
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

INFORME DE SERVICIO SOCIAL POR INVESTIGACIÓN

Efecto de Anfotericina B sobre la producción de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en un modelo canino

PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

Adrian López Díaz

Matrícula
2133052250

ASESOR INTERNO

M. en C. Miguel Á. Mosqueda Cabrera
No. Eco. 22011
UAM Xochimilco

ASESOR EXTERNO

Dra. Olivia Rodríguez Morales
Instituto Nacional de Cardiología
"Ignacio Chávez"

Ciudad de México, junio de 2020

RESUMEN

La tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas) es una infección parasitaria producida por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, transmitido por insectos hematófagos de la familia Reduviidae a mamíferos, entre ellos el ser humano. Se caracteriza por presentar una fase aguda con síntomas leves como el síndrome febril infeccioso y una crónica cuyas complicaciones comprometen al miocardio. La enfermedad se asocia con malas condiciones de vivienda, principalmente en Latinoamérica. Datos epidemiológicos de 2012 estimaban que en México había al menos 876,458 personas infectadas. La convivencia con otros mamíferos como el *Canis lupus familiaris* aumenta las posibilidades de infección. El tratamiento está preescrito con Benznidazol y Nifurtimox, fármacos de elevado costo, alta toxicidad y poca disponibilidad. Por ello, se buscan alternativas como la Anfotericina B (AmB), fármaco reposicionado del tratamiento para leishmaniosis y micosis sistémicas con propiedades anti-*T. cruzi*. Este trabajo evaluó el efecto de la AmB sobre la respuesta inmune humoral en fase aguda en perros infectados experimentalmente con *T. cruzi*. Se utilizaron perros de raza Náhuatl infectados con la cepa H8 de *T. cruzi*. El tratamiento con AmB se administró a los 25 días post-infección en cuatro ocasiones por vía intravenosa a través de una solución de dextrosa al 5%, cada 72h a razón de 0.2-1.0 mg/kg mediante goteo lento (20-30 gotas/min). Se empleó un tratamiento control con Benznidazol por vía oral a los 25 días post-infección (10 mg/kg cada 24 h por 10 días). Se confirmó la infección parasitoscópicamente, y se determinó la presencia de anticuerpos IgG totales e IgG2 anti-*T. cruzi* por la prueba de ELISA en dos tiempos de la fase aguda. La detección de parasitemia por la técnica de *microstraut* fue positiva en todos los grupos infectados entre los días 11 y 19 post-infección, sin diferencias entre grupos. Se detectaron IgG totales e IgG2 en todos los grupos infectados; sin embargo, en la etapa aguda tardía el grupo tratado con AmB presentó niveles de inmunoglobulinas por debajo del control negativo, lo que sugiere una seronegativización. En conclusión, el tratamiento con AmB fue capaz de inducir una rápida respuesta inmune humoral temprana contra *T. cruzi* en fase aguda con una seroconversión en etapa aguda tardía, lo que sugiere un combate exitoso que conlleva a la eliminación del parásito, o bien un favorecimiento hacia la respuesta mediada por células. Se recomienda esta nueva opción terapéutica para uso veterinario con ciertas recomendaciones para disminuir nefrotoxicidad.

Palabras clave: *T. cruzi*, anfotericina B, reposicionamiento de fármacos, inmunoglobulinas

Índice

Introducción	4
Marco Teórico	5
• Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
• Epidemiología de la enfermedad de Chagas en México.....	6
• Transmisión.....	6
• Respuesta inmune contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
• Fases de la enfermedad, síntomas y signos.....	8
• Manifestaciones en la especie canina.....	9
• Diagnóstico.....	10
• Tratamiento.....	10
1. Benznidazol.....	11
2. Nifurtimox.....	11
• Anfotericina B (AmB) en la estrategia de reposicionamiento de fármacos.....	12
• La especie canina como modelo animal de investigación de la enfermedad de Chagas.....	13
Objetivos	15
• General.....	15
• Específicos.....	15
Metodología	16
• Animales de experimentación y pruebas pre-infección.....	16
• Infección con <i>T. cruzi</i> cepa H8.....	17
• Eutanasia de los individuos en fase aguda.....	17
• Administración de los tratamientos.....	17
• Colecta de muestras de suero.....	18
• Técnica de <i>microstraut</i>	19
• Técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).....	19
• Análisis estadístico.....	20
Resultados	21
• Confirmación de la infección mediante parasitemia.....	21
• Observaciones de los tratamientos con AmB y Bzn.....	22
• Determinación de la presencia de anticuerpos IgG totales e IgG2 mediante ELISA.....	24
Discusión	26
• Parasitemia perros infectados con <i>T. cruzi</i>	26
• Tratamiento con AmB.....	27
• Anticuerpos anti <i>T. cruzi</i>	29
Conclusiones	32
Referencias	33

Introducción

La tripanosomiasis americana, también conocida como Enfermedad de Chagas, es una infección parasitaria producida por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), descrita por primera vez en 1909 por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (De Fuentes-Vicente *et al.*, 2016). Esta enfermedad se transmite por insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae, familia Reduviidae, del orden Hemiptera. La enfermedad de Chagas es una zoonosis compleja que involucra la interacción entre especies de invertebrados (triatominos) y vertebrados (seres humanos y otros mamíferos, tanto silvestres como domésticos) (Salazar-Schettino *et al.*, 2016), y se encuentra ampliamente distribuida en Sudamérica, principalmente en las áreas rurales y zonas marginadas de las grandes ciudades constituyendo uno de los graves problemas de salud pública en América Latina debido a sus efectos incapacitantes y mortalidad asociada (Salazar-Schettino *et al.*, 2011).

De acuerdo con su diversidad genética, *T. cruzi* ha sido dividido en dos linajes principales: *T. cruzi* I y *T. cruzi* II. Se piensa que esta variabilidad se debe al tropismo tisular del parásito en el hospedero, y que debido a su virulencia se atribuyen distintas manifestaciones clínicas. Actualmente, estos linajes se clasifican en siete unidades discretas de tipificación (DTU, por sus siglas en inglés) denominadas TcI-TcVI y TcBat. Así pues, *T. cruzi* I (TcI) parece ser más infectivo y con mayor afinidad hacia los tejidos del corazón, músculo esquelético y colon; mientras que *T. cruzi* II (principalmente los DTUs TcII, TcV y TcVI) prefiere tejidos como el hígado y el bazo o están asociados con casos crónicos presentando megaesófago y megacolon en los países del cono sur (Palmezano *et al.*, 2015; Zingales, 2018; Calvopina *et al.*, 2020).

Datos epidemiológicos de 2012 estimaban 5,742,167 personas infectadas en América Latina y 70,199,360 en riesgo de adquirir la infección. Argentina, Brasil y México fueron las tres naciones con las estimaciones más altas de infectados (1,505,235; 1,156,821; y 876,458; respectivamente). Aunque la transmisión por el vector no puede ocurrir fuera de América (por ser solo este continente su único hábitat), la infección puede extenderse a naciones no endémicas como Canadá, Europa, Asia y Oceanía por transmisión vertical, transfusiones de sangre, trasplantes de órganos, etcétera (Arce-Fonseca *et al.*, 2017; Salazar-Schettino *et al.*, 2011; Palmezano *et al.*, 2015).

En México, los triatominos fueron reportados por primera vez en 1928, y el primer caso humano de la enfermedad de Chagas fue descrito 12 años más tarde. Se considera que nuestro país alberga una de las poblaciones de triatominos más diversa, con 39 especies documentadas, y al menos 21 de ellas infectadas por *T. cruzi*, lo que representa un gran problema de salud pública (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 2015).

La transmisión vectorial de *T. cruzi* se lleva a cabo en dos ecosistemas, uno relacionado con triatominos selváticos y mamíferos silvestres (ciclo selvático), y el otro asociado a la vivienda humana con la participación del vector que habita el intra y el peridomicilio, y que está en relación directa con animales domésticos y el ser humano (ciclo doméstico) (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 2015).

Marco Teórico

• Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo de vida del parásito comienza cuando el vector se alimenta de la sangre de un huésped infectado con tripomastigotes sanguíneos que están circulando en la fase aguda de la enfermedad; estos tripomastigotes sufren una serie de diferenciaciones morfológicas mientras infectan el tubo digestivo del triatomo, predominando en el estómago la forma conocida como esferomastigote; en el intestino medio ocurre una diferenciación a epimastigote que se replica por medio de fisión binaria, luego migra al intestino grueso donde se convierte en tripomastigote metacíclico, forma infectante para los vertebrados, y se excreta con deyecciones del vector luego de una abundante ingestión de sangre. En el momento en el que las deyecciones entran en contacto con la piel del individuo picado, los tripomastigotes metacíclicos penetran la lesión o incluso la mucosa intacta (oral, nasal o conjuntival). Es allí donde los tripomastigotes metacíclicos infectan varios tipos de células nucleadas y se establecen en el citoplasma, donde se transforman en amastigotes que luego de un pequeño período se convierten nuevamente en tripomastigotes (Palmezano *et al.*, 2015; Universidad Nacional Autónoma de México, 2018).

Los tripomastigotes llevan a cabo la ruptura de células huésped para poder ser liberados en la circulación sanguínea y linfática, con lo cual invaden nuevas células hospederas donde se repetirá su transformación. La detección

de una elevada parasitemia corresponde a la fase aguda de la infección; mientras que, los individuos en fase crónica generalmente no presentan formas parasitarias detectables en sangre (Palmezano *et al.*, 2015; Universidad Nacional Autónoma de México, 2018).

- **Epidemiología de la enfermedad de Chagas en México**

En México, la incidencia de la enfermedad de Chagas se mantuvo en un rango de 0.07 a 0.37 por 100 mil habitantes del 2000 al 2007; mientras que en el periodo comprendido entre el 2008 y 2012 ascendió de 0.61 a 0.70 por 100 mil habitantes. En total, del período 2000- 2012, se registraron 5 mil 463 casos de enfermedad, de los cuales 247 fueron agudos, 171 crónicos con síntomas y 5 mil 45 crónicos asintomáticos. El grupo de edad más afectado es el de los adultos jóvenes (25 a 44 años); sin embargo, el grupo de niños menores de un año registraron 44 casos desde el año 2000, esto podría estar relacionado con un incremento en la transmisión congénita del padecimiento (Secretaría de Salud, 2014).

- **Transmisión**

Existen varias formas de transmisión, la principal es a través de mucosas o de una solución de continuidad de la piel con tripomastigotes que provienen de las heces del vector, pero también mediante la transfusión de hemocomponentes, el trasplante de órganos, la transmisión maternofetal, los accidentes en laboratorio, por la ingestión de artrópodos infectados, así como de alimentos o bebidas contaminadas con heces del parásito (Salazar-Schettino *et al.*, 2016).

La probabilidad de transmisión vectorial de *T. cruzi* está relacionada con numerosas características como el tipo de construcción de la vivienda y del peridomicilio, el nivel socioeconómico y cultural, la presencia de vectores infectados y la falta de implementación de programas de prevención en áreas vulnerables. Otros aspectos que deben ser considerados en la dinámica de la transmisión de la enfermedad de Chagas son los fenómenos evolutivos y adaptativos que han venido sufriendo los vectores a consecuencia de los programas de fumigación y la invasión de los hábitats selváticos por el hombre (Bar *et al.*, 2010; Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 2015).

- Respuesta inmune contra *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi desencadena la respuesta inmune innata al interactuar con receptores tipo Toll (TLRs) como TLR-2, TLR-4 y TLR-9 presentes en macrófagos y células dendríticas, desencadenando la producción de citocinas y quimiocinas, e induciendo endocitosis y muerte celular. En la infección temprana, *T. cruzi* promueve la activación de los linfocitos NK (del inglés *natural killer*) y la expansión de los linfocitos T. La funcionalidad de los linfocitos T se basa en tres tipos de respuestas colaboradoras: la TH1 (inmunidad celular o retardada), la TH2 (inmunidad humoral) y la TH17 (puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa). Las TH1 son altamente efectivas en la eliminación de patógenos intracelulares, las TH2 son de gran importancia en la eliminación de microorganismos extracelulares y parásitos, y las TH17 en la respuesta contra bacterias de crecimiento extracelular y hongos (Serrano, 2009).

A este respecto, y de acuerdo con la respuesta de tipo TH1, la producción de interleucina-12 (IL-12) por parte de los macrófagos induce en los linfocitos NK la formación de interferón-gamma (IFN- γ), que a su vez aumenta la producción de IL-12, factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y óxido nítrico (NO) en los macrófagos; dichas citocinas y quimiocina contribuyen a la eliminación del parásito. Una producción adecuada de citocinas pro inflamatorias como IL-1, IL-12, IL-6, IL-18, IFN- γ y TNF- α es esencial para inhibir la replicación intracelular del parásito y controlar la infección. Sin embargo, la IL-6 y la IL-1 se asocian con alteraciones endoteliales, responsables del daño en la microvasculatura en la enfermedad de Chagas. Tanto los linfocitos NK como los macrófagos sintetizan citocinas reguladoras como IL-10 e IL-4, que reducen los efectos dañinos asociados con la estimulación excesiva del sistema inmune. TH1 y TH2 trabajan de manera equilibrada para regular el sistema inmune, TH1 produce citocinas inflamatorias, mientras que TH2 tiene una función anti-inflamatoria, y está involucrada en la respuesta mediada por anticuerpos (Peña, 2019).

En la infección por *T. cruzi*, los linfocitos B y los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) también son importantes como parte de una respuesta TH2; animales con deficiencia en estos componentes del sistema inmune muestran altas parasitemias y bajas tasas de supervivencia. Esto se debe a la capacidad que poseen los linfocitos B para eliminar al parásito de la circulación

sanguínea, ya que su activación policlonal genera la producción de hipergammaglobulinemia como respuesta específica a finales de la fase aguda de la infección. Esta activación policlonal también puede ser la causa de la producción de anticuerpos autorreactivos. Algunos subtipos de IgG son responsables de la eliminación del parásito a nivel local y sistémico, por mecanismos de fijación del complemento, aglutinación y citotoxicidad (Peña, 2019).

- Fases de la enfermedad, síntomas y signos

La enfermedad de Chagas presenta dos fases clínicas bien definidas: fase aguda y fase crónica asintomática o sintomática, o ambas. La enfermedad inicia con la fase aguda, caracterizada por presentar síndrome febril infeccioso y parasitemia elevada que, de no ser tratada, progresa a la fase crónica. Esta puede manifestarse de forma asintomática (70% de los casos) o sintomática, donde se presentan complicaciones como la cardiomiopatía chagásica (Ministerio de Salud, 2010; Salazar-Schettino *et al.*, 2016).

La fase aguda es mayoritariamente asintomática con duración de dos a tres semanas o hasta cuatro meses; cuando se presentan síntomas, estos inician alrededor de 10 días después de la infección y en los casos de transmisión por transfusión sanguínea aparecen entre 20 y 40 días posteriores a esta. Aproximadamente el 75% de los casos agudos sintomáticos presentan semiología relacionada con la puerta de entrada aparente del parásito al organismo y además manifestaciones sistémicas. Cuando la vía de entrada es en la región ocular se presenta el signo de Romaña-Mazza en aproximadamente el 50% de los casos, el cual consiste en edema bpalpebral unilateral, poco doloroso, de aspecto violáceo, con prurito discreto, y se acompaña de adenopatías preauriculares, submaxilares y occipitales. Cuando la vía de entrada es en otra región del cuerpo se denomina chagoma de inoculación (25% de los casos) y se presenta como un nódulo subcutáneo, violáceo con microadenitis regional, duro, redondeado y eritematoso. Las manifestaciones sistémicas son fiebre sin características especiales, astenia, mialgias, artralgias, hepato y/o esplenomegalia. Menos de un 1% se complica con meningoencefalitis, miocarditis o pericarditis, especialmente en niños y ancianos (Palmezano *et al.*, 2015; Universidad Nacional Autónoma de México, 2018).

La fase crónica asintomática o indeterminada dura entre cinco y 20 años o más; clínicamente silenciosa con parasitemia muy baja, por lo que los métodos serológicos son los de elección para el diagnóstico.

Finalmente se presenta la fase crónica sintomática, en la que el 27% de los pacientes desarrollan lesiones cardíacas, 6% digestivas (principalmente en esófago y colon) y 3% en el sistema nervioso periférico. La fase crónica sintomática se manifiesta principalmente como cardiopatía, colopatía y esofagopatía. De acuerdo con esto, el órgano más afectado es el corazón, donde el paciente presenta miocarditis con manifestaciones de insuficiencia cardíaca congestiva y cardiomegalia. El compromiso de otros órganos como estómago, duodeno, vejiga, uréteres y otros es infrecuente. En esta fase existe una parasitemia baja y fluctuante, y en todos los pacientes hay detección de anticuerpos (Ministerio de Salud, 2010; Salazar-Schettino *et al.*, 2016; Universidad Nacional Autónoma de México, 2018).

- **Manifestaciones en la especie canina**

El período de duración de la fase aguda de *T. cruzi* en los perros oscila entre 5 y 45 días aproximadamente. En esta especie también se presenta el signo de Romaña, lesión cutánea que se genera cuando el parásito ingresa por vía conjuntival; así como el chagoma, cuando la picadura del vector es en otra región del cuerpo. Hay que tener presente que no en todos los casos se va a encontrar una lesión indicativa del sitio de ingreso del parásito. Al examen físico los pacientes pueden presentar linfadenomegalia generalizada, fiebre, pelaje hirsuto, debilidad, depresión, emaciación, alteraciones nerviosas referibles a meningoencefalomielitis como paresia, ataxia e hiperreflexia, y signos como letargo, membranas mucosas pálidas, aumento en el tiempo de llenado capilar, alteraciones del pulso, taquicardia, hepatomegalia, esplenomegalia, y ascitis atribuidos al desarrollo de insuficiencia cardíaca como consecuencia de la miocarditis aguda. Otros signos que se pueden presentar durante la fase aguda de la infección son anorexia, diarrea, hipotermia terminal y distrés respiratorio. La miocarditis aguda puede contribuir a la presentación de arritmias o lipotimia, pudiendo ocurrir la muerte súbita, la cual es poco frecuente. Esta fase tiene una duración aproximada de 10 a 45 días, pero puede llegar a extenderse hasta dos

o tres meses. En perros mayores a un año los signos de la fase aguda son mucho menos severos y a veces inaparentes (Peña, 2019).

El progreso a la fase crónica en infecciones naturales no está bien documentada; sin embargo, en estudios experimentales esta sucede entre los 8 y 36 meses postinoculación. Se presenta una dilatación cardíaca y gran variedad de anomalías en la conducción eléctrica como la fibrilación atrial, contracción ventricular prematura, bloqueos cardíacos de primer y segundo grado y taquiarritmias. Las megalovisceras, síndromes descritos en la fase crónica de la enfermedad de Chagas en seres humanos, no han sido reportados en perros cuya infección ha sido natural (Snowden y Kjos, 2016).

• Diagnóstico

El diagnóstico en la fase aguda se realiza con métodos parasitológicos directos y para la fase crónica con métodos serológicos y de gabinete.

Los exámenes parasitológicos son: examen parasitoscópico directo de gota gruesa y frotis sanguíneo, los cuales se utilizan para observar formas de tripomastigotes sanguíneos. Otro método parasitológico utilizado es la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), que usa iniciadores específicos para amplificar un segmento del DNA de *T. cruzi* en muestras clínicas de pacientes (Cita).

Los exámenes serológicos son pruebas indirectas para la búsqueda de anticuerpos anti-*T. cruzi*. Estos métodos son recomendados por la Organización Mundial de la Salud, y ejemplos de ellos son el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunofluorescencia indirecta y hemaglutinación indirecta.

Para el estudio clínico cardiológico se recomiendan electrocardiogramas, radiografías de tórax y ecocardiogramas (Ministerio de Salud, 2010; Salazar-Schettino *et al.*, 2011).

• Tratamiento

El tratamiento antiparasitario específico solo existe para la fase aguda mediante el empleo de dos fármacos, ambos con efectos hepatotóxicos y nefrotóxicos (Salazar-Schettino *et al.*, 2011), el Benznidazol y el Nifurtimox, únicos

internacionalmente aceptados para el tratamiento contra la enfermedad de Chagas (Palmezano *et al.*, 2015); sin embargo, estos presentan varias limitaciones por la alta frecuencia de efectos secundarios indeseables, largos protocolos de tratamiento, la limitada actividad antiparasítica y la aparición de resistencia del parásito frente a ellos. Estudios clínicos reportan 80% de cura parasitológica en la fase aguda, mientras que en fase crónica solo 5-20% de los pacientes son considerados “curados” según la evaluación por 20 o más años de seguimiento (Muñoz-Calderón *et al.*, 2012).

1. Benznidazol

Fármaco tripanocida que actúa uniéndose en forma covalente a los intermediarios de la nitrorreducción con los componentes del parásito, ADN, lípidos y proteínas. La dosis recomendada es de 5-7 mg/kg de peso corporal dividido en tres dosis diarias por 60 días (Ministerio de Salud, 2010).

Entre los efectos secundarios se destacan alteraciones gastrointestinales como náuseas, vómito, anorexia y diarrea; así como dermatitis, depresión medular (agranulocitosis) y neuropatía periférica que aumentan con dosis diarias de 8 mg/kg por más de 30 días, y que algunas veces pueden aparecer hasta una semana después de finalizado el medicamento. A diferencia de la dermatitis y la agranulocitosis, la neuritis ocurre al final del tratamiento, que se puede acompañar de ageusia (Palmezano *et al.*, 2015).

2. Nifurtimox

Es un análogo de nitrofuranos que actúa como tripanocida contra todas las formas de *T. cruzi*, y resulta ser más eficaz contra las formas de tripomastigotes en comparación con el Benznidazol. Origina radicales libres y produce daño por reducción de componentes celulares parasitarios como proteínas y ácidos nucleicos. Ha demostrado ser efectivo en las fases aguda, crónica asintomática y crónica sintomática de la enfermedad. En la fase aguda presenta una cura parasitológica de 76% y un porcentaje variable en la etapa crónica, habiendo resultados controversiales (Ministerio de Salud, 2010; Fuentes *et al.*, 2012).

La dosis recomendada es de 8-10 mg/kg/día durante 30 a 60 días, misma que los niños toleran mejor que los adultos. Una dosis entre 5-25 mg/kg/día es usada en formas graves como meningoencefalitis o miocarditis aguda, casos en que el tratamiento debe ser supervisado por un médico especialista; la dosis

máxima permitida por individuo es de 700 mg al día, independientemente de su peso. De preferencia, se administra cada 8 horas, después de una ingesta de alimentos. La administración se inicia en forma escalonada iniciando con 1/4 de la dosis el primer día, la mitad los días 2 y 3 y la dosis total al cuarto día, contándose los 60 días totales desde el momento que inicia la dosis.

Los efectos secundarios se presentan en el 30% de los casos y se manifiestan con mayor frecuencia en adultos; pueden producir anorexia; pérdida de peso; manifestaciones gastrointestinales como náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea; dermatitis y compromiso del sistema nervioso central con insomnio, alucinaciones y psicosis (Ministerio de Salud, 2010).

- **Anfotericina B (AmB) en la estrategia de reposicionamiento de fármacos**

La mayoría de los medicamentos que están en uso clínico son el resultado de un proceso de investigación muy complejo, el cual tarda aproximadamente entre 10 y 15 años para que dichos medicamentos sean aprobados y estén disponibles, y representa altos costos (Saldívar-González *et al.*, 2017). Para reducir gastos y tiempo de investigación se han empleado diversas estrategias como el reposicionamiento de fármacos, proceso en el cual se busca que fármacos ya existentes dirigidos para tratar una enfermedad puedan usarse para tratar otra, con ello se encuentra una nueva aplicación terapéutica distinta de aquella por la que fue diseñado, y que no necesariamente tiene la misma dosis (Medina-Franco *et al.*, 2015; Saldívar-González *et al.*, 2017).

Dicha estrategia ha mostrado ahorrar hasta el 50% de las inversiones de tiempo y dinero para desarrollar la aprobación de un tratamiento, puesto que un fármaco aprobado requerirá de menos tiempo para probar su seguridad, por lo que fármacos que no han probado efectividad para una determinada enfermedad, pero sí seguridad, son excelentes candidatos para reposicionamiento ya que cuentan con datos de seguridad en seres humanos (Medina-Franco *et al.*, 2015).

Diversos autores han discutido el reposicionamiento de la AmB para su aplicación terapéutica contra la enfermedad de Chagas, debido a la actividad tripanocida aparente que posee tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Es importante destacar que es un fármaco principalmente antimicótico del grupo de los macrólidos poliénicos, derivado del procarionte *Streptomyces nodosus*, un

actinomiceto aerobio; tiene nula actividad antibacteriana y poca actividad contra protozoarios; sin embargo, ha sido probado principalmente contra *Leishmania braziliensis* y *Naegleria fowleri* (Brunton, 2007).

En 1980, Cruz y colaboradores utilizaron la AmB para eliminar la forma de tripomastigote de *T. cruzi* en sangre almacenada a 4°C. Dicho efecto anti-tripanosoma fue conseguido con una concentración de 3 µg/mL en 48 horas; además, no produjo hemólisis en un periodo de tres semanas. Asimismo, sugirieron la consideración del uso de AmB como reemplazo del cristal violeta utilizado en los bancos de sangre para prevenir la transmisión transfusional de la enfermedad de Chagas (Cruz *et al.*, 1980).

Yardley y Croft (1999) reportan una alta actividad tripanocida de diversas formulaciones comerciales de AmB (AmBisome, Amphocil, Albecel y Fungizone) contra la forma de amastigote de *T. cruzi* en ensayos *in vitro*; sin embargo, dicha actividad no se vio reflejada en los ensayos *in vivo* en ratones BALB/c, donde a pesar de tener una actividad tripanocida significativa, ninguna de las formulaciones redujo la cantidad de parásitos en sangre como el Benznidazol. No obstante, los experimentos demostraron que una dosis alta y única de AmBisome (25 mg/kg) puede suprimir exitosamente la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, además de disminuir la toxicidad del fármaco.

A pesar de lo anterior, el uso de AmB sigue siendo limitado por su alta toxicidad, especialmente sobre el riñón, y por los efectos adversos relacionados con la infusión como tromboflebitis, fiebre, vómitos, dolores de cabeza y hemólisis, así como su baja solubilidad acuosa, permeabilidad a través del epitelio gastrointestinal y biodisponibilidad oral (<0.9%). Sin embargo, investigaciones recientes indican que las formulaciones poliagregadas de AmB reducen la toxicidad y aumentan la eficacia después de una administración intravenosa comparada con otras formulaciones del fármaco debido a un volumen de distribución más largo (Rolón *et al.*, 2017).

- [La especie canina como modelo animal de investigación de la enfermedad de Chagas](#)

La limitada posibilidad de extrapolar al ser humano los resultados obtenidos en diversos estudios utilizando técnicas *in vitro* crea la éticamente cuestionada necesidad de realizar investigación experimental en modelos animales, cuya

composición ósea y de tejidos reaccionen de una forma semejante al del ser humano. Aunque los modelos animales no reflejan completamente la condición humana, ya que su anatomía, fisiología, patología y biomecánica funcional no son del todo similares, su biología provee la oportunidad de estudiar y probar nuevos biomateriales. El perro es uno de los modelos animales más utilizados, y es generalmente adecuado para el ejercicio de una amplia gama de estudios, entre ellos los inmunológicos (Navarro *et al.*, 2012; Valenzuela *et al.*, 2015). Por lo anterior, deben ser cuidadosamente seleccionados los individuos que serán utilizados como modelo experimental.

Además de ser considerados un modelo de estudio ideal para investigar la enfermedad de Chagas, los perros son considerados reservorios domésticos de suma importancia y pueden contribuir en la transmisión de *T. cruzi* cuando el hombre y el perro cohabitan con los insectos vectores de la familia Reduviidae. Se ha demostrado una asociación positiva y significativa entre la infección de perros y variables que reflejan la exposición local a insectos infectados; además, la probabilidad de infección con *T. cruzi* aumenta de tres a cinco veces cuando se convive con animales domésticos infectados en comparación con individuos que viven con animales sin infección (Turriago *et al.*, 2008).

Objetivos

• General

Determinar la presencia de inmunoglobulinas G (IgG) totales y sus isotipos en perros infectados con *Trypanosoma cruzi* y tratados con Anfotericina B (AmB) como agente tripanocida mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para evaluar la respuesta inmune humoral postratamiento.

• Específicos

1. Infectar perros de la raza Náhuatl con *T. cruzi* cepa H8 vía intraperitoneal para causar la enfermedad de Chagas en modelo canino.
2. Administrar AmB por vía intravenosa como tratamiento antiparasitario en los perros infectados con *T. cruzi*.
3. Determinar la presencia de anticuerpos IgG totales y los isotipos IgG1 e IgG2 mediante ELISA para evaluar la respuesta inmune humoral postratamiento con AmB.

Metodología

El proyecto al que pertenece este trabajo de investigación fue financiado por el presupuesto en investigación en salud otorgado por la Secretaría de Salud, y está registrado y aprobado por el Comité de Bioética del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INCICh) con No. 18-1078 y por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (INC/CICUAL/012/2018).

• Animales de experimentación y pruebas pre-infección

Se utilizaron 18 perros de raza Náhuatl creados en México para su uso en laboratorio, cuyo certificado donde se verifica, certifica y valida a dicha raza como un modelo biológico de experimentación fue expedido en 2015 por la Asociación Mexicana de la Ciencia de los Animales de Laboratorio A. C. (AMCAL). Los ejemplares se alojaron en el Departamento de Bioterio y Cirugía Experimental (DBCE) del INCICh. Para el apropiado manejo del modelo experimental se siguieron los lineamientos presentes en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio.

El estado de salud general previo a la infección se determinó mediante un examen físico que incluyó la toma de parámetros generales como: peso, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, temperatura rectal, tamaño de linfonodos y tiempo de llenado capilar, así como pruebas sanguíneas, electrocardiogramas, ecocardiogramas y fluoroscopías. También se verificó que no tuvieran anticuerpos anti-*T. cruzi* por la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). Posterior a la infección se siguieron realizando los estudios clínicos y de gabinete para la ejecución de otros trabajos paralelos a este.

Con base en el manejo de los individuos y de manera aleatoria se definieron los siguientes grupos experimentales:

- ◊ **Sanos:** control sin infectar, $n = 2$ (Tenoch y Xipe)
- ◊ **AmB sanos:** control sin infectar tratado con AmB, $n = 2$ (Aztlán y Cualitzin)
- ◊ **Infectados sin tx:** control infectado sin tratamiento, $n = 3$ (Kochi, Teotl y Ne)
- ◊ **AmB tx:** infectados y tratados con AmB, $n = 5$ (Akatzin, Xipilli, Tika, Izel y Tepilli)

- ◊ **Bzn:** control infectado y tratado con Benznidazol, $n = 4$ (Tlali, Neki, Chía y Ahuakatl)
- ◊ **Agudos sin tx:** control agudo sin tratamiento, $n = 2$ (Cihuatl e Ixachi)

• **Infección con *T. cruzi* cepa H8**

Para la infección se utilizaron tripomastigotes sanguíneos a partir de ratones (BALB/c) infectados con la cepa H8 de *T. cruzi*. El inóculo de infección fue de 2×10^6 parásitos diluidos en 3 mL de solución salina fisiológica, administrado vía intraperitoneal a cada individuo. Dicho inóculo se preparó por conteo de parásitos presentes en la sangre de los ratones mediante una cámara de recuento celular (Neubauer, Brand ®).

• **Eutanasia de los individuos en fase aguda**

Para contar con evidencias del daño que causa la enfermedad de Chagas en fase aguda en esta especie animal, se eligieron dos individuos como control (Ixachi y Cihuatl). La eutanasia, necropsia y obtención de órganos de interés se practicaron a los 27-30 días post-infección (dpi) en el quirófano y en la sala de procedimientos del DBCE del INCICH.

Se utilizó el método de eutanasia indicado para la especie según la Norma Oficial Mexicana (NOM-033-SAG/ZOO-2014) Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres, a través de la inyección intravenosa (IV) de derivados de barbitúricos (pentobarbital sódico) a dosis letal de 90 a 210 mg/kg y cloruro de potasio a una concentración de 149 mg/mL/dosis total.

Los órganos de interés obtenidos fueron colocados en recipientes (riñón quirúrgico) con solución salina fisiológica para su procesamiento inmediato *in situ*, y posteriormente preservados en una solución de formaldehído al 10% o en RNAlater (Qiagen ®) para su eventual análisis histopatológico y molecular, respectivamente.

• **Administración de los tratamientos**

El tratamiento terapéutico con AmB se administró en cuatro ocasiones a los grupos experimentales AmB tx ($n = 5$) y AmB sanos ($n = 2$) iniciando a los 25 dpi cada 72 h a razón de 0.3-1.0 mg/kg mediante goteo lento (aprox 20-30 gotas/min) en una solución de dextrosa al 5%, vía intravenosa (IV). Las

infusiones se administraron durante un periodo de 4 h aproximadamente, tiempo en el cual el fármaco estuvo protegido de la luz solar. Durante la administración de las infusiones se monitoreó el estado general de cada individuo y se registro la frecuencia cardiaca, la frecuencia respiratoria y la temperatura rectal.

Previo al tratamiento IV, se suministró clorhidrato de acepromacina vía intramuscular (IM) entre los músculos semitendinosos y semimembranosos de las extremidades posteriores para una tranquilización ligera (a dosis de 1.25 mg/kg), y en casos muy específicos se administró Zoletil 50 (Virbac ®) IM para sedación profunda (a dosis de 7.5 mg/kg); después se canalizó al sujeto por la vena cefálica de cualquiera de las extremidades anteriores, y se proporcionó una terapia de mantenimiento con 250 mL de solución salina fisiológica como prehidratación para prevenir el daño al riñón al evitar disminuciones drásticas del flujo sanguíneo renal y de la tasa de filtración glomerular y/o al evitar también la dilución de los electrolitos séricos debido a la administración de la solución de dextrosa al 5%.

Otros medicamentos en el esquema de pretratamiento a la AmB fueron una tableta de difenhidramina como antihistamítico para evitar las náuseas, vómitos y reacciones de hipersensibilidad (a dosis de 2 mg/kg) por vía oral (PVO) colocando la tableta en la parte posterior de la cavidad oral, cerca de la base de la lengua para provocar el reflejo deglutorio. También se aplicó una inyección de ondansetrón como antiemético (a dosis de 0.15 mg/kg) vía IM. Finalmente, posterior al tratamiento de AmB se aplicó furosemida para favorecer la diuresis (a dosis de 2 mg/kg) vía IM.

El grupo control Bzn ($n = 4$) recibió un tratamiento con Benznidazol (Lafepe ®) igualmente a los 25 dpi, con una dosis de 10 mg/kg cada 24 h durante diez días mediante la administración PVO de dos tabletas por individuo para asegurarse de que cada animala recibiera la dosis correspondiente.

• **Colecta de muestras de suero**

Para aplicación de la técnica de ELISA se colectaron de 8 a 10 mL de muestra de sangre por individuo a los 45 dpi y 3 meses post-infección (mpi), tiempos que representan la fase aguda temprana y tardía, respectivamente. Dicha colecta se hizo por medio de punción de las venas cefálicas o de las yugulares con jeringas de 10 mL y agujas de calibre 22G. Las muestras se centrifugaron a 3,500 rpm

por 15 min en centrífuga refrigerada (Sorvall RT6000B ®), y el suero fue separado y depositado en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL etiquetados y conservados en congelación a -20°C hasta su uso.

• **Técnica de *microstraut***

La determinación de la infección mediante este método parasitológico directo fue realizada por la técnica de *microstraut* modificada por la MVZ. Esp. Erika Jocelin Mendoza Téllez; se colectaron muestras de sangre de los individuos infectados en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL a partir de los 11 dpi. Para su análisis se utilizaron tubos capilares partidos a la mitad y se cargaron con la muestra sanguínea llenando las 3/4 del capilar, estos fueron envueltos en algodón e introducidos con sumo cuidado en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL y centrifugados a 11,000 rpm por 5 minutos en centrífuga refrigerada (Sorvall RCM 14 ®). Los tubos fueron examinados bajo microscopio de luz poniendo énfasis en la capa leucoplaquetaria para la observación de los parásitos.

• **Técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)**

La detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* se realizó mediante ELISA con muestras de suero de individuos sanos (control negativo), individuos previamente identificados como infectados (control positivo) y con los sueros problema del presente proyecto a los 45 dpi (etapa aguda temprana) y a los 3 mpi (etapa aguda tardía).

Se utilizaron placas de 96 pozos (Nunc ®), sensibilizadas con 1 µg de antígeno (proteínas totales de epimastigotes extraídas a partir del aislado INC-9 de *T. cruzi* en el INCICH, Ciudad de México) en 200 µL de Amortiguador de Carbonatos (NaCO₃/NaHCO₃ pH 9.6) durante 1 h a 37°C. Se realizaron cinco lavados con Amortiguador de Fosfatos (PBS)-Tween 20 al 0.05% (PBS-T), y posteriormente se bloqueó la placa con 200 µL de PBS-T adicionado con Albúmina Sérica Bovina (BSA) al 0.5%, incubando por 20 minutos a 37°C. Se colocó 1 µL del suero canino en cada pozo y se incubó durante 1 h a 37°C. Se realizaron siete lavados con PBS-T al 0.005% y posteriormente se colocaron 200 µL de conjugado anti-IgG Total, anti-IgG1 o anti-IgG2 canino (Novus Biologicals®, EE.UU.) a una dilución 1:20,000; posteriormente, se incubó la placa durante 30 min a 37°C. Se realizaron cinco lavados con PBS-T al 0.005%

y se agregaron 150 μL del sustrato de revelado, peroxidasa ortofenilendiamina (OPD, Sigma $\text{\textcircled{R}}$) y H_2O_2 al 0.03 %, en Amortiguador de Citratos (0.1 M pH; 4.8) y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalmente, se agregaron 50 μL de H_2SO_4 (5 N) para detener la reacción. La lectura de los valores de absorbancia se realizó en un lector de microplacas (Bio-Rad $\text{\textcircled{R}}$) a 490 nm. El punto de corte fue establecido de acuerdo con los valores obtenidos a partir del control negativo (promedio + 3 desviaciones estándar, D.E.).

• Análisis estadístico

Mediante el uso de programas como *Excel ver.16* y *SPSS ver.19* se elaboraron los análisis descriptivos e inferenciales. Los gráficos utilizados con el fin de comparar los conjuntos de datos resultantes de la determinación de anticuerpos por la prueba ELISA fueron los diagramas de caja y bigotes. También se realizó la prueba de Kruskal-Wallis (no paramétrica), donde se analiza si varias muestras independientes provienen o no de la misma población, cuyas hipótesis fueron:

H0: Las muestras provienen de poblaciones idénticas

Ha: Las muestras provienen de poblaciones diferentes

Cuando el valor resultante de dicha prueba fue $P = \leq 0.05$ entonces se rechazó la hipótesis nula y se concluyó que existieron evidencias suficientes para plantear que la media difirió entre los grupos, con un nivel de significancia del 95%.

Automáticamente el programa de *SPSS ver.19* aplicó la prueba *post hoc* de Bonferroni, para identificar cuáles grupos fueron los que presentaron dichas diferencias estadísticamente significativas. Asimismo, los valores de significancia se ajustaron mediante la corrección de Bonferroni para varias pruebas.

Resultados

• Confirmación de la infección mediante parasitemia

Una vez infectados los ejemplares, se realizó el diagnóstico parasitológico por la técnica de *microstraut* a partir de los 11 dpi, para verificar la correcta infección y establecimiento de la fase aguda de la enfermedad de Chagas en los sujetos de estudio (Tabla 1).

Tabla 1. Detección de parásitos en sangre por *microstraut* en perros infectados con *T. cruzi*.

Grupo	Sujeto	Días post-infección						
		11-14	15-18	19-22	23-26	27-30	31-34	35-46
Infectados sin tx	Kochi	+		+	-			-
	Teotl	+		+	-		-	
AmB tx	Akatzin	+		+	-		-	
	Tika	+			+		+	-
	Izel	+	+		+		-	
	Tepili	+		+		-		
	Xipili	+		+	-	-		
Bzn	Neki	+	+	-	-	-		
	Tlali	-		+	-	-		-
	Chía	+		+		-		-
Agudos sin tx	Ixachi	+		+	+			
	Cihuatl	+		+		-		

+ = positivo a la presencia de 1 o 2 tripomastigotes sanguíneos

- = negativo a la presencia de 1 o 2 tripomastigotes sanguíneos

Como se muestra en la Tabla 1 se pudo confirmar la presencia de *T. cruzi* en sangre en el 86% de los individuos infectados (12/14) a partir de los 11dpi y hasta los 33dpi. Los otros dos individuos (Ahuakatl y Ne) ya habían sido previamente diagnosticados por la presencia de anticuerpos IgM anti-*T. cruzi* por una prueba molecular (datos no mostrados).

La presencia del parásito fue observada entre los 11 y 14dpi en todos los individuos de todos los grupos, a excepción de un ejemplar del grupo Bzn (Tlali), el cual mostró un retraso hasta los 19dpi en dar positivo, y posterior a esto sus resultados fueron negativos; sin embargo, el resto del grupo dio negativo posterior al tratamiento con Benznidazol.

De la misma forma, el grupo tratado con AmB fue diagnosticado positivo entre los 11 y 14 dpi, y dejó de observarse parásitos en sangre en el 40% del grupo (2/5, Xipilli y Akatzin) a los 26dpi. En otro 40% del grupo, los resultados

negativos se observaron posterior a la segunda infusión del tratamiento; en el caso del 20% restante del grupo (1/5, Tika) su parasitemia fue más prolongada que el resto de individuos con el mismo tratamiento, dando negativo hasta los 43 dpi. Asimismo, se destaca que Akatzin y Xipilli, los individuos con las dosis más altas de AmB terapéutica (0.95 mg/kg/infusión y 0.97 mg/kg/infusión, respectivamente), dieron negativo inmediatamente después de la primera administración del fármaco.

El grupo de infectados sin tratamiento (Kochi y Teotl) también dieron negativo a la prueba parasitológica a partir de los 26 dpi.

Al último grupo, Agudos sin tx, no se les dio seguimiento debido a que se programaron para eutanasia a los 27 y 30 dpi.

• **Observaciones de los tratamientos con AmB y Bzn**

Los sujetos con tratamiento terapéutico anti *T. cruzi* con AmB presentaron efectos adversos relacionados con la administración del fármaco, los cuales fueron náuseas, emesis, diarrea profusa y disminución de la temperatura corporal; sin embargo, en la mayoría de los casos (83.3%, 5/6 individuos) no fue necesaria la suspensión del tratamiento. Estos signos fueron evidentes con mayor frecuencia en el 40% de los individuos (2/5, Xipilli y Akatzin) cuya velocidad de goteo fue mayor (hasta 38 gotas por minuto), así como mayor dosis del fármaco (0.97 y 0.95 mg/kg/infusión, respectivamente). En el caso de Cualitzin (1/2, 50% del grupo AmB sanos) la terapia fue suspendida después de la segunda infusión por presentar daño renal. Para mitigar los efectos adversos de la AmB que se observaron con los individuos que recibieron casi 1.0 mg/kg/infusión, se ajustaron las dosis a la mínima recomendada 0.3 mg/kg/infusión (Tabla 2).

La evaluación de la función renal 24h después de cada administración de AmB se realizó mediante el análisis de urea y creatinina séricas en una química sanguínea (prescrita y analizada por la tesista de maestría encargada del proyecto general, la MVZ. Alejandra González Sandoval). Se colectaron 6 mL de sangre sin anticoagulante y se colectó la primera orina del día de cada individuo en un frasco estéril para medir densidad urinaria mediante un refractómetro.

Tabla 2. Dosis de AmB administrada a perros Náhuatl de forma individual a razón de 0.3-1 mg/kg

Grupo	Sujeto	Peso (kg)	Dosis total* AmB (mg)	Dosis de AmB por peso (mg/kg) en cada infusión
AmB sanos	**Cualitzin	27.8	16.68	0.30
	Aztlán	16.6	19.92	0.30
AmB tx	Akatzin	23.8	91.2	0.95
	Xipilli	24.4	95.3	0.97
	Tika	22.3	26.76	0.30
	Izel	20.3	24.36	0.30
	Tepili	20.6	24.72	0.30

*La dosis total se refiere a la cantidad administrada en las cuatro infusiones.

**Cualitzin solo recibió dos administraciones.

El 50% de los animales del grupo AmB sanos presentaron daño renal después de la segunda administración de AmB; por lo que se inició inmediatamente una terapia de soporte hasta su completa recuperación, la cual ocurrió 14 días posteriores al tratamiento de sostén.

Después de la tercera administración de AmB, el 40% de los animales del grupo AmB tx (2/5) presentó anorexia, debilidad del tren posterior y vómito. Esto se asoció a que fueron los sujetos que recibieron las dosis más altas del fármaco y con mayor velocidad de goteo (casi 1 mg/kg/infusión). El resto de individuos presentó síntomas similares únicamente cuando el goteo aumentaba por movimiento accidental de la venoclisis.

Para restablecer la función renal en los animales afectados, la terapia que se realizó consistió en administración de: Ipakitine (1g/kg/24h PVO), el cual es un secuestrante de fosfatos y de toxinas urémicas, auxiliar en la regulación de hiperfosfatemia en pacientes con insuficiencia renal; enalapril (0.5 mg/kg/24h PVO), un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina utilizado en el tratamiento de la hipertensión arterial; y ranitidina (2 mg/kg/24h PVO), inhibidor de ácidos gástricos. Estos medicamentos están indicados mientras exista una concentración elevada de desechos nitrogenados acumulados en el organismo, los cuales son evaluados por los niveles de urea y creatinina séricas, condición conocida como hiperazotemia.

Además, se administró fluidoterapia de mantenimiento con solución Hartmann durante cinco días consecutivos, el Ipakitine se administró durante diez días, mientras que el enalapril y la ranitidina se manejaron hasta lograr la completa mejoría, monitoreada por el restablecimiento a los valores de referencia de urea y creatinina, parámetros que se determinaron dos veces por

semana. A los 30 días del inicio de la terapia de soporte se logró restablecer la función renal.

El tratamiento con Benznidazol ocasionó vómito esporádico en el 25% de los animales tratados con este fármaco (1/4), por lo que no fue necesario suspender el tratamiento ni administrar algún medicamento de soporte.

• Determinación de la presencia de anticuerpos IgG totales e IgG2 mediante ELISA

Estos resultados se muestran como diagramas de caja y bigotes, los cuales representan la distribución de los datos por cuartiles, evaluando la dispersión y la tendencia central de los grupos.

La Figura 1 muestra la cantidad de IgG total de los diversos grupos de estudio a los 45 dpi (fase aguda temprana) y a los 3 mpi (fase aguda tardía). En el diagrama de los 45 dpi (Fig. 1A), se puede observar una diferencia notoria en los niveles de IgG total entre los grupos sin infección (control negativo y AmB sanos) y los infectados (Infectados sin tx, Bzn y AmB tx), donde estos últimos poseen valores sumamente elevados, demostrando la respuesta inmune de tipo humoral contra *T. cruzi* en esta etapa aguda temprana de infección.

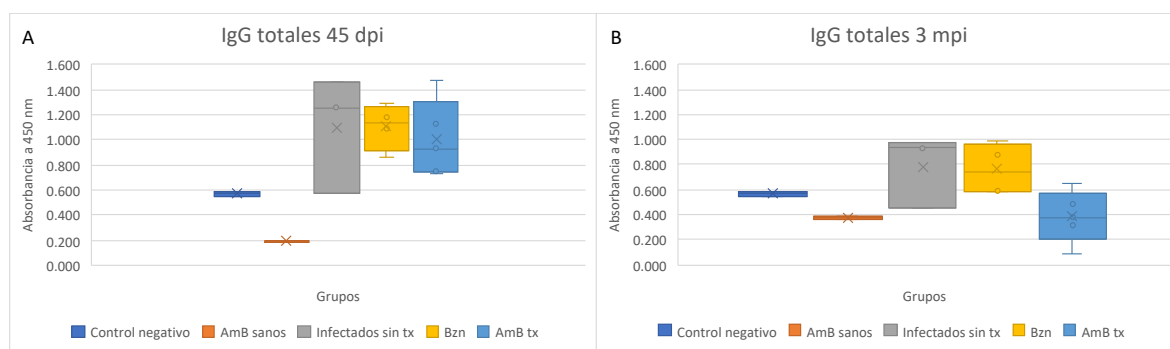


Figura 1. Niveles de IgG total a los 45 dpi (A) y 3 mpi (B). Los títulos de anticuerpos en etapa aguda temprana y tardía fueron evaluados por ELISA (absorbanza en densidad óptica a 490 nm) en perros infectados con *T. cruzi* y tratados experimentalmente con AmB. Los valores representan el promedio de ensayos por duplicado \pm D.E. No se detectaron diferencias significativas en ningún grupo comparado con los grupos infectados o sanos (prueba estadística de Kruskal-Wallis).

En cuanto al diagrama de 3 mpi (Fig. 1B), se destaca que el grupo Bzn y el Infectado sin tx tienen valores similares de IgG totales, mientras que el grupo con AmB terapéutica tiene valores por debajo de los controles negativos y del

grupo AmB sano. Estos hallazgos señalan una clara tendencia a la seronegativización en etapa aguda tardía de la infección debido a la administración terapéutica de AmB.

La IgG2 (Fig. 2) se mantuvo en niveles elevados en el grupo Infectados sin tx al igual que en el grupo Bzn en ambos tiempos de la fase aguda: 45 dpi (temprana) (Fig. 3A) y 3 mpi (tardía) (Fig. 3B); tal y como se esperaba, el grupo AmB sanos presentó niveles por debajo del valor de corte, incluso menor que el control negativo. Aunque los otros tres grupos mostraron niveles elevados de IgG2, ninguno de estos mostró diferencias significativas entre sí; sin embargo, con estos datos se demuestra que los niveles de IgG2 aumentaron en niveles muy similares en individuos infectados en el curso de toda la etapa aguda con o sin la terapia de cualquiera de los dos fármacos utilizados.

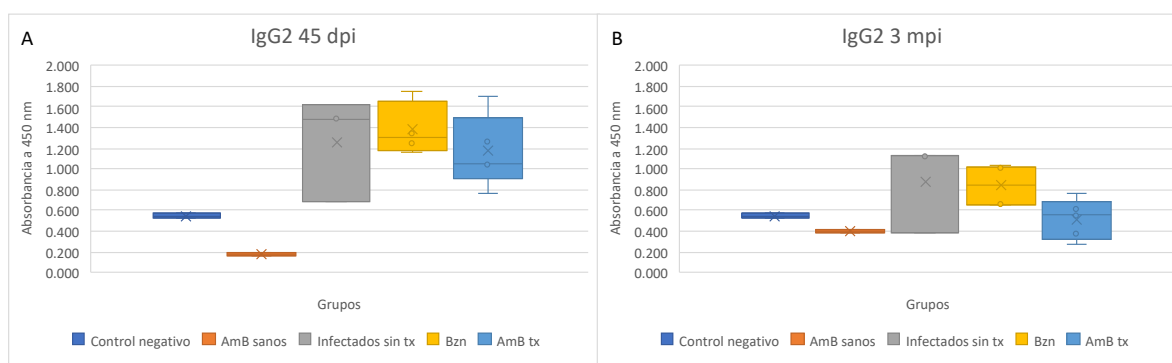


Figura 2. Niveles de IgG2 a los 45 dpi (A) y 3 mpi (B). Los títulos de anticuerpos en etapa aguda temprana y tardía fueron evaluados por ELISA (absorbancia en densidad óptica a 490 nm) en perros infectados con *T. cruzi* y tratados experimentalmente con AmB. Los valores representan el promedio de ensayos por duplicado \pm D.E. No se detectaron diferencias significativas en ningún grupo comparado con los grupos infectados o sanos (prueba estadística de Kruskal-Wallis).

Los resultados de las pruebas de ELISA para detectar la presencia de anticuerpos IgG1, lamentablemente no pudieron ser utilizados para su evaluación debido a la discrepancia de los datos obtenidos entre el grupo AmB sanos y el control negativo. Esto puede adjudicarse a un error al cargar la muestra en la placa, una mala aplicación de la técnica (lavados incorrectos) o a la contaminación del conjugado utilizado (anti-IgG1 canino).

Discusión

En este estudio se investigó la respuesta inmune de tipo humoral que desencadena un tratamiento con AmB en perros infectados experimentalmente con *T. cruzi* mediante la determinación de la producción de anticuerpos de tipo IgG y sus isotipos (IgG1 e IgG2). Para ello, fue necesario verificar que se llevó con éxito la infección mediante la observación de parásitos en sangre, y aunque durante la fase aguda de la enfermedad las cargas parasitarias suelen ser tan bajas, que incluso imposibiliten un diagnóstico de alta sensibilidad tal como lo mencionan Ramírez y colaboradores (2015), la observación directa del parásito constituye el diagnóstico definitivo.

• Parasitemia perros infectados con *T. cruzi*

Gutiérrez (2018) menciona que los tripomastigotes entran en las células, principalmente macrófagos, donde evaden al sistema inmune y se propagan por todo el organismo. La parasitemia aumenta constantemente a medida que se dan más y más ciclos de multiplicación intracelular, aumentando así el número de tripomastigotes circulantes y el daño a órganos blanco. La parasitemia pico ocurre en la fase aguda, aproximadamente entre los días 17-36 dpi, para dar paso a la fase crónica que puede prolongarse por años sin manifestaciones clínicas. Peña (2019) señala que en los perros la fase aguda, en la cual la parasitemia es elevada, dura entre 10 y 30 días, y puede prolongarse hasta los 42 días, y que, en la fase crónica de la enfermedad, la parasitemia disminuye drásticamente por la predominancia del parasitismo tisular. En el caso del estudio realizado por Arce-Fonseca y colaboradores (2013), en el que prueban vacunas de DNA con genes de *T. cruzi* para el control de la enfermedad de Chagas experimental en un modelo canino con perros de raza Beagle, la parasitemia fue detectada de los 22 dpi hasta los 51 dpi en los grupos infectados sin inmunización; mientras que aquellos grupos que recibieron la vacuna de DNA con genes de *T. cruzi* presentaron una parasitemia tardía y más corta (32 a 46 días post-infección).

Una de las razones por las que ya no se observaron parásitos en sangre a partir de los 26 dpi (en la mayoría de los casos, con o sin tratamiento anti-*T. cruzi*) sería la posible transición de la fase aguda a la fase crónica de la enfermedad de Chagas, donde baja la carga parasitaria circulante y disminuye

la probabilidad de confirmación por métodos parasitológicos directos en sangre periférica. Rodríguez-Morales y colaboradores (2012) evaluaron la parasitemia a través de la técnica de examen en fresco como método de observación directa, el cual tuvo como limitante su nivel de detección (200 a 400 parásitos por mL de sangre), lo que hace poco probable el hallazgo de formas parasitarias en una gota de sangre (aproximadamente 10-20 μ L) imposibilitando su cuantificación. Sin embargo, en el presente estudio esto se evitó realizando la técnica de concentración por *microstraut* la cual fue efectiva en el 100% de los casos aumentando el límite de detección hasta en un orden de magnitud.

El caso de Tika, individuo infectado y tratado con AmB, que presentó parasitemia negativa hasta los 43 dpi podría deberse a la variabilidad individual frente al fármaco, en la que cada individuo reacciona diferente a los tratamientos terapéuticos (Arribas, 2010). En estos casos la administración de un mismo medicamento a distintos pacientes supone que no todos responden de la misma forma, pudiendo convivir en una misma población desde pacientes con el máximo beneficio sin toxicidad alguna hasta pacientes sin ningún beneficio y máxima toxicidad, y que puede ser debido a causas farmacocinéticas (absorción, distribución, metabolización y excreción del medicamento) que pueden determinar diferentes intensidades y duraciones de la respuesta al fármaco o bien a causas farmacodinámicas (interacción fármaco-receptor), todo ello por determinantes genéticos, ambientales o patológicos, y depende también de la gravedad o intensidad de la enfermedad o síntoma que se desea tratar.

• Tratamiento con AmB

La AmB (Pisa®) en su formulación como desoxicolato de sodio está prescrita para una infusión de 2-6 horas, donde a mayor tiempo de infusión menor el riesgo de nefrotoxicidad, así como una dosis de 0.25-1.0 mg/kg/día, siendo la dosis máxima diaria de 1.0 mg/kg o hasta 1.5 mg/kg cuando se administra en días alternados en infecciones causadas por patógenos menos sensibles (Hoja técnica de Pisa®; Kahn, 2007). De acuerdo con estos datos, en el presente estudio, los perros Náhuatl recibieron infusiones con duración de 4 h promedio, y la dosis máxima usada en dos ejemplares fue >0.75 mg/kg administrada cada 72 h. En un estudio realizado por Hoeprich y colaboradores (1985) sobre la toxicidad de la administración crónica de AmB en perros mestizos, se comprobó

que una dosis de 1.25 mg/kg/día ocasionó la muerte de los sujetos de estudio después de 5-7 dosis con signos clínicos como vómito severo, hematemesis, diarrea con sangre, *shock* y colapso cardiovascular; modificando la dosis a 1.0 mg/kg en días alternados, la muerte de dos ejemplares se retrasó hasta los días 14 y 17 con signos clínicos similares; y la reducción a 0.75 mg/kg en días alternados posibilitó la administración de hasta 30 dosis (22.5 mg/kg dosis total) sin presentar signos clínicos severos; además, se suplementaron soluciones glucosadas y electrolitos en volúmenes de 500 a 1000 mL vía intravenosa cada que fue necesario en días sin tratamiento farmacológico. La mayoría de los perros Náhuatl del presente estudio, con o sin infección por *T. cruzi*, presentaron algunos de los signos descritos anteriormente (debilitamiento, vómito, diarrea profusa y anorexia) y en los individuos con dosis más altas de 0.75 mg/kg (Akatzin y Xipilli) se requirió de la observación clínica constante por la severidad de dichos signos.

De acuerdo con Arias-Yrazusta y colaboradores (2018) la velocidad de infusión de la AmB también está relacionada directamente con eventos clínicos adversos de gravedad moderada a elevada como fiebre, escalofríos, vómitos, cefalea, choque anafiláctico, arritmias, nefrotoxicidad irreversible e hipocalcemia grave; además, estos autores mencionan la existencia de reacciones adversas presentadas después de administraciones repetidas, incluyendo la hipocalcemia, la hipomagnesemia y la nefrotoxicidad. Por ello, dichos autores recomiendan realizar modificaciones en la forma de administración del fármaco para controlar los efectos adversos en cualquier modelo de investigación como: suministrar precargas salinas (descritas como protectoras de la función renal) y la infusión de la AmB en 24 horas. En este proyecto, los individuos con el tiempo de infusión más rápido, Akatzin y Xipilli (<4h), presentaron signos de moderados a graves como anorexia, vómito y diarrea profusa; asimismo, aquellos cuyo goteo aumentaba, por el movimiento de la venoclisis, presentaron vómito, disminución de la temperatura corporal y escalofríos, por lo que se tuvo sumo cuidado en mantener un goteo lento (menos de 30 gotas por min) durante el esquema de administración cada 72h, además de ajustar todas las dosis a <0.75 mg/kg en los siguientes ejemplares a ser tratados. Asimismo, se brindó una terapia de mantenimiento con 250mL de solución salina fisiológica, así como una dosis de furosemida posterior al tratamiento para evitar el daño renal.

Todos los individuos con terapia con AmB tuvieron cierto grado de daño renal; no obstante, también todos lograron reestablecer sus funciones normales; siendo el único caso severo Cualitzin (AmB sanos) con ocho años de edad (sujeto más longevo al que se le administró AmB), por lo que se atribuye a su edad avanzada la sensibilidad del fármaco y sus efectos adversos. Los resultados de Vargas (2009) muestran que la edad avanzada en perros, a partir de los 7 años, aumenta la posibilidad de padecer problemas renales puesto que sus órganos se van deteriorando. Sin embargo, se desconoce si existían infecciones concomitantes en el riñón de este ejemplar antes del tratamiento con AmB que influyeron en la complicación de su función renal.

Otro de los signos presentados por los individuos infectados fue el debilitamiento muscular; sin embargo, tal como lo reporta Barr (2009), este ha sido un signo observado en la mayoría de perros infectados con *T. cruzi*, el cual podría estar asociado a inmunosupresión con la consecuente severidad de la enfermedad de Chagas debido al tropismo que tiene el parásito hacia el tejido nervioso; por lo tanto, no se consideró como un síntoma adverso del tratamiento con AmB.

En el caso de los individuos tratados con Benznidazol, los efectos secundarios presentados no fueron determinantes para considerar la interrupción del tratamiento, tal como lo reportado por Arce-Vega y colaboradores (2017), donde solo los casos con reacciones severas como neuropatías, reacciones cutáneas graves, síntomas gastrointestinales, alteraciones del hemograma, función renal y/o hepática ameritaron la suspensión del tratamiento.

• **Anticuerpos anti *T. cruzi***

Coura-Vital y colaboradores (2008) mencionan que los anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* son producidos en la fase aguda de la enfermedad y reaccionan principalmente con moléculas de superficie de la forma infectiva de tripomastigote, y que la mayoría de los isotipos de IgG involucrados en la eliminación de las formas sanguíneas del parásito y en la disminución de las tasas de mortalidad, son IgG1 e IgG2. Asimismo, Basso (2013), menciona que diversos estudios han observado una protección del sistema inmune del hospedero asociado al incremento de IgG1 e IgG2, con menores niveles de IgG3

y que, respecto a la reducción de la parasitemia, se detectaron altos niveles de IgM e IgG, debido a que el papel protector de los anticuerpos en dicha fase está principalmente ligado a la capacidad de inducir la eliminación del parásito de la circulación sanguínea por su capacidad de formar microagregados que preparan al complemento e incrementen los mecanismos de opsonización y citotoxicidad. Esta información coincide con los datos del presente estudio, en el que se obtuvieron valores altos de IgG totales y del isotipo IgG2 para todos los grupos infectados a los 45 dpi (fase aguda temprana) y que en los grupos con tratamiento farmacológico (Benznidazol y AmB) dichos niveles podrían estar relacionados con la reducción de la parasitemia en fase aguda tardía y su posterior desaparición en la fase crónica. Por lo tanto, se sugiere que el tratamiento con AmB fue igualmente capaz de inducir una respuesta inmune humoral contra *T. cruzi* en fase aguda, al igual que el tratamiento con Benznidazol.

Romero (2015) sostiene que la AmB posee una acción proinflamatoria dado que es capaz de unirse a los receptores TLR-2 y TLR-4, activándolos y favoreciendo así la liberación de diversas citocinas y óxido nítrico (NO). Este último es de suma importancia puesto que Basso (2013) manifiesta que el NO ejerce su función citotóxica en *T. cruzi* afectando los factores de crecimiento por la nitrosilación en el grupo hemo, reduciendo su disponibilidad de hierro, y que además, es considerado el mediador soluble más importante producido por las células del sistema inmune puesto que los macrófagos, al reconocer los antígenos de los microorganismos a través de diferentes receptores, desencadenan la producción de mediadores inflamatorios induciendo la actividad de la enzima sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS); esta enzima es producida por las células presentadoras de antígeno y puede inhibir la expresión de moléculas de histocompatibilidad de clase II, lo que podría llevar a una disminución en la cantidad de inmunoglobulinas. Además, cuando las células efectoras son activadas por el estímulo inflamatorio, cantidades importantes de NO son sintetizadas y altas concentraciones inhiben la síntesis de IL-12 y la apoptosis, contribuyendo así a la regulación del balance entre las respuestas Th1 y Th2, lo cual favorece la proliferación de células T reguladoras durante la fase aguda de la infección.

Lo anterior se relaciona con lo reportado en el presente trabajo, donde a pesar de la disminución en la cantidad de inmunoglobulinas de los 45 dpi a los 3 mpi en todos los grupos, el tratado con AmB presentó la mayor disminución, incluso por debajo del control negativo, por lo que se tiene una seronegativización por parte de este grupo, situación que no se observa en individuos sin tratamiento o tratados con Benznidazol. Este panorama nos sugiere también que la respuesta inmune de los individuos tratados con Benznidazol y AmB podría estar polarizándose hacia una respuesta de tipo Th2, importante en la resolución de la fase aguda por la producción de anticuerpos líticos contra las formas circulantes de *T. cruzi* a través de una respuesta inmune humoral activa, misma que hubiera podido corroborarse con la determinación del isotipo IgG1.

Por otro lado, estos resultados obtenidos además explicarían el daño renal moderado en los individuos tratados con AmB, independientemente de la susceptibilidad mostrada por un individuo. Dicho daño renal estaría causado probablemente por la concentración excesiva de residuos nitrogenados (NO) mediados por AmB.

Sin embargo, niveles bajos de inmunoglobulinas a los 3 mpi (fase aguda tardía) no muestra una mala respuesta inmune, sino que advierte una respuesta orientada a la inmunidad celular. Buxbaum y Hof (2013) enfatizan que los niveles de inmunoglobulinas son el resultado de una compleja interacción entre células presentadoras de antígeno, células T y células B, por tal razón, la variación a través del tiempo con sus respectivas tendencias al aumento o disminución de ciertos isotipos depende del sistema inmunológico del individuo, de la gravedad de la enfermedad y del fármaco elegido para tratarla.

Por todo lo anterior se necesitan más estudios integrales de las respuestas humoral y celular donde se evalúe una batería más amplia tanto de de inmunoglobulinas como de citocinas para detallar con mayor precisión el efecto de la AmB sobre la respuesta inmune en la infección por *T. cruzi*, y proyectarla como terapia potencial contra la enfermedad de Chagas.

Conclusiones

- No obstante que el tratamiento con AmB induce la disminución de la cantidad de inmunoglobulinas del tipo IgG, se favorece la liberación de otros compuestos que favorecen la respuesta mediada por las células T.
- El tratamiento terapéutico con AmB contra la enfermedad de Chagas podría resultar beneficioso. Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar el reposicionamiento exitoso de este fármaco.
- Se recomienda esta nueva opción terapéutica para uso veterinario contra *T. cruzi*, con ciertas recomendaciones en pacientes nefróticas, e incluso sanos, como el monitoreo constante del funcionamiento renal en el tiempo que dure el tratamiento.

Referencias

1. Arce-Fonseca, M., Ballinas-Verdugo, M. A., Zenteno, E. R., Suárez-Flores, D., Carrillo-Sánchez, S. C., Alexandre-Aguilar, R.,...Rodríguez-Morales, O. (2013). Specific humoral and cellular immunity induced by *Trypanosoma cruzi* DNA immunization in a canine model. *Veterinary Research*, 44(15).
2. Arce-Fonseca, M., Carrillo-Sánchez, S. C., Molina-Barrios, R. M., Martínez-Cruz, M., Cedillo-Cobián, J. R., Henao-Díaz, Y. A., y Rodríguez-Morales, O. (2017). Seropositivity for *Trypanosoma cruzi* in domestic dogs from Sonora, Mexico. *Infectious Diseases of Poverty*, 6(120), 1-7. DOI: 10.1186/s40249-017-0333-z.
3. Arce-Vega, R., Ángeles-Llerenas, A., Villegas-Trejo, A. y Ramos, C. (2017). Adherencia al tratamiento terapéutico en pacientes con enfermedad de Chagas del Estado de Morelos. *Revista biomédica*, 28(1). Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-84472017000100004&lang=pt.
4. Arias-Yrazusta, P. A., Torales, G., Samudio, G. y Real, C. M. (2018). Efectos adversos de anfotericina B desoxicolato en neonatos del Hospital Nacional de Itauguá. *Rev. Nac. (Itauguá)*, 10(1). Recuperado de http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2072-81742018000100017.
5. Arribas, I. A. (2010). Farmacogenética y variabilidad interindividual en la respuesta a los medicamentos. *Discurso de contestación del académico J. López*. Academia de farmacia "Reino de Aragón", Zaragoza, Reino de Aragón.
6. Bar, M. E., Oscherov, H. B., Damborsky, M. P. y Borda, M. (2010). Epidemiología de la tripanosomiasis americana en el norte de corrientes. *Medicina*, 70(2), 133-138.
7. Barr, C.S. (2009). Canine Chagas Disease (American Trypanosomiasis) in North America. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, 39(1), 1055–1064.
8. Basso, B. (2013). Modulation of immune response in experimental Chagas disease. *World Journal of Experimental Medicine*, 3(1), 1-10.
9. Buxbaum, J. D. y Hof, P. R. (2013). *The Neuroscience of Autism Spectrum Disorders*. Oxford, United Kingdom: Elsevier Science & Technology.
10. Brunton, L. L. (Ed). (2007). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. D.F., México: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C. V.
11. Calvopina, M., Segovia, G., Cevallos, W., Vicuña, Y., Costales, J.A., Guevara, A. (2020). Fatal acute Chagas disease by *Trypanosoma cruzi* DTU Tcl, Ecuador. *BMC Infect Dis.*, 20(1), 143. doi: 10.1186/s12879-020-4851-0.
12. Coura-Vital, W., Carneiro, C. M., Martins, H. R., De-Lana, M., Veloso, V. M., Teixeira-Carvalho, A., ...Reis, A. B. (2008). *Trypanosoma cruzi*:

- Immunoglobulin isotype profiles during the acute phase of canine experimental infection with metacyclic or blood trypomastigotes. *Experimental Parasitology*, 120(1), 269-274.
13. Cruz, F. S., Marr, J. J. y Berens, R. L. (1980). Prevention of Transfusion-Induced Chagas' Disease by Amphotericin B. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29(5), 761-765. DOI: 10.4269/ajtmh.1980.29.761.
 14. De Fuentes-Vicente, J. A., Cabrera-Bravo, M., Enríquez-Vara, J. N., Bucio-Torres, M. I., Gutiérrez-Cabrera, A. E., Vidal-López, D. G., ...Córdoba-Aguilar, A. (2016). Relationships between altitude, triatomine (*Triatoma dimidiata*) immune response and virulence of *Trypanosoma cruzi*, the causal agent of Chagas' disease. *Medical and Veterinary Entomology*. 1-9. DOI: 10.1111/mve.12198
 15. Fuentes, R., Maturana, M. y De la Cruz, R. (2012). Eficacia de nifurtimox para el tratamiento de pacientes con enfermedad de Chagas crónica. *Rev. Chil. Infect.*, 29(1), 82-86.
 16. Gutiérrez, A. C. (2018). Evaluación de parasitemia, serología, electrocardiografía, ecocardiografía y radiografía en su fase crónica en perros infectados experimentalmente de la Enfermedad de Chagas (Tesis de maestría). Universidad Autónoma del Estado de México, México.
 17. Hoepfich, P. D., Huston, A. C., y Wolfe, B. M. (1985). Toxicity of amphotericins on chronic administration to mongrel dogs. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 3(1), 47-58.
 18. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. (2015). *Lineamientos para la vigilancia epidemiológica de la enfermedad de Chagas por laboratorio*. México. Versión No.1. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.
 19. Khan, C. M. (2007). Manual Merck de Veterinaria. Sexta edición, editorial Oceano/Centrum, Barcelona, España.
 20. Medina-Franco, J. L., Fernández-de Gortari, E. y Naveja, J. J. (2015). Avances en el diseño de fármacos asistido por computadora. *Educación Química*, 26, 180-186.
 21. Ministerio de Salud. (2010). *Guías de Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de la Enfermedad de Chagas*. Chile: Ministerio de salud.
 22. Muñoz-Calderón, A., Santaniello, A., Pereira, A., Yannuzzi, J., Díaz-Bello, Z. y Alarcón de Noya, B. (2012). Susceptibilidad *in vitro* a Nifurtimox y Benznidazol de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de pacientes venezolanos con enfermedad de Chagas infectados por mecanismos de transmisión oral y vectorial. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.*, 71(1), 14-22.
 23. Navarro, J., Ramírez, R. y Villagrán, C. (2012). *Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales*. México: Samsara Editorial.
 24. NOM-062-ZOO-1999. (2001). NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los

- animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
25. NOM-033-SAG/ZOO-2014. (2015). NORMA Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. Diario Oficial de la Federación, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
 26. Palmezano, J. M., Plazas, L. K., Rivera, K. E. y Rueda, V. P. (2015). *Enfermedad de Chagas: realidad de una patología frecuente en Santander, Colombia. Médicas UIS, 28(1), 81-90.*
 27. Peña, A. (2019). Enfermedad de Chagas en perros: una revisión (Tesis de Licenciatura). Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, Bogotá, Colombia.
 28. Ramírez, J. C., Cura, C. I., Da Cruz, O., Lages-Silvia, E., Juiz, N., Velázquez, E., ...Schijman, A. G. (2015). Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *J Mol Diagn., 17(5), 605–615.*
 29. Rodríguez-Morales, O., Pérez-Leyva, M. M., Ballinas-Verdugo, M. A., Carrillo-Sánchez, S. C., Rosales-Encina, J. L., Alexandre-Aguilar, R., Reyes, P. A. y Arce-Fonseca, M. (2012). Plasmid DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* genes induces cardiac and clinical protection against Chagas disease in the canine model. *Veterinary Research, 43(79)*. DOI: 10.1186/1297-9716-43-79.
 30. Rolón, M., Serrano, D., Lalatsa, A., De Pablo, E., Torrado, J. J., Ballesteros, M. P., ...Dea-Ayuela M. A. (2017). Engineering Oral and Parenteral Amorphous Amphotericin B Formulations against Experimental *Trypanosoma cruzi* Infections. *Molecular Pharmaceutics 14(4), 1095-1106*. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b01034
 31. Romero, E. (2015). La anfotericina B en el tratamiento de la *Leishmaniosis* (Tesis de licenciatura). Universidad Complutense de Madrid, España.
 32. Salazar-Schettino, P. M., Bucio-Torres, M. I., Cabrera-Bravo, M., De Alba-Alvarado, M. C., Castillo-Saldaña, D. R., Zenteno-Galindo, E. A., ...Perera-Salazar, M. G. (2016). Enfermedad de Chagas en México. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM, 59(3) 6-16.*
 33. Salazar-Schettino, P. M., Bucio, M., Cabrera, M. y Ruiz, A. L. (2011). Presentación de dos casos de enfermedad de Chagas aguda en México. *Gaceta Médica de México, 147, 63-69.*
 34. Saldívar-González, F., Prieto-Martínez, F. D. y Medina-Franco, J. L. (2017). Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación Química, 28, 51-58.*
 35. Secretaria de Salud. (2014). *Prevención y control de la Enfermedad de Chagas*. México. Primera edición. Programa Sectorial de Salud 2013-2018.

36. Serrano, A. (2009). Células colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. *Reumatología clínica*, 5(51), 1-5
37. Snowden, K. y Kjos S. (2016). American Trypanosomiasis. *Veterinarian Key*, capítulo 72. [En línea]. Disponible en: <https://veteriankey.com/trypanosomiasis-3/> [Accesado el día 29 de mayo de 2020].
38. Turriago, B. C., Vallejo, G. A. y Guhl, F. (2008). Seroprevalencia de *Trypanosoma cruzi* en perros de dos áreas endémicas de Colombia. *Revista Med.*, 16(1), 11-18.
39. Universidad Nacional Autónoma de México, (2018). “Enfermedad de Chagas” en *Departamento de Microbiología y parasitología: recursos de Parasitología*. [En línea]. México, disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trypanosomiasis.html> [Accesado el día 5 de mayo de 2018].
40. Valenzuela, G., Sánchez-Rubio, R. M., Plascencia, A., Soto, L. A. y Grau, I. (2015). El perro (*Canis familiaris*) como modelo animal en estudios con implantes dentales: Revisión bibliográfica actualizada. *Revista ADM*, 72(3), 139-145.
41. Vargas, T. M. (2009). Detección de alteraciones renales subclínicas mediante ultrasonografía y urianálisis en pacientes caninos del Hospital de Especies Menores y Silvestres de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (Tesis Licenciatura). Universidad Nacional Facultad de Ciencias de la Salud, Costa Rica.
42. Yardley, V. y Croft, S. (1999). *In vitro* and *in vivo* activity of Amphotericin B-lipid formulations against experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(2), 193–197.
43. Zingales B. (2018). *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*. 184(1), 38-52.