

Diagnóstico y genotipificación de tripanosomátidos en perros de una comunidad rural de la provincia de Panamá Oeste, Panamá

Diagnosis and genotyping of trypanosomatids in dogs from a rural community in the province of Panama Oeste, Panama

Krislly R. Ramírez¹, Vanessa Pineda², Vanessa Vásquez³, Azael Saldaña⁴

¹Universidad de Panamá, Facultad de Medicina, Centro de Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Parasitarias, Panamá; krislly.ramirez@up.ac.pa; <https://orcid.org/0000-0002-7384-9334>

²Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Departamento de investigaciones en Parasitología, Panamá; vpineda@gorgas.gob.pa; <https://orcid.org/0000-0002-2847-2419>

³Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Departamento de investigaciones en Parasitología, Panamá; vasquez@gorgas.gob.pa; <https://orcid.org/0000-0002-5589-7527>

⁴Universidad de Panamá, Facultad de Medicina, Centro de Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Parasitarias, Panamá; azael.saldana@up.ac.pa; <https://orcid.org/0000-0002-5653-1332>
DOI: <https://doi.org/10.48204/j.vian.v7n1.a3921>

Fecha de recepción: 14 de marzo de 2023

Fecha de aceptación: 04 de mayo de 2023

Resumen: El perro doméstico es huésped de una gran variedad de parásitos, muchos de los cuales pueden también causar enfermedad en el humano. En este estudio, se evaluó la infección con tripanosomátidos de importancia médica en 91 perros de la comunidad rural de Las Pavas, provincia de Panamá Oeste. Para esto se utilizaron metodologías parasitológicas (hemocultivo y xenodiagnóstico), serológicas (western blot, inmunofluorescencia indirecta y pruebas inmunocromatográficas comerciales) y moleculares (PCR) durante el diagnóstico de las infecciones con *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli*. Los resultados sugieren que las infecciones con *Leishmania* spp. no son frecuentes en estos animales. No obstante, se encontró que las infecciones con *T. cruzi* y *T. rangeli* son prevalentes en un 28.5% y 15.3% respectivamente, con un índice global de infección por tripanosomas de 42.8% (39/91). Ocho perros presentaron una infección mixta con *T. cruzi*/*T. rangeli*. El genotipo de *T. rangeli* presente en los perros evaluados fue caracterizado como KP1-, el cual se vincula con el vector *Rhodnius pallescens* y es además el único grupo genético de este parásito hasta ahora reportado en Panamá. Se confirma la utilidad del perro doméstico como centinela epidemiológico para la infección con estas especies de tripanosomas.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Leishmania*, perro, diagnóstico.

Abstract: The domestic dog serves as a host for a wide variety of parasites, many of which can also cause disease in humans. In this study, infection with trypanosomatids of medical importance was evaluated in 91 dogs from the rural community of Las Pavas, Panama Oeste province. Parasitological (blood culture and xenodiagnosis), serological (western blot, indirect immunofluorescence and commercial immunochromatographic tests) and molecular (PCR) methodologies were used during the diagnosis of infections with *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. The results suggest that infections with *Leishmania* spp. are not frequent in these animals. However, infections with *T. cruzi* and *T. rangeli* were found to be prevalent at 28.5% and 15.3%, respectively, with an overall trypanosome infection rate of 42.8% (39/91). Eight dogs had mixed infection with *T. cruzi*/*T. rangeli*. The genotype of *T. rangeli* present in the evaluated dogs was characterized as KP1-, which is linked to the vector *Rhodnius pallescens* and is also the only genetic

group of this parasite so far reported in Panama. The usefulness of the domestic dog as an epidemiological sentinel for infection with these trypanosome species is confirmed.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Leishmania*, dog, diagnosis.

1. Introducción

Diferentes especies de parásitos protozoarios del orden cinetoplástita han sido demostrados en mamíferos silvestres y domésticos de Panamá (Restrepo et al., 2013; Sousa, 1971). Algunos de estos tripanosomátidos pueden ser transmitidos al hombre y producir patologías serias, como la enfermedad de Chagas causada por *Trypanosoma cruzi* y la leishmaniasis cutánea ocasionada por especies de parásitos del género *Leishmania* (Torrice et al., 2013; Valderrama et al., 2014). Además, es frecuente la infección de estos reservorios con *Trypanosoma rangeli*, un parásito no patógeno para los seres humanos, pero de gran interés biológico, epidemiológico e inmunológico en áreas donde la enfermedad de Chagas es endémica (Vallejo et al., 2015). El ciclo biológico de los tripanosomátidos involucra una alternancia de generaciones entre un insecto vector y un hospedero vertebrado (Maia da Silva et al., 2007). Por lo general, estos vectores tienen como hábitat principal ambientes boscosos o tipos de vegetación particulares como las “palmas reales” en el caso de *Rhodnius pallescens*, principal vector de *T. cruzi* y *T. rangeli* en Panamá (Perea et al., 2021; Romaña et al., 1999). La cercanía de las viviendas humanas a estos escenarios silvestres promueve la aproximación de los vectores al ambiente peridoméstico y doméstico (Hurtado et al., 2014), lo que se vincula frecuentemente con la transmisión de estas infecciones al ser humano, pero también conlleva la infección de animales domésticos y con ello el potencial establecimiento de los ciclos biológicos de estos parásitos en el entorno familiar (Calzada et al., 2015; Fung et al., 2014). Estudios previos realizados en otras regiones del continente, sugieren que los cánidos intervienen en el ciclo de transmisión doméstico de estos hemoflagelados (Montenegro et al., 2002; Tome et al., 2011). En Panamá se ha reportado la infección con tripanosomátidos en perros de zonas endémicas para la EC y LT (Calzada et al., 2015; Pineda et al., 2011), sin embargo, aún no se define totalmente si actúan como reservorios o huéspedes accidentales de estos hemoparásitos (Calzada et al., 2015; Pineda et al., 2011; Saldaña et al., 2015). El objetivo de

esta investigación fue diagnosticar y genotipificar los tripanosomátidos presentes en perros de una comunidad rural de la provincia de Panamá Oeste y determinar por medio de una encuesta las características epidemiológicas que se relacionan con los casos de cánidos infectados en esta región.

2. Materiales y métodos

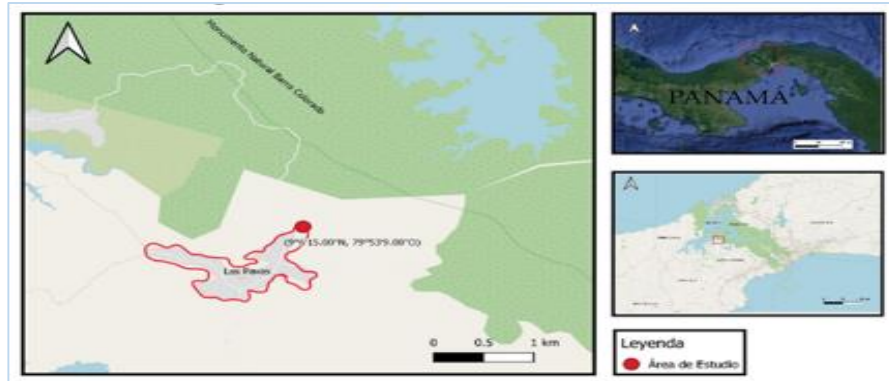
El estudio se realizó en la comunidad rural de Las Pavas, (9°6_15N, 79°53_9W), distrito de La Chorrera, provincia de Panamá Oeste. Figura 1. La misma se encuentra en una región considerada endémica para las infecciones humanas con *T. cruzi*, *T. rangeli* y *Leishmania* spp. Se evaluó la infección con *T. cruzi*, *T. rangeli* y *Leishmania* spp. en 91 perros (*Canis lupus familiaris*).

Inicialmente, mediante una encuesta realizada a los dueños de los perros, se registraron las características generales de las viviendas (techo, paredes, piso, etc.) y ambiente peridoméstico (presencia y tipo de vegetación, estructuras secundarias, ordenamiento, etc).

Posteriormente, se tomó una muestra de 2-4 ml de sangre de la vena cefálica de cada animal. La muestra de sangre se dividió en dos alícuotas, 1.0 ml fue mezclado con EDTA y 2-3 ml se pasaron a tubos sin anticoagulante. La muestra con EDTA fue utilizada para la extracción del ADN total, el mismo se utilizó para la realización de las pruebas moleculares. Las muestras de sangre sin anticoagulante se utilizaron para las pruebas serológicas y hemocultivos. Para esto, cada muestra fue centrifugada a fin de obtener la fracción de suero, el cual se recolectó y se almacenó a -20°C para su posterior uso en análisis serológicos. La sangre remanente (incluyendo el coágulo) se utilizó en hemocultivos para tripanosomátidos siguiendo los procedimientos descritos por (Flores-Chávez et al., 2007 y Sousa, 1971).

Figura 1

Mapa de localización de la zona de estudio, comunidad de las Pavas, Panamá Oeste



Fuente: Sistema de información geográfica.

- **Estudios Serológicos**

El diagnóstico serológico se realizó mediante diferentes pruebas, para la detección de anticuerpos específicos para cada parásito: Una prueba rápida para *T. cruzi*, (RDT): Dipstick test *T. cruzi* Detect, (Inbios, Seattle, WA), según el protocolo descrito por (Lorca et al., 2008); una prueba rápida para la detección de anticuerpos anti-Leishmaniasis visceral en perros TR DPP® (Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, 2020). Adicionalmente se utilizó una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) según el protocolo descrito por (Vásquez et al., 2011). Para esta prueba de IFI se utilizaron como antígeno epimastigotes de un aislado de *T. cruzi* (Aislado 1551 A, Arraiján, Burunga/*Rhodnius pallescens*), de *T. rangeli* (PL 18-03 Capira, Lidice/*Choloepus hoffmanni*) y promastigotes de *Leishmania* spp. del aislado MHOM/PA/1971/LS94, provenientes del cepario del Departamento de Investigaciones en Parasitología del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES). Para la detección en la IFI se empleó un conjugado de fluroceina-anticuerpos de conejo anti-IgG (H+L) de perro (Jackson Immuno Reserch). Se realizaron también pruebas de Western Blot utilizando los antígenos antes referidos, esto según el protocolo descrito por (Saldaña et al., 1995). Para este análisis se usó un conjugado peroxidasa-anticuerpos de conejo anti-IgG (molécula completa) de perro (Sigma. Aldrich).

Las muestras se consideraron positivas cuando mostraron reactividad en al menos dos de las pruebas serológicas utilizadas.

- **Estudios Parasitológicos**

- Hemocultivos**

El hemocultivo de las muestras de sangre se realizó según lo descrito por (Vásquez et al., 1997). Los tripanosomas aislados se identificaron mediante observación microscópica y posteriormente por pruebas moleculares. El tiempo para considerar la prueba negativa sin presencia de parásitos fue de 60 días.

- Xenodiagnóstico**

Posterior a la toma de sangre de los perros, se les realizó un xenodiagnóstico, según lo descrito por (Flores-Chaves et al., 2007). Para esto se utilizaron 10 triatominos por perro (*R. pallescens* de 4to y 5to estadio), procedentes del insectario del Centro de Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Parasitarias (CIDEP), Facultad de Medicina, Universidad de Panamá. Una muestra del contenido intestinal de estos triatominos se revisó semanalmente por microscopia. Los triatominos que resultaron positivos a la presencia de flagelados se utilizaron para realizar los análisis de PCR durante la identificación y caracterización de *T. cruzi* / *T. rangeli*.

- **Estudios Moleculares**

- Extracción de ADN**

La extracción del ADN total de las muestras sanguíneas de cada perro se realizó de acuerdo con las instrucciones del kit de purificación QIA amp[®] DNA Blood cat # 51106. Una vez completada la búsqueda de parásitos por xenodiagnóstico, los triatominos utilizados en cada animal fueron divididos en dos grupos de cinco insectos (2 pools) y también procesados para la extracción del ADN del contenido intestinal utilizando el kit de extracción Wizard[®] Genomic DNA purification Kit de Promega catálogo # A1120. El ADN obtenido de cada grupo fue colocado en un microtubo de 1.5 ml que contenía 500 µl de PBS (Pavia et al., 2007).

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *T. cruzi* y *T. rangeli***

Todas las muestras de ADN extraídas de sangre y del contenido intestinal de triatominos (xenodiagnóstico), fueron analizadas por PCR para la región variable del minicírculo (ADNk) con los cebadores (S35 Y S36) los cuales amplifican una secuencia

repetida de este parásito de 330 pb para *T. cruzi* y 460/750 pb para *T. rangeli*, según el protocolo descrito por (Vallejo et al., 1999). Posteriormente, se realizó una PCR en un termociclador SimpliAMP Thermal Cycler, Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, con los cebadores específicos S35 (5'-AAATAATGTACGGGKGA- GATGCATGA-3') y S36 (5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA-3') utilizando 5µl de ADN en un volumen final de 50 µl de reacción.

Además, todas las muestras de este estudio fueron analizadas por un PCR para el gen, snoRNA-cl1 con los cebadores (TrF y TrR2), según el protocolo descrito por (Morales et al., 2002). Estos cebadores amplifican una secuencia repetida de 620 pb específica para *T. rangeli*. La reacción de PCR se realizó en un termociclador SimpliAMP Thermal Cycler, Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, con los cebadores específicos TrF (5'-CGCCCCGTCTTG CCCTGT-3') and TrR2 (5'-CGCAGCAAGGACAG GAGGGA-3') utilizando 5µl de ADN en un volumen final de 25µl de reacción.

El diagnóstico de la infección con *Leishmania (Viannia) spp.* para todas las muestras de ADN sanguíneo se basó en el protocolo descrito originalmente por (Passos et al., 1999), el cual utiliza los cebadores (B1 y LV), que amplifican para una región variable del ADNk de este subgénero de 750 pb. Se realizó una PCR en un termociclador SimpliAMP Thermal Cycler, Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, con los cebadores específicos [5'-GGG(G/T) AGGGGCGTTCT (G/C) CGAA-3' and 5'-(G/C) (G/C) (G/C) A/C) CTA T (A/T) TTACACCAACCCC-3'], utilizando 5µl de ADN en un volumen final de 50 µl de reacción.

Caracterización de aislados de *T. cruzi* según el genotipo (UDTs) del parásito

Las muestras con resultados positivos para la infección por *T. cruzi* fueron evaluadas a fin de determinar la Unidad Discreta de Tipificación (UDTs) del parásito. Para esto se utilizaron dos metodologías, un PCR que amplifica la región intergénica del gen miniexon de *T. cruzi* según el protocolo descrito por (Souto et al., 1996), utilizando los cebadores TC 1: 5'-GTGTCCGCCACCTCCTTCGGGCC, TC2: CCTGCAGGCACA- CGTGTGTGTG, TC: 5'-CCCCCTCCCAGGCCCACTG. Se utilizaron 5 µl de ADN para un volumen final de 25 µl de reacción, los productos de amplificación esperados eran de 300 pb para TC1 y 350 pb para TC2 y un segundo RTPCR diseñado para la tipificación de los genotipos *T. cruzi* (TcI- TcVI),

que amplifica la región intergénica (SL-IR) descrito por (Cura et al., 2015). En esta prueba se incluyeron los aislados de control SF1, Tulahuén, PG/ PL014/RT35/Pt04, utilizando sondas TaqMan (MTq-PCR) con los siguientes oligonucleótidos:

UTCC-Fw: (5' CAGTTTCTGTACTATATTGGTACG 3') concentración 0.5 μ M., TcI-Rv: (5' CGATCAGCGCCACAGAAAGT 3') concentración 0.5 μ M., TcII/V/VI-Rv: (5' GGAAAACACAGGAAGAAGC 3') concentración 0.5 μ M., TcIII-Rv: (5' CATT TTTATGAGGGGTTGTTTCG 3') concentración 0.5 μ M., TcI (probe): (FAM-CTC+CTTC+AT+GTT+TGT+GTCG-BHQ1) concentración 0.1 μ M., TcII/V/VI (probe): (HEX-TATA+CC+CATATA+TATA+TA+GC-BHQ1) concentración 0.05 μ M., TcIII (probe): (Quasar670-AATCGCG+TGTATGCACCGT-BHQ3) concentración 0.05 μ M. Para una reacción de 25 μ l, utilizando un equipo Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 Real-Time PC.

Genotipificación de los aislados de *T. rangeli* y *T. cruzi* basado en la amplificación de la subunidad 2 del gen del citocromo oxidasa.

En aquellas muestras con resultados positivos a *T. cruzi* o *T. rangeli* también se procedió a la genotipificación de las respectivas especies utilizando el protocolo descrito por (De Sá et al., 2013). El mismo se basa en la amplificación de la subunidad 2 del gen del citocromo oxidasa (COII-RFLP), usando la enzima AluI para la detección simultánea de *T. rangeli* (KP1+/ KP1-) y *T. cruzi* (UDT I – UDT VI). Se emplearon los cebadores Tcmit-10 (5'-CCA TAT ATT GTT GCA TTA TT-3') y Tcmit-21 (5'-TTG TAA TAG GAG TCA TGT TT-3'), utilizando 5 μ l de ADN para un volumen final de 50 μ l de reacción. Los productos finales se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio (Ethidium Bromide Solution, Molecular Grade catalogo # H5041). Posterior a la electroforesis los geles se evaluaron con luz ultravioleta para detectar los fragmentos sin digerir de 400pb. Luego de digerirla con la enzima Alu I, para *T. rangeli* la digestión del amplicón COII de aislados de *T. rangeli* del genotipo KP1- debe generar un fragmento de aproximadamente 400 pb. Los geles fueron observados con la ayuda de un equipo de análisis de imágenes (UVP BioDoc- It™ System). Para cada reacción se incluyeron controles positivos y negativos.

3. Resultados

El presente estudio se realizó en la comunidad de Las Pavas, localizada en una zona rural de la provincia de Panamá Oeste, en donde han sido reportados casos humanos de enfermedad de Chagas y leishmaniasis cutánea (Perea et al., 2021; Pineda et al., 2011). El perro es el mamífero doméstico más común en esta comunidad, pudiendo servir eventualmente como fuente de alimentación (sangre), para los vectores de hemoflagelados tripanosomátidos que se aproximen a las viviendas. Con la finalidad de diagnosticar y caracterizar los tripanosomátidos de importancia médica que infectan los cánidos domésticos de la comunidad de Las Pavas se analizaron un total de 91 perros los cuales se sometieron a análisis parasitológicos directos, inmunológicos y moleculares. Estas pruebas revelaron que 26 perros (28.5%) fueron positivos para *T. cruzi*, 14 perros (15.3%) para *T. rangeli* y 0 perros (0%) para *Leishmania* spp. , tabla 1. Una sola muestra fue positiva para *T. rangeli* tanto en hemocultivo como en xenodiagnóstico.

Tabla 1

Anticuerpos contra Trypanosoma cruzi y Trypanosoma rangeli en perros de la comunidad de Las Pavas, Panamá Oeste

Las Pavas	n	Frecuencia de Anticuerpos		
	91	<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i>	<i>Leishmania</i> spp.
		28.5%	15.3%	0%

Fuente: Los Autores.

De las 91 muestras analizadas por PCR, 1.09% (1/91) fue encontrada positiva para *T. cruzi*, 4.39% (4/91) resultaron positivos para *T. rangeli* y 0 % para *Leishmania (Viannia)*. Los resultados obtenidos se describen en la tabla 2, figura 2 y 3.

Tabla 2

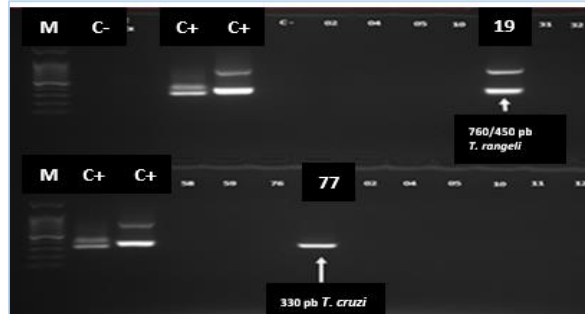
Detección por PCRs de T. cruzi/T. rangeli en perros, de la comunidad de las Pavas, Panamá Oeste

Muestras con ADN de tripanosomátidos detectados por PCR	<i>T. cruzi</i> Cebadores S35/S36	<i>T. rangeli</i> Cebadores S35/S36	<i>T. rangeli</i> Cebadores TrF/ TrR2
LP – 19 Sangre		Positivo (760/450 pb)	
LP – 73X (Triatomino usado en Xenodiagnóstico)		Positivo (760/450 pb)	Positivo 620pb
LP - 77 Sangre	Positivo (330 pb)		
LP - 82 X (Triatomino usado en Xenodiagnóstico)		Positivo (760/450 pb)	
LP - 90 X (Triatomino usado en Xenodiagnóstico)		Positivo (760/450 pb)	Positivo 620 pb

Fuente: Los Autores.

Figura 2

Análisis por PCR para muestras de cánidos, de la comunidad de las Pavas utilizando los Cebadores S35/S36

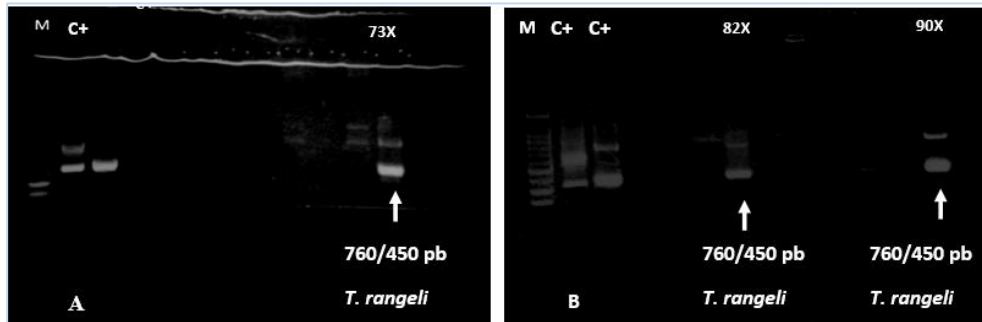


Fuente: Los Autores.

M: Marcador de peso molecular, C-: Control negativo C+: Control positivo (*T. cruzi*, *T. rangeli*, 19: LP19 Positiva para *T. rangeli*, 77 : LP 77 positiva para *T. cruzi*.

Figura 3

Análisis por PCR (S35/S36) de triatominos utilizados en xenodiagnóstico de cánidos, comunidad de Las Pavas



Fuente: Los autores.

A: Carriles M: Marcador de peso molecular, C+: Control positivo (*T. cruzi*, *T. rangeli*, C-: Control negativo 73 X: LP- 73 Triatominos- xenodiagnóstico – positivo *T. rangeli*, B: M: Marcador de peso molecular 82X: LP- 82 y 90X: LP – 90 Triatominos xenodiagnóstico-positivos para *T. rangeli*.

La tipificación (UDTs) de la muestra LP- 77, que mostró un resultado positivo por PCR convencional (ADNk), no fue posible. Dos muestras positivas para *T. rangeli* fueron tipificadas, determinando que el genotipo de *T. rangeli* presente en ambas muestras fue KP1-, como se muestra en la tabla 3, figura 4 y 5.

Tabla 3

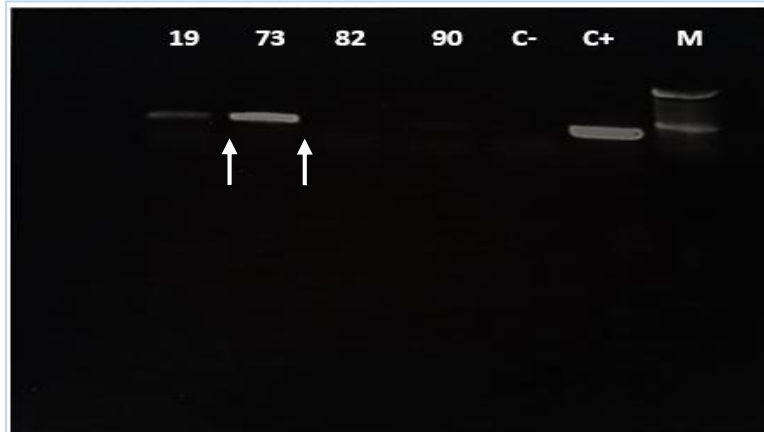
Genotipificación de los aislados de T. rangeli o T. cruzi basado en la amplificación de la sub unidad 2 del gen del citocromo oxidasa

Muestra	UDTs <i>T. cruzi</i>	Grupo genético <i>T. rangeli</i>
LP-19		KP1 -
LP- 73		KP1 -
LP-77	No amplificó	
LP- 82		No amplificó
LP-90		No amplificó

Fuente: Los Autores.

Figura 4

Genotipificación de los aislados de T. rangeli basado en la amplificación de la sub unidad 2 del gen del citocromo oxidasa (COII-RFLP)



Fuente: Los autores.

Carriles 19: LP19 positivo para *T. rangeli*, 73: LP- 73 Triatominos- xenodiagnóstico – positivo *T. rangeli*, 82 y 90: LP-82 – LP 90 Triatominos- xenodiagnóstico – negativos *T. rangeli*, C-: Control negativo, C+: Control positivo, M: marcador de peso molecular.

Figura 5

Genotipificación por digestión del amplicón COII para las cepas de T. rangeli KP1-



Fuente: Los autores.

Carriles 19: LP-19 *T. rangeli* (KP1 -), 73: LP- 73 *T. rangeli* (KP1 -), C+r: Control positivo de *T. rangeli*, M: Marcador molecular.

De las 83 encuestas que se aplicaron a los jefes de familia, el 100% de los entrevistados confirmó poseer al menos 1 perro por vivienda. Se reportó que el 95.1% (79/83) de los perros permanece fuera de las casas la mayoría del tiempo y que un 57.8% (48/83)

incursionaba con frecuencia al bosque o “montes” cercano. Según sus dueños, un 36.1% (30/83) de los perros independientemente cazaban animales silvestres, entre los que se destacan en orden de frecuencia armadillos, zarigüeyas y conejos. Los dueños de los perros evaluados reportaron que el 95.1% (79/83) residían en viviendas construidas parcialmente con techos de hojas de palmas (pencas), 75.9% (63/83) con piso de madera y 95,1% (66/83) con paredes de adobe/quincha o madera. El 67.4% (56/83) de estas viviendas disponían de electricidad como fuente de iluminación. Además, el 51.8% (43/83) de los entrevistados reportaron la presencia de palmas reales en el área domiciliar cercana. Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre las variables que describen las condiciones de la vivienda (tipo de piso, tipo de pared) y las variables ambientales y peridomiciliares (visita de perros al bosque, presencia de gallineros y cocina con leña) y los casos positivos por *T. cruzi* y/o *T. rangeli* con una $p < 0.05$.

4. Discusión

La enfermedad de Chagas y la leishmaniasis cutánea son infecciones parasitarias endémicas en muchas regiones rurales de Panamá, incluyendo las áreas aledañas a la ribera oeste del canal de Panamá (Perea et al., 2021; Sousa, 1971). Lo anterior se vincula con la presencia de muchas de las características eco-epidemiológicas que favorecen la transmisión de estas infecciones zoonóticas al humano (Calzada et al., 2015; Fung et al., 2014). Como es frecuente, en los asentamientos humanos de estos sitios, el perro es el mamífero doméstico más común, pudiendo resultar eventualmente infectado con especies de tripanosomas y Leishmanias.

Con la finalidad de diagnosticar y caracterizar a los tripanosomátidos de importancia médica que infectan a cánidos domésticos de una comunidad de la provincia de Panamá Oeste, se analizaron un total de 91 muestras sanguíneas, las cuales se sometieron a análisis parasitológicos directos, inmunológicos y moleculares. Los resultados obtenidos (serología/PCR), sugieren la existencia de una baja o nula prevalencia de infección para *Leishmania* spp. (0%) y una mayor prevalencia para *T. cruzi* (28.5%) y *T. rangeli* (15.3%) en los perros de esta comunidad rural. La aparente ausencia de la infección con *Leishmania*

spp. en las muestras evaluadas fue un resultado inesperado ya que se conoce en este sitio la existencia de los vectores, reservorios y casos humanos de leishmaniasis cutánea (Perea et al., 2021). Quizás una diferencia importante con respecto a estudios realizados en otros países, en donde sí se ha podido confirmar la infección de perros con especies causante de leishmaniasis cutánea (Reithinger et al., 2000), sea las especies y variantes genéticas del género *Leishmania* endémicas en Panamá (Miranda et al., 2021). Es probable que los perros no sean huéspedes apropiados para estos parásitos. No obstante, es necesario realizar estudios adicionales que contemplen un mayor número de muestras colectadas en diferentes épocas del año. Al respecto de la infección con leishmaniasis visceral, tampoco se encontraron perros positivos, hallazgo que confirma la ausencia de esta parasitosis en el sitio evaluado.

A diferencia de los resultados con *Leishmania* spp., la infección con *T. cruzi* fue frecuente (28.5%) en los perros estudiados según los resultados de la serología utilizada en este trabajo. Este alto porcentaje de animales seropositivos podría ser el resultado de una eficiente vía de transmisión. Diferentes estudios refieren que la vía oral es la ruta de transmisión más frecuente en los casos de la infección chagásica en perros; los cuales suelen morder, masticar o comer los triatominos infectados que llegan al área peridomiciliar (Montenegro et al., 2002; Saldaña et al., 2015).

En relación con *T. rangeli* once (12.08%) de los perros evaluados resultaron con serología positiva para este parásito, el cual se transmite predominantemente por medio de la saliva del vector durante la alimentación de los mismos (Cuba, 1998). A pesar de que la infección con *T. rangeli* no se asocia con ninguna característica clínica, su presencia está siempre vinculada con los vectores y reservorios de *T. cruzi* (Guhl et al., 2003). Esta condición hace por lo tanto importante conocer la prevalencia y frecuencia de la transmisión de *T. rangeli* en un área determinada. Es de resaltar que en Panamá este parásito comparte el mismo vector y reservorios que *T. cruzi* (Sousa, 1971).

En el caso de *T. cruzi* y *Leishmania* spp. no se lograron cultivos positivos para estos parásitos. Esto obedece principalmente a que, para lograr el aislamiento de estos

tripanosomátidos por hemocultivos, es necesario la presencia de formas parasitarias en sangre al momento de tomar la muestra. Parasitemias detectables son más frecuentes en las primeras semanas de la infección chagásica o quizás en animales que presenten lesiones cutáneas por *Leishmania* spp. (Flores-Chávez et al., 2007; Reithinger et al., 1999). Al respecto la alta seroprevalencia (28.7%) encontrada para la infección chagásica en este estudio sugiere que la mayoría de estas infecciones se encontraban en etapa crónica, con muy pocos tripomastigotes sanguíneos.

Todas las muestras sanguíneas de este estudio fueron también analizadas por pruebas moleculares. Algunos autores reportan una alta sensibilidad al utilizar el análisis por PCR para diagnosticar la infección chagásica en los perros (Araújo et al., 2002; Enriquez et al., 2013). Esta metodología permitió detectar la infección de *T. cruzi* y *T. rangeli*; dos de las muestras sanguíneas positivas por PCR, presentaron serología positiva a una infección mixta con *T. cruzi* y *T. rangeli*. Este hallazgo es de importancia ya que aun cuando *T. rangeli* no causa enfermedad en los humanos ni en los perros, debido a su similitud antigénica con *T. cruzi* puede interferir con el diagnóstico de la infección chagásica en zonas donde coexisten ambos parásitos (Cuba, 1998). Se ha sugerido también, que la infección con *T. rangeli* induce una respuesta inmunológica capaz de conferir una protección parcial contra posteriores infecciones por *T. cruzi* (Paláu et al., 2003).

Por otro lado, el análisis molecular del contenido intestinal de los triatominos utilizados en las pruebas de xenodiagnóstico confirmó la infección con *T. rangeli* en tres perros, y con ello su capacidad como reservorio amplificador para este hemoflagelado. Además, estos resultados demuestran el potencial sinérgico que tiene la combinación de estas dos técnicas (Xenodiagnóstico/PCR) para el diagnóstico de la infección con *T. rangeli*/*T. cruzi*, al aumentar la sensibilidad diagnóstica.

Al respecto de la caracterización genética, no se logró la identificación de las UDT's de *T. cruzi*, aun cuando una muestra resultó positiva por PCR. Esto puede estar relacionado con la baja parasitemia encontrada en la muestra sanguínea (cultivo y xenodiagnóstico negativos), lo cual representaría una baja concentración de ADN parasitario. Hasta donde sabemos, no se conocen la(s) UDTs de *T. cruzi* en perros infectados en Panamá. En relación

a esto, en futuros estudios en nuestro medio, deben ser considerados los hallazgos realizados en perros de otras áreas geográficas, en donde sí se ha logrado la tipificación de *T. cruzi*, por ejemplo utilizando la extracción de ADN del coágulo de los hemocultivos y continuar con el uso de triatomino/xenodiagnóstico (Dario et al., 2022; Enriquez et al., 2013).

Para la tipificación de los aislados de *T. rangeli* se utilizó la amplificación de la subunidad 2 del gen del citocromo oxidasa (COII-RFLP), usando la enzima AluI para la detección de *T. rangeli* (KP1+/ KP1-). El linaje KP1- fue el único encontrado en dos (2) muestras positivas para *T. rangeli*, lo que coincide con investigaciones previas realizadas en Panamá (Pineda et al., 2022). Esta variante genética se vincula a la presencia del vector *R. pallescens*, el cual como se ha mencionado anteriormente es el vector de *T. cruzi* y ha sido reportado por algunos autores en el área de estudio (V. Pineda et al., 2011; Saldaña et al., 2015).

Por otro lado, el análisis estadístico de los resultados indicó que existe una relación significativa entre las variables físicas de las viviendas (tipo de piso, tipo de pared, presencia de cocinas con leña) y la infección canina con *T. cruzi* y/o *T. rangeli*. Los hallazgos sugieren, que estas características favorecen la infección de los perros con tripanosomátidos (Hurtado et al., 2014). Se encontró también, que entre la variable movimiento de perros al bosque/monte y los casos positivos de *T. cruzi* y *T. rangeli* existe una asociación estadísticamente significativa con una $p < 0.05$ para la prueba de Chi cuadrado, a un nivel de 95% de confianza. Se resuelve que la visita de los perros al área silvestre guarda relación con los casos positivos, lo que puede obedecer a que la infección de los perros se da por la ingestión del vector o sus heces (*T. cruzi*), por la picadura del vector (*T. rangeli*) o por la ingesta de animales reservorios infectados. Probablemente los perros están en contacto con *T. cruzi* y *T. rangeli* al masticar insectos triatomino infectados a partir de reservorios silvestres; por lo tanto, es razonable considerar que la movilidad permanente de los perros al área silvestre cercana aumenta el riesgo de infección por alguna de estas vías.

El papel epidemiológico del perro doméstico, en el contexto de las infecciones con tripanosomátidos de importancia médica, ha sido evaluado en numerosos estudios, desde

el sur de Estados Unidos hasta Argentina (Calzada et al., 2015; Gürtler et al., 2007; Montenegro et al., 2002). Si bien algunas de estas investigaciones también se han realizado en Panamá (Calzada et al., 2015; V. Pineda et al., 2011), los resultados previos y los nuestros, no permiten confirmar con certeza el papel que juega el perro doméstico en la transmisión de estas parasitosis en las diferentes regiones endémicas del país. Los hallazgos del presente estudio confirman la infección con *T. cruzi* y *T. rangeli* en los perros evaluados y la utilidad de este animal como centinela de estas infecciones. La infección con parásitos causantes de la LC y LV parece no ser frecuente en estos animales, sin embargo, es necesario continuar con estas evaluaciones utilizando diferentes metodologías diagnósticas y con un número mayor de muestras de esta y otras regiones endémicas del país.

5. Conclusiones

- Los resultados confirman que las infecciones con *T. cruzi* y *T. rangeli* son prevalentes en 28.5% y 15.3% respectivamente en los perros evaluados durante este estudio.
- Se corrobora la utilidad de este animal como centinela epidemiológico para estas infecciones.
- El papel del perro como reservorio funcional (amplificador) de *T. cruzi* no pudo ser confirmado, ya que no se logró aislar por cultivo o xenodiagnóstico en ningún animal.
- Se comprobó que *R. pallescens* se infecta con *T. rangeli* al alimentarse de la sangre de perros infectados con este tripanosomátido, lo que sugiere que este mamífero puede servir como reservorio amplificador para este parásito en el ambiente peridoméstico.
- Se ratifica que el genotipo de *T. rangeli* presente en los perros de la comunidad de LP corresponde al linaje KP1(-)
- Las infecciones con parásitos causantes de la LC y LV parecen no ser frecuentes en estos animales; no se obtuvo ningún resultado positivo con las metodologías utilizadas.

- Los análisis estadísticos sugieren que los perros que visitan áreas boscosas, frecuentemente, y los que viven en casas con condiciones precarias, son más propensos a infectarse con tripanosomas de importancia médica.

Los autores declaran que no existe conflicto de interés y que el trabajo fue aprobado por el Comité de ética de la investigación y bienestar de los animales (CEIBA) de la Universidad de Panamá, con número de nota CEIBA – UP- 004-2022 y del Registro y seguimiento de investigación para la salud RESEGIS número 2157.

Referencias Bibliográficas

- Araújo, F., Bahia, M., Magalhães, N., Martins-Filho, O., Veloso, V., Carneiro, C., Tafuri, W. & Lana, M. (2002). Follow-up of experimental chronic Chagas' disease in dogs: Use of polymerase chain reaction (PCR) compared with parasitological and serological methods. *Acta Tropica*, 81(1), 21–31. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(01\)00196-6](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(01)00196-6)
- Calzada, J., Saldaña, A., González, K., Rigg, C., Pineda, V., Santamaría, A., Rodríguez, I., Gottdenker, N., Laurenti, M. & Chaves, L. (2015). Cutaneous Leishmaniasis in dogs: is high seroprevalence indicative of a reservoir role?. *Parasitology*, 142, 1202–1214. <https://doi.org/10.1017/S0031182015000475>
- Cuba, A. (1998). Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Review of biological and diagnostic aspects of. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31(2), 207–220. <https://doi.org/10.1590/s0037-86821998000200007>
- Cura, C., Duffy, T., Lucero, R., Bisio, M., Péneau, J., Jimenez-Coello, M., Calabuig, E., Gimenez, M., Valencia Ayala, E., Kjos, S., Santalla, J., Mahaney, S., Cayo, N., Nagel, C., Barcán, L., Málaga Machaca, E., Acosta Viana, K., Brutus, L., Ocampo, S., Aznar, C., ... Schijman, A. (2015). Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for the Identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Biological and Clinical Samples. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(5), e0003765. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003765>.
- Dario, M., Lisboa, C., Xavier, S., D'Andrea, P., Roque, A. & Jansen, A. (2022). Trypanosoma Species in Small Nonflying Mammals in an Area With a Single Previous Chagas Disease Case. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12(2), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.812708>.
- de Sá, A., Steindel, M., Demeu, L., Lückemeyer, D., Grisard, E., Neto, Q., de Araújo, S., Toledo, M. & Gomes, M. (2013). Cytochrome oxidase subunit 2 gene allows simultaneous detection and typing of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. *Parasites & vectors*, 6, 363. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-363>.

- Enriquez, G., Cardinal, M., Orozco, M., Lanati, L., Schijman, A. & Gürtler, R. (2013). Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi* identified in rural dogs and cats in the humid Argentinean Chaco. *Parasitology*, 140(3), 303–308. <https://doi.org/10.1017/S003118201200159X>.
- Flores-Chávez, M., de Fuentes, I., Gárate, T. y Cañavate, C. (2007). Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25(3) 29-37. <https://doi.org/10.1157/13111835>.
- Fundacao Oswaldo Cruz-FIOCRUZ. (2020). *Teste rápido qualitativo para a detecção de anticorpos de cão para Leishmania em soro, plasma ou sangue total venoso (TR DPP Leishmaniose visceral canina)*. <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/produtos/reativos/testes-rapidos/dppr-leishmaniose-canina>.
- Fung, H., Calzada, J., Saldaña, A., Santamaria, A., Pineda, V., Gonzalez, K., Chaves, L., Garner, B. & Gottdenker, N. (2014). Domestic dog health worsens with socio-economic deprivation of their home communities. *Acta Tropica*, 135(1), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.03.010>.
- Guhl, F. & Vallejo, G. (2003). *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920-An Updated Review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(4), 435–442. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000400001>.
- Gürtler, R., Cecere, M., Lauricella, M., Cardinal, M., Kitron, U. & Cohen, J. (2007). Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology*, 134(1), 69–82. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001259>.
- Hurtado, L., Calzada, J., Pineda, V., González, K., Santamaría, A., Cáceres, L., Wald, C. y Saldaña, A. (2014). Conocimientos y factores de riesgo relacionados con la enfermedad de Chagas en dos comunidades panameñas donde *Rhodnius pallescens* es el vector principal. *Biomédica*, 34(2), 260–270. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.2133>.
- Lorca, M., Contreras, M., Salinas, P., Guerra, A. y Raychaudhuri, S. (2008). Evaluación de una prueba rápida para el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi* en suero. *Parasitología Latinoamericana*, 63(1/4), 29-33. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-77122008000100005>.
- Maia Da Silva, F., Junqueira, A., Campaner, M., Rodrigues, A., Crisante, G., Ramirez, L., Caballero, Z., Monteiro, F., Coura, J., Añez, N. & Teixeira, M. (2007). Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. *Molecular Ecology*, 16(16), 3361–3373. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03371.x>.

- Miranda, A., González, K., Samudio, F., Pineda, V., Calzada, J., Capitan-Barrios, Z., Jiménez, A., Castillo, J., Mendoza, Y., Suárez, J., Ortiz, B., Méndez, J., Pascale, J., Grögl, M., Sosa, N. & Saldaña, A. (2021). Molecular identification of parasites causing cutaneous leishmaniasis in Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(4), 1326–1334. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-1336>.
- Montenegro, V., Jiménez, M., Pinto Dias, J. & Zeledón, R. (2002). Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(4), 491–494. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000400006>.
- Morales, L., Romero, I., Diez, H., Del Potrillo, P., Montilla, M., Nicholson, S. & Puerta, C. (2002). Characterization of a candidate *Trypanosoma rangeli* small nucleolar RNA gene and its application in a PCR-based parasite detection. *Experimental Parasitology*, 102(2), 72-80. [https://doi.org/10.1016/s0014-4894\(03\)00027-4](https://doi.org/10.1016/s0014-4894(03)00027-4).
- Paláu, M., Mejía, A., Vergara, U. & Zúñiga, C. (2003). Action of *Trypanosoma rangeli* in Infections with Virulent *Trypanosoma cruzi* Populations. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(4), 543–548. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000400022>.
- Passos, V., Fernandes, O., Lacerda, P., Volpini, A., Gontijo, C., Degravé, W. & Romanha, A. (1999). *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta Tropica*, 72(3), 251-258. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(98\)00100-4](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(98)00100-4).
- Pavia, P., Vallejo, G., Montilla, M., Nicholls, R. & Puerta, C. (2007). Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection in triatomine vectors by amplification of the histone H2A/SIRE and the sno-RNA-C1 genes. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 49(1), 23–30. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652007000100005>.
- Perea, M., Rigg, C., Santamaría, A., González, K., Magallón, A., Calzada, J., Hurtado, L., Chavez, L. y Saldaña, A. (2021). Factores de riesgo asociados con la leishmaniasis cutánea en dos comunidades rurales de Panamá Oeste. *Revista Médica de Panamá*, 41(3), 12–20. <https://doi.org/10.37980/im.journal.rmdp.20211834>.
- Pineda, V., González, K., Perea, M., Rigg, C., Calzada, J., Chaves, L., Vásquez, V., Samudio, F., Gottdenker, N. & Saldaña, A. (2022). Surveillance and genotype characterization of zoonotic trypanosomatidae in *Didelphis marsupialis* in two endemic sites of rural Panama. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 17, 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2021.12.002>.

- Pineda, V., Saldaña, A., Monfante, I., Santamaría, A., Gottdenker, N., Yabsley, M., Rapoport, G. & Calzada, J. (2011). Prevalence of trypanosome infections in dogs from Chagas disease endemic regions in Panama, Central America. *Veterinary Parasitology*, 178(3–4), 360–363. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.043>.
- Reithinger, R. & Davies, C. (1999). Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61(4), 530–541. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.530>.
- Reithinger, R., Lambson, B., Barker, D. & Davies, C. (2000). Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in dog blood and bone marrow. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(2), 748–751. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.2.748-751.2000>.
- Restrepo, C., De la Guardia C., Sousa, O., Calzada, J., Fernández, P. & Lleonart, R. (2013). AFLP Polymorphisms Allow High Resolution Genetic Analysis of American Tegumentary Leishmaniasis Agents Circulating in Panama and Other Members of the *Leishmania* Genus. *PLoS ONE*, 8(9), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073177>.
- Romaña, C., Pizarro, J., Rodas, E. & Guilbert, E. (1999). Palm trees as ecological indicators of risk areas for Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(6), 594–595. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(99\)90059-7](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(99)90059-7)
- Saldaña, A., Sousa, O. & Orn, A. (1995). Immunoparasitological Studies of *Trypanosoma cruzi* Low Virulence Clones from Panama: Humoral Immune Responses and Antigenic Cross-Reactions with *Trypanosoma rangeli* in Experimentally Infected Mice. *Scandinavian Journal of Immunology*, 42(6), 644–650. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1995.tb03707.x>.
- Saldaña, A., Calzada, J., Pineda, V., Perea, M., Rigg, C., González, K., Santamaria, A. Gottdenker, N. & Chaves, L. (2015). Risk factors associated with *Trypanosoma cruzi* exposure in domestic dogs from a rural community in Panama. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(7), 936–944. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150284>.
- Sousa, O. (1971). Anotaciones sobre la enfermedad de Chagas en Panamá. Frecuencia y distribución de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*. *Rev. Biol. Trop.*, 20(2), 167–179. <https://tropicalstudies.org/rbt/attachments/volumes/vol20-2/02-Sousa-Chagas.pdf>
- Souto, R., Fernandes, O., Macedo, A., Campbell, D., Zingales, B. (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 83(2), 141–152. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(96\)02755-7](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(96)02755-7).

- Tome, R., Gaio, F., Generoso, D., Menozzi, B. & Langoni, H. (2011). Active surveillance of canine visceral leishmaniasis and american trypanosomiasis in rural dogs from non endemic area. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 20(1), 64–66. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612011000100013>
- Torrice, M., Tellez, T., Tenorio, O., Rojas, L., Huaranca, J., De la Barra, A., Garcia, A. & Torrico, F. (2013). Trypanosomatidae isolated from wild mammals in three departments of Bolivia (Cochabamba, Potosi and Santa Cruz de la Sierra). *Gac Med Bol*, 36(1), 6–10. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1012-29662013000100002.
- Valderrama, A., Tavares, M. & Dilermando, J. (2014). Phylogeography of the *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Phlebotominae) on the Panama Isthmus. *Parasites & Vectors*, 7(9), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-9>.
- Vallejo, G., Suárez, Y., Olaya, J., Gutierrez, S. & Carranza, J. (2015). *Trypanosoma rangeli*: un protozoo infectivo y no patógeno para el humano que contribuye al entendimiento de la transmisión vectorial y la infección por *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 39(150), 111. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.143>
- Vásquez, J., Krusnell, J., Sousa, O. & Harris, R. (1997) Serological diagnosis of *Trypanosoma rangeli* infected patients. A comparison of different methods and its implications for the diagnosis of Chagas disease. *Scandinavian Journal of Immunology*, 45(3), 322-330. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1997.d01-405.x>
- Vásquez, L., Ruelas, N., Cordoba, E. (2011). Patrones de coloración en la inmunofluorescencia indirecta y su utilidad en el diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria y enfermedad de Chagas. *Acta Médica Peruana*, 28(1), 19-22. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S172859172011000100004