 2 y 8%. En las formas leves o moderadas de la enfermedad, los síntomas generales así como la miocarditis, suelen desaparecer, aun en ausencia de tratamiento antiparasitario, en un período de 6 a 10 semanas después del inicio de los síntomas. Sin embargo, en las formas graves de miocarditis intensa, el paciente puede fallecer como consecuencia de taponamiento cardíaco, trastornos del sistema de conducción, taquicardia ventricular o insuficiencia cardíaca severa. La probabilidad de muerte parece estar relacionada con la edad y es mayor en niños que en adolescentes y adultos (Rassi *et al.*, 2010; Rosas *et al.*, 2007).

### 2.6.4. Manifestaciones neurológicas

Se ha descrito la meningoencefalitis chagásica aguda, forma poco frecuente que ocurre principalmente en lactantes y en niños menores de dos años de edad, que suele ser fatal. Sus manifestaciones clínicas son idénticas a las de las meningoencefalitis de otras etimologías, incluyendo convulsiones generalizadas. Su diagnóstico se realiza mediante el hallazgo de tripomastigotes metacíclicos en el examen directo de líquido cefalorraquídeo (Rassi *et al.*, 2010; Rosas *et al.*, 2007).

### 2.6.5. Fase aguda en perros

Después de la infección los tripomastigotes entran en las células, principalmente infecta a macrófagos, donde evaden al sistema inmune y puede propagarse por todo el organismo, algunos parásitos que entren a la circulación pueden ser detectados por citología de manera casi inmediata a los tres días post infección. La parasitemia aumenta constantemente a medida que se dan más y más ciclos de multiplicación intracelular, aumentando así el número de tripomastigotes circulantes, el número de células infectadas y el daño a órganos blanco. La parasitemia pico ocurre aproximadamente entre los días 17-36 días post infección, alrededor del momento en que los signos clínicos de linfadenopatía generalizada y la miocarditis aguda aparecen. La causa de la miocarditis se cree es debido al daño celular y la inflamación resultante de la ruptura de cardiomiocitos por la salida de tripomastigotes. El letargo, la linfadenopatía generalizada, el tiempo de llenado capilar lento, las mucosas pálidas, en algunos casos esplenomegalia y hepatomegalia, son signos que se pueden presentar en cachorros. En perros mayores de seis meses, los signos clínicos suelen ser mucho menos severas y a veces no evidentes en todos.

Los hallazgos histopatológicos incluyen una severa miocarditis difusa, grandes números de pseudoquistes parasitarios y una mínima fibrosis. Aunque menos común que las manifestaciones cardíacas, los signos neurológicos atribuibles a meningoencefalitis secundaria a la invasión del parásito al sistema neurológico también puede ocurrir, e incluyen debilidad, ataxia, y reflejos espinales hiperrefléxicos sugestivos de moquillo canino.

Los hallazgos histopatológicos incluyen una severa miocarditis granulomatosa difusa, grandes números de pseudoquistes parasitarios y una mínima fibrosis. Aunque menos común que las manifestaciones cardíacas, los signos neurológicos atribuibles a meningoencefalitis secundaria a la invasión del parásito al sistema neurológico también puede ocurrir, e incluyen debilidad, ataxia, y reflejos espinales hiperrefléxicos sugestivos de moquillo canino (Barr *et al.*, 2014).

### 2.6.6. Fase indeterminada en perros

Los perros que sobreviven a la fase aguda de la enfermedad, entran a la fase conocida como fase indeterminada que se caracteriza por la ausencia de signos clínicos. La presencia de parásitos en sangre es baja en torno a los 30 días post infección y solo puede ser demostrada por hemocultivo o xenodiagnóstico. El electrocardiograma suele ser normal durante esta fase, aunque las arritmias ventriculares pueden ser inducidas por el ejercicio (Barr *et al.*, 1991, 1992, 2014).

### 2.6.7. Fase crónica en perros

Aunque no todos los perros llegan a desarrollar la enfermedad crónica, algunos desarrollan miocarditis crónica con dilatación cardíaca durante los siguientes 8 a 36 meses. Con el progresivo desarrollo de la dilatación cardíaca, las anomalías en el ECG son cada vez más frecuentes e incluso pueden resultar en muerte súbita. Los signos clínicos generalmente se asocian a enfermedad miocárdica del lado derecho, pero en algunos se puede producir alteraciones del lado izquierdo del corazón, y estos incluyen; déficit de pulso, ascitis, derrame pleural, hepatomegalia y congestión venosa yugular. Los perros que fueron diagnosticados con estos signos en una edad media de 9 años sobrevivieron entre 30 y 60 meses, mientras que los perros diagnosticados en una edad más joven en promedio de 4,5 años, sobrevivieron solo hasta 5 meses después del diagnóstico (Barr *et al.*, 1991, 2014).

Las alteraciones ecocardiográficas incluyen dilatación ventricular derecha con progresión para incluir una pérdida de la función del ventrículo izquierdo, con disminución de la fracción de acortamiento, la reducción de la fracción de eyección, disminución en el grosor de la pared libre de ventrículo izquierdo y un aumento en el volumen sistólico final. La patogénesis de la cardiomiopatía dilatada biventricular es desconocida, pero los posibles mecanismos incluyen mecanismos inmunomediados dirigidos contra los cardiomiocitos o al sistema nervioso autónomo, o a una enfermedad microvascular junto con disfunción plaquetaria (Barr *et al.*, 2014; Andrade *et al.*, 1994, 1997). En la histopatología del miocardio se caracteriza por infiltrado celular mononuclear intersticial multifocal, perivasculitis y fibrosis marcada, y si los hubiese nidos de parásitos. La dilatación cardíaca ocurre cuando la fibrosis ya no posibilita la hipertrofia compensatoria (Andrade *et al.*, 1994; Tanowitz *et al.*, 1992). Algunos aislados de *T. cruzi* de perros en los Estados Unidos no son patogénicos, pero pueden producir una marcada respuesta serológica y una parasitemia durante momentos de estrés o inmunosupresión (Barr *et al.*, 1991).

### 2.7. Medidas de control de la enfermedad de Chagas

En los países de Latinoamérica donde la enfermedad de Chagas es endémica, y la principal forma de transmisión es por triatomíneos, las medidas del control del vector han sido por medio del uso de insecticidas así como en la aplicación de técnicas basadas en la gestión del entorno humano, educación a las comunidades sobre la enfermedad, que pueden suplementar a las medidas del uso de insecticidas. Debido a los patrones de comportamiento del ciclo peridomiciliario de los triatomíneos, así como de la necesidad de que la fumigación se aplique de manera anual, y la aun no completa comprensión del patrón temporal de inmigración del vector, las medidas encaminadas al control del vector, no han sido suficientes para la completa eliminación de esta forma de transmisión (Barbu *et al.*, 2009; Lardeux *et al.*, 2015; Waleckx *et al.*, 2015).

### 2.8. Tamizaje en bancos de sangre

La transmisión de la enfermedad de Chagas a través de transfusiones sanguíneas se evidenció en la década de los 50's, no fue hasta los años 80's cuando con la aparición del SIDA los programas de análisis de sangre, tanto nacionales y regionales para el tamizaje de la enfermedad de Chagas se reforzó en los países endémicos. En México, los resultados de la Encuesta Serológica (ENSE) realizada entre 1987 y 1989 mostraron que 1.6% de la población total estaba afectada y que la transmisión por transfusión en zonas e diversa extensión casi todos los estados del país, aunque con mayor magnitud en los situados en el sur-sureste (Chiapas y Oaxaca), en el centro (Hidalgo, San Luis Potosí y Zacatecas) y en la costa del Golfo de México (Veracruz), así como en la península de Yucatán (Yucatán y Quintana Roo) (Velasco *et al.*, 1998; Bathia *et al.*, 2004).

### 2.9. Uso de quimioterapéuticos

El nifurtimox (Lampit) y el benznidazol (Radanil), son los dos fármacos aprobados para el tratamiento en la enfermedad de Chagas. Ambos agentes antiparasitarios son utilizados en la fase aguda, con tasas de curación de hasta el 80% después de dos meses de tratamiento. Estos medicamentos son menos eficaces

en la fase crónica aunque existen algunas controversias entre los expertos científicos sobre la eficacia en este periodo agudo de la enfermedad (Solomon, 2012).

En los países de América Latina se considera al Benznidazol como el fármaco más indicado, y es el único autorizado en España. Se trata de un medicamento no disponible en farmacia y debe tramitarse su obtención a través de medicación extranjera. Los efectos adversos de este fármaco son: neuropatía periférica, prurito, sarpullido, descamación, fiebre, linfadenopatía, angioedema, náuseas, vómitos, somnolencia, dolor de cabeza, mucosas secas, artralgias, astenia, granulocitopenia, neutropenia, incremento en alaninaminotransferasa, y en aspartato aminotransferasa (Murcia *et al.*, 2012; Molina *et al.*, 2015).

Nifurtimox es mal tolerada en adultos con enfermedad de Chagas Crónica, resultando en una reducida tasa de finalización del tratamiento, debido a los adversos efectos colaterales, los cuales incluyeron anorexia, náuseas, dolor abdominal, vómitos y diarrea, dolor de cabeza, cambios de humor, mareos y neuropatía periférica, fatiga, insomnio, artalgia, mialgia, prurito y sarpullido. Considerando el importante riesgo de reacciones adversas medicamentosas, se requiere un estrecho control, que pueden ser difíciles de controlar en las zonas rurales de los países donde la enfermedad es endémica. La seguridad y la eficacia del Nifurtimox y Benznidazol debe compararse para mejorar las recomendaciones actuales terapéuticas, y los sistemas de fármaco-vigilancia deben ser mejorados (Jackson *et al.*, 2010).

Varios estudios clínicos han demostrado que la patogénesis de la enfermedad de Chagas va más allá de la persistencia del parásito *per se*; en otras palabras, se caracteriza esencialmente por ser una enfermedad inflamatoria junto con el desequilibrio de la respuesta inmune. Por lo tanto, la enfermedad ha sido considerada como incurable y el tratamiento antiparasitario específico ha sido descuidado (Bernardez *et al.*, 2015).

Por otro lado, a pesar de un porcentaje razonablemente alto de cura en la fase de infección aguda, el porcentaje de curaciones con éxito, medido por la tasa de erradicación del parásito se alcanza sólo en una pequeña proporción de pacientes en etapa crónica, <20%, también se tiene reportada la residencia de algunas cepas de *T. cruzi* (Bernardez *et al.*, 2015).

Debido a esta relativa eficacia menor y a sus efectos adversos de los fármacos tradicionales para la enfermedad de Chagas, el diseño y las pruebas de nuevos fármacos es necesario. Los medicamentos antimicóticos se ha estado investigando como posibles tratamientos debido a la inhibición que provocan a los esteroides endógenos que son esenciales para las membranas vitales del parásito, su división, el crecimiento y el desarrollo de los procesos. El posaconazol ha sido ampliamente estudiado como un nuevo posible fármaco para el tratamiento de pacientes chagásicos con alta actividad *in vivo* contra la infección causada por *T. cruzi* así como sus cepas resistentes (Lepesheva, 2013).

En un estudio realizado para comprobar la eficacia del Benznidazol sobre la cepa Berenice-78, en la reducción de la carga parasitaria y mitigar los daños en el tejido del músculo cardíaco y disfunción diastólica del ventrículo izquierdo, mostrando el beneficio de la reducción de la carga parasitaria por medio de resultados negativos en los hemocultivos y ensayos de PCR en un 82% de los perros con tratamiento en comparación con solo el 36% de los perros no tratados. Sin embargo, durante todo el periodo que comprendió el estudio los resultados positivos se fueron detectando mientras este seguía su curso (Santos *et al.*, 2016).

### 3. Planteamiento del problema

En perros no se ha publicado la caracterización de la evolución puntual de la cardiomiopatía de la enfermedad de Chagas en la fase aguda y crónica a través del tiempo

### 4. Justificación

Tanto en la clínica de perros, como en las pruebas de desarrollo de vacunas de la enfermedad de Chagas, es necesario saber interpretar los hallazgos encontrados por los métodos diagnósticos, en las diferentes etapas evolutivas de la enfermedad. Por un lado, para contar con un pronóstico clínico acertado que contribuya a instaurar un tratamiento terapéutico adecuado a los animales y brindar un asesoramiento idóneo a los propietarios, y por otro lado para dar un seguimiento más puntual a la efectividad de los candidatos vacunales en experimentación.

### 5. Hipótesis

La descripción puntual de los eventos clínicos de la enfermedad de Chagas en perro contribuye a elaborar un pronóstico clínico acertado en animales en fase crónica de la enfermedad.

### 6. Objetivo general

Evaluar los cambios clínicos que ocurren a través del tiempo durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas en perros infectados experimentalmente

#### 6.1 Objetivos específicos

1. Evaluar la respuesta humoral de la infección de *T. cruzi*.
2. Determinar la parasitemia en fase crónica en perros desafiados
3. Evaluación de los cambios clínicos y sub-clínicos asociados a la infección crónica en los perros infectados experimentalmente
4. Determinar cambios en la biometría hemática, perfil renal y hepático en la fase crónica de la enfermedad de Chagas
5. Cuantificar los cambios morfológicos y funcionales del corazón, en perros infectados mediante ecocardiografía, electrocardiografía, radiografía a través del tiempo en perros con enfermedad de Chagas en fase crónica
6. Realizar una clasificación de estadios de desarrollo de la cardiomiopatía en perros con enfermedad de Chagas en fase crónica a través del tiempo

### 7. Materiales y métodos

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de biología molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) y en el área de Imagenología del Hospital Veterinario para Pequeñas Especies (HVPE), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de México. El CIESA se localiza en el kilómetro 12.5 de la carretera Panamericana en su tramo Toluca-Atlacomulco. El HVPE se localiza en Jesús Carranza #203 Universidad, Toluca de Lerdo México.

#### 7.1 Estrategia general

Para este experimento se utilizaron 14 perros de la raza Beagle, se asignaron aleatoriamente a uno de los dos grupos bajo los siguientes tratamientos: a) grupo no infectado (sin desafiar) (n=7); b) grupo infectado (desafiado) (n=7).

El experimento consta de dos fases:

#### 7.2 Pre-infección

Se tomaron muestras de sangre de manera semanal a partir del día cero, para realizar la evaluación serológica, con la prueba de ELISA en busca de cambios en los niveles de anticuerpos. Los perros fueron observados diariamente por el tiempo que duró el experimento, para evaluar los posibles cambios en la salud (con un examen físico general, estado de ánimo y se les midió el consumo de alimento y agua), también se monitoreo una vez a la semana, durante el experimento, la conductividad eléctrica del corazón a través de electrocardiograma, así como cada 15 días la función y morfología cardíaca del corazón a través de ecocardiograma.

#### 7.3 Infección

Los perros fueron separados en dos grupos, un grupo infectado (+) (n=7) y un grupo no infectado (-) (n=7). Los perros infectados (+) fueron inoculados a los 365 días de edad, vía intraperitoneal, con 3500 trypomastigotes de la cepa *SylvioX10/4* de *Trypanosoma cruzi* por kg de peso, en solución salina fisiológica (Barbabosa-Pliego *et al.*, 2009) a los perros del control negativo se les aplicó únicamente solución salina fisiológica estéril.

#### 7.4. Animales

Se adquirieron 14 perros de la raza Beagle (7 hembras y 7 machos, 3-4 meses de edad), localmente y se mantuvieron en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) donde fueron incluidos en el experimento, a los 12 meses de edad (8-12 kg de peso corporal). Los perros fueron confirmados libres de la infección de *T. cruzi* mediante examen microscópico de frotis de sangre, evaluación serológica de anticuerpos anti-*T. cruzi* mediante una prueba de inmunoabsorción enzimática (ELISA) y por PCR punto final y PCR anidado de acuerdo a lo descrito por Aparicio-Burgos *et al.*, 2016. Antes de la inclusión de los perros al estudio experimental, estos fueron desparasitados y vacunados contra las enfermedades infecto contagiosas de la región (Distemper, Parvovirus, Adenovirus, Leptospira y Rabia). Todos los perros se mantuvieron con acceso a agua *ad libitum*, y fueron alimentados con una dieta comercial dos veces al día acorde a sus requerimientos nutricionales. El protocolo experimental fue realizado bajo las especificaciones técnicas de producción, cuidado y uso de animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), y el Consejo Internacional de Organizaciones de Ciencias Médicas. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética y Bienestar Animal de la FMVZ UAEM.

#### 7.5 Parásitos

Los parásitos fueron cultivados en monocapas de células C2C12 según lo descrito por Urbina *et al* 1988, en medio de cultivo DMEM(GIBCO, Carlsbad, USA, número de catálogo 11885-084) enriquecido con 2% de suero fetal bovino (HyClone Laboratories, Inc, Logan UT, USA, número de catálogo SH30071.03), incubadas en una estufa de medio ambiente controlado (5% CO<sub>2</sub>, 37°C y humedad saturada) en condiciones asépticas. Las células C2C12 fueron infectadas con tripomastigotes metacíclicos (en una relación de 20 parásitos por célula) cuando se encontraban a un 60% de confluencia. Y los parásitos se cosecharon a partir de una semana después, se lavaron por centrifugación con PBS, dos veces, se contaron y se concentró en un ml de solución salina fisiológica a una dosis de 3500 parásitos por kilogramo de peso de los animales a infectar.

## 7.6 Serología.

Se obtuvieron 5 ml de sangre por punción de la vena yugular en tubos vacutainer y cada muestra fue clasificada con un número de identificación y registrada. El suero fue separado de la sangre permitiendo que la muestra coagule, o mediante centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos. Se prepararon alícuotas de 500 µl de suero en tubos Eppendorff de 1.5ml y se almacenaron en congelación (-20°C) hasta su uso.

Las muestras obtenidas de sueros que se obtuvieron fueron analizadas en busca de anticuerpos anti *T. cruzi* por ELISA de acuerdo a estudios previos (Barbabosa-Pliego *et al.*, 2009, Gupta *et al.*, 2013). En breve: placas de 96 pozos Maxisorb, fueron cubiertas toda la noche a 4°C, con un lisado de *T. cruzi* cepa *Sylvio X10/4* (5µg/mL de proteína) en 200 µl de NaCO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> a un pH de 9.6 (Bufer Carbonato). Después las placas fueron lavadas seis veces con 200µl de PBS 1X - 0.05% Tween-20 (PBS-T) y bloqueados con 5% leche sin grasa, por 60 min a 37°C. Los sueros fueron diluidos 1:10 en 200µl/pozo de la solución bloqueadora e incubados (1 h a 37°C). Las placas se lavaron seis veces con una solución de PBS-Tween 20, después se le agregó el conjugado peroxidasa anticuerpo de inmunoglobulina (IgG) de (Bethyl laboratorios USA) se incubaron por 1 hora a 37°C, se utilizó una dilución de anticuerpos de 1:2500. Las placas fueron lavadas seis veces con una solución de PBS-Tween 20, después se le agregó el sustrato peroxidasa OBD en búfer citrato a un pH de 4.5-0.03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción se detuvo 15 minutos después adicionando una solución de 5N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La lectura se realizó hizo en un lector para microplacas SpectraMax microplate (EPOCH) y el punto de corte para ELISA se utilizó el valor de 450 n. Para determinar el punto de corte para ELISA se utilizó el valor promedio de 30 sueros negativos ± 2 desviaciones estándar (Barbabosa *et al.*, 2009). Se realizaron dos repeticiones por muestra y los datos se presentan en promedios por perro.

## 7.7 Evaluación de parasitemia

La evaluación de la parasitemia se realizó por dos técnicas: por xenodiagnóstico que fue realizado como lo describe Portela-Lindosso & Shinkanai-Yasuda, 2003, Basso *et al.*, 2007, Aparicio-Burgos *et al.*, 2015. De manera breve, 6 ejemplares de ninfas de triatominos (*T. mazzotti*) libres de *T. cruzi* por perro fueron alimentadas los días 30 y día 60 PI. Las muestras de heces de las chinches fueron colectadas a los 60 días después de ser alimentadas, y se analizaron bajo microscopio para detectar epimastigotes o tripomastigotes metacíclicos. Fueron analizados al menos 10 campos por muestra de heces, y los triatominos fueron considerados positivos a *T. cruzi* cuando se detectó al menos un parásito.

Por gota fresca según Brener 1967; de cada perro se colectaron 5µl de sangre, se colocaron en un portaobjetos con cubreobjetos (18 mm x 18 mm) y se observó en un microscopio óptico a 40x, se contaron todos los campos de la laminilla por perro/grupo.

## 7.8 Evaluación clínica y cardiovascular

Los cambios en el ritmo y la conducción eléctrica en el corazón en los perros fueron monitorizados antes de la inclusión al estudio, y después de la infección, cada 15 días durante 365 días. Se utilizó un electrocardiógrafo portátil de la marca Temmis, modelo TM-300-V, a una velocidad de 25 y 50 mm/seg calibrado a 0.1 mV. Empleando seis derivadas electrocardiográficas (Tilley 1992).

La ecocardiografía fue realizada antes y después de la infección a los días 0, 60, 90, 180, 270 y 365. Se utilizó un ecógrafo de la marca Sonoscape, modelo S6 con un transductor sectorial multifrecuencia SPI 7-4 MHz phased array application cardiology, Pediatric. Los estudios se aplicaron siguiendo la programación utilizada en cardiología veterinaria (Boon 2011). Realizando un estudio de ecocardiografía en los siguientes modos: modo B, Modo M en eje paraesternal derecho de 4 cámaras a nivel de las puntas de las cúspides de la válvula mitral, Doppler color en las 4 válvulas cardíacas, Doppler Espectral de válvula pulmonar en eje corto de 5 cámaras en ventana paraesternal derecha, flujo transmitral en ventana paraesternal izquierda en eje apical de 4 cámaras, flujo aórtico en ventana paraesternal izquierda en eje apical de 5 cámaras, y flujo tricúspide en ventana paraesternal izquierda en eje apical de 4 cámaras,

Doppler Tisular empleando una ventana paraesternal izquierda en eje apical de 4 cámaras colocando el cursor en anillo lateral de válvula mitral.

Se realizó el índice de funcionamiento miocárdico global (Índice de Tei) es un índice que evalúa de forma conjunta la función sistólica y diastólica del ventrículo izquierdo o derecho, y se obtiene a por ecocardiografía Doppler espectral del flujo transmitral o transtricúspideo. Para el propósito de este estudio medimos el intervalo “a” (del final de la onda de llenado auricular al inicio de la onda de llenado temprano) con el volumen muestra del Doppler pulsado colocado en la punta de las valvas de la mitral, y el intervalo “b” (del inicio al final del flujo de expulsión aórtico) con el volumen muestra del Doppler pulsado colorado justo por debajo del anillo aórtico. El índice de Tei se calculó de la siguiente manera (a-b)/b (Torres-Rojo *et al.*, 2005, Sousa *et al.*, 2007, Sousa *et al.*, 2016).

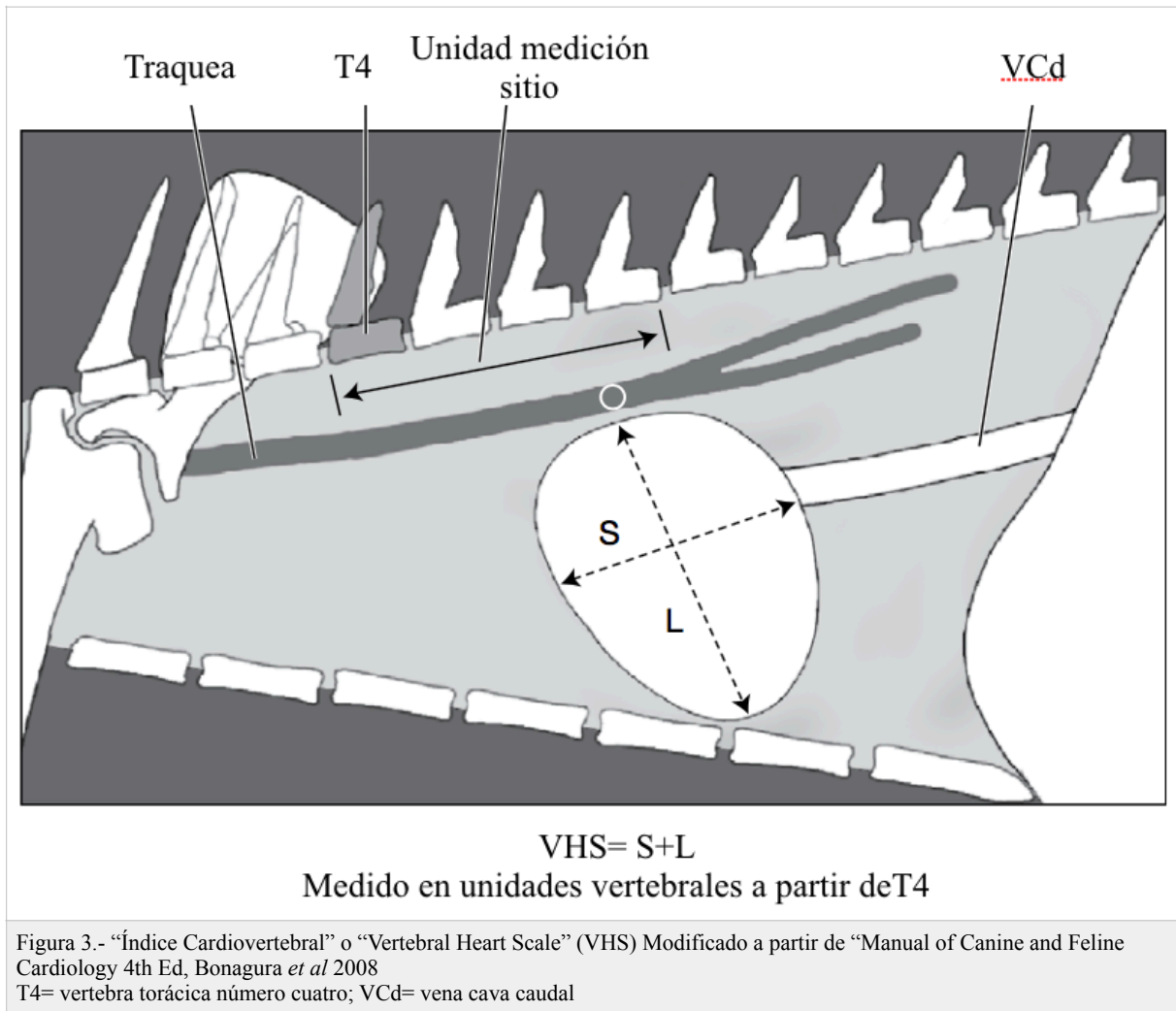
Para cada uno de los estudios se utilizó una escala subjetiva a la cual se le asignó un valor de 1 a 4 (Díaz González *et al.*, 2011) según el grado de afectación para cada variable que se analizó. Pudiendo dar un total de 12 puntos para los animales sanos en todos los aspectos y 38 para los animales afectados severamente para cada variable.

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	SUB-VARIABLES	DEFINICIÓN OPERATORIA	TIPO DE VARIABLE	NIVEL DE MEDICIÓN	ESCALA DE MEDICIÓN
E L E C T R O C A R D I O G R A F Í A	Lectura gráfica de la conducción eléctrica	Frecuencia Cardíaca	Número de latidos por minuto	Cualitativa Ordinal	(1) Normal = 60-140 latidos por minuto (lpm) (2) Taquicardia = >140 lpm (3) Bradicardia <60 lpm	Politómica
		Ritmo	Latidos del corazón, medidos en pulsos por minuto	Cualitativa Nominal	(1) Normal = 0.04 seg (2) Aumentada = P mitral ↑ Ai (3) Múltiples = bloqueo de 2° y 3° grado (4) Ausente	Politómica
		Onda P (segundos = seg)	Velocidad en la despolarización atrial medida en segundos	Cualitativa Ordinal	(1) Normal = 0.04 seg (2) Aumentada = P mitral ↑ AI (3) Múltiples = bloqueo de 2° y 3° grado (4) Ausente = Fibrilación atrial	Politómica
		Onda P (milivoltios = mv)	Sensibilidad en la despolarización atrial medida en milivoltios	Cualitativa Ordinal	(1) Normal = 0.4mv (2) Disminuida = arritmia supraventricular (3) Aumentada = P pulmonar ↑ AD (4) Ausentes = Fibrilación atrial	Politómica

Intervalo P-R (seg)	Pausa entre sistole atrial y sistole ventricular medida en segundos = llenado ventricular	Cualitativa Ordinal	(1) Normal = 0.06-0.13 seg (2) Aumentada = Bloqueo AV 1° grado (3) Disminuida = Bloqueo AV 3° grado (4) Ausentes	Politómica
Complejo QRS (seg)	Velocidad en la despolarización ventricular medida en segundos	Cualitativa Ordinal	(1) Normal = <0.06 seg (2) Aumentada = Bloqueo AV	Dicotómica
Complejo QRS (mv)	Sensibilidad en la despolarización ventricular medida en milivoltios	Cualitativa Ordinal	(1) Normal = 3.0 mv (2) Aumento R = ↑ VI (3) Disminuida = microvoltaje (4) Onda S profunda ↑VD	Politómica
Segmento ST (mv)	Pausa entre la despolarización y repolarización ventricular medida en milivoltios	Cualitativa Ordinal	(1) Normal = 0.2 mv (2) Desplazamiento = hipoxia, isquemia, hipertrofia de VI	Politómica
Onda T (mv)	Sensibilidad de la repolarización ventricular medida en mv	Cualitativa Ordinal	(1) Normal = 0.05-1mv (2) Aumentada = hiperpotasemia (3) Disminuida = hipopotasemia	Politómica
Intervalo Q-T (seg)	Velocidad total de la activación ventricular medida en segundos	Cualitativa Ordinal	(1) Normal = 0.15-0.25 seg (2) Aumentada = hipocalemia (3) Disminuida = hipercalemia	Politómica
Eje eléctrico	Evaluación del tamaño ventricular y clasificación de defectos de conducción infra-ventricular	Cualitativa Ordinal	(1) Normal = + 40° / + 100° (2) Levoeje = desviación del eje a la izquierda (3) Dextroeje = desviación del eje a la derecha	Politómica
Diagnóstico	Interpretación diagnóstica de la lectura del electrocardiograma	Cualitativa Nominal	(1) Normal (2) Anormal	Dicotómica

↑ AI: aumento del atrio izquierdo denominado como P mitral, ↑ AD aumento del atrio derecho denominado como P pulmonar, AV: atrio-ventricular, V: ventriculo, VI: ventriculo izquierdo, VD: ventriculo derecho, seg. : segundos, mv. : milivoltios.

Los exámenes radiográficos, se realizaron bajo un protocolo estandarizado con un sistema CMR LINEAR MC15 a los 0 y 365 días PI (Kraetschmer *et al.*, 2008).



Y para la proyección dorsoventral (DV), se utilizó la analogía del reloj (Kittleson & Kienle 1998) para detectar aumentos en la silueta cardíaca sugerentes de agrandamiento de las cámaras del corazón.

La radiografía lateral izquierda lateral derecha fue calificada en base a el VHS con un valor de 1=normal y 2= anormal.

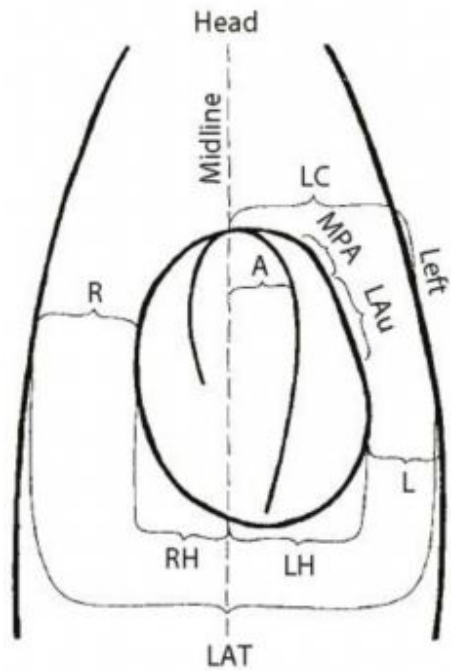


Figura 4.- Tomado de Kittleson & Kienle “Small Animal Cardiovascular” 1Ed 1998. Mostrando la posición de las cámaras cardíacas y los grandes vasos en una proyección radiográfica DV, empleando la analogía de la carátula de reloj. Arco aórtico (A) “12 del reloj”; Arteria pulmonar principal (MPA) “de 1-2 del reloj”; Aurícula izquierda (LAu) “2-3 del reloj); Ventriculo izquierdo (LH) “3-6 del reloj); Ventriculo derecho (RH) “6-12 del reloj”; Atrio derecho “9-12 del reloj”

Tabla 2.- Variables radiográficas de los estudios en los perros

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	SUB-VARIABLES	DEFINICIÓN OPERATORIA	TIPO DE VARIABLE	NIVEL DE MEDICIÓN	ESCALA DE MEDICIÓN
Radiografía de tórax	Observación de la morfología cardíaca	VHS	Suma de la medición del largo y ancho de la silueta cardíaca medida en cuerpos vertebrales	Cualitativa Ordinal	1=Normal (9.7-10.7 CIV) 2= Anormal (>10.7 CIV)	Dicotómica
		Analogía de la carátula del reloj	Observación monodimensional de la morfología de la silueta cardíaca y grandes vasos	Cualitativa Ordinal	1= Normal 2= ↑ AI 3= ↑ VI 4= ↑ AD 5= ↑ VD 6= Edema pulmonar	Politómica

VHS= vertebral heart scale; CIV= cuerpos intervertebrales; ↑ AI= Aumento de aurícula izquierda; ↑ VI= aumento de ventriculo izquierdo; ↑ AD= aumento de aurícula derecha; ↑ VD= aumento de ventriculo derecho

Tabla 5.- Variables ecocardiográficas estudiadas en los perros

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	SUB-VARIABLES	DEFINICIÓN OPERATORIA	TIPO DE VARIABLE	NIVEL DE MEDICIÓN	ESCALA DE MEDICIÓN
E C O C A R D I O G R A F Í A	Observación de la función y morfología cardíaca	Diagnóstico Modo B	Observación bidimensional de la función y morfología cardíaca	Cualitativa Ordinal	(1) Normal (2) Dilatación VD (3) Dilatación VI (4) ↑ paredes VD (5) ↑ paredes VI	Politómica
		SVd	Medición del septo en diástole	Cualitativa Ordinal	(1) Normal (2) Aumentada (3) Disminuida	Politómica
		VIId	Medición de ventrículo izquierdo en diástole	Cualitativa Ordinal	(1) Normal (2) Aumentada (3) Disminuida	Politómica
		PVd	Medición de pared ventricular izquierda en diástole	Cualitativa Ordinal	(1) Normal (2) Aumentada (3) Disminuida	Politómica
		SVs	Medición del septo en sístole	Cualitativa Ordinal	(1) Normal (2) Aumentada (3) Disminuida	Politómica
		VIIs	Medición ventrículo izquierdo en sístole	Cualitativa Ordinal	(1) Normal (2) Aumentada (3) Disminuida	Politómica
		PVIs	Medición de pared ventricular izquierda en sístole	Cualitativa Ordinal	(1) Normal (2) Aumentada (3) Disminuida	Politómica
		Diagnóstico Modo M	Medición de paredes y cámaras ventriculares en sístole y diástole	Cualitativa Nominal	(1) Normal (2) Anormal	Dicotómica
		Diagnóstico Modo Doppler Pulsado Flujo Transmitral	Medición del flujo diastólico a través de la válvula mitral	Cualitativa Ordinal	(1) Normal (2) Relajación anormal (3) Pseudonormal (4) Restrictivo	Politómica
		Diagnóstico Modo Doppler Color	Evaluación del flujo de mosaico a través de las válvulas AV y semifinales	Cualitativa Nominal	(1) Normal (2) Anormal	Dicotómica
↑= aumento; VI= ventrículo izquierdo; VD= ventrículo derecho; AV= auriculoventriculares						

## 7.9 Xenodiagnóstico

Se utilizaron 6-10 ninfas de *Triatoma mazzottii*/perro, y las ninfas fueron alimentadas a los días 35 post infección y evaluadas al día 60 post alimentación (Basso *et al.*, 2007).

## 7.10 Extracción de ADN del tejido digestivo de triatominos y sangre de perro

Posterior a la toma de muestra de las heces de los triatominos para la identificación de *T. cruzi* por microscopía óptica, se procedió a tomar el total del tejido del aparato digestivo de la cavidad abdominal de los insectos para extraer el ADN total y hacer el diagnóstico por PCR. Los intestinos se extrajeron cortando el abdomen de la chinche en la región anal y exprimiendo todo el contenido de tejido digestivo en un tubo ependorf de 1.5 ml. Para la extracción de ADN de las muestras de tejido con heces se empleó el *Kit ZR Tissue & Insecto DNA Micro prep (Zymo Research, USA)* de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El ADN de sangre de perro fue extraído y purificado utilizando el *Kit Wizard SV Genomic DNA Purificación System (Promega)* siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza de la preparación de ADN se determinó por espectrofotometría a 260 nm, y se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb (DNA size ladder; GeneRuler, número de catálogo SM0241, Fermentas).

## 7.11 PCR para amplificación del gen mini exón

Para detectar molecularmente la presencia de *T. cruzi* en heces o tejido de aparato digestivo de triatominos y en sangre de perro, se amplificó por PCR una banda de 350 pb de la región intergénica del

gen mini exón de *T. cruzi*, utilizando una mezcla de iniciadores reportados por Souto *et al* 1996 cuya secuencias son: TC2 5' CCTGCAGGCACACGTGTGTGTG 3' y TC 5' CCCCCCTCCCAGGCCACTG 3'. La reacción se realizó a un volumen final de 50µl, la cual contenía los siguientes reactivos: 1x de buffer Taq (750 mM Tris-HCL (pH 8.8), 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1% de Tween 20), una mezcla de 0.2mM de cada dNTPs; 1µM de cada iniciador; 3mM de MgCl<sub>2</sub>; de Taq polimerasa (Go Taq Flexi DNA Polymerase) 1µg/50µl. Con las siguientes ciclos térmicos una desnaturalización inicial de 94° C por 4 minutos, y después 30 ciclos con temperatura de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, la temperatura de alineación a 55° C por 30 segundos y una extensión a 72° C por 30 segundos con una extensión final a 72° C por 1 minuto, y una incubación final a 10° C por 5 minutos. Para la reacción PCR anidada se diseñaron los iniciadores internos utilizando el programa Primer3Plus; secuencia sentido fue: nested\_Tc2F5'-GCACGGTGTCTGTCTTGTC-3' y la secuencia contrasentido nested\_TCR 5'-ATCAGCGCCACAGAAAGTGT-3' 197 pb para producir un amplicón de 197 pb. Bajo las siguientes condiciones una desnaturalización inicial de 94° C por 10 minutos, seguido por 30 ciclos; desnaturalización a 95° C por 30 segundos, alineación 61.1° C por 30 seg y una extensión final a 72° C por 30 segundos, se agregó un paso de extensión final a 72° C por 10 minutos, y finalmente se detuvo la reacción a 4 grados por 5 minutos. Los productos amplificados fueron observados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, a 100 V por 30 minutos teñidos con bromuro de etidio (0,5µg/ml) a 100 V por 30 minutos y examinados usando un transiluminador de luz ultravioleta. Las imágenes fueron capturadas por una cámara digital MiniBis Pro 16mm.

#### 7.12 Identificación de la presencia del parasito en sangre por PCR.

Para detectar molecularmente la presencia de *T. cruzi* en sangre se realizó lo descrito anteriormente en detección de *T. cruzi* por PCR.

## 8. Resultados

### 8.1 Título de capítulo de libro

Enfermedad de Chagas en Perros

### 8.2 Página frontal del capítulo

#### **Enfermedad de Chagas en perros**

Cuahtémoc Alonso Gutiérrez Espinoza<sup>1</sup>, Juan Carlos Vázquez-Chagoyán<sup>1</sup>, Alberto Barbabosa Pliego<sup>1</sup>,  
Sandra Díaz González Vieyra <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, CIESA-FMVZ-UAEMéx

<sup>2</sup> Hospital Veterinario Pequeñas Especies, HVPE-FMVZ-UAEMéx

+corresponding author: jcvch@yahoo.com

### 8.3 Carta de aceptación



**Grupo Latinoamericano de  
Investigación Cardiovascular  
Veterinaria**

Buenos Aires, 14 marzo del 2018

Estimado Dr. Cuauhtemoc Gutiérrez Espinosa:

Por la presente queremos informarle que el capítulo enviado **“Enfermedad de Chagas en Perros”** de su autoría junto al Dr. Juan Carlos Vazquez Chagoyán a sido aceptado y formara parte del libro del Grupo Latinoamericano de Investigación Cardiovascular Veterinaria (GLICAV) el mismo ya se encuentra en diseño y prensa y será editado en Mexico y resto de los países de la región. Esta obra se presentará durante el Congreso Veterinario de Leon, del 5 al 8 de setiembre del corriente año. Queremos asimismo agradecerle su valiosa colaboración, y mas aun con un tema innovador en nuestra área y que representa un problema a nivel veterinaria pero así también en Salud Pública.

Un cordial saludo y nuevamente agradecido

MV.; MSc Carlos J. Mucha  
GLICAV

## 8.4 Capítulo de libro

### Enfermedad de Chagas en perros

Cuauhtémoc Alonso Gutiérrez Espinoza<sup>1</sup>, Juan Carlos Vázquez-Chagoyán<sup>1</sup>, Alberto Barbabosa Pliego<sup>1</sup>,  
Sandra Díaz González Vieyra<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, CIESA-FMVZ-UAEMéx

<sup>2</sup> Hospital Veterinario Pequeñas Especies, HVPE-FMVZ-UAEMéx

+corresponding author: jcvch@yahoo.com

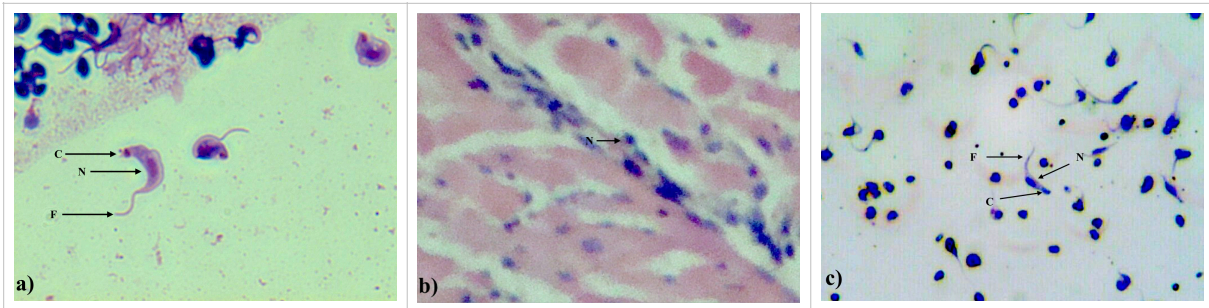
### **Etiología**

La enfermedad de Chagas es una zoonosis provocada por el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). La tripanosomiasis americana, afecta a 150 especies de 24 familias de mamíferos, el reservorio natural está conformado por fauna silvestre como armadillos, marsupiales, roedores, murciélagos, primates silvestres, además de animales domésticos como perro, gato, caballo, incluso ratas y cobayos. El perro continúa siendo el principal reservorio de la enfermedad en el ámbito doméstico. La principal forma de transmisión en América Latina es a través de las heces de los vectores triatomíneos, comúnmente conocidos como chinches besuconas, vinchucas, chipochinche gaucha, chirimacha o chinche picuda pito. La enfermedad se encuentra distribuida de manera endémica en 21 países de Latinoamérica y se estima que en la actualidad se encuentran infectadas de 6-7 millones de personas, y que 25 millones más se encuentran en riesgo de adquirir la infección en el mundo. A pesar que el vector está confinado a los países endémicos de América la enfermedad se ha reportado en regiones no endémicas del mundo, como Estados Unidos de América, Canadá, y algunos países europeos y del pacífico occidental. Esto obedece a que la infección también se puede adquirir mediante transfusión de sangre, transmisión congénita, transplante de órganos, leche materna y accidentes de laboratorio, no siendo necesaria la presencia del vector en estos casos en países no endémicos.

*Trypanosoma cruzi* presenta formas evolutivas con aspectos morfológicos distintos, en los hospederos y en los insectos vectores. Por microscopía óptica se pueden apreciar estas diferencias en la forma general de la célula, el núcleo, el cinetoplasto, y el flagelo. Adicionalmente sus distintos tipos de sus tres formas principales se describen a continuación :

- a) Tripomastigote: cuando se encuentra en la sangre es monomórfico, de aspecto fusiforme, mide de 20-25µm x 2-4µm, con núcleo vesiculoso y citoplasma granuloso, con un complejo cinetoplástico posterior, del cual emerge una membrana ondulante, que recorre al parásito y cuyo borde libre lleva un flagelo. Adopta la forma de C o S, es muy móvil y en preparaciones en fresco, de sangre de animales, humanos infectados o de heces del insecto vector, el desplazamiento del parásito se detecta porque mueve a los glóbulos rojos. Se considera que es la forma infectante, no se reproduce y resiste a altas temperaturas de refrigeración.
- b) Epimastigote: de aspecto fusiforme, con un complejo cinetoplástico localizado por delante del núcleo o a su nivel, mide 20-40µm x 2-5µm, presenta una membrana corta ondulante y un flagelo libre. Este estadio se encuentra en el intestino del vector, donde se reproduce por fisión binaria y también es la forma predominante en el cultivo axénico del parásito.

- c) Amastigote: con una morfología esférica, muy pequeña, mide de 1.5-4µm de diámetro, núcleo y complejo cinetoplásmico muy próximos, sin flagelo. Es intracelular, y aparece en grupos formando nidos, en tejidos lesionados lo que facilita su identificación.



**Figura 1.-** Formas del parásito. a) Forma tripomastigote donde (N) corresponde al núcleo, (F) al flagelo y (C) al cinetoplasto; b) amastigote intracelulares de *T. cruzi*; y c) formas epimastigotes del *T. cruzi*

### Ciclo Biológico de *T. cruzi* en los mamíferos

El parásito tiene un ciclo de vida con tres estadios principales que se presentan en dos huéspedes. En el insecto vector, *T. cruzi* se encuentra en la forma de epimastigote y tripomastigote metacíclicos. En el huésped vertebrado, se encuentra como tripomastigote sanguíneo y amastigote. La transmisión se inicia cuando un vector infectado se alimenta de la sangre del hospedero vertebrado y como reflejo 20 minutos después defeca y deposita tripomastigotes metacíclicos, que son la forma infectiva del parásito. Los tripomastigotes metacíclicos pueden entrar al huésped vertebrado a través de heridas, excoriaciones de la piel o por mucosa intacta, invaden células y se forma una vacuola parasitófora iniciando el ciclo intracelular. Se ha propuesto la infección por ingestión del triatomino infectado, transfusión de sangre, y por la ingestión de leche en perras infectadas.

En el citoplasma de las células, los parásitos se diferencian en amastigotes y entran en una fase replicativa (por fisión binaria). Una vez que se han replicado, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes sanguíneos, los cuales provocan la ruptura de las células y como consecuencia se liberan en la sangre, para infectar a otras células o también pueden ser ingeridos por el vector. Los tripomastigotes ingeridos por el vector pasan a través del tracto digestivo donde sufren la diferenciación a epimastigotes, los cuales se replican y se dirigen al recto del insecto. En el recto los parásitos se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, completando así el ciclo de vida del parásito.

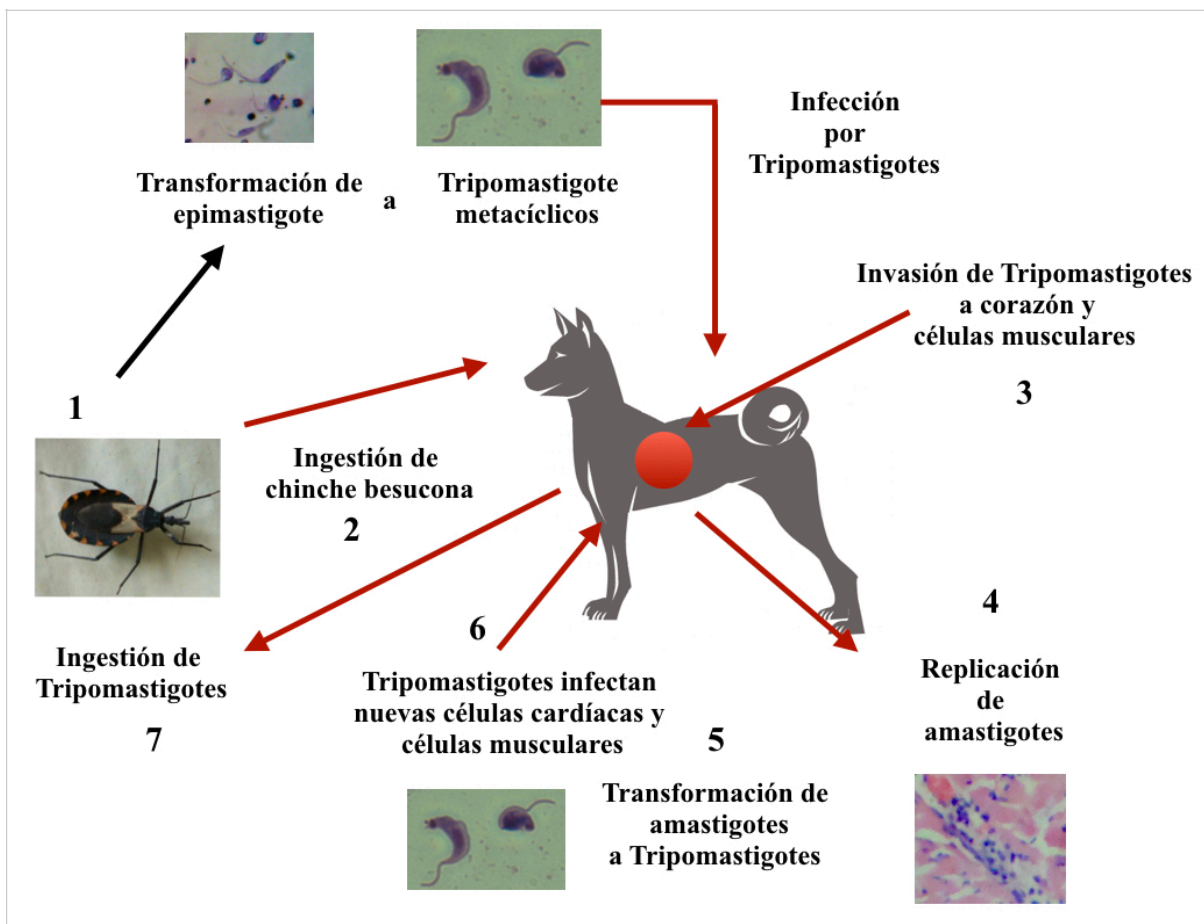
**Figura 2.-** Triatominos “*Meccus pallidipennis*”



a) Hembra, flecha terminación en “V”



b) Macho, flecha terminación redonda



**Figura.-3** Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

**1** En el vector las formas de epimastigotes los cuales se replican en el tracto digestivo del triatomino se diferencian a tripomastigote metacíclicos, **2** los perros se infectan al ingerir los triatominos infectados, **3** se lleva acabo la infección de tripomastigotes metacíclicos a células cardíacas y células musculares, **4** se realiza la diferenciación de tripomastigotes metacíclicos en amastigotes y se replican por fisión binaria, **5** los amastigotes se diferencian a tripomastigotes sanguíneos los cuales provocan la ruptura de la célula y se liberan a la circulación **6** infectando nuevas células o **7** pueden ser ingeridos por el vector, completando así el ciclo de vida del parásito

## **Modos de transmisión del *Trypanosoma cruzi***

### **Transmisión vectorial**

En Latinoamérica es un problema de salud pública y continua siendo la principal forma de infección de la enfermedad de Chagas. Esta ocurre cuando la persona duerme, el vector se alimenta y como acto reflejo defeca en la zona de la picadura, la cual al frotarse le da acceso a los parasitos contenidos en las heces con lesiones cutáneas o ablaciones de la piel. Es común que el sitio de entrada sea la conjuntiva ocular. Probablemente porque los insectos se sienten atraídos a la cara de las personas debido a su relativa calidez o al CO<sub>2</sub> exhalado, o porque la penetración de las mucosas es más fácil para la alimentación. En el caso de los perros, las formas de entrada natural del parásito al huésped son similares a las del humano, pero adicionalmente el perro puede infectarse vía oral por consumir ya sea el triatomino portador o sus heces infectadas.

### **Transmisión por transfusión sanguínea**

La transmisión se puede dar por transfusión de sangre completa o sus derivados. Se considera que es la segunda vía de infección más común en países endémicos, y es la principal forma de transmisión en países no endémicos. En México y en países Latinoamericanos, la población campesina que migra a las ciudades industrializadas o turísticas en busca de trabajo dispersa la enfermedad de Chagas por todo el país y aumenta el riesgo de transmisión de *T. cruzi* por transfusión de sangre y sus derivados en las áreas urbanas de mayor atracción para los migrantes campesinos. En el caso de perros, dado que la transfusión sanguínea es un poco menos común, esta vía de contagio es muy poco frecuente.

### **Transmisión congénita**

Para que se produzca la transmisión vertical debe existir parasitemia en la embarazada. El *T. cruzi* genera en el huésped una infección persistente, por lo cual este parásito puede hallarse en sangre tanto en la fase aguda como en la crónica. Este hecho biológico determina que una persona embarazada puede transmitir el parásito en cualquier estadio de la infección y que una madre infectada puede dar a luz niños con infección congénita en uno o más embarazos. La infección aguda durante la gestación aumenta el riesgo de transmisión transplacentaria. Para que la infección congénita se pueda dar se sabe que existen factores parasitarios como las cepas de *T. cruzi* o la carga parasitaria de la madre gestante, así como factores del huésped como estado inmunológico y nutricional, la historia obstétrica y fase de la enfermedad materna durante la gestación. El *T. cruzi* invade y se multiplica en las células de Hofbauer de la placenta; los tripomastigotes liberados posteriormente pueden invadir el embrión o el feto. Luego de la infección el feto puede sufrir alteraciones en su viabilidad y/o crecimiento de acuerdo con el momento en que suceda la infección parasitaria. La enfermedad congénita puede producir aborto espontáneo, nacimiento prematuro, retardo en el crecimiento intrauterino y muerte fetal. Esta vía no esta muy bien documentada en perros pero si se han reportado casos de infección transplacentaria.

### **Transmisión por trasplante de órganos**

Está documentado que la transmisión del parásito se puede dar través del trasplante de órganos. Los donantes de órganos con un perfil de riesgo o provenientes de zonas endémicas de la enfermedad de Chagas, deben someterse a pruebas de laboratorio para descartar la infección por *T. cruzi*, ya que existe un riesgo importante de transmitir la infección a través de esta vía. Se ha reportado que la infección puede transmitirse con una frecuencia de entre 13 a 22% de los receptores de trasplante de riñón o hígado a partir de donantes infectados, y del 75 al 100% en el caso de los receptores de trasplante de corazón. Al

igual que en el caso de la transfusión sanguínea, el trasplante de órganos no es común en medicina veterinaria y en ese mismo sentido la transmisión por esta vía es poco frecuente o nula.

### **Transmisión oral**

Es la forma en la que probablemente se infecten más frecuentemente los perros y los gatos. La transmisión del *T. cruzi* por vía oral tiene carácter habitual en el ciclo endémico primitivo de este parásito, por medio de la ingestión de vectores y reservorios infectados por mamíferos susceptibles. En el caso del hombre, esta transmisión ocurre de manera circunstancial, mediante alimentos contaminados con el parásito, sobre todo a partir de triatóminos o de sus deyecciones. También puede ocurrir por medio de la ingestión de carne de caza cruda o mal cocida, o de alimentos contaminados por orina o secreción anal de marsupiales infectados, o hasta, mediante hábitos primitivos de la ingestión de triatóminos. Las heces de los triatóminos pueden permanecer algunas horas infectantes en ambiente con elevada humedad, pudiendo así contaminar tanto alimentos, como patas y aparato bucal de transportadores secundarios, como moscas y cucarachas. En alimentos como la leche o caldo de caña, a la temperatura ambiente, el parásito puede mantenerse activo por veinticuatro horas o más, en estudios experimentales e inclusive por el contacto con sangre de perros infectados ya sea por agresiones u otra razón. Aunque, el jugo gástrico de los vertebrados superiores tenga la capacidad de destruir muchos parásitos, una cierta proporción de los mismos es capaz de evadirse de esta acción, mediante mecanismos químicos de protección externa, o bien su penetración puede ocurrir a través de la mucosa oral. Las evidencias experimentales disponibles hasta la fecha sugieren que la transmisión oral puede ocurrir a partir de formas de tripomastigotes, epimastigotes y, probablemente, de amastigotes y masas celulares, originarias de mamíferos o vectores contaminados.

### **Transmisión por accidentes de laboratorio**

Se puede adquirir la infección de *T. cruzi* por la exposición a triatóminos infectados, por el contacto con cultivos de sangre provenientes de personas o animales infectados con lesiones pre-existentes en piel como micro-ablaciones o mucosas no intactas así como por lesiones provocadas con agujas utilizadas con individuos infectados. Al igual que en otras formas de transmisión ésta es muy poco probable que ocurra en perros.

### **Diagnóstico**

#### **Métodos diagnósticos**

##### **Métodos parasitológicos directos**

Los exámenes parasitológicos directos son aquellos en los que la presencia del parásito es detectada mediante observación directa. Están particularmente indicados en el diagnóstico de la fase aguda e incluye los siguientes métodos:

- Gota fresca: es la primera alternativa de diagnóstico directo por ser rápida, simple, bajo costo, efectiva y más sensible que el extendido. El parásito puede ser detectado por su motilidad. El momento en que la infección es detectada más fácilmente por esta vía es cuando el paciente está en estado febril al momento de la toma de la muestra. Se deben buscar parásitos en sangre periférica en fresco sin anticoagulante, entre portaobjeto y cubreobjeto de 22 x 22, examinando inmediatamente, antes de que se seque la gota de sangre sin anticoagulante. Para obtener una monocapa de hematíes que permita observar los rápidos movimientos del parásito refringente entre las células sanguíneas, se recomienda colocar 5 µl de la preparación, deslizar el cubreobjeto y apretarlo contra el portaobjeto con la extremidad roma de un bolígrafo. Una vez visualizado el parásito, se confirma el diagnóstico sin necesidad de practicar otros exámenes.
- Métodos de concentración: consisten en artificios para visualizar el parásito cuando no es rápidamente visible en la gota fresca o no hay una parasitemia elevada.
- Microhematocrito: consiste en obtener uno o más capilares heparinizados, con sangre y someterlos a centrifugación en la microcentrífuga apropiada para microhematocrito. En la interfase entre el

empaquetado de glóbulos rojos y el plasma, se encuentra la capa flogística en la que se observan los movimientos del parásito al microscopio con un ocular de 10x y objetivo de 40 aumentos. Alternativamente se puede poner el contenido como si fuese en fresco.

- Técnica de Strout: también se emplea para otros hemoflagelados, consiste en la colecta de sangre mínimamente de 3 ml sin anticoagulante, dejando el tubo a 37°C durante dos horas, para la debida formación y retracción del coágulo. Si existen parásitos, migrarán hacia fuera del coágulo. El suero exudado se transfiere a otro tubo, el que se centrifuga cinco minutos a 2000rpm, del sobrenadante se transfiere a un segundo tubo y se somete a centrifugación 10 minutos, aproximadamente 2000 rpm. El sobrenadante, constituido por suero límpido, se decanta y se hace una preparación como de gota fresca, resuspendiendo la última gota del sedimento.

### **Métodos parasitológicos indirectos**

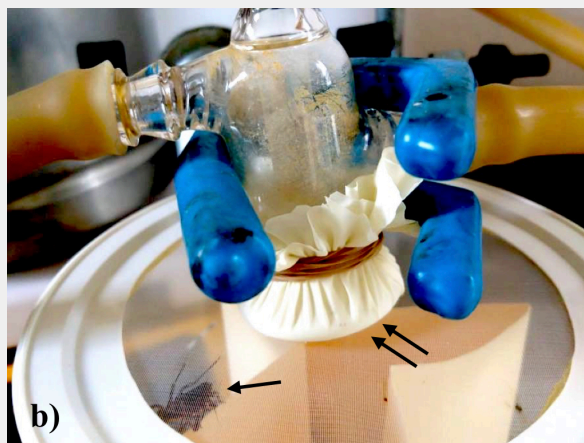
Los métodos parasitológicos indirectos son el xenodiagnóstico y el hemocultivo. En la fase aguda de la enfermedad, cuando la parasitemia es importante, la sensibilidad de estos métodos es semejante a la de los métodos directos. En la fase crónica, cuando es difícil la observación de los parásitos en la sangre, estos métodos son más sensibles que los métodos directos. Sin embargo, dada la escasez de parásitos en sangre en la fase crónica, la posibilidad de dar un diagnóstico positivo es inferior a lo observado en la fase aguda.

- Xenodiagnóstico: usa el triatmino libre de parásito, como medio de reproducción de los parásitos en la sangre. Los insectos criados en laboratorios son colocados en cajas sobre la piel del paciente, dejándolos durante 30 min para que se alimenten de sangre. Después de 30 a 60 días se examina el contenido intestinal de los triatominos en búsqueda de los parásitos en formas de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos. Alternativamente puede realizarse el xenodiagnóstico por un alimentador artificial de chinches, que consiste en que la sangre del paciente que es obtenida por venopunción, heparinizada se coloque en recipientes mantenidos a la temperatura corporal y con membranas finas de látex, a través de las cuales los insectos se alimentan. La sensibilidad varía mucho y depende de la fase en la que se encuentre la enfermedad y el tiempo de infección. En la fase aguda la sensibilidad puede ser del 100% mientras que en la fase crónica en general se acepta que no es mayor del 50%.
- Hemocultivo: se emplean medios líquidos tales como triptosa de infusión de hígado (LIT) o infusión cerebro corazón (BHI). La realización de hemocultivos de forma seriada aumenta la posibilidad de la técnica; sin embargo la variabilidad en el diagnóstico es importante entre regiones geográficas, lo que probablemente refleja una diferente constitución genética de las cepas de *T. cruzi*, el tiempo en que normalmente el hemocultivo se vuelve positivo es de 30 a 60 días.
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): esta técnica se basa en la amplificación de fragmentos ya sea del ADN del cinetoplasto o del genómico. Con alguna frecuencia, en animales con infección crónica se observan falsos negativos en PCR de punto final. Aunque ésta técnica es muy sensible, la negatividad se puede deber a la ausencia o muy baja presencia de parásitos en sangre por la ocurrencia de una parasitemia intermitente, que depende del ciclo biológico y de los cambios en la relación parásito hospedero en el tiempo. Una forma de mejorar la sensibilidad de esta prueba es hacer un PCR anidado, que significa hacer una nueva reacción de PCR utilizando cebadores internos de la región previamente amplificada, aprovechando que durante la primer reacción de PCR se produjo un incremento significativo de la molécula de ADN diagnóstica, por lo que en la segunda ronda de PCR se producirá una cantidad de ADN que ya puede ser apreciada por los métodos comunes de visualización de ADN (electroforesis en gel de agarosa con tinción fluorescente para ADN). La otra opción es realizar un PCR de tiempo real, que es también una prueba de PCR en un termociclador acoplado a un espectrofluorómetro que detecta fluorescencia tras excitar el fluoróforo (Sybr Green o sondas de ADN) asociado al ADN. Esta prueba es más sensible que el PCR de punto final, sin embargo, es también es sensiblemente más costosa.

**Figura 4.-** Xenodiagnóstico

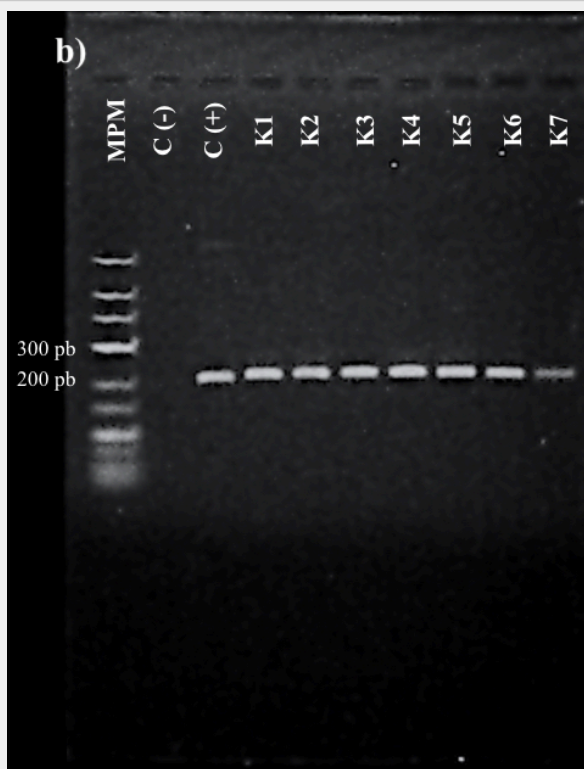
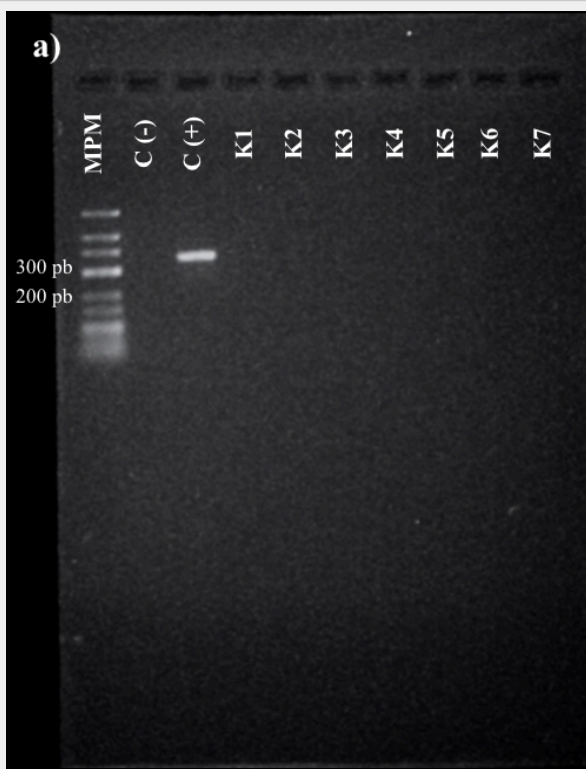


a) Xenodiagnóstico: (←) Triatomino (⇒) Piel del perro



b) Xenodiagnóstico artificial: (←) Triatomino (⇒) alimentador artificial

**Figura 5.-** Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)



**Figura 5.-** Amplificación del fragmento específico para PCR-punto final a) y PCR-anidado b) en sangre de los animales infectados durante la fase crónica. En las figuras a) b) se muestra en carril 1, MPS 700pb; carril 2, control (-), carril 3, control (+) 10 parásitos de cultivo de la cepa *SilvioX10/4*; carril 4, perro K1; carril 5, perro K2; carril 6, perro K3; carril 7, perro K4; carril 8, perro K5; carril 9, perro K6, carril 10, perro K7

### **Diagnóstico serológico en perro**

El diagnóstico serológico se basa en la determinación de IgG o IgM anti-*T. cruzi* con pruebas como ensayo inmunoenzimático (ELISA), inmunofluorescencia indirecta (IFI) o hemoaglutinación indirecta (HAI). Se conocen como pruebas serológicas convencionales a aquellas en las que se utiliza el parásito completo o una mezcla compleja de antígenos del parásito para detectar a los anticuerpos. Por otro lado el diagnóstico serológico es no convencional cuando los antígenos son purificados, recombinantes o se usan péptidos sintéticos. Estas pruebas, son sensibles y específicas pero en ocasiones pueden presentar reacciones cruzadas contra *T. rangeli* o *Leishmania spp* y dar falsos positivos.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA): permite observar la presencia de anticuerpos antiglobulinas ligados a una enzima que en presencia de su sustrato forma un producto colorido. Por ser una prueba colorimétrica el resultado es definido por la lectura de la absorbancia o densidad óptica. Los resultados alrededor de los puntos de corte, es decir, en muestras que reaccionan con un valor positivo muy bajo se clasifican como indeterminadas y en ese caso la muestra debe ser sometida a su análisis por otras técnicas.

Inmunofluorescencia indirecta (IFI): los anticuerpos presentes en el suero del perro infectado con *T. cruzi* son colocados sobre una lámina que contiene el antígeno (formas de epimastigotes de *T. cruzi*) y son revelados a través de anticuerpos anti-globulina canina unida a fluoresceína. El resultado se visualiza en el microscopio de fluorescencia con luz ultravioleta. Se debe considerar que se pueden presentar falsos positivos al presentarse reactividad cruzada con otros parásitos como *Leishmania spp* o *Trypanosoma rangeli*.

Hemoaglutinación indirecta (HAI): la superficie de los hematíes son sensibilizados con antígenos de *T. cruzi* adsorbidos, y en presencia de los anticuerpos contra el parásito presentes en el suero del paciente se produce una reacción antígeno-anticuerpo que genera aglutinación de los eritrocitos, la cual puede ser visualizada.

Durante el diagnóstico serológico deben tenerse en cuenta los siguientes aspectos:

- a) Siempre el diagnóstico debe realizarse con dos de estas técnicas.
- b) Si hay disparidad entre ambas pruebas es necesario realizar una tercera reacción para definir el estado de infección.
- c) Se considera que la prueba de ELISA tiene una alta sensibilidad y por lo tanto se recomienda como la primera prueba a realizar en el proceso de confirmación diagnóstica. Falsos negativos pueden ocurrir con la técnica de ELISA y por lo tanto se recomienda que ante un paciente con importantes elementos clínicos y epidemiológicos para sospechar enfermedad de Chagas, se debe continuar con el estudio serológico con la segunda prueba.
- d) En la fase aguda, el uso de la IgG para diagnóstico requiere de dos muestras de sangre que permitan comparar la seroconversión (IFI) con un intervalo mínimo 21 días entre una muestra y la otra.

### **Exámenes complementarios**

Hemograma: En los perros con infección experimental durante la fase aguda se ha observado que se presenta anemia, linfopenia y monocitosis, y la parasitemia persiste más allá del día 42 post infección. Durante la fase crónica de la enfermedad pueden no apreciarse cambios significativos.

Urianálisis: en perros no hay conclusiones específicas del uso de este examen en enfermedad de Chagas.

Bioquímica sanguínea: en perros la actividad de ALT, AST, creatinina y nitrógeno ureico pueden estar elevadas en perros con infección por *T. cruzi* especialmente aquellos que corren peligro de muerte por miocarditis aguda severa. Rara vez ocurre hipoalbuminemia de moderada a severa con o sin hiperglobulinemia aguda en perros infectados. Los niveles de troponina I se elevan paulatinamente en los perros infectados alrededor de 10 a 30 mg/ml a los 21 días post infección.

Electrocardiografía: hemos documentado cambios desde el primer día post infección en perros infectados experimentalmente con *T. cruzi*. Es importante mencionarlo, ya que generalmente los pacientes infectados son detectados hasta que cursan la fase crónica de la enfermedad. Una o más de las siguientes alteraciones electrocardiográficas se observaron a las 24 horas post-infección fueron: microvoltaje de la onda R, ondas S profundas, bloqueos de rama derecha y bloqueos de rama izquierda.

Los cambios electrocardiográficos ya descritos en la enfermedad de Chagas en perros son: taquicardia sinusal, microvoltaje de la onda R, ondas S profundas, alteraciones en el eje eléctrico medio con leveje y dextroeje, complejos ventriculares prematuros monofocales de probables orígenes en ventrículo izquierdo y derecho, ritmo bigémico. Con base a las alteraciones observadas los diagnósticos de los animales infectados pueden ser: bloqueo de rama derecha, bloqueos de rama izquierda, trastornos en la conducción interventricular y arritmia sinusal con aumento de distancia R-R, bloqueo aurículo-ventricular de primer grado, bloqueo sinusal o parada atrial. Otros investigadores reportan además alternancia de la onda R, anomalías en el segmento ST, bloqueos aurículo-ventriculares de segundo grado Mobitz tipo II así como bloqueos aurículo-ventriculares completos o de 3er grado.

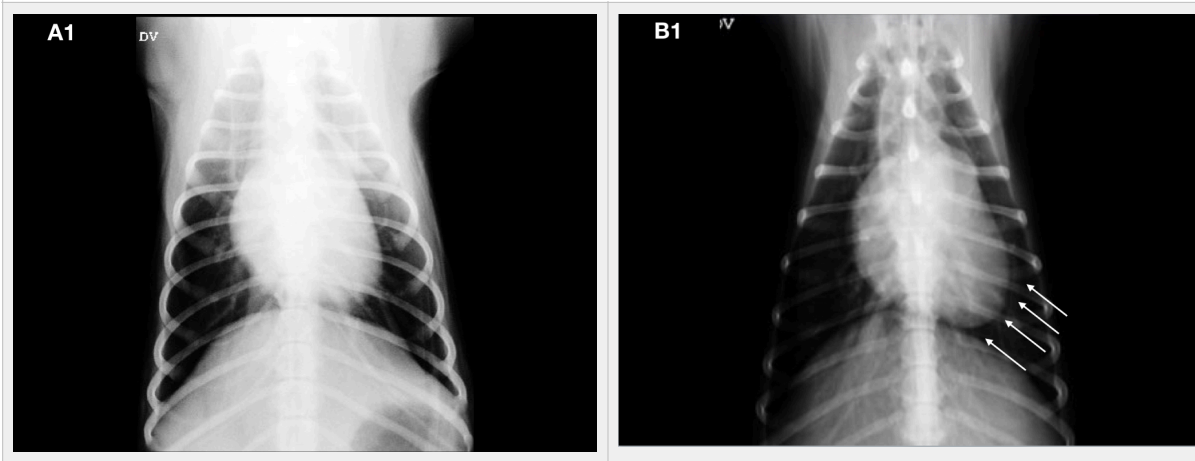




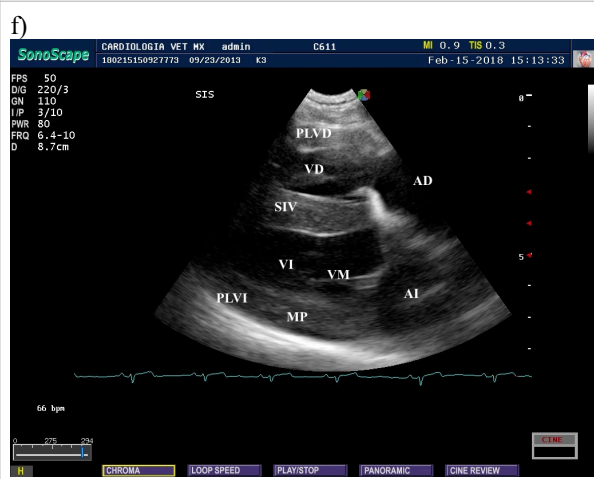
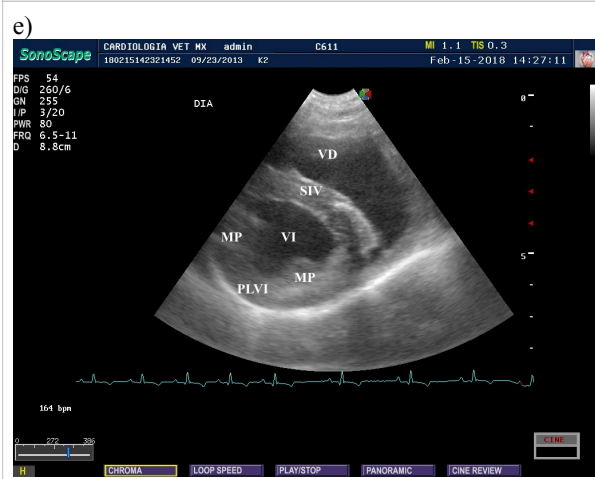
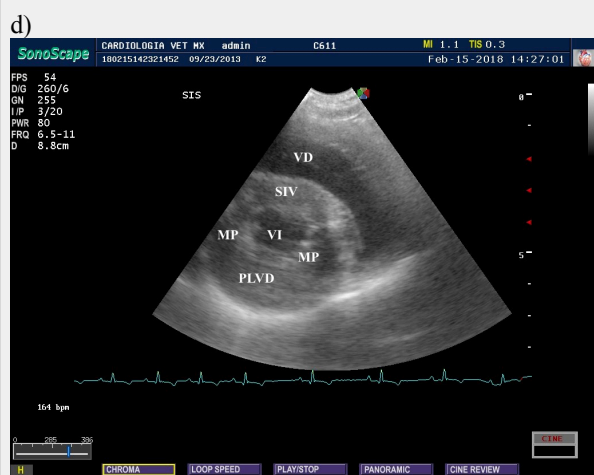
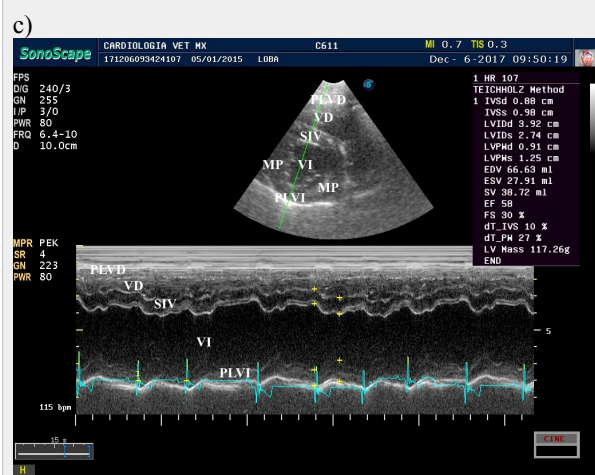
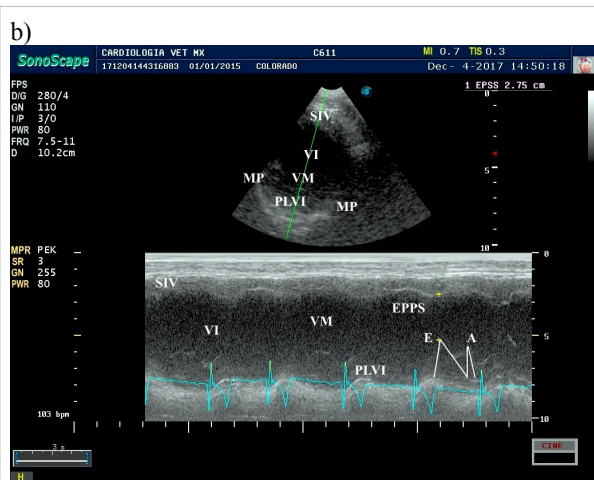
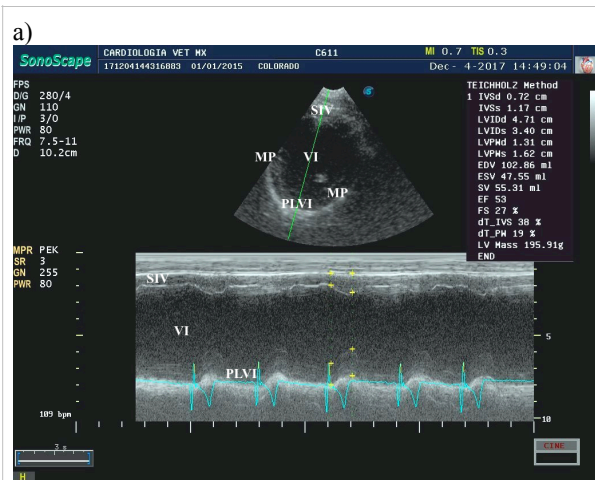
**Figura 6.-** Anormalidades electrocardiográficas encontradas en perros con infección natural por *Trypanosoma cruzi*. a) Microvoltaje del complejo QRS. b) Ritmo bigémimo y microvoltaje de la onda R (Flecha). c) Microvoltaje de la onda R (Flecha) y bloqueo sinusal. d) Microvoltaje de la onda R (Flecha) bloqueo aurículo ventricular de primer grado (P—R 0.14 ms)

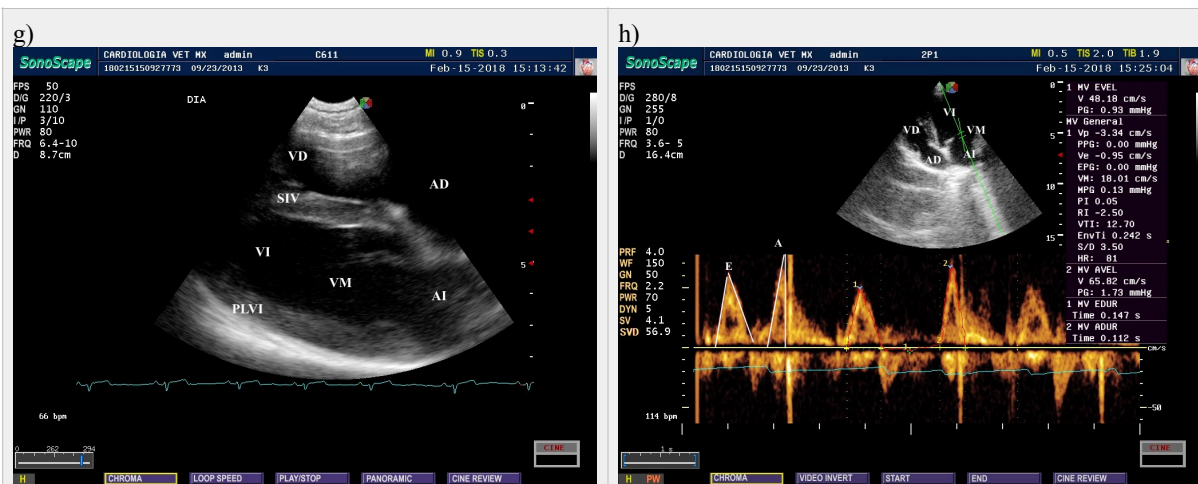
Radiografía de tórax: en perros con enfermedad de Chagas en su fase crónica, la radiografía puede revelar cardiomegalia o indicios de insuficiencia cardiaca congestiva con edema pulmonar o derrame pleural.

**Figura 7.-** Proyecciones dorsoventrales de perros infectados experimentalmente con *T. cruzi*. A1) Proyección radiográfica dorsoventral de un perro no infectado sin cambios radiográficos aparentes. B1) Proyección radiográfica dorsoventral de un perro infectado con aumento de la silueta cardiaca de las 3 a las 6 utilizando la analogía del reloj (Flechas ↑↑↑)



Ecocardiografía: Los ecocardiogramas de cachorros con miocarditis aguda generalmente están dentro de los límites normales. Las alteraciones ecocardiográficas en perros con enfermedad de Chagas en su fase crónica se han observado una o más de las siguientes alteraciones; miocarditis, dilatación ventricular derecha e izquierda, pérdida de la función ventricular izquierda, disminución de la fracción de eyección, disminución en la fracción de acortamiento, reducción en la pared libre de ventrículo izquierdo, aumento de la distancia de separación del punto E mitral al septo (EPPS), y aumento del peso estimado en gramos del ventrículo izquierdo. Por otro lado hemos detectado la presencia de la alteración de los flujos transmitrales y transtricúspideos con patrones de pseudorelajación así como la alteración en el doppler tisular a nivel de la pared lateral de anillo mitral y pared lateral de anillo tricúspideo.





**Figura 8.-** a) Proyección paraesternal derecha eje corto modo M de un perro con infección natural con cardiomiopatía chagásica en fase crónica mostrando: paredes delgadas de septo interventricular y pared libre de ventrículo izquierdo tanto en sístole como en diástole, aumento de la cavidad ventricular izquierda en sístole y diástole, fracción de acortamiento disminuida levemente, aumento del peso de ventrículo izquierdo. b) Mismo perro en proyección paraesternal derecha en eje corto modo M de válvula mitral observando un marcado incremento en el EPPS 2.75 cm (Rango normal <0.77mm). c) Proyección paraesternal derecha eje corto modo M de un perro con infección natural mostrando cardiomiopatía chagásica en fase crónica mostrando movimiento paradójico del septo interventricular asociado a una sobrecarga de presión de ventrículo derecho, aumento de la cavidad ventricular izquierda en sístole y diástole aumento del peso de ventrículo izquierdo. d) Proyección paraesternal derecha eje corto modo B de un perro con infección experimental con cardiomiopatía chagásica en fase crónica mostrando incremento en el grosor del septo interventricular, músculos papilares y pared libre de ventrículo izquierdo así como un aumento de la cavidad ventricular derecha al final de la sístole. e) Mismo perro misma proyección en modo B donde se mantienen los cambios descritos al final de la diástole. f) Proyección paraesternal derecha eje longitudinal de 4 cámaras modo B de un perro con infección experimental con cardiomiopatía chagásica en fase crónica mostrando incremento en el grosor del septo interventricular, músculos papilares y pared libre de ventrículo izquierdo así como un aumento de la cavidad ventricular derecha al final de la sístole. g) Mismo perro misma proyección en modo B cuatro cámaras donde se mantienen los cambios descritos al final de la diástole. h) Proyección paraesternal izquierda eje apical de 4 cámaras con Doppler espectral pulsado (PW) a nivel de válvula mitral mostrando un patrón de pseudorelajación asociado a disfunción diastólica en un perro con infección experimental en su fase crónica. PLVD= Pared libre de ventrículo derecho; VD= ventrículo derecho; SIV= Septo interventricular; VI= ventrículo izquierdo, MP= Músculo papilar; PLVI= Pared libre de ventrículo izquierdo; AD= Aurícula derecha; AI= Aurícula izquierda; VM= válvula mitral. EPPS= Separación del punto E del septo interventricular; E= onda E correspondiente a la apertura máxima de la válvula en diástole; A= onda A correspondiente a la contracción atrial.

## Fases de la enfermedad de Chagas

### Fase aguda en perros

Después de la infección los tripomastigotes entran en las células, principalmente infecta a macrófagos, donde evaden al sistema inmune y puede propagarse por todo el organismo, algunos parásitos que entren a la circulación pueden ser detectados por citología de manera casi inmediata a los tres días post infección. La parasitemia aumenta constantemente a medida que se dan más y más ciclos de multiplicación intracelular, aumentando así el número de tripomastigotes circulantes, el número de células infectadas y el daño a órganos blanco. La parasitemia pico ocurre aproximadamente entre los días 17-36 días post infección, alrededor del momento en que los signos clínicos de linfadenopatía generalizada y la miocarditis aguda aparecen. La causa de la miocarditis se cree es debido al daño celular y la inflamación resultante de la ruptura de cardiomiocitos por la salida de tripomastigotes. El letargo, la linfadenopatía generalizada, el tiempo de llenado capilar lento, las mucosas pálidas, en algunos casos esplenomegalia y hepatomegalia, son signos que se pueden presentar en cachorros. En perros mayores de seis meses, los signos clínicos suelen ser mucho menos severas y a veces no evidentes en todos.

Los hallazgos histopatológicos incluyen una severa miocarditis difusa, grandes números de pseudoquistes parasitarios y una mínima fibrosis. Aunque menos común que las manifestaciones cardiacas, los signos neurológicos atribuibles a meningoencefalitis secundaria a la invasión del parásito al sistema neurológico

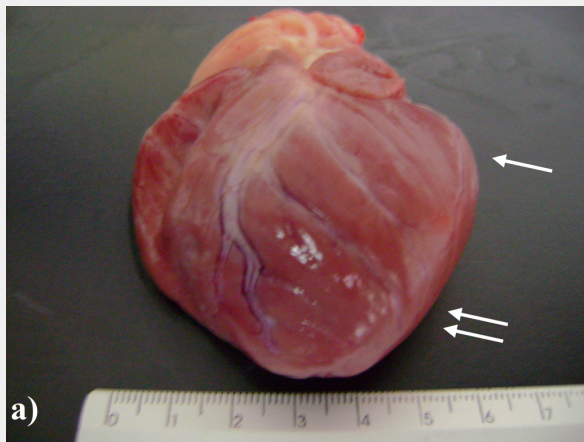
también puede ocurrir, e incluyen debilidad, ataxia, y reflejos espinales hiperreflexicos sugestivos de moquillo canino.

### Fase crónica en perros

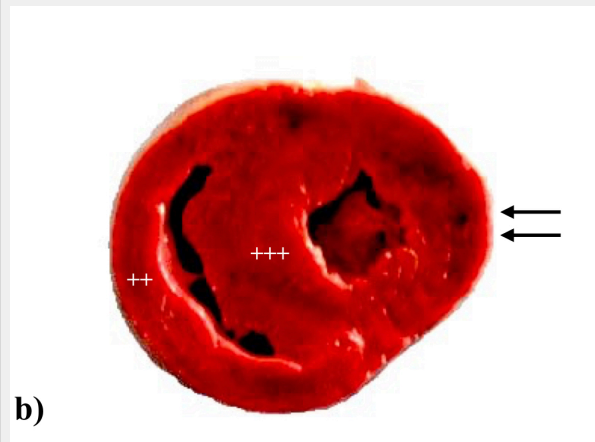
Aunque no todos los perros llegan a desarrollar la enfermedad crónica, algunos desarrollan miocarditis crónica con dilatación cardiaca. Las anomalías en el electrocardiograma se observa con mayor frecuencia y pueden ser muy variadas. Esto que esto pudiera deberse a la zona aleatoria donde *T. cruzi* se replica, en otras palabras, si el parásito *T. cruzi* afecta al nodo sinusal veremos alteraciones como bloqueos sinusales, bloqueo aurículo-ventriculares de primer grado, complejos atriales prematuros etc, si se afecta el nodo aurículo-ventricular podremos ver bloqueo aurículo-ventriculares de 2do y 3er grado, y si se ven afectadas las ramas del Haz de His observaremos los bloqueos que se observan de manera frecuente de rama izquierda o de rama derecha, así como complejos ventriculares prematuros, ritmo bigemino, etc.

En ecocardiografía se incluyen las dilataciones ventriculares derechas pero también hemos observado con frecuencia dilatación ventricular izquierda, fracción de acortamiento disminuida, fracción de eyección disminuida, EPPS aumentado, miocarditis (aumento de grosor de septo interventricular, engrosamiento de pared libre de ventrículo izquierdo, aumento en grosor de músculos papilares), en modo M movimiento paradójico del septo, en cuanto a modo color se refiere hemos podido observar un patrón de mosaico en arteria pulmonar, y evidenciar patrones de disfunción diástolica en flujos mitrales y tricúspideos.

**Figura 9.-** Cortes histológicos de miocardio de perros con infección crónica de *T. cruzi*



a) Miocardio de un perro con infección en su fase crónica infectado experimentalmente con *T. cruzi*. Mostrando dilatación de la aurícula izquierda (←) así como dilatación de ventrículo izquierdo (⇌), cambios sugerentes de cardiomiopatía dilatada chagásica



b) Corte histológico transverso de miocardio de un perro en fase crónica infectado experimentalmente con *T. cruzi*. (⇌) Señalado un aumento en el grosor de la pared libre de ventrículo izquierdo. (+++) Aumento en el grosor del septo-interventricular. (++) Adelgazamiento de la pared libre de ventrículo derecho

### Tratamiento

El nifurtimox y el benznidazol, son los únicos dos fármacos aprobados para el tratamiento (ver tabla 1) en la enfermedad de Chagas tanto en personas como para perros. Ambos agentes antiparasitarios son utilizados en la fase aguda, con tasas de curación de hasta el 80%, sin embargo existen reportes en los cuales los fármacos no producen una eliminación total de *T. cruzi* en el organismo.

<b>Tabla 1.- Antiparasitarios aprobados para el tratamiento de enfermedad de Chagas en perros</b>				
<b>Farmaco</b>	<b>Dosis (mg/kg)</b>	<b>Ruta</b>	<b>Intervalo (horas)</b>	<b>Duración (meses)</b>
<b>Benznidazol</b>	5-10	PO	24	2
<b>Nifurtimox</b>	2-7	PO	6	3-5
PO= Por oral				

### **Pronosticó**

Un porcentaje menor de los perros infectados con *T. Cruzi* puede morir en la etapa aguda de la enfermedad, por muerte súbita ocasionada por falla cardiaca. Si un animal infectado en esta etapa fuera diagnosticado y tratado contra la infección tendría buenas probabilidades de eliminarla, ya que los antiparasitarios autorizados tienen un mayor potencial de curación en fase aguda. Sin embargo, a los perros rara vez se les detecta la infección por *T. cruzi* en esta etapa debido a la inespecificidad del cuadro clínico. Por otro lado, la mayor parte de los perros infectados sobrevive a la infección aguda y pasa a una etapa crónica donde muchos de ellos desarrollan alteraciones cardiacas detectables por electrocardiografía, ecocardiografía y rayos X y se puede detectar la infección por pruebas, parasitológicas, serológicas o moleculares. Estos animales, con pronóstico reservado, pueden sobrevivir por varios años con una vida aparentemente normal, y permanecer como portadores o morir por muerte súbita en cualquier momento. El pronóstico para eliminar la infección de la enfermedad de Chagas en perros es pobre, debido a la reducida efectividad de los medicamentos utilizados durante la fase crónica de la infección, a la dificultad para acceder a los medicamentos en muchas partes de Latinoamérica y a la poca información que existe normalmente sobre esta enfermedad entre los dueños de los perros, que no entienden ni conocen los riesgos a los que están sujetos sus mascotas en las regiones endémicas de la enfermedad de Chagas. En los casos en que el perro es detectado con enfermedad de Chagas y debido a que es una enfermedad zoonótica, en muchas ocasiones se recomienda eutanasiar a la mascota para prevenir riesgos de infección a sus dueños.

### **Prevención**

La enfermedad de Chagas fue controlada y erradicada en muchas regiones de países del Cono Sur (Brasil, Argentina, Uruguay, Bolivia, Paraguay, Perú y Chile) a través del uso de insecticidas. Este ha sido un gran logro en la lucha contra la enfermedad. Pero siguen existiendo muchas regiones endémicas en América Latina donde no existen programas gubernamentales suficientemente fuertes para el control de los triatomíneos a través de insecticidas, ya que su implementación es costosa e implica un gran esfuerzo institucional. En estos casos, la educación a las comunidades acerca de la enfermedad, basadas en el conocimiento del vector y sus costumbres y la gestión del mejoramiento del entorno humano para el control epidemiológico de la enfermedad, adicionado al uso de insecticidas puede ser utilizada como una opción para contribuir a reducir el riesgo de transmisión de la infección a los humanos y sus mascotas. Adicionalmente y en el caso de los perros, se ha probado con cierto éxito el uso de collares impregnados con insecticida para reducir la frecuencia de transmisión.

### **Vacunación**

En la actualidad varios grupos de investigación incluidos el nuestro se han enfocado en el uso de antígenos de *T. cruzi* así como el uso de lisados de parásitos como *T. rangeli* para producir una protección contra la enfermedad. No se ha logrado producir una vacuna que proteja de manera eficaz e inocua. Pero se ha conseguido una protección parcial y se tiene la esperanza de que en algún momento algún grupo logrará producir una vacuna efectiva y eficaz.

## BIBLIOGRAFÍA Y LECTURAS RECOMENDADAS

- 1.- Aparicio-Burgos JE., Zepeda-Escobar JA., de Oca-Jimenez RM., Estrada-Franco JG., Barbabosa-Pliego A., Ochola-García L., *et al.* Immune Protection against *Trypanosoma cruzi* Induced by TcVac4 in a Canine Model. PLoS Negl Trop Dis 9(4). 2015
- 2.- Andrade Zilton A. "The Canine Model of Chagas' Disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Suppl. Vol. 79: 77-83, 1984
- 3.- Basso B, Castro I, Introini V, Gil P, Truyens C, Moretti E. Vaccination with *Trypanosoma rangeli* reduces the infectiousness of dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Vaccine 25: 3855-3858. 2007
- 4.- Barbabosa-Pliego., Diaz-Albiter H M., Ochoa-Garcia L., Aparicio-Burgos E., Lopez-Heydeck S M., Velasquez-Ordóñez V., Fajardo-Munoz RC., Diaz-Gonzalez S., De Oca Jimenez R M., Barbabosa-Mireles M., *Trypanosoma cruzi* Circulating in the Southern Region of the State of Mexico (Zumpahuacan) Are Pathogenic: A Dog Model. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene; 81(3):390. 2009
- 5.- Barr SC. Schmidt SP., Brown CC., *et al.* Chronic dilatative myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi* in two dogs. J Am Vet Med Assoc; 195:1237-41. 1989
- 6.- Barr SC., Holmes RA., Klei TR. Electrocardiographic and echocardiographic features of trypanosomiasis in dogs inoculated with North American *Trypanosoma cruzi* isolates. Am J Vet Res; 53:521-7. 1992
- 7.- Barr SC., Gossett KA., Klei TR. Clinical, clinicopathologic, and parasitologic observations of trypanosomiasis in dogs infected with North American *Trypanosoma cruzi* isolates. AM J Vet Res; 52:954-60. 1991
- 8.- Barr SC., van Beek O., Carlisle-Nowak MS., *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection in Walker hound from Virginia. Am J Rev Res. 56:1037-44. 1995
- 9.- Barr Stephen C., Saunders Ashley B., Sykes Jane E. Trypanosomiasis in Canine and Feline Infectious Diseases. Elsevier. 2014
- 10.- Carrada-Bravo Teodoro. *Trypanosoma cruzi*: Historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Rev Mex Patol Clin, Vol. 51, Núm. 4, pp 205-219. Octubre-Diciembre, 2004.
- 11.- De Lana Marta, Chiari Egler, Tafuri Washington L. "Experimental Chagas' Disease in Dogs" Mem. Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 87 (1): 59-71, jan/mar. 1992
- 12.- Guzmán Bracho C., García García Lourdes., Verdugo Floriani Jorge., Guerrero Martínez Sandra., Torres Cosme Mario., Ramírez Melgar Carmen., Velasco Castrejón Oscar. Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión de sangre en México. Rev Panam Salud/Pan Am J Public Health 4, (2). 1998.
- 13.- González-Vieyra SD., Ramírez-Durán N., Sandoval-Trujillo ÁH., Vázquez-Chagoyán JC., Monroy-Salazar HG., Barbabosa Pliego A. "*Trypanosoma cruzi* in dogs: electrocardiographic and echocardiographic evaluation, in Malinalco, State of Mexico. Dove Medical Press Ltd. 2011
- 14.- Kirchhoff Louis V. Epidemiology of American Trypanosomiasis (Chagas Disease). Advanced Parasitol, 2011.
- 15.- Kransdorf Evan P., Zakowski Philip C., Kobashigawa Jon A. Chagas disease in solid organ and transplantation. 2014
- 16.- Montenegro M Victor, Jiménez Mauricio, Pinto Dias JC, Zeldón Rodrigo. "Chagas Disease in Dogs from Endemic Areas of Costa Rica. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 97 (4): 491-494, June 2002
- 17.- Murcia Laura., Carrilero Bartolomé., Saura Daniel., Iborra Asunción., Segovia Manuel. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. Enferm Infecc Microbiol Clin. 31 (Supl 1): 26-34. 2013.
- 18.- OPS. Guía de Atención Clínica de la enfermedad de Chagas (Documento actualizado de versión convenio 256/09) 2010.
- 19.- OMS. Enfermedad de chagas (Tripanosomiasis americana). Nota descriptiva N 340. Marzo 2016
- 20.- Organización Panamericana de la Salud OPS/OMS. Guía para la atención clínica integral del paciente con enfermedad de Chagas. 2012.

- 21.- Quijano-Hernández Israel A., Castro-Barcena Alejandro., Vázquez-Ghagoyán Juan C., Bolio-González Manuel E., Ortega-López Jaime., Dumonteil Eric. Preventive and therapeutic DNA vaccination partially protect dogs against and infectious challenge with *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine*. 2013
- 22.- Rosas Fernando, Vanegas Diego I., Cabrales Mauricio F. Enfermedad de Chagas. Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. 2007.
- 23.- Souza, W.d. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 89-100. 2009.
- 24.- Santos Ana L. Fabiane M. Caldas Mazzeti Sergio. Goncalves Carolina R. Torres Lima Rosália M. Bahia Terezinha Maria. "Chagas Cardiomyopathy: The potential Effect of Benznidazole Treatment and Diastolic Dysfunction and Cardiac Damage in Dogs Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*" *Acta Tropica*. 2016
- 25.- Tarantola Arnaud., Abiteboul Dominique., and Rachiline Anne. Infection risk following accidental exposure to blood or body fluids in health care workers: A review of pathogens transmitted in published cases. 2005
- 26.- Zeldon, R. Epidemiology, modes of transmission and reservoir host of Chagas' disease. *Ciba. Symp.* 20:51-85. 1974

## 8.5 Serología

Se determino la IgG a los 120 días post infección con *T. cruzi* utilizando ELISA indirecta, usando un lisado de *T. cruzi* (crudo) para sensibilizar la placa. Se puede observar una densidad óptica, a 450nm son superiores al punto de corte (0.258), por lo tanto son considerados reactivos y caso de enfermedad de Chagas en todas las muestras obtenidas de los perros infectados experimentalmente (Figura 1).

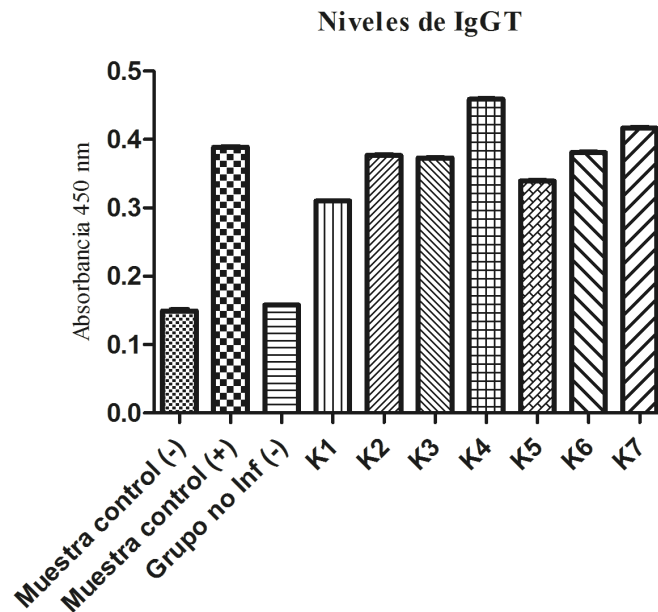


Figura.5 Niveles de IgGT en los grupos de perros estudiados a 120 dPi durante la infección crónica de *T. cruzi*

## 8.6 Evaluación de la parasitemia

### 8.7 Gota fresca.

Esta prueba se realizó a los 2, 6 y 12 meses post infección. La parasitemia no fue detectada en ningún perro, ni en la fase aguda ni en la crónica de la enfermedad.

### 8.8 Xenodiagnóstico.

Se utilizaron 6 ninfas de *Triatoma mazzottii* por perro a los días 35 post-infección, con un total de 42 insectos. Se observó mortalidad de estos insectos después de alimentarse con la sangre de los animales infectados. Con el análisis microscópico no se tuvo éxito en la detección de parásitos en las heces de los triatominos. Posteriormente se extrajo el tejido digestivo del vector, para realizar la extracción de ADN, y hacer estudios moleculares de PCR punto final y PCR anidado.

Con la técnica de PCR punto final no se pudieron detectar los parásitos en heces de triatomino. Sin embargo, cuando se realizó la PCR anidada en los animales infectados del experimento se amplificó el fragmento de 196 pb esperado, correspondiente a la región intergénica del miniexón del *T. cruzi*, confirmando la presencia de este parásito en sangre de los perros infectados durante la fase crónica de la infección.

## 8.9 Aspectos clínicos y alteraciones cardiovasculares

### 8.10 Electrocardiografía

Desde el primer día post-infección se registraron cambios electrocardiográficos en el grupo infectado (Figura 6).

Figura.6 Muestras electrocardiográficas representativas de los grupos: no infectados e infectados durante la fase aguda de la enfermedad.



DII, 50 mm/s, 1cm=1mV

Fig.6 Electrocardiograma de tres perros experimentales a un día post infección. a) Perro "C1" Grupo no infectado (-) electrocardiograma con Arritmia Sinusal Normal. b) Perro "K3" Grupo infectado (+) Microvoltaje de complejo QRS (Flecha ↓). c) Grupo infectado (+) Perro "K7" Arritmia sinusal con aumento de distancia R-R.

Figura.7 Muestras electrocardiográficas representativas de los grupos: no infectados e infectados durante la fase crónica de la enfermedad.



D)



E)



DI DII D III, 50 mm/s, 1cm=1mV

Fig.8 Electrocardiograma de cinco perros experimentales a 120 días post-infección. A) Perro "C2" Grupo no infectado, Ritmo sinusal normal; B) Perro "K2" Grupo Infectado, microvoltaje de complejos QRS de mayor amplitud en DI, DII, DIII correspondientes a bloqueo de rama derecha (Flecha ↓) y CVP's de ventrículo izquierdo (Flechas ↓↓); C) Perro "K4" Microvoltaje de complejos QRS de mayor amplitud en DI, DII, DIII correspondientes a un bloqueo de rama derecha (Flecha ↓); D) Perro "K3" Complejo QRS de mayor amplitud en DI, DII, DIII relacionado a bloqueo de rama derecha (Flecha ↓) y CVP monofocal del ventrículo derecho (Flechas ↓↓); E) Perro "K6" Microvoltaje de complejo QRS en DI II III, bigeminismo, con CVP's de ventrículo derecho monofocales (Flechas ↓↓) en DI, DII, DIII. CVP= Complejo ventricular prematuro

Dentro de las alteraciones electrocardiográficas encontradas en el grupo infectado fueron: taquicardia sinusal, microvoltaje de la onda R, ondas S profundas, alteraciones en el eje eléctrico medio con leve eje y dextroeje, complejos ventriculares prematuros monofocales de probable origen en ventrículo izquierdo y derecho, ritmo bigémimo. Con base a las alteraciones observadas los diagnósticos fueron: bloqueo de rama derecha, bloqueos de rama izquierda, trastornos en la conducción interventricular y arritmia sinusal con aumento de distancia R-R.

**Tabla 4.** Porcentaje (%) de anomalías encontradas en el electrocardiograma a través del tiempo, durante la fase aguda de los perros infectados experimentalmente con *Trypanosoma cruzi*

	Día 0	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
RSN	100%	100%	85.71%	100%	85.71%	85.71%
ASN			14.28%		14.28%	14.28%
BS				14.28%	28.57%	14.28%
CVP's						14.28%
BRD		85.71%	85.71%	85.71%	71.42	85.71%
BRI		14.28%	14.28%	14.28%	14.28%	14.28%
RVB						
MV		85.71%	85.71%	85.71%	85.71%	85.71%

RSN= Ritmo sinusal normal, ASN= Arritmia sinusal normal, BS= Bradicardia sinusal, CVP's= Complejos ventriculares prematuros, BRD= Bloqueo de rama derecha, BRI= Bloqueo de rama izquierda RVB= Ritmo ventricular bigeminado, MV= Microvoltaje

**Tabla 5.** Porcentaje (%) de anomalías encontradas en el electrocardiograma a través del tiempo, durante la fase crónica de los perros infectados experimentalmente con *Trypanosoma cruzi*

	Día 30	Día 120	Día 210	Día 300	Día 365
RSN	28.57%	42.85%	57.14%	57.14%	28.57%
ASN	71.4%	57.14%	42.85%	42.85%	71.42%
BS			14.28%	28.57%	28.57%
CVP's		42.85%			
BRD	28.57%	42.85%	42.85%	57.14%	42.85%
BRI	14.28%	14.28%	28.57%	14.28%	14.28%
RVB		14.28%			
MV	57.14%	85.71%	85.71%	85.71%	85.71%

RSN= Ritmo sinusal normal, ASN= Arritmia sinusal normal, BS= Bradicardia sinusal, CVP's= Complejos ventriculares prematuros, BRD= Bloqueo de rama derecha, BRI= Bloqueo de rama izquierda RVB= Ritmo ventricular bigeminado, MV= Microvoltaje

Cambios electrocardiográficos durante la fase aguda y fase crónica en perros infectados experimentalmente con *T. cruzi*

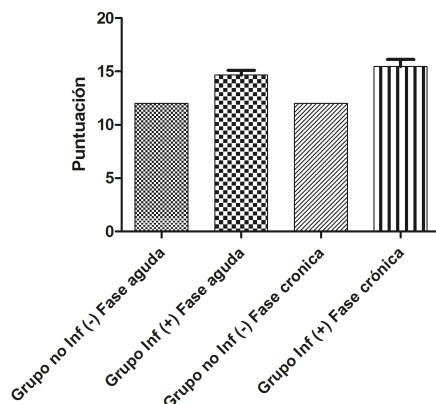


Figura. 9 Cambios electrocardiográficos observados durante la fase aguda y fase crónica de la infección por *T. cruzi*

### 8.11 Radiografía de tórax

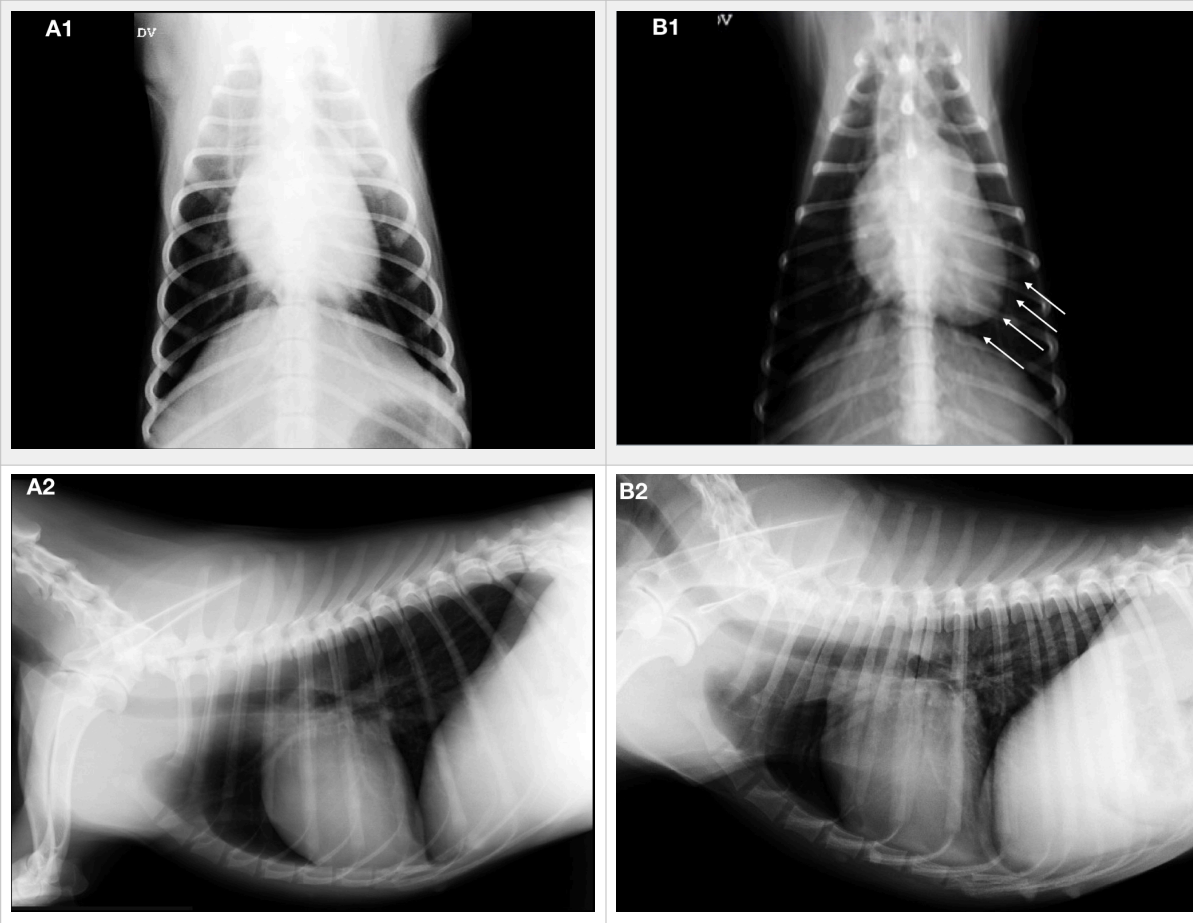
Dentro de las anomalías radiográficas encontradas se pudo observar que en la proyección radiográfica lateral izquierda lateral derecha usando el método “Vertebral Heart Scale (VHS), no se encontraron anomalías en ningún perro infectado ni en el grupo control. Sin embargo en la radiografía dorsoventral haciendo uso de la analogía de la carátula del reloj se encontró un aumento en la posición “de las 3 a las 6” correspondientes a un aumento del ventrículo izquierdo en todos los animales infectados a los 365 días post-infección. No se encontraron anomalías en el grupo negativo (-).

Figura. 10 Alteraciones radiográficas encontradas en los diferentes grupos experimentales durante la fase crónica de la infección

Grupos	Anormalidades radiográficas a 365 días post infección	Escala VHS	Analogía del reloj Proyección DV	Escala DV
Grupo control negativo (-)	0/7 (0%)	7/7 10.5 CIV	Normal	1
Grupo infectado (+)	7/7 (100%)	7/7 10.5 CIV	7/7 ↑ 3-6 (VI)	3

VHS= vertebral heart scale; CIV = cuerpos intervertebrales; ↑ VI = aumento de ventrículo izquierdo utilizando la analogía del reloj; DV=dorsoventral

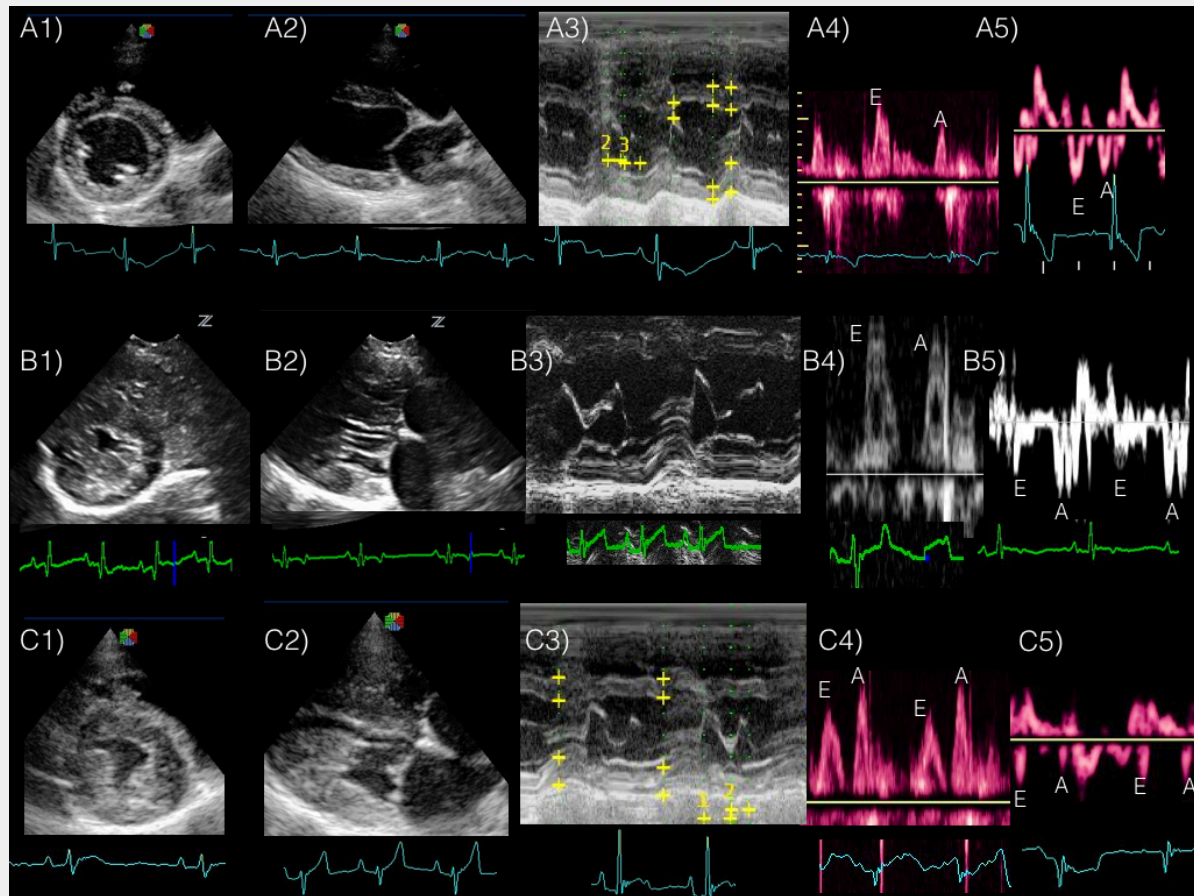
Figura. 11. Muestras representativas de radiografías de tórax de perros experimentales. A1) Proyección radiográfica dorsoventral Perro "C2" del grupo no Infectado (-), A2) Proyección radiográfica lateral izquierda lateral derecha normal Perro "C2" del grupo no Infectado (-), B1) Proyección radiográfica dorsoventral Perro infectado "K5" aumento de la silueta cardíaca de las 3 a las 6 utilizando la analogía del reloj (Flechas ↑↑↑↑), B2) Proyección radiográfica lateral izquierda lateral derecha normal Perro infectado "K3".



### 8.12 Ecocardiografía fase aguda y fase crónica de enfermedad de Chagas

Dentro de las anomalías encontradas en el estudio de ecocardiografía en modo B y modo M fueron: aumento en el diámetro del septo interventricular en diástole, aumentos en el diámetro de las cavidades de ventrículo izquierdo en diástole y sístole, aumento de la pared libre de ventrículo izquierdo en diástole y sístole, se observó movimiento paradójico del septo, hipoquinesia del septo interventricular, fracción de acortamiento disminuida, únicamente se observó en un perro un patrón alterado de flujo empleando la técnica Doppler Espectral en flujo transmitral en una vista apical de 4 cámaras; patrón de relajación anormal, y se pudo evidenciar la presencia de alteración en el patrón de relajación de ventrículo izquierdo empleando la técnica de Doppler Tisular pulsado a la altura del anillo valvular mitral en una vista apical de cuatro cámaras. Con Doppler color no se encontró evidencia de flujo turbulento en ningún perro.

**Figura. 12** Muestras ecocardiográficas representativas de animales no infectados e infectados durante la fase aguda y fase crónica de la enfermedad.

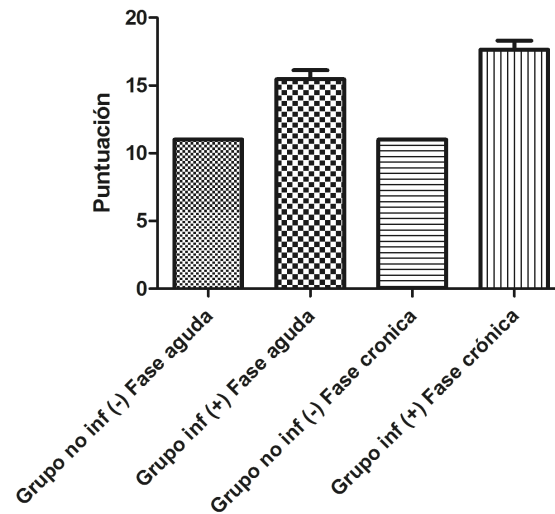


A1) Ventana paraesternal derecha eje corto de ventrículo izquierdo normal perro del grupo no Infectado (-); A2) Ventana paraesternal derecha eje largo de cuatro cámaras de ventrículo izquierdo normal perro del grupo no Infectado (-); A3) Ventana paraesternal derecha Modo M de ventrículo izquierdo normal perro del grupo no Infectado (-); A4) Ventana paraesternal izquierda Doppler espectral pulsado de flujo transmitral eje apical de cuatro cámaras normal perro del grupo no Infectado (-); A5) Ventana paraesternal izquierda eje apical de cuatro cámaras Doppler Tisular pulsador nivel de anillo valvular mitral normal perro del grupo no Infectado (-)

Cambios observados durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas 30 días post-infección B1) Ventana paraesternal derecha eje corto de ventrículo izquierdo hiperecogenicidad del endocardio del septo interventricular y ventrículo izquierdo, la superficie endocárdica es irregular; B2) hiperecogenicidad del endocardio del septo interventricular y ventrículo izquierdo, hiperecogenicidad de las cuerdas tendinosas; B3) Ventana paraesternal derecha Modo M de ventrículo izquierdo normal; B4) Ventana paraesternal izquierda Doppler espectral pulsado de flujo transmitral eje apical de cuatro cámaras normal; B5) Ventana paraesternal izquierda eje apical de cuatro cámaras Doppler Tisular pulsador nivel de anillo valvular mitral mostrando patrón de relajación pseudonormal A>E 2:1

Cambios observados durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas 300 días post-infección C1) Ventana paraesternal derecha eje corto de ventrículo izquierdo hiperecogenicidad del endocardio del septo interventricular y ventrículo izquierdo; C2) hiperecogenicidad del endocardio del septo interventricular y ventrículo izquierdo, hiperecogenicidad de las cuerdas tendinosas y músculos papilares; C3) Ventana paraesternal derecha Modo M de ventrículo izquierdo adelgazamiento de septo interventricular y pared libre de ventrículo izquierdo, fracción de acortamiento disminuida; C4) Ventana paraesternal izquierda Doppler espectral pulsado de flujo transmitral eje apical de cuatro cámaras mostrando patrón de flujo pseudonormal; C5) Ventana paraesternal izquierda eje apical de cuatro cámaras Doppler Tisular pulsado nivel de anillo valvular mitral normal

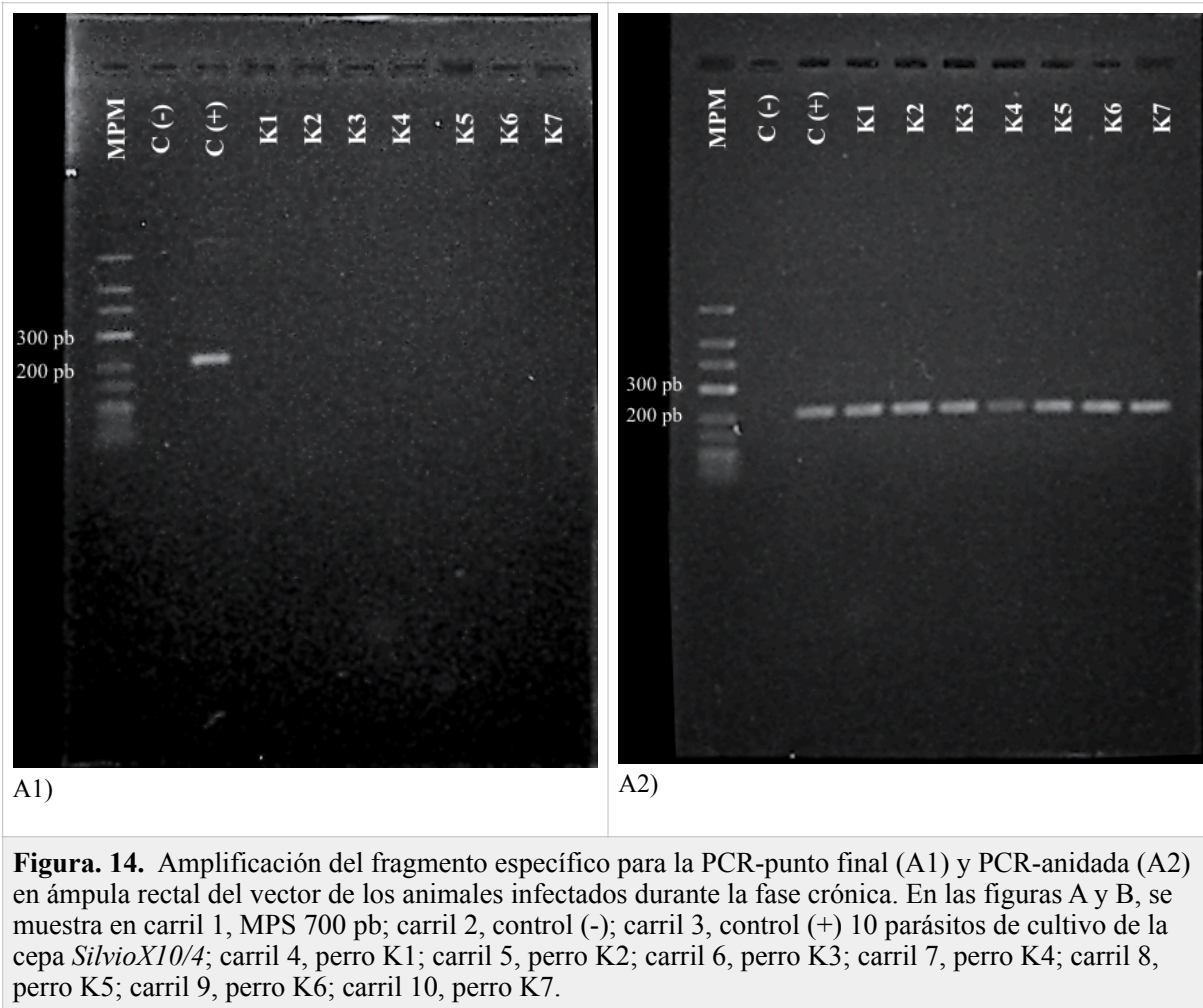
Cambios ecocardiográficos observados durante la fase aguda y fase crónica en perros infectados experimentalmente con *T. cruzi*



**Figura. 13** Cambios ecocardiográficos observados durante la fase aguda y fase crónica de la infección por *T. cruzi*

### 8.13 Carga parasitaria

Se determinó la carga parasitaria durante la fase crónica de la infección en sangre heparinizada, de los perros infectados, donde se pudo observar nuevamente que para la PCR-punto final ninguno animal fue positivo. Sin embargo en la PCR-anidada todos los animales del experimento fueron positivos, amplificando el fragmento interno de la secuencia del mini-exón de *T. cruzi*, confirmando la presencia de este parásito durante la fase crónica de la infección.



**Figura. 14.** Amplificación del fragmento específico para la PCR-punto final (A1) y PCR-anidada (A2) en ampulla rectal del vector de los animales infectados durante la fase crónica. En las figuras A y B, se muestra en carril 1, MPS 700 pb; carril 2, control (-); carril 3, control (+) 10 parásitos de cultivo de la cepa *SilvioX10/4*; carril 4, perro K1; carril 5, perro K2; carril 6, perro K3; carril 7, perro K4; carril 8, perro K5; carril 9, perro K6; carril 10, perro K7.

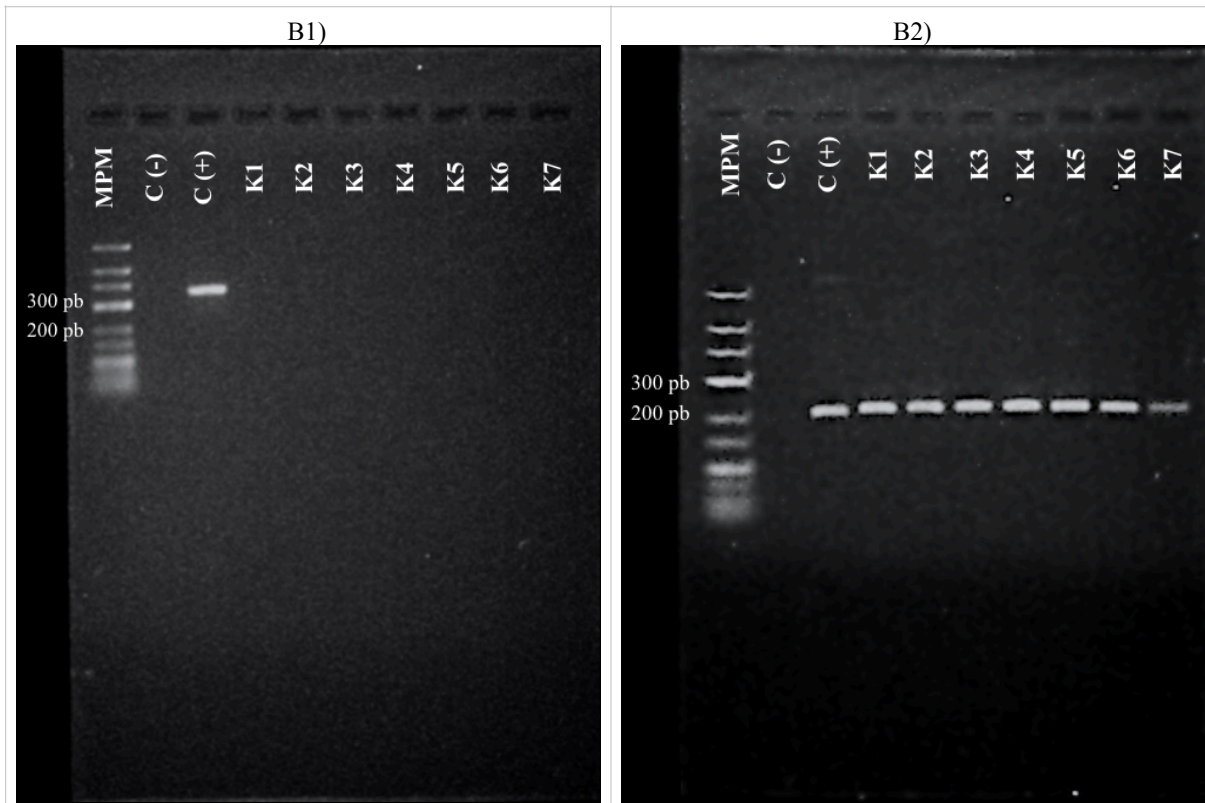


Figura. 15 Amplificación del fragmento específico para PCR-punto final B1) y PCR-anidado B2) en sangre de los animales infectados durante la fase crónica. En las figuras A1)-B1) se muestra en carril 1, MPS 700pb; carril 2, control (-), carril 3, control (+) 10 parásitos de cultivo de la cepa *SilvioX10/4*; carril 4, perro K1; carril 5, perro K2; carril 6, perro K3; carril 7, perro K4; carril 8, perro K5; carril 9, perro K6, carril 10, perro K7

## 9. Discusión

El diagnóstico de enfermedad de Chagas requiere de una combinación de exámenes clínicos, pruebas parasitológicas, serológicas y pruebas de gabinete para darle un tratamiento y un pronóstico adecuado al paciente. Adicionalmente se siguen desarrollando otro tipo de pruebas no convencionales como las moleculares para confirmar el diagnóstico y evaluar si el tratamiento funciona de manera adecuada o no. En el presente estudio, se utilizaron todas estas pruebas para conformar un diagnóstico adecuado de la enfermedad de Chagas inducida experimentalmente y se estudiaron nuevas aproximaciones de diagnóstico y pronóstico con pruebas de gabinete a partir del primer día post infección y hasta un año posterior a la enfermedad cuando se considera que ésta ha entrado en una etapa crónica.

En el experimento se utilizaron 14 perros, de los cuales 7 fueron inoculados con *T. cruzi* y los 7 restantes permanecieron como control negativo de la enfermedad. Como se esperaba la prueba serológica de ELISA el 100% de los animales infectados mostraron un resultado positivo tanto en la fase aguda como en la crónica, en tanto que el 100% de los animales no infectados dieron una respuesta negativa. En los estudios de parasitemia por microscopía (gota fresca de sangre), ni

durante la fase aguda ni durante la fase crónica de la enfermedad se observaron parásitos. Este resultado no se esperaba, ya que en experimentos anteriores, utilizando la misma cepa infectante en perros, produjo parasitemias relativamente altas (Aparicio *et al.*, 2011) No sabemos porque, las parasitemias se mantuvieron a niveles indetectables pero posiblemente se deba a cambios en la patogenicidad de la cepa derivados de haber sido mantenidos en cultivo celular por mucho tiempo. Por otro lado, microscópicamente tampoco se observaron parásitos en las heces de chinches alimentadas con sangre de perros infectados, a los 60 días post alimentación. Coincidentemente con lo visto en los estudios de parasitemia de gota fresca, donde los niveles de parásitos eran relativamente bajos, el diagnóstico de PCR punto final no detectó a ninguna chinche infectada. Pero todas las chinches alimentadas a partir de perros infectados fueron diagnosticadas como positivas a *T. cruzi* cuando se realizó PCR anidado. Como se esperaba las chinches alimentadas de perros no infectados resultaron negativas a las dos pruebas de PCR.

### Electrocardiografía

En perros al igual que en humanos existen dos fases de la enfermedad bien diferenciadas, fase aguda y fase crónica. En 1992 durante un experimento llevado a cabo por Lana *et al.*, infectando a perros con las cepas Berenice-62 y Berenice -78 encontraron anomalías en el 80% de los perros infectados durante la fase aguda encontrando disminución de voltaje en complejo QRS, disturbios en la repolarización, desviación del eje eléctrico, ritmo supraventricular indeterminado y bloqueo aurículo-ventricular de 1er grado, bloqueo completo de rama derecha y hemibloqueo anterior de rama izquierda, refieren un periodo a normalizar el electrocardiograma aproximadamente a los 3 meses post infección, durante la fase crónica el 100% de los perros infectados manifiestan alteraciones cardíacas y sumando a las alteraciones encontradas en la fase aguda se observó arritmia sinusal, extrasístoles ventriculares mono y multifocales. Los cambios electrocardiográficos reportados por Andrade 1984 durante la fase aguda en perros infectados experimentalmente se observaron del día 15 al día 30 post inoculación estos incluyeron alteraciones y cambios en la onda T, segmento ST, disfunción del nodo sinusal, se observó bradicardia al día 18 post inoculación. En un estudio realizado en el 2002 por Montenegro *et al.*, 2002 reportan bloqueos de rama derecha, complejos QRS de bajo voltaje, taquicardia sinusal, alteraciones en la repolarización y alteraciones en la onda T, probablemente los perros de este experimento se encontraban en la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

Un hallazgo importante es que observamos en los estudios electrocardiográficos es que las alteraciones las observamos a las 24 horas de la infección, signología que no había sido reportada con anterioridad. Desde el primer día post inoculación electrocardiográficamente observamos microvoltaje del complejo QRS, bloqueo de rama derecha, parada o bloqueo sinusal. Y durante la fase crónica de la enfermedad observamos que los cambios electrocardiográficos se asemejan mucho a los cambios previamente reportados para perros. Otro hallazgo que no ha sido reportado con anterioridad es la presencia de un ritmo bigeminado el cual precede a la aparición de una taquicardia ventricular que esta asociada a muerte súbita. Inesperadamente contrario a lo reportado por otros autores, no encontramos una fase de normalización en el electrocardiograma, sino una adición de alteraciones a las encontradas durante la fase aguda. Estos cambios electrocardiográficos pueden estar relacionados a una lesión del sistema especializado de conducción que se traduce en arritmias y trastornos eléctricos. Fisiopatológicamente, la respuesta

inflamatoria, las lesiones celulares y la fibrosis juegan un papel fundamental en la génesis de las alteraciones electrocardiográficas. Finalmente cuando la fibrosis se instala de manera lenta y progresiva va afectando al sistema especializado de conducción y al miocardio común, produciendo áreas de inactividad eléctrica. La asociación de arritmias ventriculares y bradiarritmias es muy frecuente como producto de la gran inestabilidad eléctrica del miocardio ventricular y la lesión de los nódulos (sinusal y atrioventricular), el Haz de his y las fibras de purkinje. Un aspecto de la cardiomiopatía chagásica que ha sido estudiada en humanos pero no en perros por electrocardiografía es el impacto del reemplazo del tejido miocárdico necrosado por áreas confluyentes de fibrosis densa que constituyen la base de las anormalidades segmentarias de la motilidad (Consenso Chagas-Mazza 2002). Este tipo de estudios requieren un electrocardiograma de doce derivadas que normalmente no se realizan en perros, pero que podrían llegar a observarse mediante ecocardiografía tipo Strain, lo cual sería interesante abordar como parte del diagnóstico y del pronóstico de la cardiomiopatía chagásica en perros en estudios subsecuentes.

#### Radiografía

Con el estudio radiográfico de tórax es posible detectar diferentes grados de cardiomegalia o crecimiento de una o algunas cámaras cardíacas, Montenegro *et al.* (2002) analizaron a 54 perros de áreas endémicas de la enfermedad de Chagas en Costa Rica, de los cuales 14 tuvieron una serología positiva a ELISA. Estos fueron examinados a través de un estudio radiográfico de tórax y encontraron cambios que engloban; cardiomegalia generalizada (1 perro), aumento del lado derecho del corazón (3 perros), agrandamiento del ventrículo izquierdo (3 perros), aumento de tamaño de aurícula derecha (4 perros) y un patrón bronquial en 3 perros. Barr *et al.* (2014) en el capítulo 78 de Trypanosomiasis en “Canine and Feline Infectious Diseases”, menciona, que en los estudios radiográficos de tórax se puede encontrar una cardiomegalia o evidencia de falla cardíaca congestiva con edema pulmonar o efusión pleural. En nuestro experimento los siete perros infectados, con enfermedad de Chagas confirmada por serología, xenodiagnóstico, por pruebas moleculares, mostraron cambios radiográficos empleando la analogía del reloj en la proyección dorsoventral de tórax donde hubo un aumento de la silueta cardíaca en la región de la carátula de las “3 a las 6”, lo que corresponde a un agrandamiento del ventrículo izquierdo. La proyección radiográfica lateral izquierda lateral derecha utilizando el método VHS (Vertebral Heart Score) no se apreciaron cambios radiográficos aparentes. Todos estos hallazgos eran esperados ya que fueron reportados con anticipación por Montenegro *et al.* (2002).

#### Ecocardiografía

La ecocardiografía es una de las exploraciones diagnósticas más útiles para la evaluación de la evolución de los trastornos cardíacos de pacientes con enfermedad de Chagas. La evaluación de la función ventricular es uno de los puntos clave del método, y aporta datos relevantes para orientar el tratamiento y el pronóstico. La miocarditis crónica, que también puede ser detectada por doppler espectral por ecocardiografía, puede causar un deterioro de la relajación ventricular y el llenado diastólico (Barbosa & Nunes 2012). Migliore *et al.* (2004) reportó alteraciones de la función diastólica durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas. De manera similar, en el presente estudio encontramos alteraciones en la función diastólica en perros, observando un

patrón de pseudorelajación del flujo transmitral con doppler espectral en la fase crónica de la enfermedad, lo cual ya había sido reportado con anterioridad en esta especie (Pascon *et al.*, 2010). De acuerdo con Acquatella *et al.* (2004) la alteración de disfunción diastólica observable con doppler tisular precede a la disfunción diastólica observada con doppler espectral en enfermedades cardíacas en humanos. Nosotros realizamos la técnica de doppler tisular en las fases aguda y crónica de la enfermedad y encontramos un patrón de pseudorelajación de la pared libre de ventrículo izquierdo que no había sido observado en pacientes, ni humanos, ni perros, infectados con *T. cruzi*. Es importante hacer notar que este es también un indicador temprano de la disfunción diastólica provocada por la infección, que a su vez es un indicador de la evolución y el pronóstico de la enfermedad, y debe ser considerado en la toma correcta de decisiones para el tratamiento de pacientes. Es interesante resaltar que la disfunción diastólica se presenta ya desde el día 15 post infección en los perros infectados experimentalmente, lo cual indica que el parásito esta afectando al tejido cardíaco desde momentos muy tempranos de la infección. Nosotros no hicimos doppler tisular antes de los 15 días post infección, pero es probable que esta anomalía ecocardiográfica se desarrolle aún más temprano, lo cual deberá ser estudiado en un futuro.

Las alteraciones ecocardiográficas modo M encontradas en pacientes humanos con serología positiva muestran alteraciones cualitativas con disminución del grosor de pared posterior del ventrículo izquierdo y de la excursión sistólica del septo interventricular y alteraciones cualitativas con hipoquinesia del septum interventricular (Acuatella *et al.*, 2013). En perros no se han reportado alteraciones ecocardiográficas en modo M en la fase aguda de la enfermedad, en nuestra investigación observamos alteraciones cualitativas durante esta fase que incluyeron aumentos en el grosor del septo interventricular, movimiento paradójico del septo y presencia del “punto o bache b”. En cardiomiopatía chagásica crónica se ha observado disminución en el grosor de la pared del septo interventricular, aumento en la distancia del punto E al septo interventricular (EPPS), movimiento paradójico de septo interventricular (Barr, Díaz González, Aparecido-Camacho). En nuestro estudio encontramos que aún en fase crónica la cardiomiopatía más frecuente de ventrículo izquierdo fue la hipertrofia de septo interventricular, músculos papilares y pared libre de ventrículo izquierdo, en contraste con lo reportado por (Barr *et al.*, 2014, Díaz González *et al.*, 2009, Pascon *et al.*, 2010). Esta diferencia pudiera deberse a que los perros estudiados por los autores antes mencionados, eran animales infectados de manera natural y mantenidos en diversas condiciones, lo cual podría sugerir que las diferencias se deben a variables en la patogenicidad de las cepas de *T. cruzi* que infectaron a los animales estudiados y probablemente a las condiciones ambientales y de cuidado y mantenimiento de estos.

### **Probable impacto médico de este estudio en la sociedad**

Los únicos fármacos autorizados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas hasta la fecha continúan siendo nifurtimox y benznidazol. Un común denominador de estos fármacos es que no son tan eficientes en la fase crónica de la enfermedad, como lo son durante la fase aguda. (Solomon, 2012, Jackson *et al.*, 2010). Desafortunadamente tanto en humanos como en animales, la confirmación de la sospecha de infección en pacientes agredidos por chinche besucona se da hasta que aparecen, el chagoma, el signo de Romaña ó los signos clínicos inespecíficos de la

enfermedad como: fiebre, linfadenopatía generalizada, mucosas pálidas, debilidad, etc. Pero estos signos no ocurren hasta que la infección se ha diseminado en el paciente. Y en este momento, el tratamiento con los medicamentos mencionados pudieran no ser tan efectivo como si el tratamiento se instaurara durante los primeros días de la infección. El inicio temprano del tratamiento hipotéticamente podría impedir que el parásito tuviera tiempo de diseminarse en el organismo y que se desarrollara la enfermedad de Chagas, incluso se podrían dar tratamientos más cortos con una reducción de los efectos secundarios que producen estos medicamentos (como ocurre con los tratamientos que se dan a las personas infectadas por accidente de laboratorio), y con la posibilidad de que un mayor número de pacientes lo concluyan. Con los hallazgos del presente estudio sabemos que, por lo menos experimentalmente, con electrocardiografía y probablemente por ecocardiografía, se pueden realizar diagnósticos presuntivos tempranos de la infección en pacientes con un alto riesgo de haber sido infectados por el parásito, e instaurar el tratamiento de manera más oportuna de lo que hasta hoy se hace por prescripción médica. Esta estrategia podría contribuir a reducir los costos por tratamiento, el número de personas que desarrollan la enfermedad, indirectamente también se podría reducir la tasa de incidencia de infección, dado que reduciendo el número de pacientes (humanos y perros) portadores del parásito se reduce la transmisión vectorial (Gurtler *et al.*, 1996, 1998, 2007). Desde luego esta hipótesis deberá ser comprobada experimentalmente en animales y luego realizar estudios clínicos en humanos diseñados para la detección temprana de los signos electrocardiográficos y ecocardiográficos de la enfermedad de Chagas.

## **10. Conclusión**

El uso de estudios de gabinete cardiológicos permite realizar diagnósticos presuntivos de la fase aguda temprana de la enfermedad de Chagas experimental en perros. Nuevos estudios experimentales en animales, y clínicos en humanos, deberán realizarse para confirmar que estos estudios son útiles para hacer diagnósticos presuntivos tempranos que permitan dar tratamientos oportunos a los pacientes sospechosos de infección por *T. cruzi* y dar tratamientos adecuados en la fase temprana de la infección.

## 10. Bibliografía

- Acquatella Harry., Gómez Mancebo José R., Cataliotti Franco., Puigbó Juan J. Imaging Techniques in the Diagnosis and Prognosis of the Chagas Disease Emphasis in Doppler Echocardiography. *Revista Argentina de Cardiología*. 81:184-195. 2013
- Acquatella H, Piras R. Chagas disease. *CurrOpCardiol*; 8:463-472. 1993.
- Aparicio-Burgos JE., Zepeda-Escobar JA., de Oca-Jimenez RM., Estrada-Franco JG., Barbabosa-PLiego A., Ochola-García L., *et al.* Immune Protection against *Trypanosoma cruzi* Induced by TcVac4 in a Canine Model. *PLoS Negl Trop Dis* 9(4). 2015.
- Andrade ZA., Andrade SG., Correa R., *et al.* Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection: ultrastructural evidence of immune damage and role of microangiopathy. *Am J Pathol*. 144:1403-11 1994.
- Andrade ZA., Andrade SG., Sadigurky M., *et al.* The indeterminate phase of Chagas disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. *Am J Trop Med Hyg*. 57:328-36. 1997.
- Basso B, Castro I, Introini V, Gil P, Truyens C, Moretti E. Vaccination with *Trypanosoma rangeli* reduces the infectiousness of dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine* 25: 3855-3858. 2007
- Barbabosa-Pliego., Diaz-Albiter H M., Ochoa-Garcia L., Aparicio-Burgos E., Lopez-Heydeck S M., Velasquez-Ordóñez V., Fajardo-Munoz RC., Diaz-Gonzalez S., De Oca Jimenez R M., Barbosa-Mireles M., *Trypanosoma cruzi* Circulating in the Southern Region of the State of Mexico (Zumpahuacan) Are Pathogenic: A Dog Model. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 81(3):390. 2009.
- Barbu Corentin., Dumonteil Eric., Gourbière Sébastien. Optimization of Control Strategies for Non-Domesticated *Triatoma dimidiata*, Chagas Disease Vector in Yucatán Peninsula, Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* 3(4):e416. 2009.
- Barbosa Marcia M, Nunes Maria Carmo P. “Estratificación del riesgo de la enfermedad de Chagas” *Red Esp Cardiol*. 65 (supl 2):17-21. 2012.
- Bhatia, V., Sinha, M., Luxon, B., & Garg, N. Utility of the *Trypanosoma cruzi* sequence database for identification of potential vaccine candidates by *In Silico* and *In Vitro* screening. *Infection and Immunity*. 2004.
- Barr Stephen C., Saunders Ashley B., Sykes Jane E. *Trypanosomiasis in Canine and Feline Infectious Diseases*. Elsevier. 2014
- Barr SC., Gossett KA., Klei TR. Clinical, clinicopathologic, and parasitologic observations of trypanosomiasis in dogs infected with North American *Trypanosoma cruzi* isolates. *AM J Vet Res*; 52:954-60. 1991.
- Barr SC., Holmes RA., Klei TR. Electrocardiographic and echocardiographic features of trypanosomiasis in dogs inoculated with North American *Trypanosoma cruzi* isolates. *Am J Vet Res*; 53:521-7. 1992.
- Barr SC. Schmidt SP., Brown CC., *et al.* Chronic dilatative myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi* in two dogs. *J Am Vet Med Assoc*; 195:1237-41. 1989.
- Barr SC., van Beek O., Carlisle-Nowak MS., *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection in Walker hound from Virginia. *Am J Rev Res*. 56:1037-44. 1995.
- Barr SC., Dennis VA., Klei TR., *et al.* Antibody and lymphoblastogenic responses of dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* isolates from North American mammals. *Vet Immunol Immunopathol*. 29:267. 1991.
- Bernardes Gustavo F., Oliveira. F., Avezum Álvaro., Mattos Cordeiro José. Perspectives in Chagas Disease Treatment. *Global Heart*. Vol 10. N. 3, 189-192. 2015.
- Brener Z. & Chiari E. Susceptibility of different strains of *Trypanosoma cruzi* to various chemotherapeutic agents. *Med. Trop. Sao Paulo*, 9, 197-207. 1967.
- Boon, June A, MS. *Ecocardiografía Veterinaria*. Multimédisica Ediciones Veterinarias. 2da Ed. 2011.

- Carrada-Bravo Teodoro. *Trypanosoma cruzi*: Historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Rev Mex Patol Clin, Vol. 51, Núm. 4, pp 205-219. Octubre-Diciembre, 2004.
- Consenso enfermedad de Chagas-Mazza. Revista Argentina de Cardiología, vol 70, suplemento 1. 2002.
- Díaz-González Sandra., Ramírez D. Ninfa., Sandoval T. Ángel H., Vázquez-Chagoyan Juan C., Monroy S. Humberto G., Barbabosa P. Alberto. Chagas diagnostic in dog from Mexico. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2009.
- Dumonteil. E. Update on Chagas' Disease in Mexico. Salud Publica Mex. 41:322-327. 1999.
- Fuenmayor Abdel J., Fuenmayor Abdel M., Carrasco Hugo., Prada Henry., Fuenmayor Carmen., Jugo Diego. Results of Electrophysiologic Studies in Patients whit Acute Chagasis Myocarditis. Clin. Cardiol. Vo. 20.1997
- Guedes PM, Veloso, Alfonso LC, Caliarí MV, Carneiro CM, Diniz LF, Marques-da-Silva EA, Caldas IS, Do Valle Matta MA, Souza SM, Lana M, Chiari E, Galvao LM, Bahia MT: 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 Immune Immunopathol* . 130:43-52. 2009.
- Guzmán Bracho C., García García Lourdes., Verdugo Floriani Jorge., Guerrero Martínez Sandra., Torres Cosme Mario., Ramírez Melgar Carmen., Velasco Castrejón Oscar. Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión de sangre en México. *Rev Panam Salud/Pan Am J Public Health* 4, (2). 1998.
- Gurtler, R. E., Cecere, M. C., Lauricella, M. A., Cardinal, M. V., Kitron, U., and Cohen J. E. "Domestic dogs and cats sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology*, 134, 69-82. 2007.
- Gurtler, R. E., Cecere, M. C., Castanera, M. B., Canale, D., Lauricella, M. A., Chuit, R., Cohen J. E. and Segura, E. L. "Probability of infection with *Trypanosoma cruzi* of the vector *Triatoma infestans* fed on infected humans and dogs in northwestern Argentina. *Am J Trop Med Hyg*. 55, 24-31. 1996
- Gurtler, R. E., Cohen J. E., Cecere, M. C., Lauricella, M. A., Chuit, R., and Segura, E. L. "Influence of humans and domestic animals on the household prevalence of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans* populations in northwestern Argentina. *Am J Trop Med Hyg*. 58, 748-758. 1998.
- Hoffman C. Nota acerca de un probable transmisor de la tripanosomiasis humana en el Estado de Veracruz. *Rev Mex Biol* 8.12-18. 1928.
- Jackson Yves., Alirol Emilie., Getaz Laurent., Wolff Hans., Combescure Christophe., Chappuis Francois. Tolerance and Safety of Nifurtimox in Patient with Chronic Chagas Disease. *Clinical Infectious Diseases*. 51 (10):e69-e75. 2010.
- Kirchhoff Louis V. Epidemiology of American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Advanced Parasitol*, 2011.
- Kittleson Mark D., Kienle Richard D. "Small Animal Cardiovascular Medicine". Ed Mosby. 1998.
- Kransdorf Evan P., Zakowski Philip C., Kobashigawa Jon A. Chagas disease in solid organ and transplantation. 2014.
- Kraetschmer S., Ludwig K., Meneses F., Nolte L and Simon D. Vertebral heart scale in the beagle dog. *Journal of Small Animal Practice*. 2008.
- Lana de Marta., Chiari Egler., Tafuri Washington L. "Experimental Chagas' Disease in Dogs" Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Vol. 82 (1): 59-71, jan/mar. 1992.
- Lardeux Frédéric., Depikére Stéphanie., Aliaga Cláudia., Chavez Tamara and Zambrana Lilian. Experimental control of *Triatoma infestans* in poor rural villages of Bolivia through community participation. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 109: 150-158. 2015.
- Lepesheva I Galina. Design or screening of drugs for the treatment of Chagas Disease what shows the most promise?. *Expert Opin. Drug Discov*. 8 (12). 2013.
- Molina I., Salvador F., Sánchez-Montalva A., Treviño B., Serre N., Avilés Sao A., Almirante B. Toxic Profile of Benzimidazole in Patients with Chronic Chagas Disease: Risk Factors and Comparison of the Product from Two Different Manufacturers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 59:6125-6131. 2015.

- Montenegro M Victor, Jiménez Mauricio, Pinto Dias JC, Zeldón Rodrigo. “Chagas Disease in Dogs from Endemic Areas of Costa Rica. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 97 (4): 491-494, June 2002
- Mazzotti. L. Dos Casos humanos de enfermedad de Chagas en el estado de Oaxaca. Gac. Med. Mex (Méx). 70, 412-420, 1940.
- Migliore Ricardo A, Adaniya María E, Tamagasku Horacio, Lapuente Alberto. “Utilidad del Doppler tisular en la valoración de la función diastólica de la enfermedad de Chagas”. Archivos de Cardiología de México. Vol. 74 Número 1/Enero-Marzo. 31-38. 2004.
- Murcia Laura., Carrilero Bartolomé., Saura Daniel., Iborra Asunción M, Segovia Manuel. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. Enferm Infecc Microbiol Clin. 31 (Supl 1): 26-34. 2013.
- OMS. Enfermedad de chagas (Tripanosomiasis americana). Nota descriptiva N 340. Marzo 2016.
- Organización Panamericana de la Salud OPS/OMS. Guía para la atención clínica integral del paciente con enfermedad de Chagas. 2012.
- OPS. Guía de Atención Clínica de la enfermedad de Chagas (Documento actualizado de versión convenio 256/09) 2010.
- OPS. Guía para vigilancia, prevención, control y manejo clínico de la enfermedad de Chagas aguda transmitida por alimentos. 2009.
- Pascon Joao Paulo da E., Pereira Neto Gláucia B., Sousa Marlos G., Junior Daniel Paulino and Camacho Aparecido A. “Clinical characterization of chronic chagasic cardiomyopathy in dogs” Pesquisa Veterinaria Brasileira 30(2): 115-120. 2010.
- Parada Henry., Carrasco Hugo A., Añez Néstor., Fuenmayor Carmen., Inglessis Ignacio. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas’ disease: a clinical, parasitological and histopathological study. 1997.
- Portela-Lindosso AA, Shinkanai-Yasuda MA. Chronic Chagas Disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. Rev Saude, Publica 37:107-115. 2003
- Quijano-Hernández Israel A., Castro-Barcena Alejandro., Vázquez-Chagoyán Juan C., Bolio-González Manuel E., Ortega-López Jaime., Dumonteil Eric. Preventive and therapeutic DNA vaccination partially protect dogs against infectious challenge with *Trypanosoma cruzi*. Vaccine. 2013.
- Rassi Jr Anis., Rassi Anis, Marin-Neto José Antonio. Chagas disease. Lancet; 375: 1388-402. 2010.
- Rosas Fernando, Vanegas Diego I., Cabrales Mauricio F. Enfermedad de Chagas. Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. 2007.
- Ramírez MA: Enfermedad de Chagas en el perro: mitos y realidades. Revista AMMVEPE 2006, 17:213-216 (In Spanish)
- Rodríguez-Morales Olivia., Carrillo-Sánchez Silvia C., García-Mendoza Humberto., Aranda-Fraustro Alberto., Ballinas-Verdugo Martha A., Alejandro-Aguilar Ricardo., Rosales Encina José Luis., Vallejo Maite., Arce-Fonseca Minerva. Effect of the Plasmid-DNA Vaccination on Macroscopic and Microscopic Damage Caused by the Experimental Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection in the Canine Model. BioMed Research International. 2013.
- Rosas Fernando, Vanegas Diego I., Cabrales Mauricio F. Enfermedad de Chagas. Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. 2007.
- Santos Fabiane M., Mazzeti Ana L., Caldas Sérgio., Goncalves R. Karolina., Lima G. Wanderson., Torres M. Rosália., Bahia Terezinha Maria. Chagas Cardiomyopathy: The Potencial Effect of Benzimidazole Treatment on Diastolic Dysfunction and Cardiac Damage In Dogs Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*. Acta Tropica. 2016.
- Sousa Marlos G., Paulino-Junior Daniel., Pascon Joao PE., Pereira-Neto Gláucia B., Carareto Roberta., Champion Tatiana., Camacho Aparecido A. “Cardiac function in dogs with chronic Chagas cardiomyopathy undergoing stem cell transplantation into the coronary arteries”. The Canadian Veterinary Journal 2011.
- Sousa MG., Pereira-Neto GB., Brüller., Paulino-Junior D., Pascon JPE., Gava FN., Carareto R., Camacho AA. “Tei index of myocardial performance in conscious healthy Beagles”. Arch Med Vet 48, 175-180. 2016.

- Solomon Claudio J. First Century of Chagas' Disease: An overview on Novel Approaches to Nifurtimoz and Benznidazole Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v0l 101, N. 3, Marzo. 2012.
- Tanowitz HB., Kirchhoff LV., Simon D., *et al.* Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev.* 5:400-19. 1992.
- Tarantola Arnaud., Abiteboul Dominique., and Rachiline Anne. Infection risk following accidental exposure to blood or body fluids in health care workers: A review of pathogens transmitted in published cases. 2005.
- Tilley, LP. Essentials of Canine and Feline Electrocardiogram: Interpretation and Treatment. *Lea & Febiger, Philadelphia, PA.* 1992.
- Torres-Rojo Yara Ibeth., Gutiérrez-Bernal José Luis., Castillejos-Zenteno Carlos Francisco., León-Macías César., Viveros-Rentería Eduardo. "Índice de Funcionamiento miocárdico global con ecocardiografía Doppler en pacientes con sepsis. *Revista Mexicana de Cardiología.* 2005.
- Velasco Oscar., Valdespino José Luis., Tapia Roberto., Salvatierra Benito., Guzmán Carmen., Magos Clementina., Llausás Alejandro., Gutiérrez Gonzalo., Sepúlveda Jaime. Seroepidemiología de la enfermedad de chagas en México. *Salud Pública de México*, vol. 34, núm. 2 marzo-abril. pp. 186-186, Instituto Nacional de Salud Pública. 1998.
- Waleckx Etienne., Mejia-Camara Javier., Ramirez-Sierra Maria Jesus., Cruz-Chan Vladimir., Rosado-Vallo Miguel., Vzquez-Narvaez Santos., Najera-Vazquez Rosario., Gourbière Sébastien., Dumonteil Eric. Una intervención innovadora de ecosalud para el control vectorial de la enfermedad de Chagas en Yucatán, México. *Rev Biomed.* 26:75-86. 2015.
- Zeldon, R. Epidemiology, modes of transmission and reservoir host of Chagas' disease. *Ciba. Symp.* 20:51-85. 1974.