



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Implicancia de la diversidad genética de *Trypanosoma cruzi* en la respuesta a drogas tripanomicidas

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área Ciencias Biológicas

Arturo Alejandro Muñoz Calderón

Director de tesis: Dr. Alejandro Gabriel Schijman

Consejero de Estudios: Dr. Guillermo Alonso

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología Molecular de la enfermedad de Chagas,
Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor
N. Torres” (INGEBI-CONICET)

Buenos Aires, 2024

「2つの*T. cruzi*は同じようには動かない」

(dos *T. cruzi* no se mueven igual)

Modificación de proverbio japonés

Dedicatoria

Otro ciclo académico y cinco largos años que culminan con una tesis (y espero que sea la última), pero la personas que me motivan a seguir adelante siguen allí, siempre incondicionales, a pesar de los 5500 kilómetros que nos separan.

Gran parte de la motivación para emprender este camino fue gracias a ustedes, **Berenice, Asís, Viviana, Patricia, Sebastián e Isabella**, mi familia. Gracias por su inmensurable apoyo, por enseñarme a elegir mi propio camino, y sobre todo porque son ejemplo de fortaleza, profesionalismo, constancia y dedicación.

No puedo dejar de mencionar a mis dos grandes amores, **Daniela y Mathias**. Mis compañeros de andanzas desde hace 7 años, han estado allí en las buenas y en las malas, con apoyo constante aun cuando los parásitos no crecían o las PCRs no salían como esperaba. Siempre han sabido levantarme el ánimo con una sonrisa, comida y palabras de aliento, mil gracias por el aguante.

Gracias a la Universidad Central de Venezuela, pero muy especialmente al Instituto de Medicina Tropical y a ustedes **Dres. Belkis y Oscar**. Son pilares en mi formación académica, enseñándome a admirar el mundo de la parasitología, brindándome las herramientas para convertirme en el profesional que actualmente soy.

Gracias **Alejandro**, nuestros caminos se cruzaron por allá en el 2010 en Caracas, luego muchas PCRs y cursos de entrenamiento y papers fortalecieron nuestra relación y acá terminé, en Buenos Aires haciendo una tesis de doctorado (la vida da muchas vueltas). Para mí fue un privilegio haber tenido la oportunidad de ser parte integral del LabMECh.

Gracias al INGEBI y a su gente. Ustedes no tienen idea lo que significa para un extranjero estar subiendo y bajando esas escaleras icónicas (de forma infinita), por donde transitaron dos Premios Nobel. Pero si de algo tengo que enorgullecerme es de haber tenido la guía de profesionales increíbles, no solo por sus cualidades como docentes y científicos, sino por su calidad como seres humanos. **Guille**, has sido parte fundamental de mi maduración como científico, gracias por tu amistad y consejos. **Karina**, sabes que siempre seré tu hijo académico no reconocido, muchas gracias por tu apoyo. **Silvia**, cuando te vi por primera vez dijiste: “*me vas a ver mucho*”

*por el laboratorio", y vaya que te he visto en estos cinco años, mil gracias por tu apoyo incondicional, transporte, risas y mates. **Paula**, la que hace magia con una computadora, muchos de los gráficos y análisis de esta tesis, sin tu ayuda no existirían. **Salo**, solo puedo decir gracias, gracias, gracias y mil gracias, eres una profesional y ser humano increíble. **Rubén**, perdón por molestarte tanto, pero sabes que sin ti el INGEBI no existiría, muchas gracias por todo amigo. Mil disculpas si me faltó mencionar alguno, saben que los quiero un montón y allí estaré cuando me necesiten.*

Agregado a la parte académica, esta aventura llamada Doctorado me regalo la compañía de 8 extraordinarias personas a las cuales agradezco infinitamente haber soportado mis estados de ánimo y locuras. Pero sin lugar a dudas, una de ellas se lleva el mérito de aguante, mil gracias a ti chiquita, **Micaela Soledad**. Cuántos congresos fatales soportamos, viajes en colectivos eternos, calor, frío, toneladas de mate (a veces horribles) y café, innumerables cremonas y chipás pasaron por nuestras manos, además de horas y horas y horas de estudio, pero sin lugar a dudas, compartimos algo que el tiempo no borrará, un sentido de hermandad increíblemente fuerte. Te quiero carajita.

Maguita, Paula (las Karinitas originales), **Fátima y Karencita** (las amiwitas), **Rosario y la Doctora Grossi**, gracias el apoyo, las merienditas, los chismes y muchos mates. Pero, también quiero darles mil disculpaaaaas por tantas quejas y desahogos, con alguien tenía que soltar la frustración de tanta burocracia argentina.

Jessica, aunque sigas creyendo que no merezco ser merideño, mil gracias las charlas, cervezas y por siempre ser un hombro sobre el cual apoyarse cuando sentía que todo se iba por una ventana. Gracias a tu vida tan accidentada, más de una vez nos reímos hasta que nos dolía la cara, y nos olvidábamos de los problemas terrenales de la tesis. Aprendimos a ser Doctores a punta de golpes.

Por último, pero no menos importante, tengo que agradecer a la vida por ponerme en el camino desde 20 años, a dos personitas a las cuales tengo que reconocer el inmenso apoyo que siempre me han brindado en cualquier etapa y aventura que emprendo, y que siempre han estado allí a mi lado aunque sea para tomarnos un café y conversar sobre la vida, gracias por tanto apoyo y cariño mis negros (**Esmeralda y Miguel**), amigos como ustedes solo se encuentran una vez en la vida.

Resumen

La respuesta farmacológica es compleja debido a la interacción entre los fármacos y sus proteínas blanco, lo que implica que cualquier modificación genética puede afectar la eficacia de los medicamentos. En la Enfermedad de Chagas (ECh), los fármacos Nifurtimox (NFX) y Benznidazol (BZN) tienen limitada eficacia en pacientes con infección crónica. Hasta ahora, las razones detrás de esta eficacia limitada siguen siendo desconocidas. Aunque se han identificado genes relacionados con la resistencia, su interacción con los fármacos sigue siendo poco clara, lo que dificulta la búsqueda de soluciones efectivas. En este contexto, esta tesis se centró en caracterizar genéticamente poblaciones de *T. cruzi* de diversos orígenes biológicos para identificar marcadores moleculares asociados a la susceptibilidad o resistencia a NFX y/o BZN. La investigación, empleó PCR-RFLP para analizar el ADN de kinetoplasto de *T. cruzi* presente en muestras clínicas de pacientes con ECh Pre-tratamiento (TTO) y Post-TTO. Se identificó una diferencia estadísticamente significativa en el Coeficiente de Jaccard ($p = 0,001$), indicando mayor heterogeneidad y diversidad parasitaria en la mayoría de las muestras Post-TTO analizadas. Posteriormente, se caracterizaron genéticamente enzimas NAD(P)H-dependientes (TcNTR-1, TcOYE y TcAKR) y un transportador de la familia ABCG (TcABCG-1) en poblaciones de *T. cruzi*. TcABCG-1 mostró baja frecuencia de polimorfismos, centrando los resultados en las enzimas NAD(P)H-dependientes. Se hallaron altas frecuencias de polimorfismos en TcNTR-1, TcOYE y TcAKR, presentando alteraciones conformacionales en los dominios catalíticos, las cuales fueron confirmadas *in-silico* mediante modelado 3D y análisis de Docking molecular. Finalmente, se describió un modelo de interacción gen-gen de cuatro vías, que relacionó los polimorfismos en las enzimas TcNTR-1 (TcNTR-1_D5*, TcNTR-1_W20*, TcNTR-1_S77_L78InsSS y TcNTR-1_S76*), TcOYE (TcOYE_L13W) y TcAKR (AKR_T121*) como posibles biomarcadores de resistencia farmacológica, con un valor de precisión de 0,867 y tasa de riesgo CVC de 7/10. Estos polimorfismos se proponen como biomarcadores para validar en futuros estudios clínicos.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, Transmisión Oral, Genes de Resistencia, Falla Terapéutica, Variabilidad Genética, Benznidazol.

Abstract

The implication of *Trypanosoma cruzi* genetic diversity in the response to trypanocide drugs

The pharmacological response is complex due to the interaction between drugs and their target proteins, implying that any genetic modification can affect drug efficacy. In Chagas Disease (CD), Nifurtimox (NFX) and Benznidazole (BZN) exhibit limited efficacy in chronically infected patients. The reasons behind this limited efficacy remain unknown. However, the role of *Trypanosoma cruzi* genetic diversity is crucial. Polyclonal populations of *T. cruzi* may rapidly develop mutations, leading to natural or acquired resistance to drugs. Although resistance-related genes have been identified, their interaction with drugs is unclear, hindering the development of effective solutions. Hence, this thesis focused on genetically characterizing *T. cruzi* populations to identify molecular markers associated with susceptibility or resistance to NFX and/or BZN. The study employed RFLP-PCR to analyze *T. cruzi* kinetoplast DNA in CD patients' clinical samples Pre- and Post-Treatment (Pre-TTO and Post-TTO). A statistically significant difference in the Jaccard Coefficient ($p = 0.001$) indicated higher heterogeneity and parasitic diversity in most Post-TTO samples. Subsequently, NADPH-dependent enzymes (TcNTR-1, TcOYE, TcAKR) and an ABCG transporter (TcABCG-1) were genetically characterized in *T. cruzi* populations. TcABCG-1 showed a low frequency of polymorphisms, focusing the results on NADPH-dependent enzymes. High frequencies of polymorphisms were found in TcNTR-1, TcOYE, and TcAKR, with conformational alterations in catalytic domains confirmed through *in-silico* 3D modeling and molecular docking analysis. Lastly, a four-way gene-gene interaction model described polymorphisms in TcNTR-1 (TcNTR-1_D5*, TcNTR-1_W20*, TcNTR-1_S77_L78InsSS, TcNTR-1_S76*), TcOYE (TcOYE_L13W), and TcAKR (AKR_T121*) as potential pharmacological resistance biomarkers, with an accuracy value of 0.867 and a CVC risk rate of 7/10. These polymorphisms are proposed as biomarkers for validation in future clinical studies.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Oral transmission, Resistance Genes, Therapeutic Failure, Genetic Variability, Benznidazole.

Parte de los resultados que se describen en esta Tesis han sido publicados en los siguientes artículos científicos

Muñoz-Calderón, A., Díaz-Bello, Z., Ramírez, J. L., Noya, O., y de Noya, B. A. (2019). Nifurtimox response of *Trypanosoma cruzi* isolates from an outbreak of Chagas disease in Caracas, Venezuela. *Journal of vector borne diseases*, 56(3), 237-243.

Muñoz-Calderón, A., Silva-Gomes, N. L., Apodaca, S., de Noya, B. A., Díaz-Bello, Z., Souza, L. R. Q., ... y Schijman, A. G. (2021). Toward the establishment of a single standard curve for quantification of *Trypanosoma cruzi* natural populations using a synthetic satellite unit DNA sequence. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 23(5), 521-531.

Muñoz-Calderón, A., Díaz-Bello, Z., Alarcón de Noya, B., Noya-González, O. O., y Schijman, A. G. (2021). Characterization and follow-up of *Trypanosoma cruzi* natural populations refractory to etiological chemotherapy in oral Chagas disease patients. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 665063.

Muñoz-Calderón, A., Ramírez, J. L., Díaz-Bello, Z., Alarcón de Noya, B., Noya, O., y Schijman, A. G. (2023). Genetic Characterization of *Trypanosoma cruzi* I Populations from an Oral Chagas Disease Outbreak in Venezuela: Natural Resistance to Nitroheterocyclic Drugs. *ACS Infectious Diseases*, 9(3), 582-592.

Todos los trabajos se encuentran disponibles accediendo a:

<https://drive.google.com/drive/folders/1NN6uliRL2jMV5VsrhqUrogTR8TntsxKG?usp=sharing>

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCIÓN	12
1.1. Importancia sanitaria	13
1.2. Enfermedad de Chagas.....	13
1.3. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas.....	14
1.4. Aspectos parasitológicos.....	16
1.5. Vías de transmisión	17
1.5.1. Vectorial / Ciclo de Vida.....	17
1.5.2. Transmisión oral.....	19
1.5.3. Transmisión congénita	19
1.5.4. Otras vías de transmisión	20
1.6. Aspectos clínicos de la enfermedad	21
1.6.1. Fase aguda.....	21
1.6.2. Fase asintomática o indeterminada	22
1.6.3. Fase crónica	22
1.7. Estructura poblacional, estrategias de tipificación y clasificación de Trypanosoma cruzi.....	23
1.8. Estructura policlonal de las poblaciones naturales de Trypanosoma cruzi.....	25
1.10. Tratamiento etiológico para la Enfermedad de Chagas	27
1.10.1. Nifurtimox (NFX).....	28
1.10.2. Benznidazol (BZN).....	28
1.11. Mecanismos de acción	30
1.12. Criterios de Cura.....	32
1.13. Eficacia del tratamiento y susceptibilidad de aislados de Trypanosoma cruzi	33
1.14. Susceptibilidad de aislados de Trypanosoma cruzi a los fármacos tripanomicidas.	35
1.15. Mecanismos de resistencia	36
1.15.1. Resistencia farmacológica vía TcNTR-1.....	39
1.15.2. Resistencia farmacológica vía TcOYE	39
1.15.3. Resistencia farmacológica vía TcAKR	40
1.15.4. Resistencia farmacológica vía TcABCG-1	40
1.16. Implicaciones clínicas de la variabilidad genética de Trypanosoma cruzi	41
JUSTIFICACIÓN	43
OBJETIVOS.....	46
3.1. Objetivo General.....	47
3.2. Objetivos Específicos.....	47
METODOLOGÍA	49
4.1. Aspectos éticos.....	50

4.2. Pacientes y muestras clínicas.....	50
i. Ensayo clínico aleatorizado con Benznidazol en la enfermedad de Chagas crónica - TRAtamiento EN pacientes Adultos (TRAENA):	50
ii. Brote de enfermedad de Chagas por transmisión oral – Municipio Chacao, Caracas, Venezuela:....	52
iii. Brote de enfermedad de Chagas por transmisión oral - Chichiriviche de la Costa, Estado Vargas, Venezuela.....	53
4.3. Cultivo de los aislados de Trypanosoma cruzi en estadio epimastigote.....	55
4.4. Preparación de muestras clínicas y extracción de ADN.....	55
4.5 Cuantificación de carga parasitaria mediante ensayo de PCR en tiempo real (qPCR).....	56
4.5.1. Parámetros para la validación de los resultados de los ensayos de qPCR:	57
4.6. Determinación de Unidades Discretas de Tipificación	58
4.7. Análisis de variabilidad genética de poblaciones parasitarias mediante secuencias de ADN de kinetoplasto a través de RFLP-PCR.....	59
4.8. Determinación de la distancia genética entre firmas de minicírculos	60
4.9. Caracterización de los genes involucrados en mecanismos de resistencia farmacológica en Trypanosoma cruzi.....	60
4.10. Purificación de fragmentos de ADN	62
4.11. Clonado de secuencias genéticas para los genes Tcntr-1, Tcoye, Tcacr y Tcabcg-1.....	63
4.11.1. Cuantificación de los ácidos nucleicos y plásmidos.....	63
4.11.2. Clonado de las secuencias peptídicas	63
4.12. Análisis de secuencias de ácidos nucleicos.....	64
4.12.1. Secuenciación de ADN	64
4.12.2. Alineamiento múltiple de secuencias.....	64
4.12.3. Análisis de Presión Evolutiva	64
4.13. Correlación de la variabilidad genética de los genes Tcntr-1, Tcoye y Tcacr-1 y Susceptibilidad/Resistencia farmacológica mediante secuenciación multilocus (MLSTest).	65
4.14. Análisis de la secuencia de proteínas y predicción de estructuras 3D.....	66
4.15. Análisis de Dinámica Molecular	67
4.16. Docking molecular	67
4.17. Asociación de Polimorfismos y fenotipos de resistencia farmacológica.....	68
4.18. Análisis estadísticos.....	69
RESULTADOS.....	70
CAPITULO 1.....	71
5.1. Establecer la existencia de asociaciones entre distribución geográfica de poblaciones de Trypanosoma cruzi, unidades discretas de tipificación (UDTs) y susceptibilidad farmacológica, mediante una revisión sistemática y meta-análisis de los ensayos de susceptibilidad in-vitro al Benznidazol disponibles en la bibliografía.....	71
5.1.1. Desarrollo del proceso PRISMA para la revisión sistemática.....	71
5.1.2.- Concentración Inhibitoria 50 (CI ₅₀) como parámetro experimental de resistencia de Trypanosoma cruzi al fármaco Benznidazol.	72

5.1.3.- Revisión sistemática de la resistencia farmacológica del Benznidazol en los estadios de <i>Trypanosoma cruzi</i> relevantes para la infección humana, utilizando valores de Concentración Inhibitoria 50 (CI ₅₀).....	77
CAPITULO 2	81
5.2. Identificar cargas parasitarias y las unidades discretas de tipificación en las poblaciones naturales de <i>Trypanosoma cruzi</i> y de aislamientos parasitarios mediante hemocultivo, asociados a pacientes enrolados en ensayos clínicos con fármacos tripanocidas o detectados en brotes orales que fueron refractarios a los tratamientos suministrados	81
5.2.1. Construcción y Validación de estándares de ADN satélite sintético para la generación de curvas de qPCR independientes de la UDT de las muestras cuantificadas.	81
5.2.2. Construcción de la secuencia sintética de ADN satélite de <i>Trypanosoma cruzi</i>	82
5.2.3. Parámetros analíticos de la qPCR basada en ADNsat utilizando ADN sintético en la construcción de la curva estándar de cuantificación.	83
5.2.4. Números de copias de la secuencia de ADN satélite en diferentes cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	83
5.2.5. Comparación de las cargas parasitarias en muestras clínicas utilizando como referencia, curvas estándar expresadas en Equivalentes parasitarios/mL y copias de ADNsatélite/μL.....	85
5.2.6. Monitoreo por PCR en tiempo real de la respuesta parasitológica a BZN en pacientes con enfermedad de Chagas.....	87
CAPITULO 3.	91
Comparación de la composición genética intra-UDT de poblaciones naturales de <i>Trypanosoma cruzi</i> detectables en sangre periférica o de aislamientos obtenidos por hemocultivo en cohortes de pacientes antes del tratamiento, durante el mismo y luego de su falla terapéutica, mediante la caracterización de firmas moleculares de minicírculos (ADNk-PCR RFLP).	91
CAPITULO 4	97
Caracterización molecular de las enzimas de <i>Trypanosoma cruzi</i> TcNTR-1, TcOYE, TcAKR y TcABCG-1 relacionadas con el procesamiento de fármacos nitro-heterocíclicos.....	97
4.1. Análisis sobre la secuencia nucleotídica de los genes <i>Tcntr-1</i> , <i>Tcoye</i> , <i>Tcacr</i> y <i>Tcabcg-1</i> , para establecer la existencia de Polimorfismos de Nucleótido Único (SNPs) diferenciales entre poblaciones de <i>Trypanosoma cruzi</i> , en un contexto epidemiológico y como posibles biomarcadores de respuesta a fármacos nitro-heterocíclicos	98
4.2.- Polimorfismos de nucleótido único (SNPs) como biomarcador de resistencia farmacológica.	101
4.3.- Análisis de la secuencia aminoacídica de las enzimas TcNTR-1, TcOYE, TcAKR y el transportador TcABCG-1, para establecer la existencia de polimorfismos diferenciales entre poblaciones de <i>Trypanosoma cruzi</i> y su posible rol como biomarcadores de respuesta a fármacos nitro-heterocíclicos.	
102	
4.4.- Polimorfismos proteicos y su asociación como biomarcadores de resistencia farmacológica.	106
4.5.- Evaluación in-silico, caracterización estructural, estudios de Dinámica Molecular y Docking de las variantes mutantes con mayor frecuencia de cada una de las enzimas NAD(P)H-dependientes de <i>Trypanosoma cruzi</i> , a fin de determinar posibles cambios en el sitio catalítico que expliquen diferencias funcionales en la respuesta farmacológica frente al fármaco Benznidazol.	110

4.6.- Análisis estructural in-silico y Dinámica Molecular de variantes de la enzima Nitroreductasa de tipo 1 de <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcNTR-1).....	111
4.7.- Análisis estructural in-silico y Dinámica Molecular de variantes de la enzima Prostaglandina F ₂ α sintasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcOYE).....	121
4.8.- Análisis estructural in-silico y Dinámica Molecular de variantes de la enzima Aldo-keto reductasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcAKR).....	129
CAPITULO 5	137
Validación de enzimas NAD(P)H-dependientes como potenciales biomarcadores de Resistencia Farmacológica	137
5.1.- Validación de la enzima TcNTR-1 como potencial biomarcador de Resistencia Farmacológica.	137
5.2.- Validación de la enzima TcOYE como potencial biomarcador de Resistencia Farmacológica.....	140
5.3.- Validación de la enzima TcAKR como potencial biomarcador de Resistencia Farmacológica.	142
5.4.- Correlación del polimorfismo en las enzimas NADH-dependientes TcNTR-1, TcOYE y TcAKR y la respuesta farmacológica in-vitro como potencial biomarcador de resistencia farmacológica.	145
DISCUSIÓN	150
Variabilidad genética de poblaciones naturales de <i>Trypanosoma cruzi</i> presentes en muestras clínicas de pacientes con Enfermedad de Chagas:	153
Dinámica de la circulación parasitaria en pacientes con Enfermedad de Chagas.....	153
Análisis del polimorfismo genético de poblaciones naturales de <i>Trypanosoma cruzi</i> en muestras de sangre y aislamientos de pacientes crónicos en ensayos clínicos con drogas tripanocidas.....	156
<i>Trypanosoma cruzi</i> resistente a fármacos: Desde su caracterización molecular a la descripción de potenciales biomarcadores de respuesta farmacológica.....	159
Consideraciones finales y perspectivas a futuro	174
BIBLIOGRAFIA.....	177
ABREVIATURAS	204

INTRODUCCIÓN

Los tripanosomátidos (familia Trypanosomatidae) constituyen un grupo diverso de parásitos protistas de la clase Kinetoplastida, caracterizados por la presencia de un único flagelo y un Kinetoplasto (una masa de ADN situado dentro de una única gran mitocondria). Dentro de esta familia de microorganismos se destacan dos géneros principales: Trypanosoma y Leishmania. Ambos géneros son dixénicos, es decir, que su ciclo de vida involucra a dos hospedadores. Adicionalmente, ambos géneros de tripanosomátidos son antroponóicos y se transmiten por medio de insectos hematófagos (Kaufer y col., 2017).

1.1. Importancia sanitaria

Los tripanosomátidos tienen la capacidad de infectar a la mayoría de las clases de vertebrados por medio de vectores invertebrados como triatominos, moscas, mosquitos y otros insectos hematófagos. La importancia sanitaria de estos parásitos radica en que muchos son responsables de graves enfermedades en los seres humanos, como la tripanosomiasis africana humana o enfermedad del sueño, endémica en 36 países subsaharianos que involucra la especie *Trypanosoma brucei*; la enfermedad de Chagas, presente mayoritariamente en el continente Americano originada por la infección por la especie *Trypanosoma cruzi* y la Leishmaniosis, un conjunto de enfermedades con una amplia distribución a lo largo de la línea ecuatorial, causada por diversas especies del género Leishmania (Cuervo y col., 2010; Kaufer y col., 2017).

Todas estas enfermedades afectan anualmente a millones de personas en el mundo y representan un gran problema sanitario, principalmente en aquellos países donde son endémicas. Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a muchas de estas enfermedades como desatendidas por afectar a los sectores más empobrecidos y vulnerables de la sociedad y señala que no reciben la suficiente atención sanitaria por parte de los gobiernos (WHO, 2023).

1.2. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas (ECh) o tripanosomiasis humana americana es una antroponosis causada por el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, que recibe su nombre gracias al médico e investigador brasileño Carlos Justiniano

Ribeiro das Chagas, quien descubrió el agente causal, el vector, reservorios y la patología de la enfermedad en el año 1909 (WHO, 2023).

1.3. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas

Según datos de la OMS, se estima que entre seis y ocho millones de personas están infectadas por *T. cruzi*, y que otros 25 millones corren riesgo de infección (Lidani y col., 2019). En la actualidad, el perfil epidemiológico de la ECh varía enormemente en todo el mundo, dependiendo de las diferentes vías de transmisión y de la presencia de triatomíneos autóctonos y alóctonos. Se describe como una enfermedad endémica del continente americano, siendo la transmisión vectorial la más estudiada.

En términos de prevalencia, para el año 2019 la región de América Latina presenta una tasa del 95% (933,76 infectados por cada 100.000 habitantes), siendo Bolivia, Brasil, Chile, Argentina, Venezuela y Paraguay los países más afectados con prevalencias en el rango de 1-5% (**Figura 1A**). No obstante, esta tasa de prevalencia ha disminuido en los últimos 30 años (Gómez-Ochoa y col., 2022). Un escenario diferente se produjo en la región europea, la cual muestra un aumento sustancial de la prevalencia de infección desde 1990 hasta 2016 (Antinori y col., 2017).

Por otra parte, durante los últimos veinte años, los casos de ECh por transmisión oral de *T. cruzi* se han convertido en un importante reto de salud pública en países de Sur América (Alarcón de Noya y Noya González, 2019). En Brasil, por ejemplo, la transmisión oral ha sido principalmente descrita en la región amazónica, con informes de algunos brotes agudos también en otras regiones del país (Santos y col., 2020). En Venezuela y Colombia este mecanismo de transmisión se encuentra también circunscripto a ambientes urbanizados (Alarcón de Noya y col., 2015)

El cambio climático asociado a otros cambios ambientales puede impactar la distribución de la enfermedad en todo el planeta, como resultado de la alteración de la ecología de patógenos, vectores, hospederos y reservorios (Lidani y col., 2019). Recientemente, varios países sin antecedentes previos de transmisión de *T. cruzi* han presenciado un incremento en la incidencia de casos, lo que representa un riesgo significativo para la salud pública. Esto se debe a la presencia de insectos triatomíneos en la fauna silvestre. (**Figura 1B**).

Además, con la globalización, las migraciones de personas de regiones endémicas a no-endémicas, ya sea dentro de un mismo país, o en países y continentes distintos, aumentaron considerablemente. Esto determina que, en áreas sin circulación de triatomíneos, existe el riesgo de transmisión congénita y a través de transfusiones sanguíneas y trasplantes de órganos y tejidos.

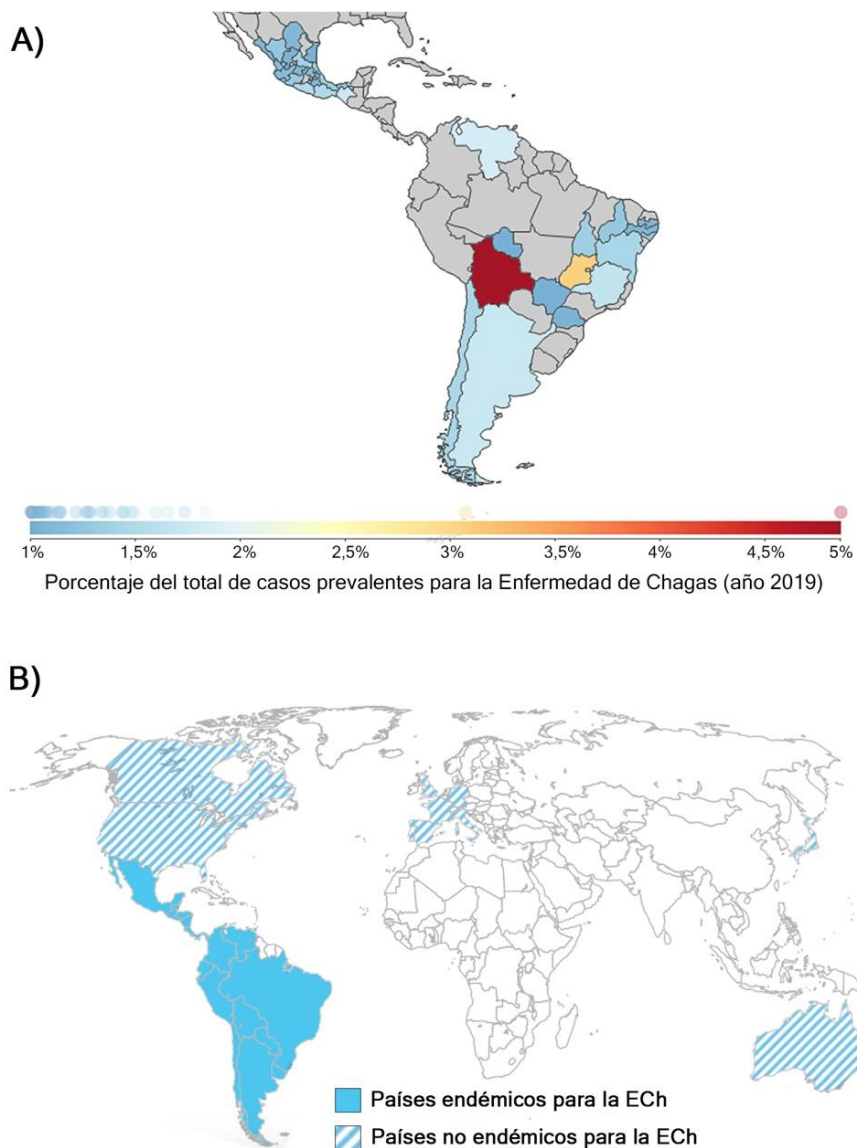


Figura 1. Mapa mundial que resume: **A)** La prevalencia de casos reportados de la Enfermedad de Chagas (ECh) en el continente americano hasta 2019; **B)** Presencia de casos reportados de pacientes con Enfermedad de Chagas (ECh).

1.4. Aspectos parasitológicos

Trypanosoma cruzi, protozoo flagelado perteneciente al Reino Protista, Subreino Protozoa, Phylum Sarcomastigophora, Clase Zoomastigophora, Orden Kinetoplastida y la familia Trypanosomatidae; género *Trypanosoma*, subgénero *Schizotrypanum*, especie *Trypanosoma cruzi* (Braunwald, 1989), es un parásito dixénico, ya que su ciclo biológico se lleva a cabo en dos hospederos: insectos triatominos de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae (hospedadores intermediarios) y mamíferos como hospedadores definitivos (Brener, 1973). El parásito presenta un ciclo de vida con tres formas evolutivas nombradas de acuerdo con la posición del kinetoplasto con relación al núcleo y la región de aparición del flagelo. Estas formas evolutivas son: epimastigote (**Figura 2A**) presenta una forma flagelada, tiene la capacidad de replicarse en el intestino del insecto y no es infectante; tripomastigote (**Figura 2B**) posee forma flagelada, es infectante, pero no tiene la capacidad de replicarse y se encuentra presente tanto en el insecto como en hospedadores vertebrados (tripomastigote metacíclico y sanguíneo, respectivamente); y amastigote (**Figura 2C**) posee una forma con un pequeño flagelo intracelular, es replicativo, responsable de la acción patógena y se encuentra presente, exclusivamente, en mamíferos. El tripomastigote es la única forma que representa el enlace entre el vector y el hospedador vertebrado (Brener, 1973; Souza, 2002).

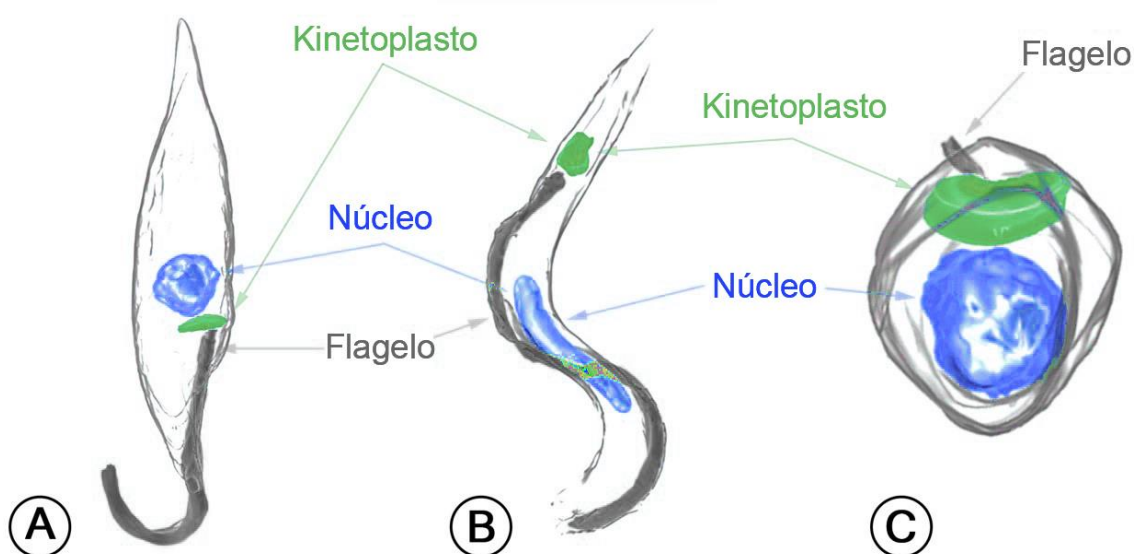


Figura 2. Representación esquemática de los diferentes estadios de desarrollo de *Trypanosoma cruzi* basada en la reconstrucción 3D de imágenes de secciones delgadas seriadas obtenidas por

microscopía electrónica. **(A)** Estadio epimastigote, proliferativo y no infeccioso presente en los insectos vectores. **(B)** Estadio tripomastigote, forma infecciosa, no proliferativa que se encuentra en la sangre del hospedador mamífero o se libera con las heces de los insectos vectores o glándulas anales de los hospederos marsupiales. **(C)** Estadio amastigote, forma replicativa que se encuentran en el citoplasma de las células de mamíferos infectados. Modificado de (Elias y col., 2009).

1.5. Vías de transmisión

1.5.1. Vectorial / Ciclo de Vida

Dentro de la transmisión vectorial es posible distinguir dos ciclos: uno silvestre, donde el hospedador vertebrado es un animal salvaje (armadillos, marsupiales, roedores, murciélagos y primates, entre otros); y un ciclo peridoméstico y/o doméstico, que incluye como hospedadores animales domésticos o con hábitats cercanos a los domicilios y al ser humano (Coura, 2014).

Desde el punto de vista de transmisión, sin importar el escenario epidemiológico, los vectores triatominos al succionar sangre de algún mamífero vertebrado infectado (hospedador definitivo) se infectan con formas tripomastigote sanguíneas circulantes **(1)** (Schaub y col., 2011). En el intestino de los insectos, los parásitos inicialmente tienden a adquirir distintas formas, algo más gruesas, denominadas esferomastigotes, los cuales se alargan transformándose en formas epimastigote **(2)** **(Figura 3)** (estadio replicativo) y que una vez que alcanzan el recto del insecto se transforman en formas tripomastigote metacíclicos (forma infectante para el hospedero vertebrado), siendo finalmente eliminados con el líquido de las heces (Heyneman y Mc Kerrow, 1991). La defecación del insecto se produce en el momento de la picadura, mientras se alimenta (en la mayor parte de las especies pertenecientes a la subfamilia Triatominae) o después de la alimentación (en las especies pertenecientes al género *Panstrongylus*). Teniendo en cuenta que el hábito alimenticio de estos insectos es nocturno, el ser humano en la mayoría de los casos, se auto-infecta al ocasionar lesiones de rascado en la piel y también al transportar inconscientemente las deyecciones del insecto a la mucosa bucal, nasal u ocular a través de las cuales penetran los parásitos (Krogstad, 1994).

Una vez en el hospedero vertebrado, el parásito en estadio de tripomastigote metacíclico **(3)** **(Figura 3)** entra a las células susceptibles, en las cuales se libera del flagelo y de la membrana ondulante, transformándose en amastigote **(5)** **(Figura 3)**, el cual podrá replicarse intracelularmente por división binaria. Las células

infectadas finalmente se rompen, liberando formas tripomastigote sanguíneas a la circulación (1) (**Figura 3**), los cuales entran a otras células para repetir el ciclo de infección celular o son ingeridos por el insecto vector y repetir el ciclo de transmisión (Anselmi y Moleiro, 1974).

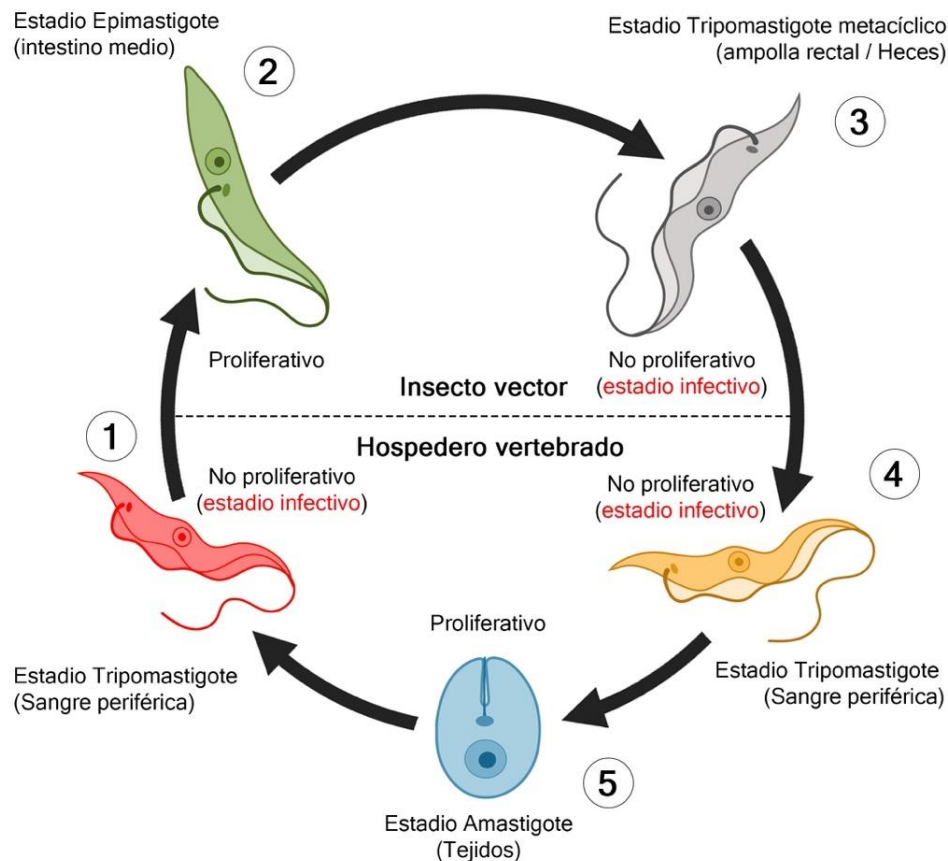


Figura 3 – Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. (1) Cuando un triatomino se alimenta de la sangre de un vertebrado infectado con *T. cruzi*, las formas tripomastigote ingresan al insecto vector, viajando al estómago donde se transformarán en la forma replicativa conocida como epimastigote (2), las formas epimastigote se replican en el intestino medio del triatomino, y en el intestino posterior ocurre un proceso de diferenciación conocido como metaciclogénesis donde las formas epimastigote se convierten nuevamente en formas tripomastigote metacíclicos (3) para infectar nuevos hospedadores vertebrados. El insecto infectado con *T. cruzi*, al alimentarse nuevamente de la sangre de algún vertebrado, liberará las formas tripomastigote junto con las heces, (4) las formas tripomastigote metacíclicos ingresan al torrente sanguíneo e infectarán diferentes tipos celulares, transformándose en el estadio replicativo amastigote; (5) los amastigote se replican dentro de las células infectadas, y eventualmente se diferenciarán nuevamente al estadio de tripomastigote liberándose al torrente sanguíneo luego de la ruptura de la célula que los contenía; (1) en la sangre los tripomastigote pueden infectar nuevas células o ser ingeridos por un nuevo insecto vector. Fuente: Adaptación de (Martín-Escolano y col., 2022).

1.5.2. Transmisión oral

La transmisión oral representa probablemente la principal vía de contaminación de vectores y animales (Nattan-Larrier, 1921) y de transmisión de la enfermedad humana aguda en la cuenca Amazónica (Alarcón de Noya y col., 2015) y se postula que ha sido el principal mecanismo de dispersión del parásito entre los mamíferos desde el conocimiento de la enfermedad (Coura, 2006).

Los estudios de infección oral por *T. cruzi* en ratones han demostrado que las formas de tripomastigote metacíclico derivados de insectos o presentes en las glándulas anales de reservorios marsupiales invaden el epitelio de la mucosa gástrica de los hospederos vertebrados mediante moléculas de superficie similares a la mucina (*gp30*, *gp82* y *gp90*) altamente resistentes a la proteólisis (Yoshida, 2008), donde el parásito se replica como amastigotes (Hoft, 1996; Hoft y col., 1996).

En la actualidad, los casos agudos causados por brotes orales de ECh (EChO) representan un problema de salud pública en zonas rurales y periurbanas no endémicas de Sudamérica (Alarcón de Noya y col., 2015). En Brasil, Venezuela, y Colombia estos brotes han sido involucrados al consumo de agua y/o alimentos contaminados con heces de triatomíneos infectados. Entre los alimentos involucrados se pueden contar jugos de caña de azúcar, guayaba (*Psidium guajava*), naranja (*Citrus x sinensis*), maracuyá (*Passiflora edulis*), frutas regionales como el açaí (*Euterpe oleracea*) y la bacaba (*Oenocarpus bacaba*), e inclusive sopas (Shaw y col., 1969; Dias y col., 2008; Bastos y col., 2010). Adicionalmente, se han relacionado micro-epidemias de EChO por contaminación de alimentos con secreciones infectadas de las glándulas anales de marsupiales (Da Silva y col., 1968; Shikanai-Yasuda y col., 1991).

1.5.3. Transmisión congénita

En ausencia de tratamiento, las mujeres infectadas por *T. cruzi*, por cualquiera de sus vías de transmisión, pueden transmitir durante su edad fértil la infección, a su descendencia, con el riesgo de perpetuar los ciclos de transmisión vertical en sucesivas generaciones de mujeres en áreas endémicas y no endémicas (Messenger y Bern, 2018).

La OMS estima que 1.125.000 mujeres en edad fértil están infectadas por *T. cruzi*, con una incidencia de transmisión congénita de 8.668 casos/año en los 21 países

latinoamericanos donde la ECh es endémica actualmente (WHO, 2023). En los países del cono sur del continente americano, las tasas notificadas pueden variar entre el 1 y el 12% (Carlier y col., 2019). En cambio, se sabe muy poco sobre las tasas de transmisión congénita en México, Centroamérica y en los países no endémicos (Telleria y Tibayrenc, 2017). Un estudio reciente estimó que unas 40.000 mujeres embarazadas y 2.000 recién nacidos podrían estar infectados por *T. cruzi* en Canadá, México y EE.UU (Edwards y col., 2019).

Entre los factores que han demostrado estar asociados a un mayor riesgo de transmisión congénita se encuentran la menor edad materna (Kaplinski y col., 2015), las respuestas inmunológicas maternas y neonatales (Hermann y col., 2004), la mayor parasitemia materna (Rendell y col., 2015; Bustos y col., 2019), los partos gemelares (Kaplinski y col., 2015) y la coinfección por VIH (Scapellato y col., 2009). Adicionalmente, se ha descrito que en los casos de grupos familiares en donde existen madres con un niño infectado congénitamente (considerado como caso índice), existe una probabilidad significativamente mayor de que esa misma madre pueda transmitir la infección a otros hijos, en comparación a madres infectadas con *T. cruzi* que nunca han tenido hijos con infección congénita, lo que podría estar relacionado con la cepa del parásito o con factores maternos del hospedero (Negrette y col., 2005; Juiz y col., 2018; Desale y col., 2022). Este fenómeno se conoce como agrupamiento familiar de la transmisión congénita (Negrette y col., 2005).

1.5.4. Otras vías de transmisión

Adicionalmente a las vías de transmisión ya descritas, la transmisión de *T. cruzi* también puede ocurrir por el trasplante de un órgano sólido o de médula ósea de un donante infectado en fase crónica, lo que ha sido bien documentado en América Latina (Kun y col., 2009; Casadei, 2010; Cura y col., 2013; Barcan y col., 2023).

Finalmente, se ha descrito que *T. cruzi* puede transmitirse específicamente al ser humano a través de mecanismos mecánicos, como la transfusión sanguínea o mediante accidentes de laboratorio. El riesgo de contraer ECh mediante la transfusión de una unidad de sangre de un donante infectado es de entre el 10% y el 20% (Rassi y col., 2015). Dado que las formas tripomastigote se separan predominantemente en la fracción plaquetaria durante la centrifugación, se ha descrito que el riesgo de transmisión es mayor en la transfusión de plaquetas que

en la de otros componentes sanguíneos (Benjamin y col., 2012; Cancino-Faure y col., 2015). Finalmente, en casos excepcionales *T. cruzi* puede transmitirse por accidentes de laboratorio a personas que trabajan con parásitos vivos. Estas infecciones suelen ocurrir por medio de punciones o por contacto directo de formas tripomastigote con las mucosas en accidentes de laboratorio, siendo una vía de transmisión de alto riesgo debido a la inoculación directa de la forma infectante (Herwaldt, 2001). Afortunadamente, las buenas prácticas de laboratorio y las normas de bioseguridad ayudan a mitigar su incidencia, siendo pocos los casos que han sido documentados por esta vía (Hofflin y col., 1987; Kinoshita-Yanaga y col., 2009; Hasslocher-Moreno, 2022).

1.6. Aspectos clínicos de la enfermedad

1.6.1. Fase aguda

La fase aguda de la ECh representa el primer contacto entre el parásito y el hospedero, y el momento en el que se desencadenará la respuesta inmunológica. Se ha postulado que los acontecimientos inmunológicos que tienen lugar durante la fase aguda influyen en gran medida en el desenlace de la enfermedad hacia el desarrollo de una respuesta protectora o patógena en la fase crónica (Andrade y col., 2014).

La detección de individuos durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas es poco frecuente debido a los síntomas clínicos relativamente inespecíficos que se observan en la mayoría de los pacientes infectados (Nóbrega y col., 2009; Bastos y col., 2010). Este retraso en la detección impide el diagnóstico y, en consecuencia, limita la disponibilidad de estudios que describan el estado inmunológico de los individuos infectados de forma aguda. Además, el diagnóstico tardío (o la ausencia de este) dificulta el tratamiento y, por tanto, la curación de la enfermedad.

El principal síntoma que puede ocurrir durante la fase aguda de la ECh es la muerte del individuo infectado (posiblemente un caso de cada 1.000 infectados agudos), la cual suele estar relacionada con un proceso de insuficiencia cardíaca, meningitis y/o encefalitis (Teixeira y col., 2006; Moscatelli y Moroni, 2019).

1.6.2. Fase asintomática o indeterminada

La mayoría de los individuos que entran en la fase crónica, suelen permanecer en una forma clínica indeterminada, que es asintomática y representa un excelente ejemplo de equilibrio entre el parásito y su hospedador (Dutra y col., 2009). La forma asintomática o indeterminada de ECh se ha asociado a una producción predominante de citocinas reguladoras, como la IL-10, sobre las citocinas inflamatorias, como el IFN-gamma y el TNF-alfa (Souza y col., 2007; De Araújo y col., 2012). Así pues, es posible que la capacidad de producir IL-10 más tarde en la fase aguda sea importante para controlar la respuesta y permitir el paso a una fase crónica de la enfermedad.

1.6.3. Fase crónica

La forma crónica de la enfermedad se caracteriza por una parasitemia baja y transitoria con niveles elevados de anticuerpos específicos IgG. Adicionalmente, la evolución crónica de la ECh se presenta con diferentes perfiles de morbilidad en sus formas cardíaca y digestiva. Estas patologías crónicas tienen un alto impacto económico debido a los gastos derivados de la hospitalización, el ausentismo laboral, las bajas por enfermedad y la muerte prematura (Pérez-Molina y Molina, 2018).

Aproximadamente el 30-40% de los pacientes que generan cronicidad en la infección por *T. cruzi* pueden llegar a desarrollar alguna afectación orgánica 10-30 años después de la fase aguda (principalmente cardiomiopatía o megavísceras).

Resultados de estudios recientes han mostrado una progresión a afectación cardíaca de alrededor del 14 – 50% por año (Viotti y col., 2006; Machado-de-Assis y col., 2013; Sabino y col., 2013), siendo el tipo de afectación orgánica más frecuente y grave de los pacientes con infección crónica (Coura y col., 1985; Dias, 1989; Viotti y col., 2006; Pérez-Ayala y col., 2011; Salvador y col., 2014), y que afecta principalmente al sistema de conducción y al miocardio. La muerte súbita es la principal causa de muerte en pacientes con cardiopatía chagásica, seguida de insuficiencia cardíaca refractaria y tromboembolismo (Rassi Jr y col., 2001).

La afectación gastrointestinal es menos común (10-21%) y ocurre con más frecuencia en el Cono Sur de Sudamérica (Coura y col., 1985; Pérez-Ayala y col., 2011; Salvador y col., 2014; Baldoni y col., 2024). Las manifestaciones van desde

trastornos asintomáticos de la motilidad hasta acalasia leve y megaesófago grave. Los síntomas incluyen disfagia, odinofagia, reflujo esofágico, pérdida de peso, aspiración, tos y regurgitación. Los pacientes con megaesófago pueden presentar un mayor riesgo de cáncer de esófago, por lo que podría estar indicada una endoscopia digestiva alta, especialmente en pacientes con síntomas nuevos o progresivos (Orozco y col., 2022).

En general, la inflamación es el principal factor determinante en la progresión de la enfermedad en la fase crónica. Sin embargo, otros factores pueden contribuir, tales como el genotipo, virulencia y tropismo celular de la cepa infectante de *T. cruzi*.

1.7. Estructura poblacional, estrategias de tipificación y clasificación de *Trypanosoma cruzi*

La estructura poblacional de *T. cruzi* ha sido atribuida a una predominante evolución clonal con baja tasa de recombinación genética (Tibayrenc y Ayala, 1988; 2002; 2013; Ramírez y Llewellyn, 2015). Este modelo no implica la ausencia absoluta de recombinación, sino una frecuencia muy baja de ésta, que no altera significativamente la propagación clonal del parásito. Sin embargo, numerosas evidencias indican que el intercambio genético podría ser frecuente y ha tenido un papel fundamental en la actual estructura poblacional de *T. cruzi* (Sturm y col., 2003; Messenger y col., 2015; Ramírez y Llewellyn, 2015; Lewis y col., 2017; Tibayrenc y Ayala, 2022).

La gran variabilidad de *T. cruzi* puede verse reflejada en su morfología (de Souza, 2002), enzimas específicas (Miles y col., 1978), patrones de patogenicidad e infectividad (Mortara y col., 2005), susceptibilidad a agentes quimioterapéuticos (Murta y Romanha, 1998; Moraes y col., 2014b), propiedades inmunológicas (Di Noia y col., 2002) y tropismo tisular en animales de experimentación (Camandaroba y col., 2006). Sin embargo, la mayoría de los estudios de la diversidad genética en *T. cruzi* se han visto obstaculizados por la falta de métodos estandarizados de tipificación y por la utilización de múltiples nomenclaturas.

Los trabajos pioneros en la caracterización genética de clones del *T. cruzi* fueron llevados a cabo por Morel y col. (1980). Para ello, se obtuvieron fragmentos de ADN de kinetoplasto (ADNk) mediante digestión enzimática (usando las enzimas *HinfI* y *EcoRI*). Estos patrones electroforéticos, también conocidos como "fingerprinting" o

esquizodemas, permitieron la identificación inicial de cepas y clones de *T. cruzi*, así como de otros tripanosomatídeos que compartían similitudes en la secuencia del ADNk. Esta metodología de análisis, más tarde denominada Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP por sus siglas en inglés), sentó las bases para estudios posteriores de variabilidad genética en estos microorganismos (Morel y col., 1980; Gonçalves y col., 1984; Gonçalves y col., 1991). La utilización del ADNk de *T. cruzi* como herramienta de caracterización genética se basa principalmente a su abundancia en el genoma total, correspondiendo entre el 20-25% del ADN total del parásito (Leon y col., 1980). Adicionalmente, dentro de la composición genética del ADNk podemos encontrar estructuras circulares denominadas minicírculos. Estas estructuras, presentan en número de 5-20x10³ copias están organizadas en cuatro regiones conservadas de 120 pares de bases (Pb) situadas en un intervalo de 90° y cuatro regiones hipervariables no repetidas (Sturm y col., 1989).

Estudios mediante PCR-RFLP de aislados de *T. cruzi* con diferentes orígenes biológicos, pudieron demostrar la presencia de poblaciones heterogéneas aisladas de pacientes con ECh (Morel y col., 1980). Por otra parte, la técnica de PCR-RFLP permitió la observar la selección de subpoblaciones parasitarias en ratones inoculados con diferentes cepas, revelando perfiles electroforéticos diferentes de los parásitos recolectados después de diferentes pasajes (Morel y col., 1986). Posteriormente, estudiando los fragmentos de ADNk generados por diferentes combinaciones de enzimas de restricción en cepas de *T. cruzi* provenientes de diferentes áreas geográficas de América del Sur y Central, lograron generar la primera clasificación de grupos en *T. cruzi*, basada en su perfil electroforético (Avila y col., 1990; Gonzalez y col., 1995; Venegas y col., 1997). Sin embargo, motivado a las limitaciones intrínsecas de la técnica de PCR-RFLP y la variabilidad genética de *T. cruzi*, el resultado final fue una gran confusión en la denominación de diferentes grupos propuestos (Guhl y Ramírez, 2013).

Paralelamente a la clasificación de esquizodemas, diversos investigadores se encontraron trabajando en la utilización de diversos marcadores moleculares para mejorar la clasificación genética de *T. cruzi*. Entre los primeros marcadores moleculares polimórficos estudiados se encontraron los genes del ADN ribosomal (ADNr) y la región intergénica del miniexón o spliced-leader (SL-IR), que

permitieron dividir a *T. cruzi* en dos grupos principales (Zingales y col., 1993; Souto y col., 1996; Fernandes y col., 1998), denominados como *T. cruzi* I y II. Posteriormente, la creación de un algoritmo de PCR basado en las secuencias de SL-IR y los genes del ADNr 24Sα y 18S permitió la clasificación de *T. cruzi* en seis linajes (TcI, TcIIa-e) (Brisse y col., 2000; Diosque y col., 2003). En el año 2009, en base a los últimos estudios filogenéticos y epidemiológicos, un comité de expertos acordó la clasificación de las cepas de *T. cruzi* en seis unidades discretas de tipificación (UDTs, TcI-TcVI) (Zingales y col., 2009). Estas UDTs se definen como un conjunto de cepas que se encuentran genéticamente más relacionadas entre sí que con cualquier otra cepa y que son identificadas por medio de marcadores genéticos y asociadas con diferentes distribuciones geográficas y ciclos de transmisión (Revollo y col., 1998; Miles y col., 2009; Zingales y Macedo, 2023).

Recientemente, en diversas regiones de América de Sur y Central, han sido caracterizados una serie de aislamientos de *T. cruzi* asociados a murciélagos, los cuales han mostrado un genotipo diferente a las seis UDTs descritas hasta el momento. Estos análisis indicaron la existencia de un nuevo grupo evolutivo, denominado *Tcbat*, genéticamente más cercano a TcI, pero claramente segregado del resto de las UDTs (Marcili y col., 2009; Ramírez y col., 2014; Lima y col., 2015). En líneas generales, con la optimización y aumento de la sensibilidad de las técnicas de biología molecular, actualmente se ha podido realizar caracterizaciones genéticas de poblaciones de *T. cruzi* en muestras clínicas de diverso origen (Cura y Schijman, 2013). Sin embargo, a pesar de los múltiples marcadores moleculares para determinar las UDTs de *T. cruzi*, hasta la fecha no existe consenso sobre cual utilizar (Ramírez y col., 2010; Muñoz-Calderón y col., 2013; Cura y col., 2015; Brenière y col., 2016; Zingales y Macedo, 2023). Además, los estudios de tipificación también pueden quedar sesgados cuando el método implica la realización de cultivos *in-vitro* o infección experimental, lo que puede llevar a un proceso de selección parasitaria (Cura y Schijman, 2013).

1.8. Estructura policlonal de las poblaciones naturales de *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es una especie compuesta de poblaciones heterogéneas que circulan por la naturaleza entre el hombre, vectores, animales domésticos y reservorios silvestres

(Fernandes y col., 1997). Esto conlleva a que, las personas que viven en regiones endémicas pueden ser infectadas en múltiples ocasiones por diferentes triatomíneos y estos a su vez pueden picar a diferentes individuos infectados. Esta ambigüedad en el mecanismo de transmisión, propicia la formación de poblaciones policlonales en vectores y hospederos, conduciendo a la obtención de cepas con una variabilidad intrínseca cuando son aisladas en cultivo (Macedo y col., 2002). Diversos estudios moleculares basados PCR-RFLP del ADNk (Morel y col., 1980; Deane y col., 1984; Carneiro y col., 1991) y loci para microsatélites (Oliveira y col., 1998) han demostrado la diversidad clonal de varias cepas de *T. cruzi*. Se han detectado diferentes UDTs en muestras de sangre seriadas de pacientes crónicos (Sánchez y col., 2013), pacientes inmunosuprimidos (Burgos y col., 2008a; Burgos y col., 2010), y en muestras Pre-Tratamiento (Pre-TTO) y Post-Tratamiento (Post-TTO) de un mismo paciente (Martínez-Pérez y col., 2016).

Debido a la propagación clonal, cada individuo presente en una cepa particular se reproduce por división binaria y se mantiene sin cambios por un elevado número de generaciones, hasta que ocurran mutaciones. De esta forma, los aislamientos de *T. cruzi* están compuestos por un conjunto de clones que pueden ser estabilizados por relaciones simbióticas, pero cuyo equilibrio podría verse afectado dependiendo del ambiente en el cual se realice la división celular. Una situación particularmente estresante podría ser el paso del vector invertebrado al hospedero humano, principalmente por el cambio de temperatura y la acción del sistema inmune humano, lo que llevaría a la eliminación de algunos clones por su incapacidad de competir y propagarse en el nuevo entorno o por la acción de los mecanismos de defensa del hospedero, simplificando la complejidad de la cepa infectante (**Figura 4**). En este sentido, se ha demostrado que las cepas aisladas de vectores o reservorios silvestres son más complejas genéticamente que aquellas obtenidas de pacientes con infección aguda, y que a su vez las cepas de estos últimos son más complejas que las aisladas de pacientes con infección crónica (Oliveira y col., 1998). Asimismo, debido al polimorfismo genético, diferentes clones de una cepa pueden presentar tropismo por diferentes tejidos, por lo que la diversidad de las poblaciones infectantes y su tropismo específico puede ser un factor determinante en el curso clínico que tome la enfermedad (Macedo y col., 2002). Este escenario

constituye el denominado modelo de histotropismo clonal de la enfermedad de Chagas (Macedo y Pena, 1998).

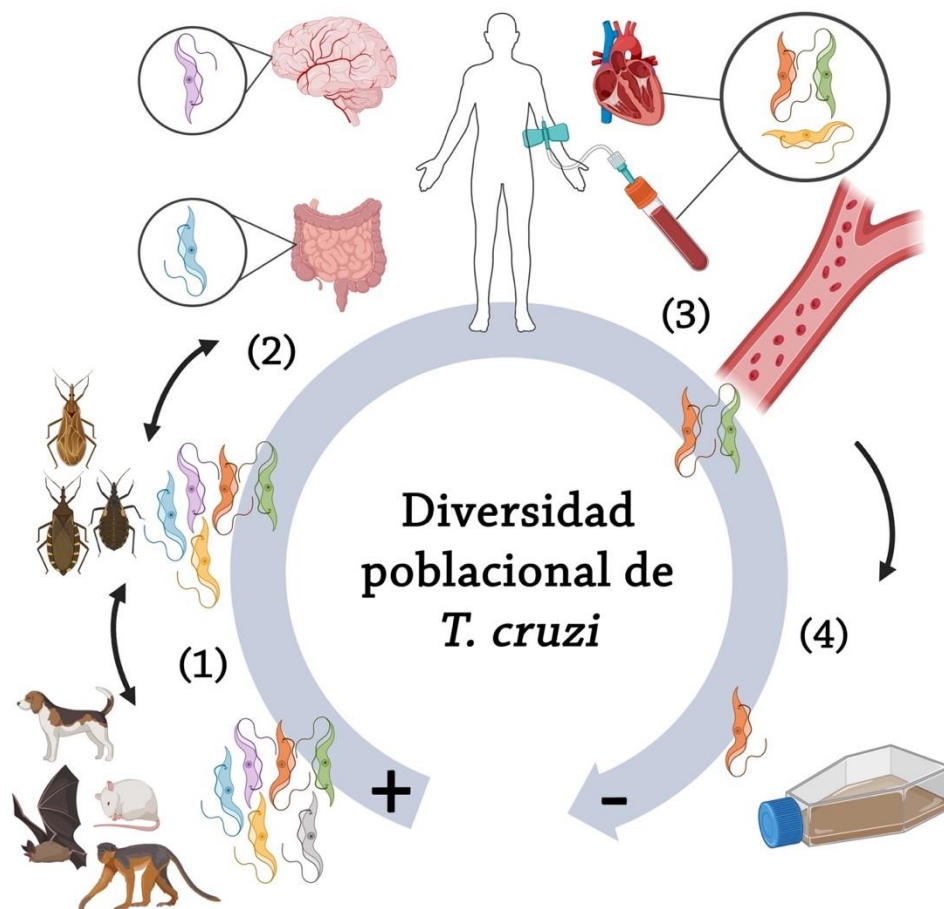


Figura 4. Esquema del proceso de reducción de las poblaciones policlonales de *T. cruzi*. El paso de la población policlonal del vector invertebrado al humano conlleva la selección de algunos clones parasitarios (1), decreciendo la complejidad de la cepa infectante en la fase aguda. Esta reducción de clones es aún mayor en la fase crónica (2). La selección clonal también puede ocurrir durante el aislamiento del parásito (3) y su cultivo *in-vitro* (4), por lo que las poblaciones analizadas por métodos moleculares dependerán del proceso de aislamiento de la cepa de la sangre del paciente. Modificado de (Macedo y col., 2002)

1.10. Tratamiento etiológico para la Enfermedad de Chagas

El objetivo del tratamiento específico de la ECh es la eliminación total de los parásitos en los individuos infectados, previniendo así el desarrollo de la enfermedad. Con esta iniciativa, a finales de 1960 e inicios de 1970, surgieron dos medicamentos con buenas perspectivas para el tratamiento de la ECh.

1.10.1. Nifurtimox (NFX)

Su estructura química es 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilideno-amino tetra hidro 4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) (**Figura 5A**). Fue sintetizado por Bayer AG y conocido, inicialmente, como Bayer 2502, para comercializarse luego, en 1972, como Lampit (Brener, 1979). Desde 1967, la dosis recomendada es de 8-10 mg/kg/día durante 90-120 días (Chirac y Torreele, 2006). Sin embargo, su producción de NFX se interrumpió en 1997, reanudándose en 2000 tras las exigencias de la OMS para el tratamiento tanto de la tripanosomiasis africana como de la enfermedad de Chagas (Jannin y Villa, 2007; Ranjita, 2013). En 2013, se llevó a cabo un ensayo clínico (fase I) con pacientes crónicos infectados para analizar las propiedades biofarmacéuticas de un nuevo comprimido de 30 mg de NFX en comparación con los comprimidos de 120 mg disponibles en el mercado. Los resultados mostraron que ambas formas farmacéuticas sólidas eran bioequivalentes, lo que sugiere la eficacia de NFX a dosis bajas (Junior y col., 2017).

El NFX es un parasiticida perteneciente a la familia de los nitrofuranos y tiene acción directa contra las formas tripomastigote y amastigote de *T. cruzi*. Es administrado por vía oral, con buena absorción y es eliminado luego de sufrir un proceso de biotransformación a nivel del hígado (Vives y col., 2004). Los efectos adversos son frecuentes e incluyen hipersensibilidad, dermatitis, fiebre, ictericia, infiltrados pulmonares, anafilaxia, mialgias y debilidad. Luego de un tratamiento prolongado, se observa con frecuencia alteraciones gastrointestinales (náuseas y vómitos), neuropatías periféricas y anorexia severa. De forma infrecuente, se pueden presentar cefaleas, leucopenia, alteraciones psíquicas, excitación del Sistema Nervioso Central y disminución del número de espermatozoides (Rassi y Luquetti, 1992; Kelly y Wilkinson, 2013).

1.10.2. Benznidazol (BZN)

Su estructura química es N-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida (**Figura 5B**). Fue sintetizado por F. Hoffman-La Roche e inicialmente llamado Ro7-1051 (Rassi y Luquetti, 1992). Este compuesto destruye las formas circulantes de *T. cruzi* con erradicación de la parasitemia, aunque sus beneficios para mejorar las lesiones histopatológicas o la función cardíaca no son del todo conocidos en la actualidad (Parada y col., 1996; Cançado, 2000).

La dosis recomendada de BZN para adultos es de 8-10 mg/kg por vía oral, mientras que la dosis correspondiente para niños de hasta 12 años es de 5-8 mg/kg por vía oral, ambas en dos dosis divididas y administradas diariamente durante 30-60 días (Viotti y col., 2009). Adicionalmente, a través de la Iniciativa de Medicamentos para Enfermedades Desatendidas (DNDi) y LAFEPE (Brasil) se realizó una formulación pediátrica para niños con un peso <20 kg (12,5 mg de BNZ por comprimido). Esta nueva formulación fue registrada por la Agencia Brasileña de Vigilancia Sanitaria y en el año 2013 se añadió a la Lista Modelo de Medicamentos Esenciales para Niños de la OMS (Junior y col., 2017; Seremeta y col., 2019). En la actualidad, un consorcio público y privado argentino constituido por el Ministerio de Salud, Maprimed y Elea en conjunto con la Fundación Mundo Sano, es la única fuente de BZN a nivel mundial. En 2017, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) aprobó el BZN para el tratamiento de niños (de 2 a 12 años) con ECh, siendo el primer fármaco registrado por la institución para el tratamiento de esta enfermedad (Yoshioka y col., 2020).

Los efectos adversos producidos por este fármaco han sido clasificados en tres grupos: 1. Signos de hipersensibilidad, dermatitis con reacciones cutáneas, edema generalizado, fiebre, linfadenopatía, mialgias y artralgias; 2. Depresión de la médula ósea, neutropenia, púrpura trombocitopénica y agranulocitosis y 3. Polineuropatía, parestesia y polineuritis periférica (Urbina y col., 1999; Coura y De Castro, 2002).

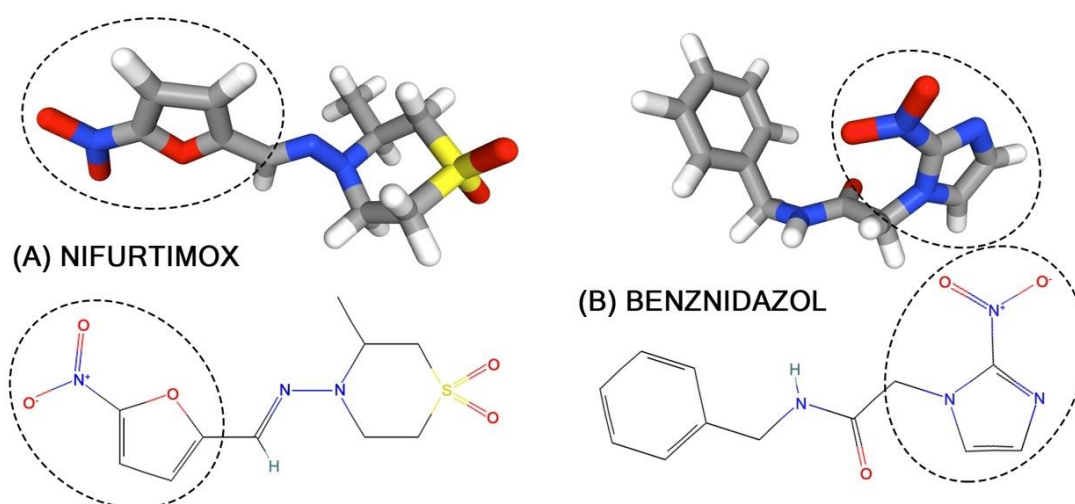


Figura 5- Estructura química de los fármacos actualmente disponibles para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas. Las regiones resaltadas corresponden a los grupos: **A)** 5-nitrofurano (Nifurtimox); **B)** 2-nitroimidazol (Benznidazol). Modificado de (Kelly y Wilkinson, 2013)

1.11. Mecanismos de acción

Benznidazol y Nifurtimox son prodrogas que actúan directamente sobre el parásito después de ser activadas por nitroreductasas propias, dentro de las que se han descrito las enzimas TcNTR-1 (número EC 1.5.1.38), TcOYE (número EC 1.6.99.1) y TcAKR (número EC 1.1.1.188) (Murta y col., 2006; Wilkinson y col., 2008; Díaz-Viraqué y col., 2023). Hasta el momento, se conoce que ambos fármacos son procesados inicialmente por diferentes vías. Durante el proceso de bioactivación de NFX, se originan metabolitos químicamente reactivos (O_2^- y H_2O_2) (**Figura 6**). Este proceso comienza con una reacción catalizada por la NADPH-citocromo P450 reductasa presente en *T. cruzi*, que actúa sobre el grupo nitro ($-NO_2$) de las moléculas de tipo $R-NO_2^-$ produciendo un anión-radical nitro intermediario (Moreno y col., 1984). Este radical sufre un ciclo redox con el oxígeno molecular, que lo reduce y regenera el fármaco (Mason y Holtzman, 1975). Como se ve en la **Figura 6**, el anión superóxido (O_2^-) sufre una dismutación catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), para producir O_2^- y H_2O_2 (Temperton y col., 1998). El anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en presencia de Fe^{3+} , forman el radical libre hidroxilo (reacción de Haber-Weiss). Estos radicales libres, principalmente OH^- , se unen a lípidos, proteínas y ADN, y originan la actividad citotóxica del fármaco (Díaz de Toranzo y col., 1988).

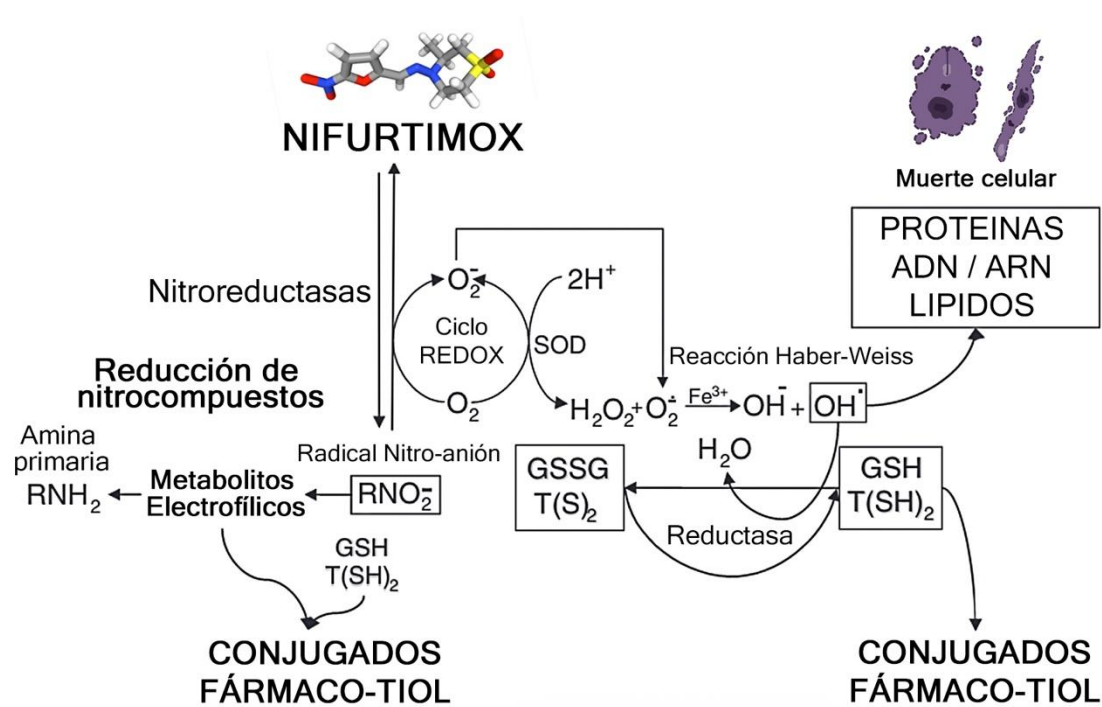


Figura 6- Mecanismo de Acción del fármaco Nifurtimox. Modificado de (Maya y col., 2007).

El mecanismo de activación del BZN es poco conocido y parece no depender de la formación de radicales de oxígeno, como en el caso de NFX (Maya y col., 2007). Existen pruebas que indican que la bioactivación del BZN ocurre por la activación enzimática de enzimas nitroreductasas de tipo I (NTR) (Patterson y Wyllie, 2014). En este proceso, las NTR dependientes de NADH reducen el residuo 2-nitroimidazol del BZN a hidroxilamina en una reacción de transferencia de dos pasos/dos electrones. La hidroxilamina se convierte en dialdehído glioxal, un producto altamente reactivo que forma complejos moleculares a partir de enlaces covalentes con ADN, ARN, proteínas y tioles de bajo peso molecular (**Figura 7**). A partir de la formación de aductos glioxal-guanosina, se bloquea la síntesis de nuevas cadenas de ADN, mientras que los aductos glioxal-tioles inhiben el rudimentario sistema antioxidante de *T. cruzi*, haciendo que el parásito sea altamente susceptible al daño oxidativo (Hall y Wilkinson, 2012). Adicionalmente, el metabolismo del BZN también produce derivados del anión radical nitro ($R\text{-NO}_2^-$), que junto con el dialdehído glioxal ejerce potentes efectos citotóxicos en todas las formas evolutivas de *T. cruzi* (Wilkinson y Kelly, 2009).

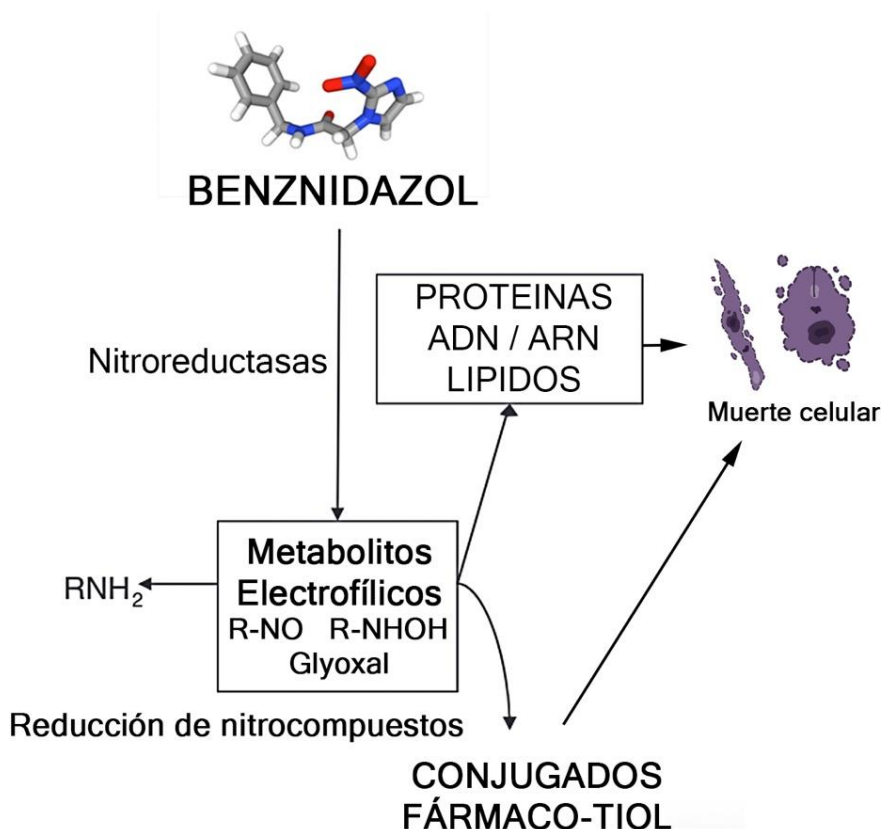


Figura 7- Mecanismo de Acción del fármaco Benznidazol. Modificado de (Maya y col., 2007).

1.12. Criterios de Cura

Como se mencionó anteriormente, el tratamiento actual para la ECh sigue realizándose con medicamentos desarrollados en las décadas de 1960 y 1970, los cuales además de su actividad tripanocida, también presentan una alta tasa de efectos adversos (Hasslocher-Moreno y col., 2012; Alarcon de Noya y col., 2017), lo que lleva a que aproximadamente el 10% de los pacientes interrumpan el tratamiento antes de completar los días recomendados del mismo (Sperandio da Silva y col., 2017).

Una vez infectados, los individuos que sufren ECh muestran consistentemente títulos de anticuerpos para *T. cruzi* a lo largo de toda su vida, mientras que la parasitemia suele ser indetectable en más de la mitad de los casos. A nivel clínico, la progresión de la enfermedad es lenta, tardando años en manifestar signos y/o síntomas de patología. Esta interacción entre factores serológicos, parasitológicos y clínicos influye significativamente en la evaluación de la respuesta al tratamiento tripanocida. Sin embargo, los criterios que definen si un paciente se curó con el tratamiento etiológico hasta el momento no se han establecido con claridad.

A corto plazo, las herramientas de biología molecular para detectar ADN parasitario se utilizan como marcador de falla terapéutica o, como factor decisivo para la inclusión de pacientes dentro de los ensayos clínicos que investigan la respuesta terapéutica de NFX, BZN y otras formulaciones farmacológicas (Moreira y col., 2013; Parrado y col., 2019; Schijman, 2023). En estos casos, donde la PCR cumple funciones de biomarcador, la definición de cura parasitológica requiere de la ausencia continua de presencia parasitaria durante un período de tiempo posterior al tratamiento (no definido). Por otra parte, estudios de seguimiento a medio y largo plazo, los pacientes tratados con medicamentos tripanocidas suelen mostrar un declive progresivo en los títulos de anticuerpos con el paso del tiempo. La investigación realizada en adultos, sugiere que las tasas de seroconversión pueden ocurrir dentro de un período de 5 a 10 años después del tratamiento, alcanzando eventualmente un estado seronegativo sostenible (Sguassero y col., 2015; Murphy y col., 2021), lo que hasta el momento si es un claro indicio de cura parasitológica.

Dentro de los criterios de cura, también es importante considerar los aspectos clínicos que presentan estos pacientes. Cuando se habla de anormalidades

electrocardiográficas o ecocardiográficas, estas no presentan una reversión de las alteraciones luego de realizarse los tratamientos tripanocidas (Morillo y col., 2015). Por lo tanto, en la ECh crónica, el factor crucial para el pronóstico del paciente no radica en la resolución de signos y/o síntomas, sino en disminuir el riesgo de sufrir eventos cardiovasculares subsiguientes y la progresión a la forma cardíaca (Hasslocher-Moreno y col., 2023). En este contexto específico, se establece el criterio de cura clínica.

Adicionalmente a los marcadores parasitológicos y serológicos, han sido investigados diversos biomarcadores para evaluar la respuesta terapéutica a corto plazo (Cortes-Serra y col., 2020). Sin embargo, solo un número limitado de estos puede determinar de manera confiable la efectividad del tratamiento. Además de los biomarcadores serológicos convencionales, que implican la detección de anticuerpos contra antígenos de *T. cruzi*, se han analizado subclases específicas de IgG y cambios en sus niveles de expresión (Francisco y col., 2022). En cuanto a la evaluación clínica, se han considerado biomarcadores cardíacos como el electrocardiograma, y los niveles de anticuerpos específicos para la troponina sérica, péptido natriurético cerebral, marcadores de fibrosis cardíaca, proteína C reactiva, citocinas y quimiocinas; estas últimas ofreciendo información sobre procesos inflamatorios y respuestas al tratamiento (Sathler-Avelar y col., 2008; Apt y col., 2021; Ferreira y col., 2022).

En resumen, la evidencia científica existente confirma que la evaluación del tratamiento etiológico en la ECh puede basarse en criterios parasitológicos, serológicos y clínicos. Si bien se han examinado diversos tipos de biomarcadores en relación con la respuesta terapéutica al tratamiento tripanocida, su aceptación generalizada como criterios de cura aún no se ha establecido.

1.13. Eficacia del tratamiento y susceptibilidad de aislados de *Trypanosoma cruzi*

En general, se acepta que el BZN y NFX presentan una actividad tripanocida limitada, pues a menudo, no producen cura parasitológica (Brener, 1979; Storino y col., 2014). Los estudios clínicos indican que NFX y BZ son muy eficaces en el tratamiento de la fase aguda de la enfermedad de Chagas, alcanzando hasta un 80% de curación parasitológica (Cançado, 2002). Además, el fármaco BZN promueve una curación

parasitológica del 60-70% en niños de hasta 14 años de edad en Brasil y Argentina (Andrade y Magalhães, 1997; Sosa Estani y col., 1998; Sosa-Estani y col., 2009). Sin embargo, otros estudios en pacientes del mismo grupo de edad mostraron tasas de curación más bajas (Silveira y col., 2000; Solari y col., 2001; Urbina, 2009; Yun y col., 2009). En adultos en fase crónica, sólo el 5-20% de los pacientes se consideraban parasitológicamente curados (Cançado, 2000; Cançado, 2002; Dias, 2006).

Hasta la fecha, se desconocen las razones de las marcadas diferencias en la eficacia de ambos fármacos en las fases aguda y crónica de la enfermedad de Chagas. Se han atribuido a diferencias fenotípicas entre cepas, variaciones en las propiedades farmacocinéticas de los fármacos (vida media corta) y su capacidad limitada para penetrar en los tejidos donde se concentran los parásitos en la fase crónica (Urbina y Docampo, 2003; Buckner, 2008). En este contexto, el modelo de evolución clonal postulado para *T. cruzi* predice una correlación entre la divergencia filogenética de los clones y sus propiedades biológicas (Tibayrenc y Brenière, 1988).

La evaluación de la efectividad farmacológica del BZN como tratamiento de la enfermedad de Chagas, ha sido objeto de ensayos clínicos exhaustivos (Riarte y col., 2012a; Molina y col., 2014; Morillo y col., 2017; Rassi y Marin, 2017; Torrico y col., 2018; Cafferata y col., 2020; Torrico y col., 2021). Sin embargo, la condición de cronicidad de la mayoría de los pacientes enrolados en estos estudios, así como las dificultades asociadas con la interpretación de los resultados *post-hoc* de subgrupos de pacientes por región geográfica, se ha revelado como un desafío intrincado, dada la diversidad en las cargas parasitarias, variabilidad genética de las poblaciones de *T. cruzi* y las respuestas al tratamiento.

Estudios sobre la eficacia de la BZN y NFX han revelado que sus efectos terapéuticos varían según la zona geográfica donde se administren (Yun y col., 2009; Molina y col., 2014; Rassi y Marin, 2017). En este contexto, la aplicación de técnicas de biología molecular altamente sensibles y la consideración de la variabilidad genética de *T. cruzi*, se presentan como elementos esenciales para comparar de manera precisa la efectividad de los tratamientos etiológicos de la enfermedad de Chagas a nivel regional.

La cuantificación de la carga parasitaria mediante qPCR en los ensayos clínicos multicéntricos, se ha utilizado durante mucho tiempo para comparar las cargas parasitarias entre cohortes de pacientes como evidencia de efectividad terapéutica.

Sin embargo, debido a la heterogeneidad genética entre las cepas de *T. cruzi*, el establecimiento de una curva estándar única ha sido un gran reto. En la última década, se han publicado diversos protocolos utilizando curvas estándar a partir de diferentes cepas de *T. cruzi* (UDTs) como patrones de referencia (Andrade y col., 1985; Schijman y col., 2003; Peters y McLeod, 2008; Rassi y Marin-Neto, 2010; Urbina, 2010; Bern, 2015). Estas curvas estándar, se realizan mediante cultivos axénicos de *T. cruzi* que presenten la mayor prevalencia en cada región, lo que permite una cuantificación más precisa para la mayoría de las muestras de pacientes, asumiendo que estaban infectados con poblaciones pertenecientes a una única UDT. No obstante, este enfoque genera un sesgo para la comparación directa de cargas parasitarias entre muestras clínicas de diferentes pacientes, incluso dentro de la misma región geográfica, ya que puede existir presencia solapada de diferentes poblaciones de *T. cruzi* con un contenido genómico variable y, por tanto, presentar diferencias en el número de copias del gen diana de la qPCR en la misma cohorte de pacientes, e incluso sobre un mismo individuo (Organization, 2002; Salvatella, 2006; Lugo, 2011).

Esta dependencia de la cepa de *T. cruzi* en la construcción de curvas standard para cuantificación de carga parasitaria, podría resolverse generando una secuencia conservada o consenso correspondiente al fragmento utilizado como blanco molecular, y una vez clonada, se podrían generar curvas de calibración para expresar la carga parasitaria en numero de copias del blanco molecular por unidad de volumen de muestra, independientemente de la UDT de *T. cruzi* que esté infectando al paciente.

1.14. Susceptibilidad de aislados de *Trypanosoma cruzi* a los fármacos tripanomicidas.

Diversos estudios se han centrado en la relación entre la diversidad genética de las cepas y las características clínicas o biológicas asociadas (DVORAK y col., 1982; Andrade y col., 1985; Andrade y Magalhães, 1997; Revollo y col., 1998; Toledo O y col., 2002; Villarreal y col., 2005). En este contexto, un hallazgo importante es la aparición de cepas naturalmente resistentes al BZN y NFX descritas por Filardi y Brener (1987) al evaluar 47 aislados representativos del norte y sur de Brasil. Los autores observaron que la eficacia terapéutica oscilaba entre el 0% y el 100%, y

clasificaron las cepas en resistentes (0 a 33% de curación); intermedias (33 a 66% de curación) y sensibles (66 a 100% de curación) a los fármacos. Curiosamente, la mayoría de las cepas presentaron susceptibilidad o resistencia a ambos fármacos (Filardi y Brener, 1987).

1.15. Mecanismos de resistencia

En las últimas décadas, el principal obstáculo para el tratamiento de las enfermedades causadas por organismos procariotas y eucariotas ha sido la aparición de resistencia a los fármacos (Papadopoulou y col., 1994; Borst y Ouellette, 1995; Ouellette, 2001). *Trypanosoma cruzi* no es la excepción, aislados refractarios al tratamiento pueden ser encontrados en todo el continente americano y es posible inducir la resistencia a los nitro-heterocíclicos fácilmente en el laboratorio (Murta y Romanha, 1998; Wilkinson y Kelly, 2009). Los mecanismos implicados en el fenómeno de la resistencia a BZN y NFX son investigados mediante diferentes enfoques, utilizando para ello, aislados cuya resistencia fue inducida por la presión selectiva de los fármacos. Se han encontrado, aproximadamente, 96 genes potencialmente generadores de mecanismos de resistencia, cuyas funciones biológicas son muy diversas, involucrándose en la activación de fármacos, transporte transmembrana, defensa ante especies reactivas de oxígeno (del inglés ROS) y metabolismo celular, por mencionar algunos (Villarreal y col., 2005; Murta y col., 2006; Andrade y col., 2008).

Todos estos genes actúan en las vías moleculares de resistencia en poblaciones parasitarias inducidas *in-vitro*, posiblemente como mecanismos estables y/o transitorios en la resistencia y supervivencia frente a una variedad de fármacos nitro-heterocíclicos, entre ellos BZN y NFX. Sin embargo, menos del 5% de estos genes han sido confirmados como generadores de mecanismos de resistencia (Kubata y col., 2002; Wilkinson y Kelly, 2009; Hall y Wilkinson, 2012). Adicionalmente, la falta de conocimiento sobre la naturaleza de los metabolitos tóxicos involucrados en la muerte del parásito, constituye un punto importante al momento de reconstruir los posibles mecanismos de resistencia en *T. cruzi*. Estudios realizados por Whiteway y col. (1998) en bacterias y utilizando nitrofuranos, que actúan como prodrogas, demostraron que los mecanismos de resistencia a estos

fármacos son conferidos por mutaciones de una oxidoreductasa dependiente de flavina, perteneciente a la familia de las Nitroreductasas (NTR) de tipo I.

En *T. cruzi*, se han identificado al menos tres enzimas con actividad similar de NTR, de las cuales, la Prostaglandina F₂ α sintasa (TcOYE) es la única que no presenta un papel significativo en el procesamiento de los fármacos, ya que sólo es capaz de promover la reducción de NFX en condiciones anaeróbicas (Streeter y Hoener, 1988). Las otras dos enzimas, han sido designadas como TcNTR-1 (Wilkinson y col., 2008) y TcAKR (Garavaglia y col., 2016), para las cuales se ha evidenciado experimentalmente su participación en la reducción de BZN y/o NFX en presencia de NADPH y/o NADH. Sin embargo, hasta el momento solamente la enzima TcNTR-1 ha mostrado participar directamente en la activación de BZN, NFX y otros fármacos nitro-heterocíclicos en *T. cruzi* (**Figura 8a**) (Wilkinson y col., 2008).

La reducción de NFX por la enzima TcNTR-1 genera un grupo nitrilo insaturado de cadena abierta, responsable del efecto tripanomicida (Kubata y col., 2002). En el caso de BZN, el metabolismo del fármaco conduce a la formación de glioxal, un metabolito con diversas propiedades citotóxicas (**Figura 8a**) (Hall y Wilkinson, 2012).

Los mecanismos de resistencia al tratamiento en *T. cruzi* parece ser el resultado de mecanismos multifactoriales, entre los que también se destaca la presencia de transportadores ABC (Sauvage y col., 2009). Los transportadores ABC colaboran en el mantenimiento de las vías de respuesta al estrés y la detoxificación celular y están implicados en el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (MDR) (**Figura 8a**). Aunque los transportadores ABC han sido descritos en protozoos flagelados desde 1990, todavía se sabe poco sobre su papel fisiológico y su participación en la resistencia al tratamiento. Estudios realizados por Zingales y col. (2015), sugieren que el transportador ABCG1 está relacionado con la resistencia natural al BZN en cepas de *T. cruzi*, identificando diversos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) a lo largo de su secuencia (Zingales y col., 2015) y por lo tanto, ciertas variaciones aminoacídicas en la secuencia predicha de la proteína (Franco y col., 2015). Sin embargo, estas diferencias no pudieron asociarse con la resistencia a los fármacos. La capacidad de *T. cruzi* para desarrollar fácilmente resistencia por mecanismos mutacionales podría reflejar características evolutivas asociadas al mantenimiento

del genoma (Kelly y Wilkinson, 2013). Por lo tanto, este es un punto importante a considerar para el diseño de nuevos fármacos para el tratamiento de la ECh.

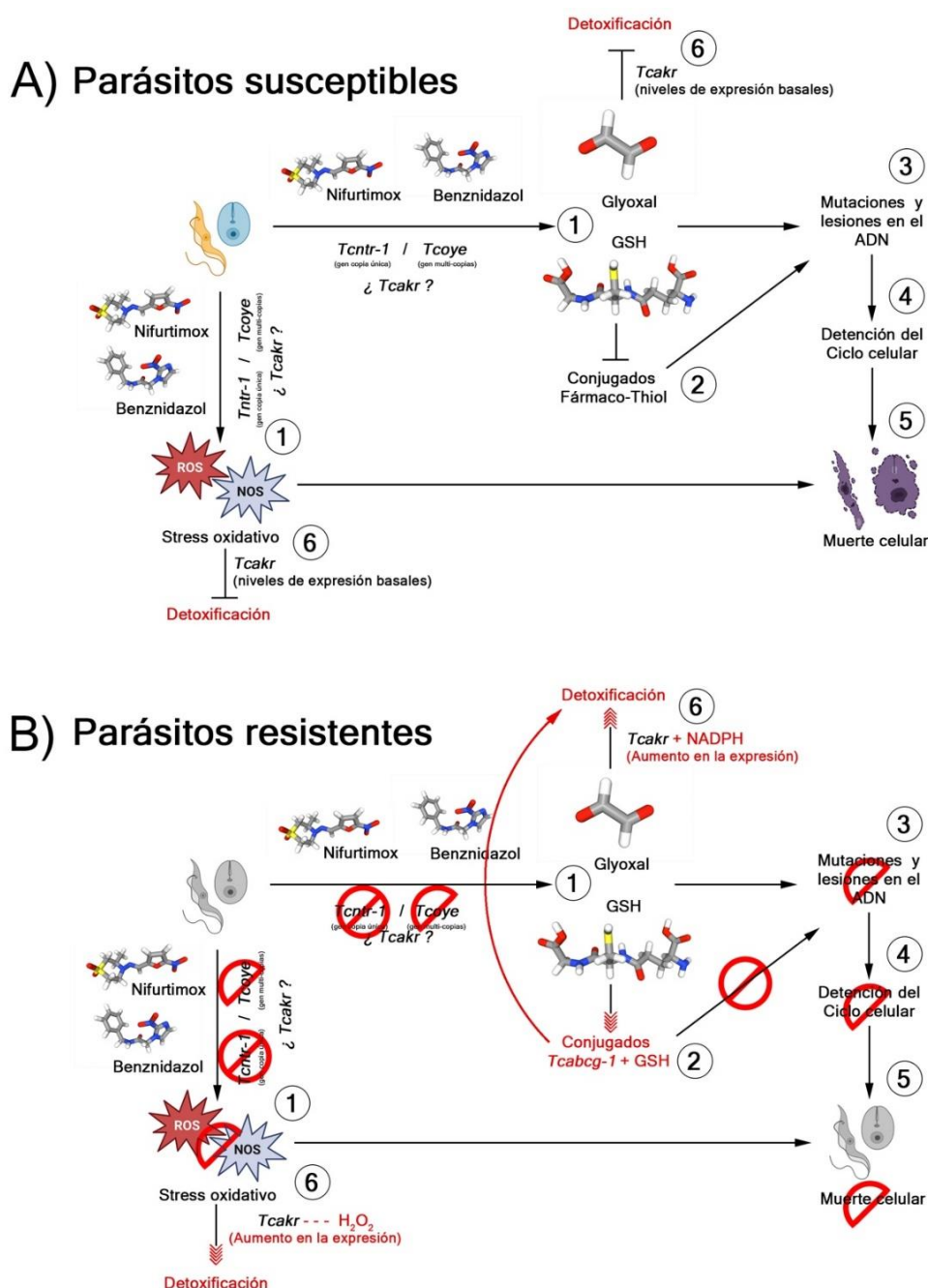


Figura 8. Modelo del papel de las enzimas TcNTR-1, TcOYE, TcAKR y TcABCg-1 en la resistencia a Benznidazol (BZN). En parásitos Wild-Type, el NFX o BZN se activan por la acción de TcNTR-1 para formar glicoxal y glutatión, o por otras nitroreductasas NAD(P)H dependientes para producir ROS (1, 2). Estas moléculas son las responsables de generar mutaciones y lesiones en el ADN (3), detención del ciclo celular (4) y muerte celular (6). En parásitos resistentes a BZN se ha evidenciado que la delección de alelos de TcNTR-1 o copias de TcOYE, sumado a la sobreexpresión de la enzima TcAKR junto con el transportador TcABCg-1 pueden disminuir la formación de glicoxal, glutatión y ROS, extraerlo del interior celular produciendo mecanismos de detoxificación (6) y así disminuir la formación de aductos de nucleótidos, que generan mutaciones y lesiones en el ADN y finalmente muerte celular.

1.15.1. Resistencia farmacológica vía TcNTR-1

Estudios realizados por Wilkinson y col. (2008), Mejía y col. (2012) y Campos y col. (2014) han logrado identificar dos mecanismos diferentes capaces de desactivar la actividad de oxidorreductasa de la enzima TcNTR-1 y, por consiguiente, activar la resistencia a los fármacos nitro-heterocíclicos. Estos mecanismos involucran la pérdida de cromosomas y mutaciones puntuales en la secuencia genética que conlleva a la aparición de codones de detención de la traducción (*STOP*) prematuros en la secuencia aminoacídica de la enzima.

La selección *in-vitro* de fármacos ha demostrado que el cariotipo parasitario puede ser fácilmente alterado (Moreno y col., 1984; Murta y col., 2006). Al comparar el perfil cromosómico de un aislado parental con un aislado parasitario resistente a NFX, se pudo evidenciar la pérdida de un fragmento de 800 Kb (Wilkinson y col., 2008). Esta pérdida en la expresión del fragmento en un cromosoma de *T. cruzi* se ha correlacionado con la baja actividad en la reducción del fármaco NFX por parte de los parásitos con resistencia inducida, comparado con el aislado parental. Debido a que BZN y NFX son prodrogas, Wilkinson y col. (2008) postularon que la resistencia observada, puede deberse a que el gen no codificado en las poblaciones resistentes presenta actividad fisiológica (**Figura 8b**).

Por otra parte, al examinar la secuencia del gen *Tcntr-1* en parásitos con resistencia inducida, Campos y col. (2014) lograron encontrar una transición C/T en la posición 568 río abajo del gen. Esta mutación genera un codón *STOP* (TGA) en la mitad del gen, resultando en una proteína truncada en el carboxilo terminal del sitio de unión a Flavina Mononucleótido (*FMN*), derivando en una reducción considerable en la capacidad de activar la reducción de fármacos nitro-heterocíclicos en las células progenitoras (Campos y col., 2014).

1.15.2. Resistencia farmacológica vía TcOYE

La Prostaglandina F_{2α} sintasa (TcOYE), es otra enzima NADPH-flavin oxidorreductasa, similar a la TcNTR-1, que ha sido implicada en la vía de activación de otros fármacos nitro-heterocíclicos como el NFX, pero no al BZN (Kubata y col., 2002). Esta enzima, una oxidorreductasa, ha sido objeto de diversos estudios que han mostrado diferencias en la regulación entre parásitos sensibles y resistentes a estos fármacos.

Mediante el estudio de proteomas de *T. cruzi*, se ha podido evidenciar que esta proteína estaba disminuida en parásitos resistentes, debido a la delección de tres copias del gen (Murta y col., 2006; Andrade y col., 2008) (**Figura 8b**). Sin embargo, Mejia y col. 2011 demostraron que el gen *Tcoye* estaba sobreexpresado en los parásitos resistentes (Mejía-Jaramillo y col., 2011). Curiosamente, esto se atribuyó a la ausencia funcional del gen *Tcntr-1* en estos parásitos (Mejía-Jaramillo y col., 2012). Por lo tanto, se ha sugerido que cuando *T. cruzi* es expuesto al BZN, primero se inactiva la enzima TcNTR-1 y posteriormente, a mayor concentración del fármaco se pierden copias del gen *Tcoye* y parte de la actividad enzimática de la enzima (Murta y col., 2006).

1.15.3. Resistencia farmacológica vía TcAKR

Trochine y col. (2014). han informado que la enzima TcAKR podría interactuar con un derivado inmovilizado de BZN, lo que sugiere su participación en el modo de acción del BZN. Estudios dirigidos a demostrar el papel de esta enzima en el metabolismo del BZN, lograron evidenciar que tanto una enzima TcAKR recombinante como la nativa pueden reducir BZN utilizando NADPH como cofactor (Garavaglia y col., 2016). Sin embargo, paradójicamente también se ha informado que la sobreexpresión del gen *Tcacr* confiere una modesta resistencia al BZN (Garavaglia y col., 2016; González y col., 2017; Roberts y col., 2018). Estudios previos utilizando formas epimastigote transfectados que sobreexpresan el gen *Tcacr* sugieren que esta enzima puede contribuir a la detoxificación de BZN (**Figura 8b**). Este proceso de detoxificación parece ocurrir mediante la eliminación de glioxal (González y col., 2017), el cual es un metabolito intermedio tóxico y mutagénico que puede reaccionar con el ADN formando un aducto cíclico glioxal-deoxiguanosina, además de provocar la desaminación de la desoxicitidina y la reticulación del ADN (Kasai y col., 1998).

1.15.4. Resistencia farmacológica vía TcABCG-1

Uno de los mecanismos de resistencia farmacológica que se encuentra conservado desde las bacterias hasta la especie humana, consiste en bombear los compuestos fuera de la célula, reduciendo así su concentración interna y, en consecuencia, su citotoxicidad (Balzi y Goffeau, 1994; Ouellette y col., 1998; Ouellette y col., 2001). En

este proceso actúan los transportadores ABC, que son proteínas transmembrana de una superfamilia específica que presentan sitios de unión a ATP, por lo que se denominan transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) (Higgins y Linton, 2004). En específico, se ha propuesto que uno de estos transportadores, denominado TcABCG-1, está implicado en la resistencia natural de *T. cruzi* a BZN (Franco y col., 2015; Zingales y col., 2015). Este gen parece expresarse a niveles más altos en las cepas que son naturalmente resistentes al fármaco (Zingales y col., 2015). Adicionalmente, se han podido observar cambios en la secuencia aminoacídica de TcABCG-1 entre cepas naturalmente resistentes y susceptibles (Franco y col., 2015). Aunque no se ha demostrado, es posible que el transportador TcABCG-1 actúe en el eflujo del BZN mediante la formación de un complejo con glutatión (GSH) (da Costa y col., 2022) (**Figura 8b**).

1.16. Implicaciones clínicas de la variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi*

La infección humana por *T. cruzi* es un fenómeno reciente en su historia evolutiva, lo que sugiere que distintas cepas del parásito pueden tener tasas variables de infectividad y virulencia, provocando respuestas patológicas diversas en el hospedero humano. Esta diversidad en las poblaciones naturales de *T. cruzi* que generan enfermedades con manifestaciones clínicas múltiples, plantea una posible relación entre ambos fenómenos. Sin embargo, varios estudios no han logrado correlacionar la variabilidad genética del parásito con los síntomas clínicos de la enfermedad (Moreno y col., 2010; Mejia-Jaramillo y col., 2012). Esta falta de correlación podría deberse a que, la diversidad poblacional de *T. cruzi* obtenida a partir de muestras de sangre en pacientes infectados puede no representar el conjunto completo de clones parasitarios que inicialmente infectaron al paciente. Esto podría ser resultado de procesos de histotropismo o de la dinámica misma de la infección (Vago y col., 2000; D'Ávila y col., 2009; Burgos y col., 2010). Otro factor a tener en cuenta, es que la mayoría de estos estudios podrían estar sesgados si el proceso de análisis implica la utilización cultivos *in-vitro* o infecciones en modelo animal, lo que podría inducir la selección de ciertos clones (Macedo y col., 2002). Por lo tanto, uno de los principales objetivos de los estudios taxonómicos en *T. cruzi* es identificar si existe asociación de sus genotipos con las manifestaciones clínicas de

la enfermedad. En ese sentido, en pacientes con la forma cardio-digestiva de la enfermedad se ha podido identificar mediante el estudio de perfiles de PCR-RFLP de ADNk, que en poblaciones de *T. cruzi* con diferentes UDTs, existe una distribución diferencial en tejidos (Vago y col., 2000). Otro hallazgo interesante, a partir del análisis de loci de ADN microsatélites, ha sido la detección de diferentes poblaciones parasitarias en sangre y tejido cardíaco de pacientes infectados (Burgos y col., 2007; Valadares y col., 2008), sugiriendo que las manifestaciones clínicas de la enfermedad podrían ser causadas por poblaciones específicas de *T. cruzi*. De igual forma, se ha confirmado la existencia de diferentes poblaciones parasitarias en muestras de circulación periférica y del sistema nervioso central en pacientes reactivados debido a coinfección por VIH (Burgos y col., 2005; Burgos y col., 2008a).

Por otro lado, se ha postulado que la variabilidad genética de *T. cruzi* podría estar implicada en su respuesta diferencial a drogas (Murta y Romanha, 1998; Villarreal y col., 2004). Estudios recientes han demostrado la existencia de una amplia diversidad de respuesta a drogas tripanocidas en ensayos *in-vitro* frente a cepas de *T. cruzi* de diferentes linajes (Filardi y Brener, 1987; Moraes y col., 2014b). Yun y col. 2009, observaron diferentes tasas de seronegativización en cohortes de pacientes de distintas regiones geográficas tratados con BZN, sugiriendo la implicancia de las cepas circulantes en la variabilidad de la respuesta farmacológica.

Diversos estudios han identificado cepas de *T. cruzi* refractarias al tratamiento, pero no han podido confirmar si se trata de resistencia natural o inducida (Veloso y col., 2001). En Colombia y Venezuela, se ha reportado la circulación de cepas con un amplio rango de susceptibilidad al BZN, incluyendo la existencia de cepas naturalmente resistentes (Mejia-Jaramillo y col., 2012; Muñoz-Calderón y col., 2019; Muñoz-Calderón y col., 2021a; Muñoz-Calderón y col., 2023). La resistencia natural de *T. cruzi* ha sido confirmada en cepas aisladas de vectores y reservorios silvestres de zonas geográficas en donde no se han presentado casos autóctonos de la enfermedad, por lo que el parásito nunca debió estar en contacto con drogas tripanocidas (Filardi y Brener, 1987). Sin embargo, hasta la fecha todavía no se ha podido relacionar la susceptibilidad al BZN de aislamientos pretratamiento con el resultado terapéutico (Moreno y col., 2010).

JUSTIFICACIÓN

La respuesta farmacológica es un fenotipo complejo que implica una serie de eventos que van desde la interacción del fármaco con sus receptores, hasta la manifestación de efectos tóxicos en la célula diana, por lo que pequeñas variaciones en el ADN afectarán directamente la respuesta a los medicamentos. El término "farmacogenética" fue acuñado en 1959 por Friedrich Vogel, para abordar las implicancias de las variaciones genéticas entre individuos en su respuesta a los fármacos (Vogel, 1959).

Las investigaciones indican que el tratamiento con NFX y BZN muestra mayor eficacia en la fase aguda de la ECh (Jannin y Villa, 2007; Patterson y Wyllie, 2014; Junior y col., 2017), pero presenta limitada efectividad en la etapa crónica, inconsistencias geográficas en la respuesta, resistencia farmacológica y efectos secundarios notables (Viotti y col., 2009; Alarcón de Noya y col., 2012). Uno de los factores comprometidos en la falla quimioterapéutica asociada a la resistencia, es el alto grado de diversidad genética y biológica que exhiben poblaciones de *T. cruzi*, siendo evidente esta falla en al menos el 27% de las cepas aisladas naturalmente (Macedo y Pena, 1998; Yun y col., 2009).

En la actualidad, uno de los puntos más preocupantes y críticos sobre el tratamiento de la ECh, es quizás, el escaso conocimiento que existe sobre los mecanismos de acción que poseen los fármacos BZN y NFX. Esfuerzos científicos previos han logrado identificar ciertos genes relacionados con estos mecanismos (Andrade y col., 2008; Wilkinson y col., 2008; Mejía-Jaramillo y col., 2011); sin embargo, el modo de acción y los resultados obtenidos aún son ambiguos. Por lo tanto, es esencial comprender estos mecanismos, los blancos terapéuticos y las bases moleculares de la resistencia farmacológica.

En este contexto, surge la necesidad de investigar la correlación entre la diversidad genética de *T. cruzi* y la susceptibilidad al fármaco BZN, considerando la posibilidad de que la falta de correlación experimental pueda deberse a la subestimación de la diversidad parasitaria en las poblaciones de *T. cruzi* cultivadas *in-vitro*. Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que un enfoque dirigido a estudiar las poblaciones naturales de *T. cruzi* presentes en muestras clínicas de pacientes con ECh que exhiben falla terapéutica al tratamiento con BZN, permitirá una caracterización molecular más detallada de los genes vinculados al metabolismo subcelular del fármaco BZN, tales como *Tcntr-1*, *Tcoye*, *Tcacr* y *Tcabcg-1*. Así, podríamos

determinar si posibles mutaciones puntuales presentes en estos genes se pueden asociar a modificaciones estructurales de estas enzimas, además de evidenciar si estos polimorfismos pueden estar presentes en los ciclos de transmisión naturales del parásito, o si, por el contrario, son el resultado de la presión farmacológica.

Los hallazgos de este trabajo de investigación, buscan contribuir al conocimiento de la biología de *T. cruzi*, con la finalidad de generar información útil para la instauración de nuevas formulaciones farmacológicas seguras, basadas en las características genéticas de las poblaciones naturales de parásitos que circulen en pacientes de diversas regiones geográficas. Adicionalmente, estos hallazgos buscan contribuir a la generación de futuros biomarcadores de respuestas terapéuticas, los cuales podrían ser útiles para realizar seguimientos médicos efectivos en la evolución del tratamiento en personas con ECh. En consecuencia, este estudio sugiere un beneficio indirecto para los pacientes con ECh y por ende para el sistema de salud pública.

OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Desarrollar un estudio de caracterización genética sobre poblaciones naturales de *Trypanosoma cruzi* o a partir de aislamientos de las mismas obtenidos por hemocultivo de muestras de pacientes infectados antes y después del tratamiento etiológico, como una aproximación al hallazgo de marcadores moleculares que puedan asociarse a la susceptibilidad o resistencia a las drogas parasitocidas Nifurtimox o Benznidazol.

3.2. Objetivos Específicos

1. Establecer la existencia de asociaciones entre la distribución geográfica de poblaciones de *Trypanosoma cruzi*, unidades discretas de tipificación (UDTs) y susceptibilidad farmacológica, mediante una revisión sistemática y meta-análisis de los ensayos de susceptibilidad *in-vitro* al Benznidazol disponibles en la bibliografía.
2. Identificar cargas parasitarias y unidades discretas de tipificación en las poblaciones naturales de *Trypanosoma cruzi* y de aislamientos parasitarios mediante hemocultivo, asociados a pacientes enrolados en ensayos clínicos con fármacos tripanocidas o detectados en brotes orales que fueron refractarios a los tratamientos suministrados.
3. Comparar la composición genética intra-UDT de poblaciones naturales de *Trypanosoma cruzi* detectables en sangre periférica o de aislamientos obtenidos por hemocultivo en cohortes de pacientes antes del tratamiento, durante el mismo y luego de su falla terapéutica, mediante la caracterización de firmas moleculares de minicírculos (PCR-RFLP-ADNk).
4. Caracterización estructural de las enzimas de *Trypanosoma cruzi* TcNTR-1, TcOYE, TcAKR y TcABCG-1 relacionadas con el procesamiento de fármacos nitro-heterocíclicos.

4.1. Realizar análisis sobre la secuencia nucleotídica de estos genes, para establecer la existencia de Polimorfismos de Nucleótido Único (SNPs) diferenciales entre poblaciones de *Trypanosoma cruzi*, en un contexto epidemiológico y como posibles biomarcadores de respuesta a fármacos nitro-heterocíclicos.

4.2. Realizar análisis sobre la secuencia aminoacídica de estas enzimas, para verificar la existencia de polimorfismos diferenciales entre poblaciones de *Trypanosoma cruzi* y su posible rol como biomarcadores de respuesta a fármacos nitro-heterocíclicos.

4.3. Realizar una evaluación *in-silico*, caracterización estructural, estudios de Dinámica Molecular y Docking de las variantes mutantes con mayor frecuencia de cada una de las enzimas NAD(P)H-dependientes de *Trypanosoma cruzi*, a fin de determinar posibles cambios en el sitio catalítico que expliquen diferencias funcionales en la respuesta farmacológica frente al fármaco Benznidazol.

5. Evaluar la asociación de los polimorfismos identificados como posibles biomarcadores de resistencia farmacológica, en muestras clínicas de pacientes con ECh que presentan falla terapéutica al tratamiento etiológico. Esto se realizará, tanto en poblaciones naturales de *Trypanosoma cruzi* antes y después del tratamiento (de un mismo paciente), como entre las cohortes de pacientes afectados por la misma micro-epidemia de transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*.

METODOLOGÍA

4.1. Aspectos éticos

Los ensayos clínicos abordados en este trabajo fueron aprobados por los Comités de Ética de las instituciones participantes: Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela (CEC-IMT 019/2010, Diciembre 10, 2010) e Instituto Nacional de Parasitología Mario Fatale Chabén, ANLIS-MALBRAN, Ministerio de Salud. Los pacientes incluidos en estos estudios fueron debidamente informados sobre la utilización de las muestras colectadas. Cada participante o sus tutores legales (para el caso de los sujetos menores de edad) firmaron formularios de consentimiento informado por escrito. Las muestras se anonimizaron antes de ser procesadas.

4.2. Pacientes y muestras clínicas

Para el presente estudio, fue utilizada una serie de conveniencia compuesta por un total de 81 pacientes (300 muestras clínicas en total). Cada paciente fue elegido por la presencia de títulos positivos de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* y amplificación/cuantificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) de ADN kinetoplasto y ADN satélite, en la muestra antes del tratamiento etiológico (Pre-TTO) y en al menos una muestra luego del tratamiento (Post-TTO). Adicionalmente, en algunos pacientes fue posible obtener aislados parasitarios en ciertos puntos del seguimiento clínico, los cuales fueron incluidos. Las muestras analizadas fueron colectadas en el marco de un ensayo clínico y dos brotes de transmisión oral de *T. cruzi*.

- i. **Ensayo clínico aleatorizado con Benznidazol en la enfermedad de Chagas crónica - TRAtamiento EN pacientes Adultos (TRAENA):** El objetivo de TRAENA fue determinar si una droga parasitocida como el Benznidazol (BZN) era capaz de modificar la evolución natural de la enfermedad de Chagas (ECH) crónica en pacientes adultos (Riarte y col., 2012a). Se realizó mediante un ensayo clínico aleatorizado (ECA) a doble ciego, en Fase III. Los pacientes fueron seleccionados de la población urbana de la ciudad autónoma de Buenos Aires y la provincia de Buenos Aires, Argentina. Se caracterizó su estadio clínico por evaluación médica, radiología de tórax y electrocardiograma. La muestra se estimó en 750 con una potencia

del 80% y un error $\pm$ de 0,05; los pacientes fueron aleatorizados como BZN o Placebo (PI), y la dosis de administración fue 5 mg/kg/día durante 60 días (Riarte y col., 2012b). La descripción de cada una de las muestras es mostrada en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Características epidemiológicas de los pacientes participantes en el ensayo clínico TRAENA incluidos en el estudio

Código Muestra	Tipo de muestra	Género	Fase clínica inicial	Tratamiento primario	Muestras evaluadas
T11	Sangre	F	Crónico	BZN	3
T36	Sangre	M	Crónico	BZN	3
T63	Sangre	M	Crónico	BZN	2
T156	Sangre	M	Crónico	BZN	2
T194	Sangre	M	Crónico	BZN	2
T301	Sangre	M	Crónico	BZN	3
T374	Sangre	F	Crónico	BZN	2
T393	Sangre	F	Crónico	BZN	2
T401	Sangre	M	Crónico	BZN	3
T39	Sangre	F	Crónico	BZN	3
T255	Sangre	M	Crónico	BZN	2
T339	Sangre	M	Crónico	BZN	2
T536	Sangre	F	Crónico	BZN	3
T549	Sangre	M	Crónico	BZN	3
T613	Sangre	M	Crónico	BZN	3
T656	Sangre	F	Crónico	BZN	3
T249	Sangre	M	Crónico	BZN	3
P001	Sangre	F	Crónico	Placebo	3
P009	Sangre	M	Crónico	Placebo	3
T002	Sangre	F	Crónico	Placebo	3
T009	Sangre	F	Crónico	Placebo	3
T013	Sangre	M	Crónico	Placebo	4
T023	Sangre	M	Crónico	Placebo	4
T024	Sangre	F	Crónico	Placebo	3
T025	Sangre	M	Crónico	Placebo	3
T027	Sangre	M	Crónico	Placebo	3
T033	Sangre	F	Crónico	Placebo	3
T048	Sangre	M	Crónico	Placebo	3
T049	Sangre	M	Crónico	Placebo	3
T050	Sangre	M	Crónico	Placebo	3
T051	Sangre	F	Crónico	Placebo	3
T057	Sangre	M	Crónico	Placebo	3
T059	Sangre	F	Crónico	Placebo	3

T064	Sangre	F	Crónico	Placebo	3
T071	Sangre	F	Crónico	Placebo	3
T073	Sangre	M	Crónico	Placebo	3
T076	Sangre	M	Crónico	Placebo	3
F: Femenino		M: Masculino		BZN: Benznidazol	

- ii. **Brote de enfermedad de Chagas por transmisión oral – Municipio Chacao, Caracas, Venezuela:** En diciembre de 2007 se encontraron formas tripomastigote de *T. cruzi* en un frotis de sangre de una niña remitida al Hospital Universitario de Caracas (HUC) (Martín y col., 2009). La vinculación de casos con la localidad de la posible microepidemia ocurre con la confirmación de un segundo caso positivo (una profesora que trabajaba en el mismo colegio donde estudiaba la niña antes mencionada) (Alarcón de Noya y col., 2010). A partir de ese momento, se realizó un amplio cribado en 1.000 individuos de la escuela. Ciento tres individuos resultaron infectados, pudiéndose demostrar que, en una localidad ubicada a 6 Km de la escuela, existía un ciclo de transmisión activo compuesto por un vector triatomino (*P. geniculatus*), roedores y perros infectados con *T. cruzi* (Alarcón de Noya y col., 2010; Alarcón de Noya y col., 2015). Este brote ha sido el mayor conocido hasta la fecha (Miles, 2010). La descripción de cada una de las muestras se presenta en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Características epidemiológicas de los pacientes del Brote de Enfermedad de Chagas por transmisión oral (Chacao-Venezuela), hemocultivos obtenidos, número de muestras de sangre incluidos en el estudio.

Código Muestra	Tipo de muestra	Edad al momento de la infección (años)	Género	Fase clínica inicial	TTO primario	TTO secundario	Nº de muestras	Clasificación del cultivo <i>in-vitro</i>
909	Hemocultivo	4	F	Agudo	NFX	BZN 1 año Post-TTO	1	Pre-TTO
868	Sangre	5	F	Agudo	NFX		4	
875	Sangre / Hemocultivo	6	M	Agudo	NFX	BZN 3 años Post-TTO	5	1 año Post-TTO
925	Sangre	6	F	Agudo	NFX	BZN 10 años Post-TTO	5	
1614	Sangre	6	F	Agudo	NFX	BZN 4 años Post- TTO	5	
1593	Sangre / Hemocultivo	9	F	Agudo	NFX	BZN 4 años Post- TTO	6	Pre-TTO

1091	Sangre	11	M	Agudo	NFX		3	
1414	Sangre	12	F	Agudo	NFX	BZN 3 años Post- TTO	5	
1600	Sangre	23	F	Agudo	NFX	BZN 3 años Post- TTO	4	
843	Sangre / Hemocultivo	44	F	Agudo	NFX		6	6 y 8 meses Post-TTO
1613	Sangre / Hemocultivo	49	F	Agudo	NFX		5	Pre-TTO
1601	Sangre / Hemocultivo	50	M	Agudo	NFX		5	1 año Post-TTO
1595	Hemocultivo	56	F	Agudo	NFX		1	Pre-TTO
820	Sangre	58	F	Agudo	NFX	ICZ 2 años Post- TTO	3	
C39	Hemocultivo aislado de un <i>P. geniculatus</i> presente en el ciclo de transmisión de la localidad							
F: Femenino			M: Masculino			BZN: Benznidazol		
NFX: Nifurtimox			ICZ: Itraconazol			TTO: Tratamiento		

- iii. **Brote de enfermedad de Chagas por transmisión oral - Chichiriviche de la Costa, Estado Vargas, Venezuela:** En marzo de 2009, un epidemiólogo del Estado Vargas recogió muestras de sangre de pacientes con fiebre prolongada de una localidad rural a orillas del mar. Todas las muestras, fueron evaluadas en el Instituto de Medicina Tropical (IMT) de la Universidad Central de Venezuela, revelando serología IgG e IgM anti-*T. cruzi* positivas. Adicionalmente, se observaron parásitos en los frotis de sangre fresca en algunos individuos. Se realizó un cribado serológico de toda la población (n = 441), encontrándose ochenta y ocho casos confirmados con ECh en individuos relacionados con la escuela local (Alarcón de Noya y Martinez, 2009). Cuatro individuos fallecieron; uno de ellos motivado a un derrame pericárdico e invasión sistémica del parásito (Suárez y col., 2010). La descripción de cada una de las muestras es mostrada en la **Tabla 3**

Tabla 3. Características epidemiológicas de los pacientes del Brote de Enfermedad de Chagas por transmisión oral (Chichiriviche de la Costa-Venezuela), hemocultivos obtenidos, número de muestras de sangre incluidos en el estudio.

Código Muestra	Tipo de muestra	Edad al momento de la infección (años)	Género	Fase clínica inicial	TTO primario	TTO secundario	Muestras evaluadas	Clasificación del cultivo <i>in-vitro</i>
2340	Hemocultivo	5	F	Agudo	BZN		1	Pre-TTO
2431	Sangre	6	M	Agudo	BZN		5	
2367	Sangre	7	F	Agudo	BZN		5	
2384	Sangre	7	F	Agudo	BZN		4	
2708	Sangre	7	F	Agudo	BZN		5	
2712	Sangre	7	F	Agudo	BZN	BZN 1 año Post-TTO	5	
2523	Hemocultivo	7	F	Agudo	BZN		1	1 año Post-TTO
2713	Sangre	8	F	Agudo	BZN		4	
2351	Sangre / Hemocultivo	8	M	Agudo	BZN	BZN 1 año Post-TTO	4	Pre-TTO
2732	Sangre	8	F	Agudo	BZN		5	
2736	Sangre	9	F	Agudo	BZN		5	
2429	Sangre	9	F	Agudo	BZN		5	
2740	Sangre	9	F	Agudo	BZN		5	
2379	Sangre	9	F	Agudo	BZN	BZN 1 año Post-TTO	5	
2393	Sangre	9	F	Agudo	BZN		5	
2318	Sangre	10	F	Agudo	BZN		6	
2400	Sangre	10	M	Agudo	BZN		2	
2417	Sangre	10	M	Agudo	BZN	BZN 1 año Post-TTO	5	
2399	Sangre	10	M	Agudo	BZN		5	
2376	Sangre	10	F	Agudo	BZN		5	
2377	Sangre	11	F	Agudo	BZN		5	
2405	Sangre	11	F	Agudo	BZN		5	
2425	Sangre	11	F	Agudo	BZN		5	
2725	Sangre	11	M	Agudo	BZN		5	
2341	Sangre	11	F	Agudo	BZN		5	
2426	Hemocultivo	11	M	Agudo	BZN		1	1 año Post-TTO
2375	Sangre	16	M	Agudo	BZN		4	
2323	Sangre	26	F	Agudo	BZN	BNZ 1 año Post-TTO	6	
2333	Sangre / Hemocultivo	36	M	Agudo	BZN		5	Pre-TTO
2721	Sangre	47	F	Agudo	BZN		6	
C.Chichi Hemocultivo aislado de un <i>P. geniculatus</i> presente en el ciclo de transmisión de la localidad								
F: Femenino			M: Masculino		BZN: Benznidazol		Tx: Tratamiento	

4.3. Cultivo de los aislados de *Trypanosoma cruzi* en estadio epimastigote

Las formas epimastigote obtenidas de hemocultivos de pacientes (Pre y Post-TTO) y las cepas de referencia de *T. cruzi* Dm28c (TcI), Colombiana (TcI), SylvioX10/1 (TcI), Y (TcII), HE (TcV), Tul (TcVI) y Cl-Brener (TcVI), fueron cultivadas en medio LIT, suplementado con 5% de Suero Fetal Bovino (SFB) y 1% de solución Penicilina-Estreptomicina, realizando sub-cultivos cada 15 días durante la fase de crecimiento exponencial (Rodríguez Durán y col., 2021). Adicionalmente, se utilizaron diversas muestras de ADN genómico provenientes de cepas de referencia de *T. cruzi* presentes en el Biobanco del Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas, Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI), Buenos Aires, Argentina. La descripción epidemiológica de las cepas de referencias de *T. cruzi* utilizadas en este trabajo, son mostradas en la **Tabla Suplementaria 1**.

4.4. Preparación de muestras clínicas y extracción de ADN.

En todos los pacientes, fueron colectados 5 mL de sangre periférica en tubos con EDTA e inmediatamente se mezclaron con igual volumen de solución de Cloruro de Guanidina 6 M – EDTA 0,2 M pH 8,0, dando lugar a la mezcla Guanidina-EDTA-Sangre (GEB, por sus siglas en inglés). Las muestras GEB fueron preservadas a 4°C hasta el momento de la extracción de ADN y posteriores análisis. Para la extracción de ADN, 300 µL de GEB fueron procesados con el uso del High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics Corp., Indianápolis, EEUU) y eluidos en 100 µL de solución, tal como se ha descrito en trabajos previos (Duffy y col., 2013; Ramírez y col., 2015). En cada extracción se incluyó una muestra GEB de sangre seronegativa como control negativo. Luego de extraídos los ADNs, se cuantificaron utilizando un espectrofotómetro Nanodrop1000® (Thermo Fisher Scientific Inc.), calculando la concentración y pureza de las muestras mediante la medición de los valores de DO a 230 nm, 260 nm y 280 nm. Finalmente, todas las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

4.5 Cuantificación de carga parasitaria mediante ensayo de PCR en tiempo real (qPCR)

Dado que todas las muestras incluidas en el estudio son muestras de archivo, almacenadas durante mucho tiempo luego de su extracción (entre 10 a 15 años en buffer Guanidina EDTA-pH8 condiciones de temperatura promedio de 5 °C), se les realizó una medición de carga parasitaria con el fin de corroborar la cantidad aproximada de ADN específico de *T. cruzi* presente al momento de realizar los ensayos. Para ello, se utilizó una qPCR dúplex dirigida al ADN satélite (ADNsat) de *T. cruzi* y un control interno de amplificación (IAC, por sus siglas en inglés), como fue descrito en Duffy y col. (2013) y Ramírez y col. (2015). Las reacciones de qPCR fueron realizadas en un volumen final de 20 µL, con 5 µL de ADN de molde y la mezcla de reacción comercial FastStart Universal Probe Master Mix (Roche Diagnostics GmbH Corp., Mannheim, Alemania). Las amplificaciones por PCR en tiempo real se llevaron a cabo en un termociclador ABI7500 (Applied Biosystems, Foster City, EEUU).

Para la cuantificación de la carga parasitaria se utilizaron dos aproximaciones:

1. Mediante una curva estándar de 5 puntos, construida con diluciones seriadas 1/10 del ADN genómico (ADNg) obtenido a partir de sangre seronegativa mezclada en proporción 1:1 con 1×10^5 equivalentes de parásitos/mL (Eq.Par./mL) de formas epimastigote de *T. cruzi*.

Dada las variaciones encontradas en el número de copias de ADNsat presente en distintos UDTs de *T. cruzi* en trabajos previos (Muñoz-Calderón y col., 2021b), se decidió realizar una curva estándar a partir de cultivo *in-vitro* de la cepa CL-Brener (TcVI) para la cuantificación de carga en los pacientes del ensayo clínico de TRAENA y otra curva estándar a partir de cultivo *in-vitro* de la cepa SylvioX10/1 (TcI) para la cuantificación de las muestras procedentes de brotes orales en Venezuela.

Para cada ensayo de qPCR se incorporaron dos controles positivos de 1 y 10 fg/µL de ADN de *T. cruzi* cepa CL-Brener o SylvioX10/1 y un control negativo sin molde (NTC), como se recomienda en las guías CLSI-MM17 (Institute, 2018). Adicionalmente, todas las muestras, puntos de la curva estándar, controles positivos y negativo fueron analizadas por duplicado.

2. Con el fin de eliminar el factor de variabilidad en la proporción de ADNsat presente en las diferentes UDTs de *T. cruzi*, en colaboración con el Laboratorio de Biología Molecular y Enfermedades Endémicas del Instituto Oswaldo Cruz (IOC) (Rio de Janeiro, Brasil), realizamos la estandarización de una metodología de cuantificación de carga parasitaria, basada en el número de copias de ADNsat utilizando una secuencia de ADN sintético.

La construcción de esta curva estándar se realizó a partir de ADNg de una muestra sangre preservada en GEB de una persona seronegativa, la cual se mezcló con el oligonucleótido sintético de ADNsat a una concentración de 1×10^8 copias/ μ L. A partir de este stock, se preparó una curva estándar de 5 puntos (1×10^5 a 1 copias/ μ L) mediante diluciones seriadas 1/10 utilizando como matriz el ADNg del paciente seronegativo.

Finalmente, se realizaron ensayos de qPCR comparativa utilizando como estándar la nueva secuencia de ADNsat sintética y ADNg aislado de parásitos cultivados.

4.5.1. Parámetros para la validación de los resultados de los ensayos de qPCR:

1. qPCR válida: cuando no amplifica (ausencia de Ct) ninguna réplica del control negativo de PCR y los controles positivos amplifican en el rango de Cts esperado.
2. Extracción de ADN válida: cuando no amplifica ninguna réplica del control negativo de extracción y su RNasaP amplifica en el rango de Cts esperado.
3. Curva estándar válida: cuando la eficiencia esté entre 90-110% y el $R^2 \geq 0,98$. La RNasa P, fue utilizada como control endógeno de amplificación, con la finalidad de validar el funcionamiento del sistema de qPCR.
4. Muestra válida: cuando los Cts de la RNasaP de al menos dos de sus réplicas cumplen con el criterio de Tukey ($Cts \leq \text{Percentil } 75 + 1,5 \times \text{distancia intercuartil}$).

Los parámetros relacionados con la construcción de la secuencia sintética de ADN satélite, la secuencia de oligonucleótidos, los programas de ciclado y la descripción de las muestras clínicas utilizadas para los análisis de correlación, pueden encontrarse en la publicación **Muñoz-Calderón, Arturo**, y col. "Toward the establishment of a single standard curve for quantification of *Trypanosoma cruzi* natural populations using a synthetic satellite unit DNA sequence." The Journal of Molecular Diagnostics. 23.5 (2021): 531.

4.6. Determinación de Unidades Discretas de Tipificación

Aquellas muestras pertenecientes a los brotes orales de Ech y el ensayo clínico de TRAENA que resultaron positivas cuantificables para ADNsat de *T. cruzi*, fueron tipificadas mediante estrategias de Hemi-Nested-PCR dirigidas a marcadores nucleares, como es descrito en Burgos y col. (2010). La **Figura 9** muestra el algoritmo de tipificación utilizado.

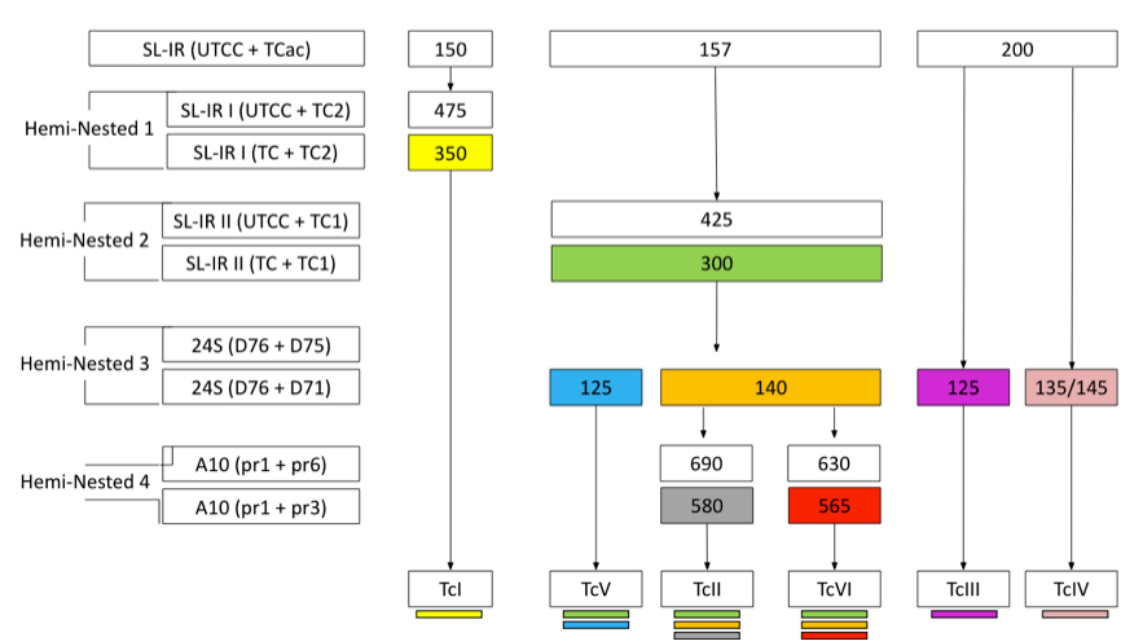


Figura 9. Algoritmo de tipificación por PCR convencional utilizado para determinar las UDTs de las muestras de los ensayos clínicos y brotes de enfermedad de Chagas por vía oral. Modificado de (Burgos y col. 2010).

En los casos con resultados positivos en la PCR SL-IR II, pero negativos en la PCR 24S α , se informó la identificación del grupo TcII/V/VI. Las muestras que amplificaron el fragmento de 140pb en la PCR 24S α , pero tuvieron resultados negativos en la PCR A10, fueron informadas como pertenecientes al grupo TcII/VI. Las muestras con resultados positivos en la PCR SL-IR II y para ambos fragmentos de 125 y 140 pb en la PCR 24S α , pero tuvieron resultados negativos en la PCR A10, fueron reportadas como poblaciones mixtas de TcV + (TcII o TcVI).

4.7. Análisis de variabilidad genética de poblaciones parasitarias mediante secuencias de ADN de kinetoplasto a través de RFLP-PCR.

Se realizó un ensayo de PCR convencional dirigido a la amplificación de la región hipervariable del ADN de kinetoplasto (ADNk) con los oligonucleótidos 121/122 como fue descrito en Burgos y col. (2007). Las secuencias de cada oligonucleótido y las condiciones generales de ciclado se muestran en la **Tabla 4**. Estos análisis permitieron identificar las firmas de minicírculos (Fm) de las poblaciones de parásitos.

La reacción de PCR fue realizada en un volumen final de 50 μ L, con 5 μ L de ADN de molde y 1 U de ADN polimerasa GoTaq (Promega). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Bio-Rad T100 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) y fue confirmada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2%, seguida de tinción con bromuro de etidio y visualización en cámara de luz ultravioleta.

Los productos de amplificación fueron purificados con el PCR Purification Kit (Dongsheng Biotech Co.) y cuantificados en un NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Posteriormente, 1 μ g de ADN fue digerido con 1 U de las enzimas de restricción HinfI, RsaI y MspI (New England BioLabs Inc., Ipswich, EEUU), durante 3 horas a 37°C en un volumen final de 25 μ L. Los productos de la digestión enzimática fueron analizados mediante electroforesis en geles de acrilamida:bis-acrilamida (19:1) al 12%, a voltaje constante de 90 V durante 90 min, en el sistema Mini Protean II™ (Bio-Rad Laboratories Inc., Hércules, EEUU).

Posterior a la electroforesis, los geles fueron teñidos con Sybr Gold (Invitrogen, Carlsbad, EEUU) durante 45 minutos en agitación. Los perfiles de PCR-RFLP fueron visualizados y digitalizados en un transiluminador de luz ultravioleta Syngene (Synoptics Ltd., Cambridge, Reino Unido) a 498 nm. El tamaño de las bandas de cada

perfil de PCR-RFLP fue determinado por comparación con los marcadores de peso molecular de 10 pb y 25 pb de la casa comercial Promega, con el software GelAnalyzer 19.1 (www.gelanalyzer.com). Mediante esta metodología se analizaron todas las muestras GEB antes y después del tratamiento y hemocultivos.

4.8. Determinación de la distancia genética entre firmas de minicírculos

Se crearon matrices binarias a partir de cada firma de minicírculos. En el análisis sólo se utilizaron las bandas nítidas resueltas en las electroforesis. Las bandas amplificadas visibles se puntuaron como "1", mientras que la ausencia de bandas del mismo peso molecular se puntuó como "0". Todas las muestras de un mismo paciente se analizaron en un mismo gel. El grado de similitud, (la frecuencia de co-ocurrencia de bandas entre las muestras clínicas) se midió utilizando el coeficiente de Jaccard (CJ) (Jaccard, 1901) entre las muestras Pre-TTO y Post- TTO para cada paciente, como medida de la distancia genética de las poblaciones parasitarias naturales. Adicionalmente, se compararon entre sí las firmas de minicírculos obtenidos de los hemocultivos, con el fin de obtener una visión global del CJ en las cepas de parásitos cultivadas.

El Coeficiente de Jaccard (CJ) entre dos muestras fue calculada según la fórmula: $CJ = \frac{a}{a + b + c}$, donde "a" es el número de bandas comunes en ambas muestras, "b" el número de bandas presentes en la primera y ausentes en la segunda, y "c" el número de bandas presentes en la segunda y ausentes en la primera; obteniéndose un valor entre 0 y 1, en función de cuan cercanos o lejanos sean los perfiles de PCR-RFLP de ambas muestras, respectivamente.

4.9. Caracterización de los genes involucrados en mecanismos de resistencia farmacológica en *Trypanosoma cruzi*

Con el fin de caracterizar la variabilidad de las secuencias génicas de los genes *Tcntr-1*, *Tcoye*, *Tcacr* y *Tcabcg-1*, se utilizaron dos estrategias, dependiendo de la carga parasitaria presentes en las muestras:

- i. Para las muestras con alta carga parasitaria (> 20 Eq.Par./mL) o aquellas procedentes de hemocultivos, se realizó una PCR convencional dirigida por los oligonucleótidos específicos para cada gen, con la finalidad de obtener

amplificación de los genes completos. Para todas las reacciones de PCR se utilizaron 5 µL de ADN genómico, 0,45 µM de cada uno de los oligonucleótidos y 1U de Taq polimerasa GoTaq (Promega), en un volumen final de 30 µL. Las secuencias de cada oligonucleótido y las condiciones generales de ciclado se muestran en la **Tabla 4**.

- ii. En aquellas muestras clínicas con baja carga parasitaria (< 20 Eq.Par./mL), la obtención de las secuencias completas para cada gen se realizó mediante la segmentación del gen en dos dominios (D1 y D2), y su posterior amplificación mediante PCR convencional o Hemi-Nested-PCR. En la primera ronda de PCR se utilizaron 5 µL de ADN genómico, 0,45 µM de cada uno de los oligonucleótidos y 1U de Taq polimerasa GoTaq (Promega), en un volumen final de 30 µL. En la segunda ronda de amplificación (en aquellos casos en que la metodología incluya Hemi-Nested-PCR) se utilizaron 1 µL del producto de amplificación de la primera PCR, 0,45 µM de cada uno de los oligonucleótidos y 1U de Taq polimerasa GoTaq (Promega), en un volumen final de 30 µL. Las secuencias de cada oligonucleótido y las condiciones generales de ciclado se muestran en la **Tabla 4**.

Para todos los casos, la amplificación de los fragmentos esperables se confirmó mediante geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio (BrEt) y visualizados bajo luz UV.

Tabla 4. Secuencias de cada oligonucleótido y las condiciones generales de ciclado.

Secuencia (5' – 3')		Amplicón	Temp. (°C)	Tiempo /ciclos	
ADNk			94	3 min.	
121	AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA	330 pb	94	45 seg.	
			68	45 seg. x 5 ciclos	
			72	45 seg.	
			94	45 seg.	
122	GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA		64	45 seg. x 35 ciclos	
			72	45 seg.	
			72	45 seg.	
			72	10 min.	
NTR_completo		937 pb	94	3 min.	
TcNTR_Fw	GGGTAGCCAATGAAGAGAAATGAC		94	45 seg. x 45 ciclos	
TcNTR_Rv	AATGCTTCGTGGGAAATCGTGGG	424 pb	68	45 seg.	
			72	45 seg. x 45 ciclos	
			72	10 min.	
			72	10 min	
NTR_D2			94	10 min.	
TcNTR-D2_Fw	CAGTTGTGTTTCGCTGGTGACATG	456 pb	94	45 seg.	
TcNTR_Rv	AATGCTTCGTGGGAAATCGTGGG		68	45 seg. x 45 ciclos	
			72	45 seg.	
			72	10 min.	

OYE_completo			94	3 min.	x 45 ciclos
OYE - Fw	ATGGCGACGTTCCCTGAACTTCTG	1120 pb	94	45 seg.	
OYE - Rv	TAGTTGTTGTACGTCGGGTAATCGT		68	45 seg.	
			72	45 seg.	
			72	10 min.	
OYE_D1			94	3 min.	x 45 ciclos
OYE - Fw	ATGGCGACGTTCCCTGAACTTCTG	600 pb	94	45 seg.	
OYE-D1_Rv	CCATGAATCTCAACGCCATCAAAC		68	45 seg.	
			72	45 seg.	
			72	10 min.	
OYE_D2			94	3 min.	x 45 ciclos
OYE-D2_Fw	GTTTGATGGCGTTGAGATTCATGG	560 pb	94	45 seg.	
OYE - Rv	TAGTTGTTGTACGTCGGGTAATCGT		68	45 seg.	
			72	45 seg.	
			72	10 min.	
AKR_completo			94	3 min.	x 45 ciclos
AKR - Fw	CGGTGAGGCGTACATAAAACA	940 pb	94	45 seg.	
AKR - Rv	AAAGATCACAGAGCCGCGTT		68	45 seg.	
			72	45 seg.	
			72	10 min.	
AKR_D1			94	3 min.	x 45 ciclos
AKR - Fw	CGGTGAGGCGTACATAAAACA	400 pb	94	45 seg.	
AKR-D1_Fw	CAAACTTCTTCTTCCCCGGC		60	45 seg.	
			72	45 seg.	
			72	10 min.	
AKR_D2			94	3 min.	x 45 ciclos
AKR-D2_Fw	GCCGGGAAGAAGAAGTTTG	520pb	94	45 seg.	
AKR - Rv	AAAGATCACAGAGCCGCGTT		60	45 seg.	
			72	45 seg.	
			72	10 min.	
ABCG1_completo			94	3 min.	x 45 ciclos
ABCG1 - Fw	ATGTCTTGCTGCCGAGC	1998 pb	94	1 min.	
ABCG1 - Rv	CTAAACTTTGTACGCGCG		62	90 seg.	
			72	3 min.	
			72	10 min.	
ABCG1_D1			94	3 min.	x 45 ciclos
ABCG1-D1_Fw	GTGAATGARCCAGTAACTCCAG	975 pb	94	1 min.	
ABCG1-D1_Rv	GGAAATTTCTGGATCTTGGAGCA		58	1 min.	
			72	1 min.	
			72	10 min.	
ABCG1_D2			94	3 min.	x 45 ciclos
ABCG1-D2_Fw	AATCCCAATCCCTCYGAGTC	1000 pb	94	1 min.	
ABCG1-D2_Rv	AGTTAGCCACAAAARCCAGR		58	1 min.	
			72	1 min.	
			72	10 min.	

4.10. Purificación de fragmentos de ADN

Para purificar los productos de amplificación obtenidos en el punto anterior, se utilizó el kit comercial DNA Product Purification Kit (DSBIO, China) bajo las especificaciones del fabricante. Dicha metodología elimina fragmentos muy cortos de ADN (oligonucleótidos cebadores), los nucleótidos no incorporados y los componentes del buffer de reacción. Para purificar los fragmentos generados en una reacción de PCR que hubiera producido amplificaciones inespecíficas se utilizó el equipo comercial Gel Extraction Kit (DSBIO, China). Se realizó una electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión (1-1,5% en tampón TAE 1X), a partir de la

cual los fragmentos deseados se cortaron del gel visualizándolos en un transiluminador de luz UV. Dicho fragmento, inmerso en agarosa, se procesó según las indicaciones del fabricante para la purificación de productos de PCR.

4.11. Clonado de secuencias genéticas para los genes *Tcntr-1*, *Tcoye*, *Tcacr* y *Tcabcg-1*

Una vez establecidos los amplicones purificados para cada uno de los genes a estudiar, fueron clonados en vectores pGEM®-T Easy (Promega, Madison, EE. UU.) con la finalidad de obtener un perfil de variabilidad de secuencias mas aproximado a la realidad presente en las muestras de diversos orígenes biológicos. Para ello se realizó:

4.11.1. Cuantificación de los ácidos nucleicos y plásmidos.

Para conocer la concentración de ADN genómico de los amplicones purificados, se midió la absorbancia a 260 utilizando en un equipo Nanodrop1000 (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU), y se calculó su pureza por la determinación de la proporción DO a 260 nm/280 nm y DO a 230 nm/280 nm. Paralelamente, también se realizó una cuantificación por gel, corriendo alícuotas mediante electroforesis en geles de agarosa y comparando la intensidad de banda con los estándares de peso molecular de ADN.

4.11.2. Clonado de las secuencias peptídicas

Para el caso de los fragmentos a ser clonados en el vector pGEM®-T Easy, se utilizó una enzima ADN polimerasa ya que añade un residuo de adenina a los extremos 3' en los productos de PCR. Posteriormente, se utilizó el kit pGEM®-T Easy (Promega, Madison, EE. UU.), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Se transformaron bacterias competentes químicas DH5 α con 10 μ L totales de reacción de ligación y se plaquearon en LB-Agar/Ampicilina/IPTG/X-Gal. Para confirmar que las colonias obtenidas presentaran el vector pGEM-T con los insertos, se seleccionaron 6 colonias bacterianas de color blanco (de acuerdo con lo establecido por el mecanismo de α -complementación), y se sub-cultivaron en tubos falcon con 5 mL de medio LB adicionado con ampicilina (100 μ g/mL) a 37 °C. De los cultivos, se realizó extracción de ADN plasmídico y a partir de éste, 3-5 μ L se sembraron en un gel de agarosa. Los 10 μ L restantes fueron enviados a secuenciación para corroborar su identidad.

4.12. Análisis de secuencias de ácidos nucleicos

4.12.1. Secuenciación de ADN

Partiendo del ADN plasmídico obtenido de los clones descritos anteriormente, se realizó una secuenciación capilar en forma bidireccional sobre ambas hebras de ADN, utilizando cada par oligonucleótido respectivo a cada gen evaluado. Se utilizó el servicio de secuenciación brindado por Macrogen Corporation (Corea del Sur).

4.12.2. Alineamiento múltiple de secuencias

Los electroferogramas de las secuencias obtenidas se editaron utilizando el software UGENE V49.1 (Okonechnikov y col., 2012). El alineamiento de las secuencias de ADN obtenidas se realizó mediante el algoritmo MAFFT (Kuraku y col., 2013). Posteriormente, se realizó una edición manual para corregir posibles errores en el alineamiento. En el caso de los genes cuya secuenciación fue segmentada en los D1 y D2, el algoritmo de alineamiento incluyó la elaboración de una secuencia consenso, a partir de la cual se obtuvo la longitud total de los genes evaluados. En todas las muestras donde se logró amplificar alguno de los genes evaluados, se construyó una secuencia consenso definitiva, la cual incluyó tres PCRs y secuenciaciones independientes para cada gen amplificado. Las secuencias genéticas de referencia para la realización de las secuencias consenso, se obtuvo de las bases de datos GeneBank o la TritrypsDB (**Tabla Suplementaria 1**).

4.12.3. Análisis de Presión Evolutiva

Se utilizó la prueba de Ka/Ks, basada en la Teoría Neutralista (Kimura, 1983), donde las únicas fuerzas evolutivas que influyen los patrones de diversidad genética dentro de las poblaciones, son las mutaciones y la deriva génica. La prueba Ka/Ks (también llamada Dn/Ds) se utiliza generalmente en comparaciones interespecíficas de genes ortólogos.

Los resultados esperables son:

- **Ka/Ks = 1**, esto significa que las tasas de evolución sinónima y no sinónima son iguales, lo que sugiere que todos los sitios son neutros, es decir que no hay presiones selectivas diferenciales sobre las distintas posiciones nucleotídicas. El ejemplo clásico son los pseudogenes.

- **Ka/Ks < 1**, la mayoría de los cambios aminoacídicos son deletéreos y por lo tanto son seleccionados negativamente (esto ocurre en la mayoría de los genes). Entonces Ks es mayor que Ka. Al cambiar el aminoácido en la proteína esta puede perder su función, en cambio una sustitución sinónima conserva el aminoácido en la proteína y en la mayoría de los casos es neutral. La tasa Ks puede considerarse como neutral (aunque se sabe que las posiciones sinónimas también pueden ser blanco de la selección natural, (Akashi, 1995).
- **Ka/Ks > 1**, eso significa que Ka es mayor que Ks y puede inferirse que sobre ese gen hubo selección positiva. Es decir que la selección natural favoreció la fijación de cambios aminoacídicos. Esto podría deberse a que dichos cambios proporcionan una actividad más eficiente o una nueva función a la proteína involucrada, otorgando algún tipo de ventaja adaptativa a sus portadores.

4.13. Correlación de la variabilidad genética de los genes *Tcntr-1*, *Tcoye* y *Tcakr-1* y Susceptibilidad/Resistencia farmacológica mediante secuenciación multilocus (MLSTest).

Partiendo de las muestras de *T. cruzi* en las cuales se pudo obtener la secuencia genética completa y que tengan una clasificación como susceptibles o resistentes, se crearon alineamientos múltiples para cada uno de los genes de *T. cruzi* evaluados en este estudio mediante el algoritmo MAFFT.

Para realizar los análisis MLST, se evaluó y el poder discriminatorio (DP) (software MLSTest, <http://ipe.unsa.edu.a/software>) (Tomasini y col., 2013), para determinar la resolución de los marcadores individuales. A continuación, se construyeron filogenias diplotípicas y haplotípicas. Los árboles filogenéticos diplotípicos se construyeron inicialmente para investigar la diversidad de los aislados y permitir la concatenación entre loci, como describen (Tavanti y col., 2003; Yeo y col., 2011), lo que hace que los datos diplotípicos sean adecuados para su uso en dendrogramas basados en la distancia.

La idoneidad de los objetivos para su inclusión en un esquema MLST se evaluó a través del análisis "Incongruence Length Difference" (ILD), implementado a través de MLSTest 1.0 software, utilizando 1000 permutaciones (Tomasini y col., 2013). Finalmente, se concatenaron los datos MLST, probando todas las combinaciones de fragmentos, utilizando MLSTest, y así poder definir si las variaciones de secuencia

entre los genes evaluados pueden resolver diferencias entre aislados identificados como susceptibles o resistentes a NFX/BZN.

4.14. Análisis de la secuencia de proteínas y predicción de estructuras 3D

Dado a que ninguna de las enzimas a utilizar en este trabajo se encuentra cristalizada y, por tanto, no existen estudios de interacción con el cofactor Flavin Mononucleótido (FMN), los residuos de interacción proteína-ligando fueron obtenidos de la base de datos de Dominios Conservados (CDD) del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>). Estos residuos fueron utilizados para futuros análisis de comparación con las predicciones obtenidas a partir de los ensayos *in-silico* de Docking molecular.

Adicionalmente, a todas las secuencias de aminoácidas obtenidas se les realizó un análisis de direccionamiento a mitocondrias mediante el algoritmo de Machine Learning MitProt-Pred (Mirza y col., 2013).

Posteriormente, las estructuras terciarias fueron predichas por AlphaFold2 (Jumper y col., 2021). Este programa es capaz de generar modelos 3D precisos de proteínas a partir de la secuencia primaria sin utilizar plantillas. La validación de las estructuras resultantes se llevó a cabo mediante la prueba de diferencia de distancia local α predicha (pLDDT) y la construcción de gráficos de Ramachandran. De ser necesario, cada una de las estructuras fue refinada mediante el servidor web GalaxyRefine2 (Lee y col., 2019) [<https://galaxy.seoklab.org/>]. Una vez obtenidos todos los modelos, los archivos se descargaron en formato *.pdb para visualización mediante el software ChimeraX (Meng y col., 2023) y para análisis posteriores.

Debido a la falta de estructuras cristalizadas confiables para las tres enzimas evaluadas al momento de escribir esta tesis, se optó por utilizar la predicción de la estructura 3D de la cepa SylvioX10/1 (a través de AlphaFold2). Inicialmente caracterizada como susceptible al BZN por Filardi y Brener (1987), esta cepa de referencia TcI presente en el biobanco del LabMECh-INGEBI, se estableció como un modelo Wild-Type para llevar a cabo los análisis comparativos de estructuras. La susceptibilidad al BZN fue corroborada mediante ensayos de CI_{50} realizados antes de la amplificación, clonamiento y secuenciación de los genes *Tcntr-1*, *Tcoye*, *Tcacr* y *Tcabcg-1* (datos no mostrados).

4.15. Análisis de Dinámica Molecular

Partiendo de las predicciones 3D, obtenidas tanto para las configuraciones WT como cada una de las variantes de las enzimas bajo estudio, se utilizó el flujo de trabajo pre-configurado “Making it Rain” (Arantes y col., 2021) actualmente integrado en el servidor web Google-Colab. A partir de este flujo de trabajo se procedió a:

(i) Configurar el paquete AMBER, generando un sistema con la molécula inmersa en una caja de agua e iones, minimizándola energéticamente. Para ello se tomaron en cuenta los siguientes parámetros:

- **Campo de Fuerzas:** se seleccionó el modelo AMBER ff14SB.
- **Modelo de Solvente:** Se eligió un modelo de agua rígido TIP3P y una caja de solvatación cubica con un tamaño de 12 Angstroms.
- **Iones:** Se utilizaron Iones Sodio (Na^+) a una concentración molar de 0.15.
- Se equilibró la caja de simulación, mediante la minimización de Energía (para reducir cualquier tensión inicial en el sistema) y un calentamiento Gradual del sistema desde 0 K a 298 K). Finalmente se realizó equilibrado en Volumen Constante y Temperatura Constante (NVT) y Presión Constante y Temperatura Constante (NPT).

(ii) Se realizó un análisis de control de calidad (QC) en una trayectoria cargada, para finalmente:

- Calcular Fluctuaciones Cuadráticas Medias por Residuo (RMSF).
- Desviaciones Medias Cuadráticas (RMSD).
- Distribución general de las estructuras mediante análisis de componentes principales (ACP). Todas las simulaciones, se realizaron con un tiempo de 500 miliseg, realizando lecturas cada 10 picosegundos, a una temperatura de 298 K y 1 bar de presión.

4.16. Docking molecular

La metodología de docking molecular se realizó mediante la utilización de diversos softwares de código abierto. Primeramente, se prepararon los archivos de entrada de las predicciones de cada una de las variantes de enzimas obtenidas, eliminando los heteroátomos, hidrógenos no polares y se añadiendo estados de protonación,

mediante el algoritmo Protoss (Lippert y Rarey, 2009). Seguidamente, con DoGSite3.1 (Graef y col., 2023) se ubicaron los posibles bolsillos de unión proteína ligando, mediante la utilización de una metodología de rejilla que utiliza un filtro de Diferencia de Gaussiana, basándose únicamente en la estructura tridimensional de las macromoléculas. Con este Software se calcularon propiedades globales que describen el tamaño, forma y características químicas de los (sub)bolsillos predichos, eligiendo aquellos con mejores valores de superficie ($\text{\AA}^2$) y profundidad ($\text{\AA}$). Finalmente, mediante la plataforma CB-Dock2 (Liu y col., 2022) se realizó el docking molecular con la estructura predicha de las proteínas y su cofactor, la Flavin Mononucleótido (FMN). Esta herramienta genera Docking proteína-ligando en ciego, heredando el procedimiento de detección de cavidades basado en AutoDock Vina o, mediante la definición de bolsillos previamente establecidos. Los resultados, mostrados como una alineación multi-característica jerárquica, explora las posibles conformaciones, seleccionando aquellas con los valores más bajos de afinidad y eficiencia. Finalmente, para ilustrar las interacciones resultantes para cada variante enzimática, se utilizó el software ChimeraX (Meng y col., 2023).

4.17. Asociación de Polimorfismos y fenotipos de resistencia farmacológica

Para la caracterización de las interacciones génicas, se aplicó el software libre para la Reducción de la dimensionalidad multifactorial (MDR v.3.0) (Martin y col., 2006). La precisión de cada modelo se evaluó mediante un clasificador de Bayes en el contexto de una validación cruzada de 10 veces. La significancia estadística se evaluó usando una prueba de 1000 permutaciones. Los mejores modelos en todas las combinaciones posibles fueron definidos por: (i) el test de precisión balanceado (BTA), que indica la precisión de la clasificación, calculada a partir del subconjunto de datos de prueba, (ii) la consistencia en la validación cruzada (CVC), que representa el número de veces que un determinado modelo, obtenido del total de los datos, se reproduce al utilizar 10 subconjuntos aleatorios de esos datos, y (iii) el nivel de significancia.

Finalmente, también se evaluó la ganancia de información (information gain, IG) mediante el método de MDR. Este concepto crucial se basa en la medición de la entropía: cuánta entropía se elimina del estado de caso-control al considerar los

genotipos, combinando dos o más SNPs. En otras palabras, la IG mide cuánta información se obtiene de la combinación en comparación con los SNPs individuales. La IG selecciona combinaciones significativas de variables según la entropía (Martin y col., 2006): valores de entropía positivos indican interacción sinérgica, mientras que los valores negativos indican redundancia.

4.18. Análisis estadísticos

Dentro de las variables a analizar para cada paciente en el panel de seguimiento Pre-TTO y Post-TTO se incluyen los títulos de anticuerpos IgG (valor de densidad óptica), carga parasitaria (Eq.Par./mL) y el coeficiente de Jaccard (CJ). Las comparaciones gráficas entre las distintas variables se realizaron mediante una transformación de datos Z score. Las medidas continuas se expresaron y graficaron como mediana y rango intercuartilo de 25-75%, mientras que las variables dicotómicas se expresaron y graficaron como porcentaje.

Para todas las variables, las distribuciones normales se evaluaron mediante la prueba de Shapiro-Wilks. Se calculó el coeficiente de correlación de rangos de Spearman para evaluar las correlaciones entre las variables objeto de estudio (niveles de parasitemia, valores de IgG y CJ). La correlación es más fuerte a medida que el valor de “R” se aproxima a 1. Para evaluar las diferencias entre los puntos de seguimiento Pre-TTO y Post-TTO, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney.

Todos los análisis se realizaron con el software RStudio Team (2020), y los cálculos se determinaron con un valor $p < 0,05$ para diferencias estadísticas significativas.

RESULTADOS

CAPITULO 1.

5.1. Establecer la existencia de asociaciones entre distribución geográfica de poblaciones de *Trypanosoma cruzi*, unidades discretas de tipificación (UDTs) y susceptibilidad farmacológica, mediante una revisión sistemática y meta-análisis de los ensayos de susceptibilidad *in-vitro* al Benznidazol disponibles en la bibliografía

Tradicionalmente, se ha considerado que el flujo genético entre cepas de *T. cruzi* es inexistente o escaso, por lo que se ha considerado que esta especie es principalmente clonal (Tibayrenc y Ayala, 1988). Sin embargo, se ha podido comprobar que las poblaciones de *T. cruzi* son heterogéneas en cuanto a la mayoría de las características biológicas tanto para los modelos experimentales *in-vitro* como *in-vivo*, es decir, cada cepa muestra distintas propiedades en términos de infectividad, actividad metabólica, expresión enzimática y, niveles variables de susceptibilidad a los fármacos (Filardi y Brener, 1987; Laurent y col., 1997; Zingales y col., 2014; Bermudez y col., 2016; Telleria y Tibayrenc, 2017). Sin embargo, hasta el momento ha sido imposible mostrar una correlación entre la susceptibilidad al BZN y las distancias genéticas entre las cepas de *T. cruzi* (Villarreal y col., 2004; Revollo y col., 2019).

En este contexto, con el fin de evaluar una posible asociación entre la susceptibilidad al fármaco BZN y linajes genéticos específicos de *T. cruzi*, decidimos realizar una revisión sistemática y un análisis comparativo entre los ensayos de susceptibilidad *in-vitro* frente al fármaco Benznidazol sobre el estadio tripomastigote de *T. cruzi*, que se encuentran disponibles en la bibliografía durante los últimos 40 años.

5.1.1. Desarrollo del proceso PRISMA para la revisión sistemática

La **Figura 10** muestra el proceso de selección de artículos. De las 610 publicaciones identificadas inicialmente, 381 se eliminaron por duplicación. De las 229 publicaciones restantes, 88 no cumplieron con los criterios de selección: El 52,1% realizaba las mediciones de susceptibilidad al BZN exclusivamente en ensayos *in-vivo*; el 40,1% de las publicaciones no informaron el valor de CI_{50} ni el CL_{50} para el

BZN; el 6,2% fueron artículos de revisión, y finalmente el 1,6% comunicaban una CI_{50} o una CL_{50} para fármacos que no incluían al BZN. Adicionalmente, de los 142 artículos restantes, 78 fueron excluidos debido a que: el 60,9% no incluían los valores de desviación estándar para cada ensayo; el 12,5% no incluyeron el tiempo de incubación con el fármaco; el 7,8% no informaron sobre la UDT de la/las cepas *T. cruzi* con las cuales trabajaron; el 6,3% no mencionaban el nombre de la cepa/aislado, y el 12,5% correspondía a artículos en los que los valores de la CL_{50} o la CI_{50} habían sido publicados previamente en otro artículo por los mismos equipos de investigación.

Al final, quedaron 64 artículos, que engloban valores de CI_{50} y CL_{50} para el fármaco BZN correspondiente a 208 ensayos individuales. Dentro de los datos seleccionados se analizaron los datos de 59 cepas de *T. cruzi* pertenecientes a 6 DTU diferentes (75 cepas TcI, 25 TcII, 9 TcIII, 1 TcIV, 7 TcV y 8 TcVI). Las cepas procedían de nueve países diferentes (Argentina: 4, Bolivia: 7, Brasil: 25, Colombia: 45, Chile: 4, México: 10, Venezuela: 8, Nicaragua 1 y Paraguay: 40). En el 26,9% de los ensayos, los autores utilizaron cepas transfectadas o clonadas en el laboratorio. En total, se utilizaron 11 métodos diferentes para evaluar la viabilidad de los parásitos; sin embargo, el recuento manual al microscopio (63,6%) fue el más frecuente. Entre los 64 artículos, la gran mayoría incluía sólo uno o dos ensayos (63,3%), el 23,3% incluía de 3 a 5 ensayos y el 13,3% un número mayor, que oscilaba entre 6 y 27 ensayos.

5.1.2.- Concentración Inhibitoria 50 (CI_{50}) como parámetro experimental de resistencia de *Trypanosoma cruzi* al fármaco Benznidazol.

De los datos seleccionados, se obtuvo que mayoritariamente los ensayos pertenecen a cepas/aislados de *T. cruzi* fueron procedentes de Brasil (39,2%), mientras que el resto del porcentaje se dividió en ensayos realizados con cepas/aislados de Colombia (22,9), Chile (16,3%), Venezuela (7,8%), México (5,2%), Argentina (4,6%) y Bolivia (3,9%). Un punto importante a destacar, es que a pesar de disponer de 49 ensayos individuales realizados con cepas/aislados TcII, el 83% fueron realizados con la cepa Y.

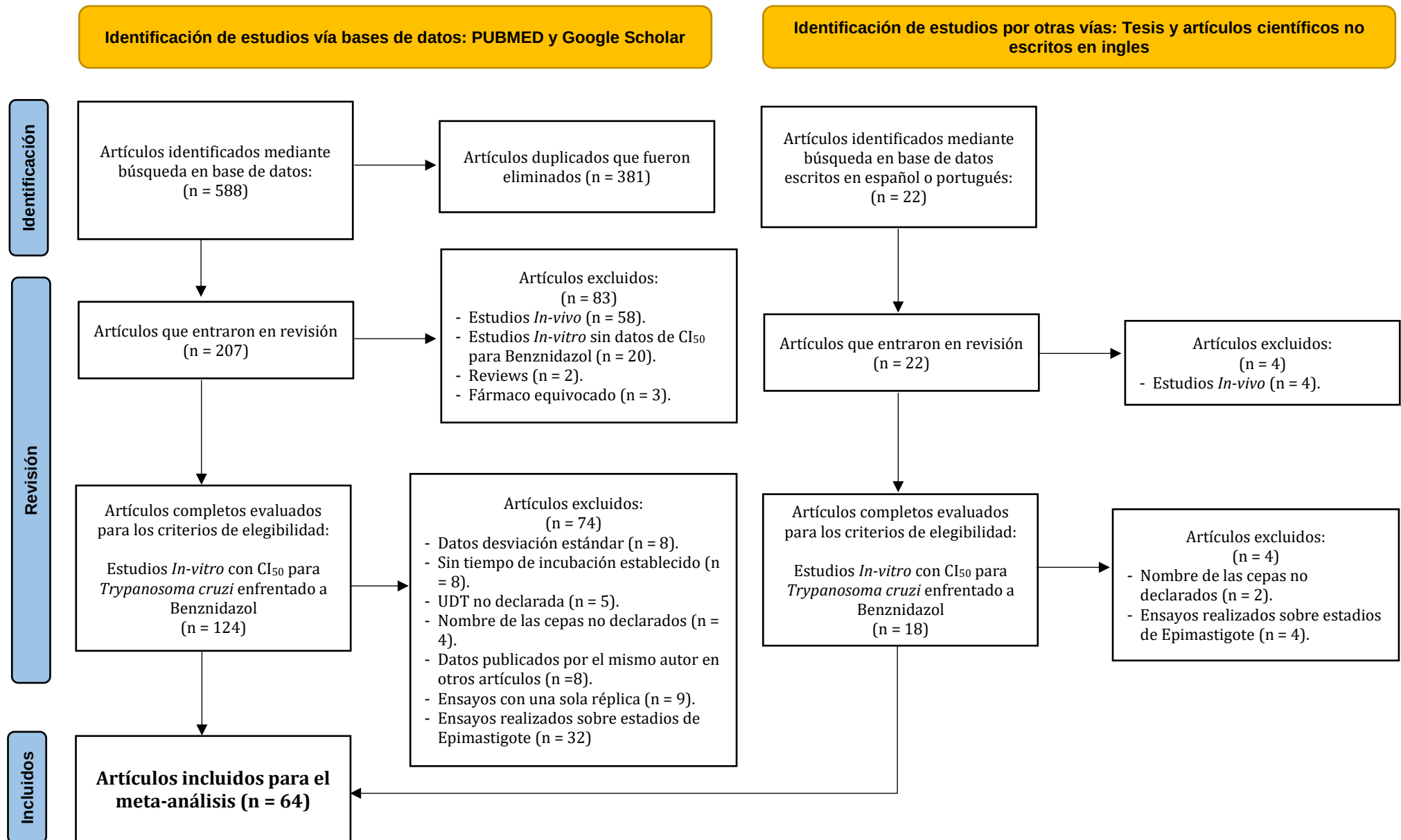


Figura 10. Diagrama de flujo del proceso PRISMA para la selección de artículos y ensayos elegibles. Diagrama elaborado a partir de la guía en: Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, y col. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. BMJ 2021;372:n71. doi: 10.1136/bmj.n71. <http://www.prisma-statement.org/>

Por otra parte, a pesar de la importancia de los estadios tripomastigote y amastigote en las infecciones humanas causadas por *T. cruzi*, existe una escasez de investigaciones que utilicen estas formas parasitarias para evaluar la susceptibilidad farmacológica.

Como resultado, solo se identificaron 64 estudios que cumplieron los criterios de inclusión para llevar a cabo un análisis detallado. Estos estudios abordaron únicamente tres de las seis UDTs de *T. cruzi* (TcI, TcII y TcVI).

Los valores de mediana resultantes de los 153 ensayos individuales de IC₅₀ (cada ensayo en promedio se realizó por triplicado) se ubicaron en 7,86 μ M [IQR=3,25 – 18,6] con un valor de rango intercuartil (del inglés IQR) de 15,35 μ M. Dado que no existe en la literatura científica un consenso sobre el tiempo de incubación ideal para realizar estudios de IC₅₀ sobre cepas de *T. cruzi*, ya que este puede variar dependiendo de diversos factores, como por ejemplo la metodología de registro del ensayo utilizado (contaje) y la cepa utilizada, en este estudio sistemático decidimos evaluar la variabilidad de la respuesta farmacológica del BZN sobre los estadios de tripomastigote y amastigote de *T. cruzi* a diversos tiempos de incubación.

La **Figura 11** muestra los valores medios de CI₅₀ y sus intervalos de confianza del 95% para cada ensayo de citotoxicidad. En líneas generales, fue posible evidenciar que existe una tendencia general a que los valores de IC₅₀ disminuyan a medida que aumenta el tiempo de incubación. En términos de porcentaje, la mayoría de los ensayos (58%) se evaluaron luego de 24 horas de incubación con el BZN, seguido de un 17% de resultados obtenidos después de 72 horas de incubación con el fármaco. Curiosamente, se pudo observar que en un 19% de los ensayos consultados se obtuvieron resultados de CI₅₀ con tiempo de incubación mayores a 96 horas, aunque es preciso indicar que en el 100% de estos ensayos, los investigadores a cargo evaluaron la respuesta farmacológica sobre el estadio de amastigote. En términos estadísticos, no se evidenció diferencia significativa entre los valores de mediana al comparar los resultados de CI₅₀ de las mismas cepas/aislados obtenidos con 24 y 48hr de incubación (Test U de Mann-Whitney, $p = 0,02$). Caso contrario se obtuvo al comparar los valores de CI₅₀ de las mismas cepas/aislados con los tiempos de incubación de 24 y 72hr (Mann-Whitney, $p < 0,0001$). Por lo tanto, con la finalidad de trabajar con datos más robustos, a partir de este momento, solo serán utilizados los registros de CI₅₀ con 24 y 48hr de incubación con el fármaco BZN.

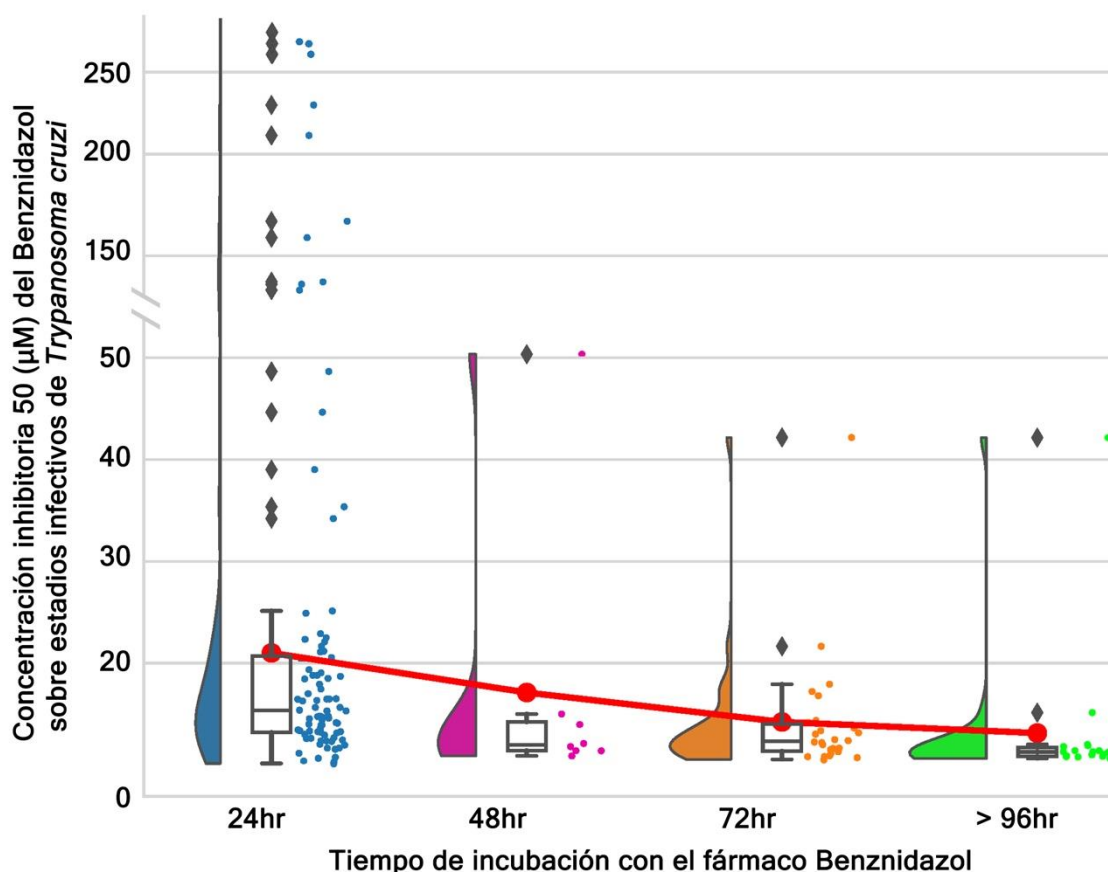


Figura 11. Valores de Concentración Inhibitoria 50 (CI_{50}) y sus intervalos de confianza del 95%, expresados como una media para cada tiempo de incubación de los ensayos *in-vitro*.

Con el propósito de establecer un umbral experimental que permita caracterizar una cepa/aislado de *T. cruzi* como susceptible o resistente al fármaco BZN, hemos llevado a cabo un análisis minucioso de los valores de CI_{50} , utilizando medidas de tendencia central como criterio de selección. La utilización de la moda estadística como parámetro para evaluar el rango de actividad del fármaco BZN sobre *T. cruzi* se justifica debido a su capacidad para identificar la concentración más frecuente o dominante que produce una respuesta farmacológica específica. Esta consideración adquiere especial relevancia al evaluar la respuesta predominante en diferentes poblaciones de parásitos frente al fármaco.

En la **Figura 12A** se representa el patrón de distribución de los valores de CI_{50} , expresados en rangos de concentración, obtenidos a partir del análisis sistemático de 153 ensayos individuales. Los resultados revelan que el rango de concentración más frecuente que induce una respuesta farmacológica se encuentra en el intervalo de 0,1 a 10 μM , mostrando una distribución unimodal. Sin embargo, al realizar un

análisis detallado de los resultados segregados por las tres variantes genéticas de *T. cruzi*, se observan tres respuestas farmacológicas distintas al fármaco BZN (**Figura 12B**).

En las cepas correspondientes a la UDT I, se aprecia una tendencia bimodal, donde el primer rango de concentraciones predominante se sitúa entre 5 y 10 μM , seguido de un segundo valor modal que identifica rangos de concentraciones entre 15 y 30 μM de BZN. Resultados similares se observan en las cepas pertenecientes a la UDT II, con un rango de concentraciones más frecuente entre 0,1 y 5 μM , seguido de otro rango de actividad farmacológica dominante entre 10 y 15 μM de BZN. Por último, las cepas de la UDT VI muestran una distribución unimodal similar a la descrita en las poblaciones parasitarias de la **Figura 12A**.

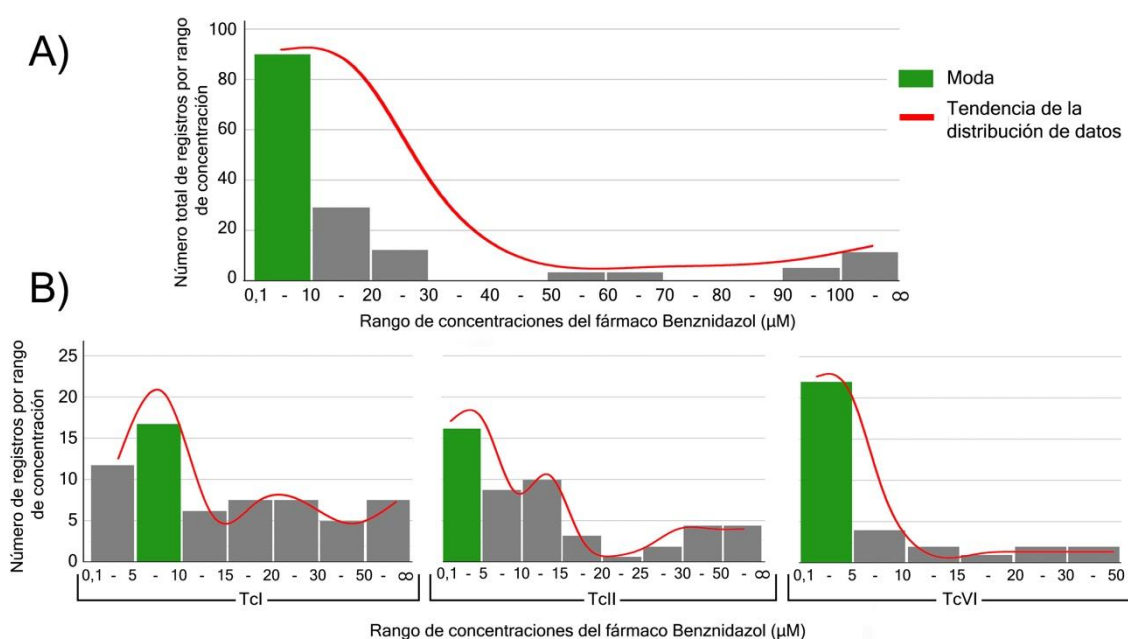


Figura 12. Distribución de los valores de Concentración Inhibitoria 50 (CI_{50}), obtenidos a partir del análisis sistemático de 153 ensayos de citotoxicidad *in-vitro* independientes de estadios tripomastigote frente a Benznidazol. **(A)** Número de registros totales obtenidos para cada rango de concentraciones de Benznidazol (μM) obtenidos a partir de ensayos de citotoxicidad *in-vitro* independientes; **(B)** Número de registros totales obtenidos para cada rango de concentraciones de Benznidazol (μM) comparando poblaciones parasitarias con diferentes UDTs.

Basándonos en los resultados presentados y reconociendo que el valor de la moda estadística puede tener ciertas limitaciones al no proporcionar información sobre la variabilidad o la distribución completa de las respuestas farmacológicas, y considerando que los fenómenos de resistencia farmacológica en *T. cruzi* naturalmente no deberían ser tan frecuentes, hemos decidido calcular la mediana y los rangos intercuartiles a partir de los rangos de concentraciones modales más dominantes. Esto nos permitirá conocer la distribución precisa de los valores de CI_{50} y establecer umbrales de concentración a partir de los cuales definir cepas susceptibles al fármaco BZN.

Al evaluar en detalle los valores de CI_{50} ubicados en el rango de 0,1 a 30 μM se obtuvo una mediana de 6,03 μM [IQR= 2,77 – 11,34] con una diferencia intercuartil de 8,57. Ahora bien, para establecer un valor de concentración más robusto y menos influenciado por valores atípicos, decidimos utilizar como umbral para definir susceptibilidad al BZN, todos aquellos valores que estén por debajo de dos veces el valor de la diferencia intercuartil, es decir, una concentración de BZN $\leq 17,14 \mu M$.

Para establecer el umbral de concentraciones a partir del cual podemos caracterizar una cepa o aislado de *T. cruzi* como resistente, consideramos la distribución completa de las poblaciones parasitarias evaluadas. Como se mencionó previamente, el análisis de las medidas de distribución central para toda la población reveló un valor de 7,86 μM [IQR= 3,25 - 18,6], con una diferencia intercuartil de 15,35 μM . Siguiendo el mismo criterio mencionado anteriormente, hemos decidido establecer un umbral de resistencia en un valor de concentración equivalente a dos veces el IQR, es decir, concentraciones de BZN $\geq 30,70 \mu M$.

5.1.3.- Revisión sistemática de la resistencia farmacológica del Benznidazol en los estadios de *Trypanosoma cruzi* relevantes para la infección humana, utilizando valores de Concentración Inhibitoria 50 (CI_{50}).

Utilizando los criterios establecidos previamente, se procedió a realizar una clasificación de las cepas/aislados de *T. cruzi* incluidos en los 153 ensayos seleccionados para este análisis sistemático. La clasificación se basó en la escala de resistencia farmacológica y se dividió en tres categorías: susceptibles al BZN ($CI_{50} \leq 17,14 \mu M$), resistencia media al BZN (CI_{50} entre 17,15 y 30,69 μM) y resistentes al BZN ($CI_{50} \geq 30,70 \mu M$). Los resultados obtenidos son mostrados en la **Figura 13**.

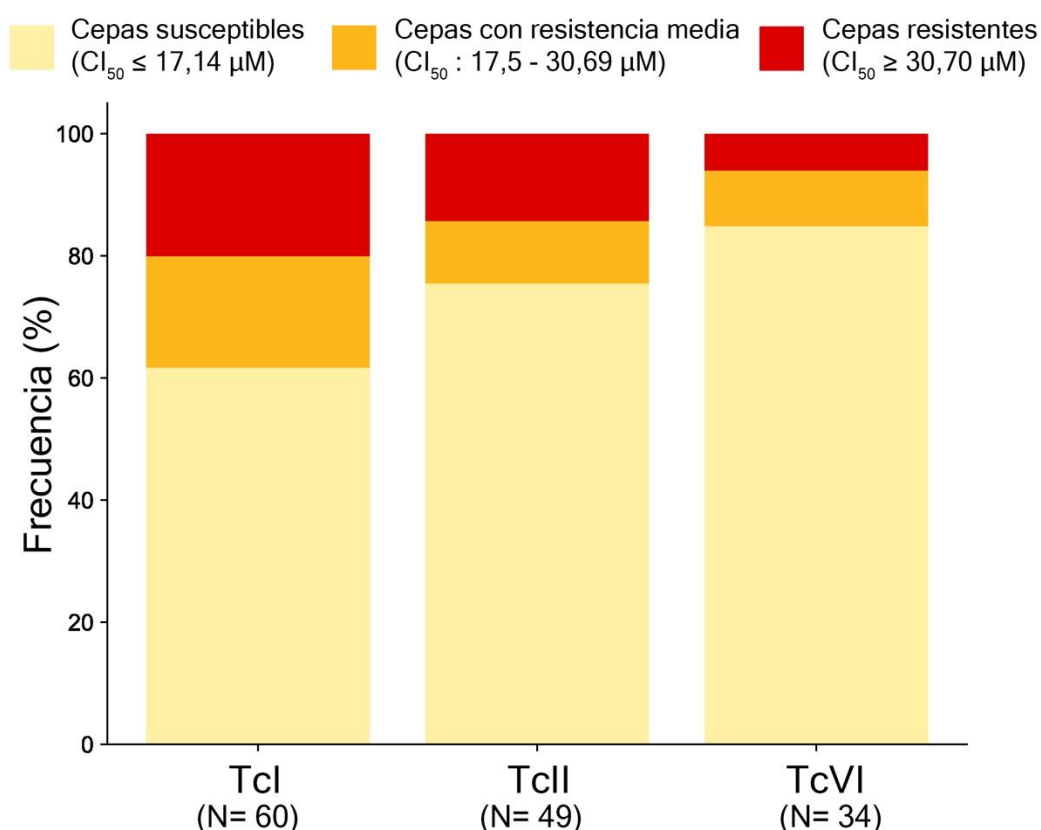


Figura 13. Clasificación de los valores de Concentración Inhibitoria 50 (CI_{50}) de tres UDTs de *Trypanosoma cruzi*, basada en tres niveles de susceptibilidad farmacológica. Los valores están reflejados como una frecuencia de aparición respecto al total de ensayos independientes obtenidos para cada UDT.

En líneas generales, se pudo evidenciar que las cepas/aislados pertenecientes a la UDT I fueron significativamente menos susceptibles que las cepas TcII y TcVI (Test U de Mann-Whitney, $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente). No se encontraron diferencias significativas entre las medianas de los valores de CI_{50} entre poblaciones TcII y TcVI. Sin embargo, es importante destacar que el análisis arrojó un amplio IQR para los ensayos realizados con parásitos TcII, a pesar que más del 80% de los ensayos fueron realizados con la misma cepa parasitaria. En efecto, los valores de CI_{50} notificada para la cepa Y osciló entre 1,1 μM y 282 μM .

En relación a la resistencia farmacológica, en la **Figura 14** se puede observar que, a pesar de que aproximadamente el 40% de los ensayos realizados con cepas/aislados de TcI se encuentran dentro de los rangos de resistencia intermedia (CI_{50} entre 17,5 - 30,69 μM) o resistencia neta ($CI_{50} \geq 30,70 \mu M$), no se encontró diferencia estadísticamente significativa con las cepas que presentan algún nivel de resistencia pertenecientes a la UDT II (Test U de Mann-Whitney, $p = 0,079$). Caso contrario se

encontró al comparar los valores de CI_{50} dentro de los rangos de resistencia farmacológica establecidos para las cepas/aislados TcI y TcII respecto a los TcVI, en los cuales las diferencias estadísticas fueron altamente significativas (Test U de Mann-Whitney, $p = 0,002$ y $p = 0,001$, respectivamente).

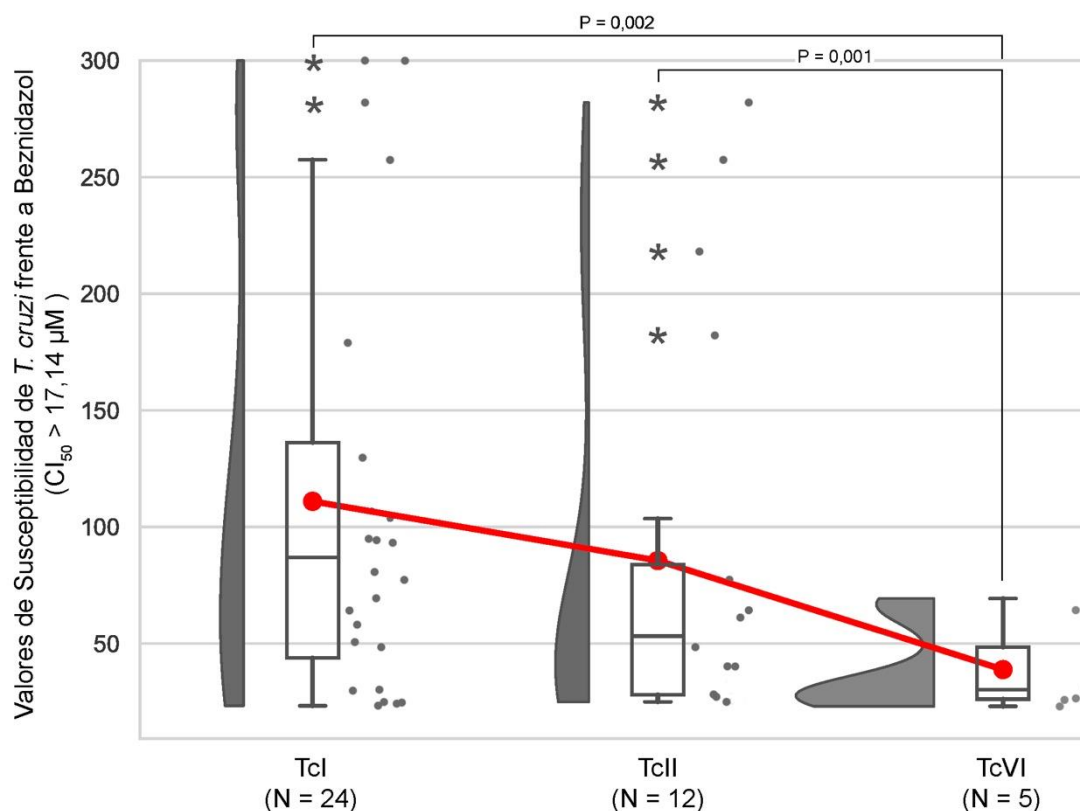


Figura 14. Comparación de los valores de Concentración Inhibitoria 50 (CI_{50}) para tres UDTs de *Trypanosoma cruzi*. Los asteriscos (*), representan valores atípicos (outliers). La línea roja representa la tendencia media de los datos. Las diferencias estadísticamente representativas se obtuvieron mediante el Test U de Mann-Whitney ($p < 0.05$).

Finalmente, decidimos realizar un mapeo de la distribución de la resistencia al BZN en poblaciones de *T. cruzi* en el continente americano. Para ello, utilizamos los datos de CI_{50} recopilados de los 64 estudios seleccionados tras el análisis sistemático, los cuales fueron clasificados en función de su nivel de susceptibilidad al BZN (**Figura 15**).

A pesar de la sesgada representación de datos, debido al elevado número de estudios procedentes de Brasil (39,2%), se pudo identificar un importante foco de resistencia al BZN en la región suroeste del país, que puede irradiar hasta el sur de Bolivia. Adicionalmente, fue posible identificar una concentración significativa de baja

susceptibilidad al BZN en el noreste de Colombia y la región central de Venezuela. Estos hallazgos sugieren la existencia de múltiples áreas geográficas donde la resistencia al BZN puede ser prevalente.

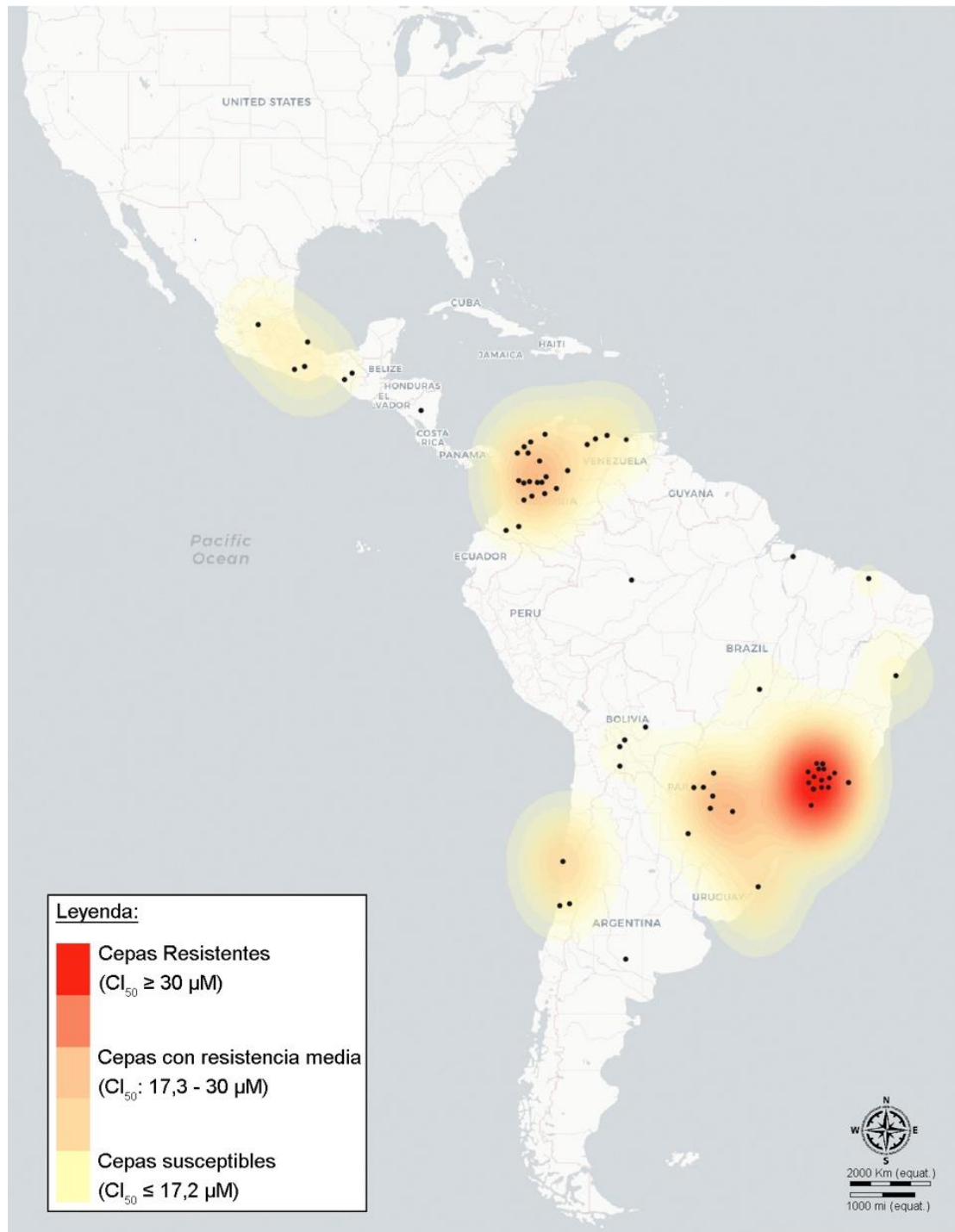


Figura 15. Heatmap con la distribución de los valores de susceptibilidad farmacológica frente a Benznidazol de las formas tripomastigote de *Trypanosoma cruzi*, obtenidas a partir del meta-análisis de 153 ensayos de citotoxicidad *in-vitro* independientes.

CAPITULO 2

5.2. Identificar cargas parasitarias y las unidades discretas de tipificación en las poblaciones naturales de *Trypanosoma cruzi* y de aislamientos parasitarios mediante hemocultivo, asociados a pacientes enrolados en ensayos clínicos con fármacos tripanocidas o detectados en brotes orales que fueron refractarios a los tratamientos suministrados

Este capítulo se enfoca en la caracterización de carga parasitaria y de las Unidades Discretas de Tipificación (UDTs) de las poblaciones parasitarias naturales halladas en tres cohortes de pacientes con infección por *T. cruzi* (Tablas 1, 2 y 3)

5.2.1. Construcción y Validación de estándares de ADN satélite sintético para la generación de curvas de qPCR independientes de la UDT de las muestras cuantificadas.

La importancia de la cuantificación de la carga parasitaria mediante qPCR en el tratamiento de la ECh ha sido ampliamente estudiada (Molina y col., 2014; Torrico y col., 2018; Muñoz-Calderón y col., 2019; Álvarez y col., 2020). Sin embargo, los efectos de la variabilidad genética de las poblaciones de *T. cruzi* al momento de establecer comparaciones de efectividad a nivel regional presentan un gran desafío. Para superar esta limitación, se realizó una colaboración con el Laboratorio de Virología y Parasitología Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundación Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil) para desarrollar y estandarizar una curva estándar de ADN sintético. Este enfoque busca mitigar sesgos en la comparación de cargas parasitarias entre muestras clínicas que se producen al cuantificar muestras biológicas o clínicas infectadas utilizando como curvas estándares DNA obtenido de cepas con distinto dosaje génico para el blanco molecular que las que infectan a dichas muestras. Esto permitiría cuantificar carga parasitaria independientemente de la cepa de *T. cruzi* que afecte al paciente, expresando la carga como el número de copias de ADN satélite (ADNsat) por microlitro (μL) de muestra.

5.2.2. Construcción de la secuencia sintética de ADN satélite de *Trypanosoma cruzi*

Dado que la mayoría de los procedimientos estandarizados de PCR en tiempo real y los kits comerciales de PCR para monitoreo de tratamiento de pacientes con infección por *T. cruzi* emplean como blanco molecular la secuencia repetitiva nuclear de ADN satélite, se decidió generar un fragmento de ADN sintético correspondiente a una unidad repetitiva de ADN satélite. Para la elaboración de este ADN sintético, se procedió al alineamiento de las repeticiones de ADNsat de cepas y clones representativos de las UDTs I al VI que se encontraron en el GenBank, mostrando un porcentaje de conservación cercano al 95%. Adicionalmente, el alineamiento de nucleótidos (**Figura 16**) presentó una proporción muy baja de polimorfismos de un solo nucleótido (*SNPs*) dentro de las regiones reconocidas por los oligonucleótidos más usados en el diagnóstico molecular de *T. cruzi* (Cruzi 1, Cruz 2 y la sonda TaqMan Cruz 3) (Piron y col., 2007). Finalmente, se eligió una secuencia consenso que representara el ADNsat de *T. cruzi* con la mayoría de *SNPs* posibles entre UDTs.

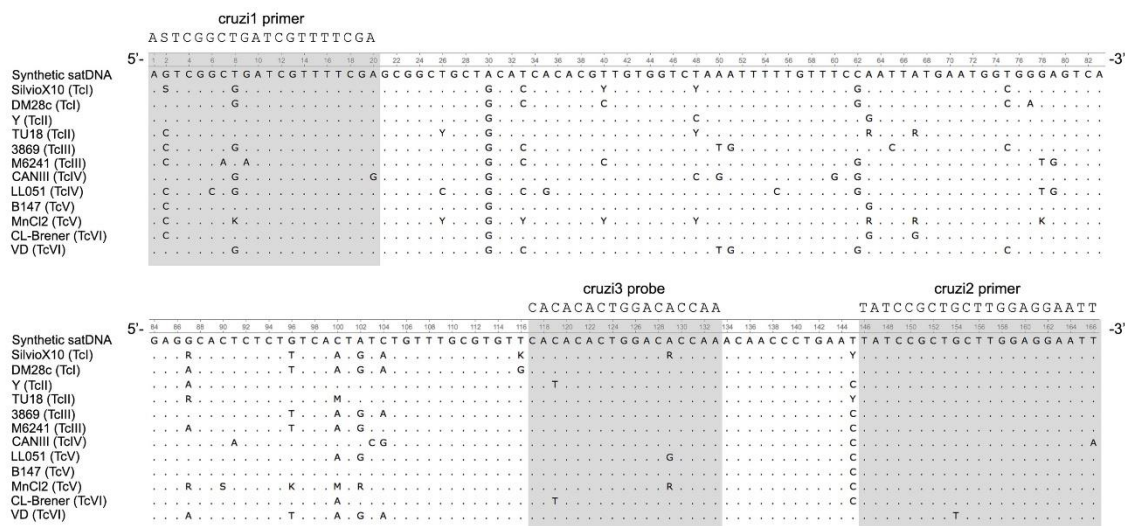


Figura 16. Alineamiento de las repeticiones de ADN satélite de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* que cubren las seis unidades de tipificación discretas. Los recuadros grises corresponden a las regiones en las que se sitúan los oligonucleótidos y la sonda TaqMan utilizadas en el diagnóstico molecular de la Enfermedad de Chagas.

5.2.3. Parámetros analíticos de la qPCR basada en ADNsat utilizando ADN sintético en la construcción de la curva estándar de cuantificación.

Para estimar la sensibilidad analítica, la linealidad y el rango dinámico de la qPCR utilizando el ADNsat sintético como estándar de cuantificación, se probaron seis diluciones seriadas del oligonucleótido en tres ensayos independientes, con duplicados técnicos por ensayo. El ensayo qPCR mostró una buena linealidad ($R^2 = 0,99$) con un rango dinámico de detección de 1 a 10^5 copias/ μ L (**Figura 16**). La pendiente fue de -3,23, equivalente a una eficacia de la qPCR del 104%. Según las curvas estándar, el límite de detección de la qPCR se determinó en 1 copia/ μ L.

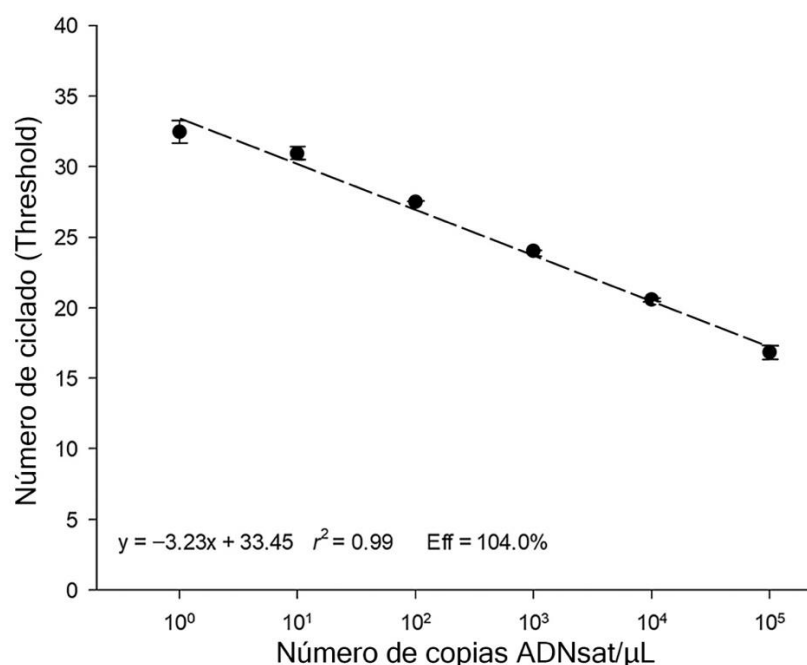


Figura 16. Curva de cuantificación de la qPCR en tiempo real del ADN satélite. La curva estándar se generó trazando los valores de ciclo umbral medios, obtenidos mediante PCR cuantitativa en tiempo real frente a diluciones seriadas 10 veces del ADN satélite sintético de *Trypanosoma cruzi* expresado en número de copias/ μ L.

5.2.4. Números de copias de la secuencia de ADN satélite en diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*

Partiendo de ADNg de las cepas de *T. cruzi* Dm28c (TcI), Y (TcII), INPA 3663 (TcIII), INPA 4167 (TcIV), Bug 2149 (TcV) y CL-Brener (TcVI), se estimó el número relativo de copias de ADNsat mediante qPCR. Para ello se utilizó la curva estándar de ADNsat sintético y ADNg de la cepa DM28c (TcI) como genoma de referencia.

Adicionalmente, la cuantificación de copias estimada mediante la curva de calibración con el ADNsat sintético, se comparó con los valores de dosificación relativa de ADNsat disponible en Vargas et al (2004) y Souza y col. (2011) (**Figura 17**). Ambas estrategias revelaron diferencias similares entre las cepas de *T. cruzi* utilizadas como representativas de las diferentes UDTs, excepto para las cepas TcIII y TcVI (**Figura 17**). Las cepas TcII (Y), TcIV (INPA 4167) y TcV (Bug 2149) presentaron un número de repeticiones de ADNsat por genoma entre cuatro y ocho veces mayor al de TcI. Las cepas pertenecientes a TcIII (INPA 3663) y TcVI (CL-Brener) presentaron entre 30 y 50 veces más abundancia en número de genes de ADNsat que el clon Dm28c (**Figura 17**).

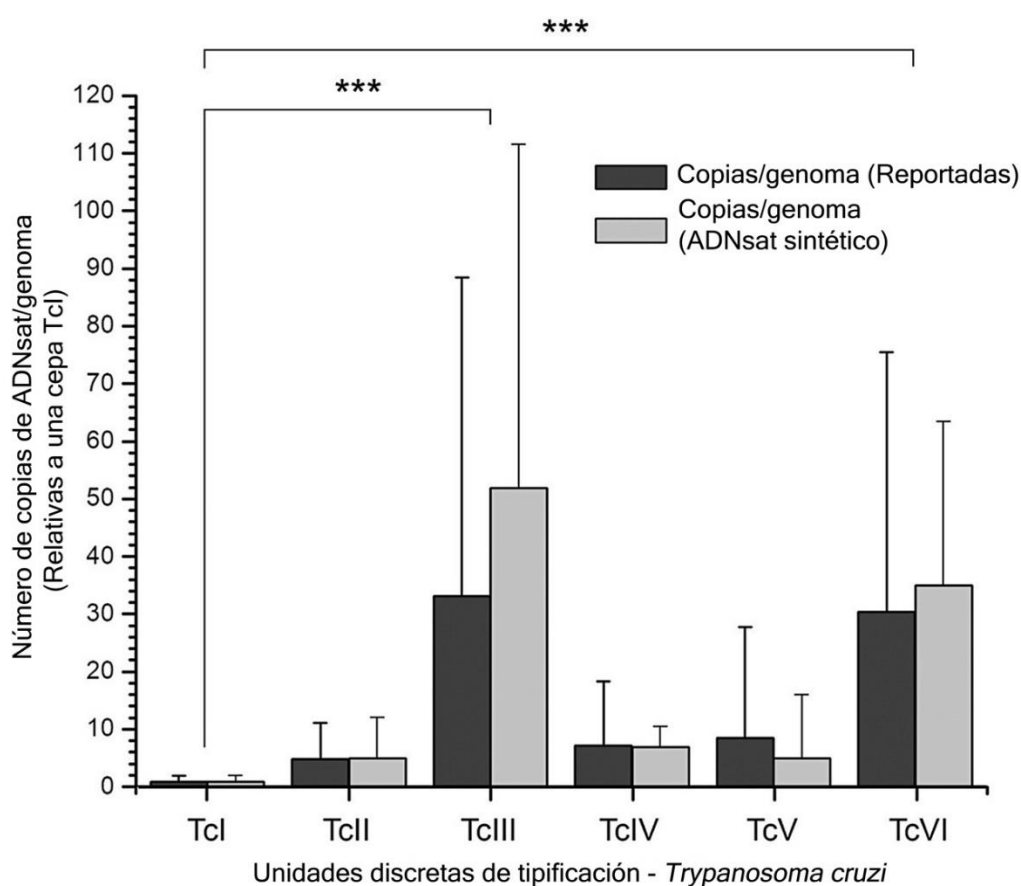


Figura 17. Número relativo de copias de ADN satélite (ADNsats) por genoma, en cepas de *Trypanosoma cruzi* representativas de diferentes unidades discretas de tipificación (UDT). **Barras negras:** Dosaje relativo del gen ADNsat obtenido a partir de datos publicados (Vargas y col., 2004; Souza y col., 2011) **Barras grises:** Dosaje relativo del gen ADNsat estimado mediante PCR cuantitativa en tiempo real frente a una curva estándar basada en el oligonucleótido sintético. UDT I (Dm28c); UDT II (Y); UDT III (INPA 3663); UDT IV (INPA 4167); UDT V (Bug 2149); UDT VI (CL-Brener). (***) : $P < 0,001$, análisis de varianza de una vía.

5.2.5. Comparación de las cargas parasitarias en muestras clínicas utilizando como referencia, curvas estándar expresadas en Equivalentes parasitarios/mL y copias de ADNsatélite/μL

Este estudio comparativo de cuantificación de carga parasitaria en muestras clínicas se realizó con dos cohortes de pacientes con ECh.

El grupo 1 (G1) consistió en 186 muestras de 38 pacientes venezolanos con EChO de los brotes de Chacao (año 2007) (**Tabla 2**) y Chichiriviche de la Costa (2009) (**Tabla 3**). Estas muestras fueron colectadas al momento del diagnóstico (Pre-TTO) y luego del tratamiento, cubriendo alguno de ellos hasta 9 años de seguimiento Post-TTO. La tipificación de las poblaciones parasitarias infectantes de esta cohorte de pacientes resultó en un 100% TcI (Muñoz-Calderón y col., 2013). El grupo 2 (G2), lo componen 19 muestras de sangre de pacientes brasileiros con ECh en fase crónica (**Tabla 6**), cuyas poblaciones parasitarias fueron tipificadas como TcII y TcVI (Rodrigues-dos-Santos y col., 2018).

Tabla 6. Características epidemiológicas de los pacientes brasileiros pertenecientes el grupo 2 (G2) incluidos en Muñoz-Calderón y col. 2021.

Código Muestra	Serología anti- <i>T. cruzi</i>	UDT	Ubicación Geográfica (Estado)
2	Positivo	II	CE
3	Positivo	II	PE
4	Positivo	II	MG
7	Positivo	II/V/VI	RJ
8	Positivo	II/V/VI	AL
12	Positivo	II/VI	PE
13	Positivo	II/VI	AL
14	Positivo	II+VI	RJ
15	Positivo	II+VI	AL
16	Positivo	II+VI	CE
17	Positivo	II+VI	CE
18	Positivo	III+VI	BA
19	Positivo	V	BA
20	Positivo	V	BA

Con el fin de comparar los valores de carga parasitaria utilizando curvas estándar expresadas en Eq.Par./mL con la curva estándar generada a partir del ADNsat sintético, las muestras pertenecientes al G1 fueron cuantificadas con una curva

estándar producida a partir de ADN_g extraído de sangre contaminada con una concentración conocida de parásitos de la cepa SylvioX10/1 (TcI). La cuantificación del G2 se realizó utilizando una curva estándar producida con ADN_g extraído de sangre contaminada con una concentración conocida de parásitos de la cepa Y (TcII). Los resultados obtenidos del análisis comparativo son mostrados en la **Figura 18**. Los resultados obtenidos del análisis de correlación de Pearson entre ambas mediciones, mostraron valores de $R^2 = 0,995$ para los pacientes del G1 y de $R^2 = 0,884$ para la comparación de técnicas en el G2 (**Figura 18**, A and B, respectivamente).

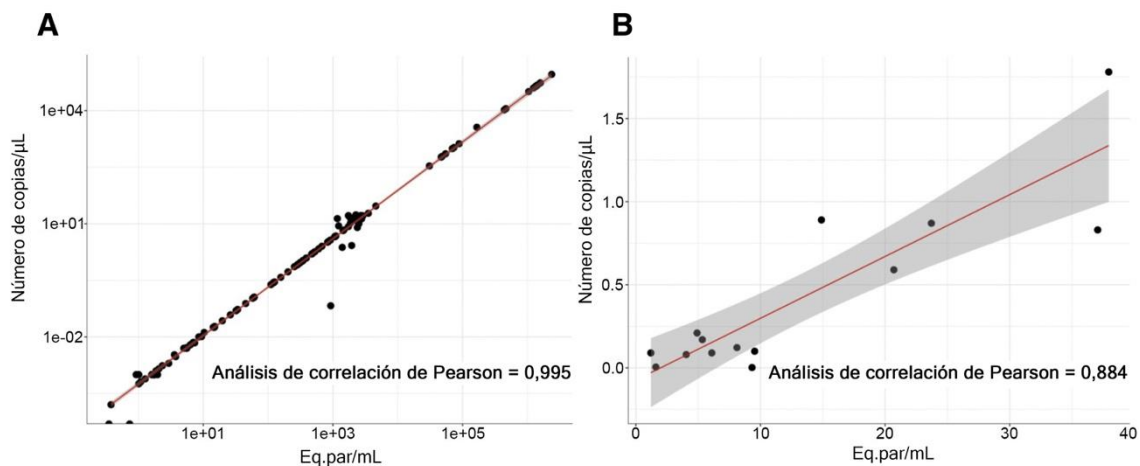


Figura 18. Análisis de correlación de Pearson comparando los valores de cargas de *Trypanosoma cruzi* en muestras clínicas, utilizando curvas estándar basadas en sangre enriquecida con parásitos o ADN sintético. **A)** Análisis de correlación para el grupo de pacientes de los brotes de Enfermedad de Chagas oral (G1). **B)** Análisis de correlación para pacientes con Enfermedad de Chagas en fase crónica (G2). El área sombreada en gris corresponde al IC del 95% según la prueba estadística. * $P = 0.05$; Eq.Par./mL = equivalentes de parásitos/mL; ADNsat = ADN satélite.

Adicionalmente, se realizaron análisis comparativos de la cuantificación de carga mediante gráficos de caja y dispersión de puntos (**Figura 19**). Los resultados mostraron diferencias en los valores de cuantificación cercanos a la significancia estadística en el G1. Esta diferencia se vio reflejada como una subestimación de los valores de cuantificación en las muestras del G1 al utilizar como referencia las curvas estándar con el ADNsat sintético, sobre todo en aquellas muestras con baja carga parasitaria. Sin embargo, los datos obtenidos al comparar las dos metodologías de cuantificación en el G2, no mostraron diferencias estadísticas, correlacionándose casi en un 100% las cuantificaciones de carga parasitaria.

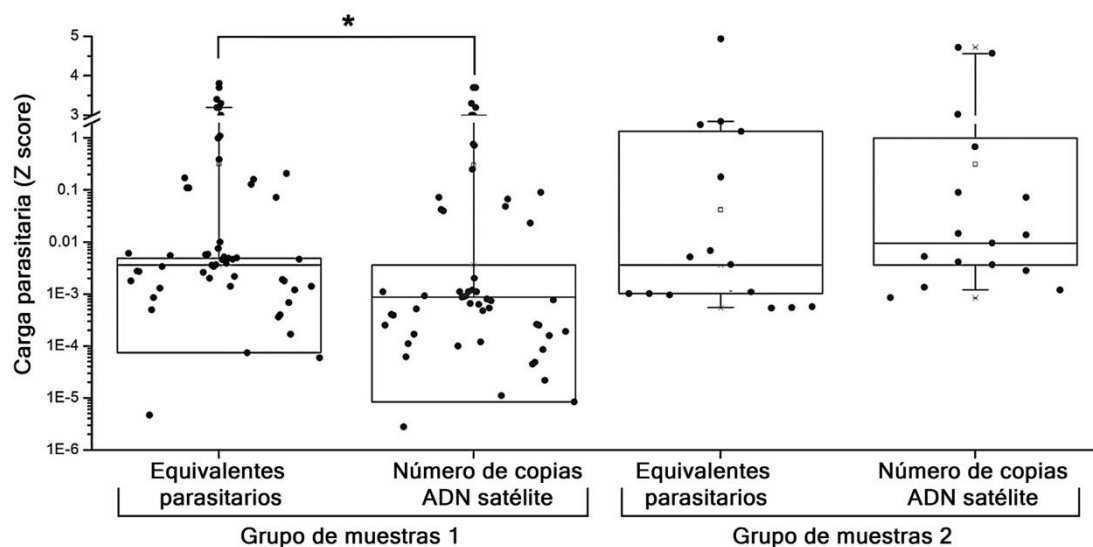


Figura 19. Gráficos de caja comparativos entre los dos enfoques de cuantificación de carga parasitaria. Los datos se normalizaron calculando el algoritmo de z score.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se pudo evidenciar que la estrategia de cuantificación de carga parasitaria basada en copias de ADNsat utilizando una curva de ADN sintético, permitió la comparación directa de las cargas parasitarias entre pacientes de diversas regiones geográficas infectados con diferentes genotipos de *T. cruzi*, con un alto grado de equivalencia al compararla con la cuantificación de carga basada en curvas de equivalentes parasitarios. Esto es verdaderamente beneficioso para realizar futuros meta-análisis entre resultados obtenidos de distintos ensayos clínicos.

5.2.6. Monitoreo por PCR en tiempo real de la respuesta parasitológica a BZN en pacientes con enfermedad de Chagas

Como ya fue mencionado con anterioridad, todas las muestras incluidas en esta tesis corresponden a una serie de conveniencia compuesta por cohortes de pacientes con ECh con escasa respuesta al tratamiento etiológico y cuyas muestras fueron colectadas entre los años 1999 y 2017. Por tal motivo, al trabajar con muestras de archivo, decidimos corroborar la integridad del material genético mediante el marcador molecular del genoma humano ARNasa P, así como, los valores de carga parasitaria (expresados en copias de ADNsat/ μ L) para los tres grupos de pacientes. Los resultados mostraron un porcentaje de positividad de la qPCR (entre el 75-88%) en las muestras Pre-TTO para ambos brotes de ECh0, respecto a las diferentes

visitas Post-TTO (95-100% de positividad); mientras que no se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de muestras positivas en las diferentes visitas de seguimiento (**Tabla 7**, $p > 0,05$). Al evaluar estos porcentajes de positividad de la qPCR en pacientes crónicos cuyas muestras de archivo se remontan hasta 1999, se pudo evidenciar al menos un 70% de pérdida en la positividad para *T. cruzi* en muestras Pre-TTO y entre el 60-70% de disminución en la carga de las muestras Post-TTO (**Tabla 7**).

Para todas las cohortes de pacientes evaluados, se evidenció que el 100% (N= 45 pacientes) tuvieron resultados intermitentes entre qPCRs positivas y no detectables a lo largo de todo el seguimiento clínico-parasitológico. A pesar de esto, la positividad en la qPCR en muestras entre los 9-10 años posteriores al tratamiento en 21 pacientes que recibieron BZN, demuestra la sensibilidad de esta herramienta diagnóstica y aporta indicios sobre una posible falla terapéutica. A lo largo del seguimiento Post-TTO de los pacientes con EChO, la mediana de la carga parasitaria se ubicó en un valor de -0,18 [IQR = -0,79 – 0,66] $\log_{10}$ copias ADNsat/ μ L, lo que resulta en muestras positivas para el marcador de ADNsat, pero que se encuentran por debajo del límite de cuantificación de la técnica. Sin embargo, a los 9 años Post-TTO, salvo 4 pacientes que presentaron cargas parasitarias en el orden de 1,99 [IQR = 1,104 – 2,889] $\log_{10}$ copias ADNsat/ μ L, en general se pudieron observar valores de cuantificación de carga cercanos al límite de detección de 1 copia de ADNsat/ μ L (0,94 [IQR = 0,405 – 1,138] $\log_{10}$ copias ADNsat/ μ L).

Tabla 7. Análisis de la integridad del material genético y carga parasitaria de las muestras de archivo utilizadas en este trabajo, durante el periodo de tamizaje y seguimiento Post-Tratamiento.

Cohorte de Pacientes	Parámetros	Pre-TT0	Post-TT0			
			Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
Brote Echo Chichiriviche de la Costa	N total	17	17	17	10	13
	Positivos ARNAsa P	17	17	17	10	13
	Positivos <i>T. cruzi</i>	15 (88%)	16 (95%)	17 (100%)	10 (100%)	12 (95%)
	Cuantificables	9 (53%)	9 (53%)	14 (83%)	6 (60%)	6 (46%)
	Mediana [IQR] Log copias ADNsat/μL	0,028 [-2,49 - 1,45]	0,33 [-2,72 - 3,70]	0,66 [-1,10 - 2,01]	0,56 [-2,09 - 1,17]	-0,54 [-2,64 - 1,00]
Brote Echo Chacao	N total	8	6	8	5	
	Positivos ARNAsa P	8	6	8	5	
	Positivos	6 (75%)	5 (95%)	8 (100%)	5 (100%)	
	Cuantificables	4 (67%)	3 (60%)	5 (63%)	3 (60%)	
	Mediana [IQR] Log copias ADNsat/μL	-0,52 [-1,69 - 0,82]	-0,79 [-1,58 - -0,14]	-0,34 [-1,09 - 0,62]	-0,02 [-0,95 - 0,34]	
ECA – TRAENA	N total	55	48	18	10	
	Positivos ARNAsa P	27	28	15	10	
	Positivos	12 (45%)	18 (64%)	3 (20%)	3 (30%)	
	Cuantificables	4 (33%)	6 (33%)	1 (33%)	0	
	Mediana [IQR] Log copias ADNsat/μL	-0,53 [-1,59 - 0,48]	0,80 [-1,99 - -0,37]	-0,86 [-3,06 - 1,31]	-2,08 [-2,41 - -1,72]	

Con el objetivo de tipificar las poblaciones naturales detectables en muestras de las cohortes de pacientes estudiadas en esta tesis, de las 130 muestras PCR positivas pertenecientes a las tres cohortes de pacientes, se seleccionaron aquellas con mayor carga parasitaria (> 5 Eq.Par./mL). Las UDTs fueron identificadas en un total de 54 muestras (**Tabla 8**), 10 pacientes presentaron poblaciones parasitarias pertenecientes al linaje TcVI, mientras que 25 estuvieron infectados por el linaje TcI. A pesar que los brotes de EChO ocurrieron en localidades de Venezuela con condiciones epidemiológicas diferentes, no se encontraron diferencias en la distribución de UDTs entre las muestras de brotes de Chacao y Chichiriviche de la Costa. Curiosamente, fue posible tipificar en dos de los pacientes de la cohorte del ECA-TRAENA poblaciones parasitarias TcI a pesar que en el sur del continente la distribución de este linaje es significativamente inferior a la de los linajes TcV y TcVI. Las UDTs TcIII y TcIV no fueron detectadas.

Tabla 8. Genotipificación de las muestras con mayor carga parasitaria obtenidas durante el seguimiento clínico-parasitológico de las tres cohortes de pacientes con Enfermedad de Chagas evaluadas en este trabajo.

Cohorte	Unidad discreta de tipificación (UDT)	Número de pacientes
Brote de EChO: Chacao	TcI	10
Brote de EChO: Chichiriviche de la Costa	TcI	13
ECA-TRAENA	TcI	2
	TcVI	10

CAPITULO 3.

Comparación de la composición genética intra-UDT de poblaciones naturales de Trypanosoma cruzi detectables en sangre periférica o de aislamientos obtenidos por hemocultivo en cohortes de pacientes antes del tratamiento, durante el mismo y luego de su falla terapéutica, mediante la caracterización de firmas moleculares de minicírculos (ADNk-PCR RFLP).

En base al interés en explorar las distancias genéticas entre las poblaciones naturales de *T. cruzi* pertenecientes o no a un mismo UDT que pueden coexistir en circulación sanguínea en un mismo paciente a lo largo del seguimiento parasitológico, se procedió al análisis de los perfiles de PCR-RFLP de ADNk (firmas de minicírculos) de cada paciente en sus muestras Pre y Post-Tratamiento.

A fin de minimizar los errores inherentes a este método, todas las muestras GEB de un mismo paciente fueron analizadas en el mismo gel. Los perfiles de variabilidad en los coeficientes de Jaccard entre los perfiles de PCR-RFLP de ADNk de las muestras Pre-TTO y los respectivos puntos de seguimiento de cada paciente son mostrados en la **Figura 20**.

En líneas generales, todos los pacientes enrolados en este trabajo presentaron un rango amplio de distancias genéticas entre sus muestras Pre y Post-TTO, superior a 0,5 en algún punto del seguimiento. La única diferencia estadísticamente significativa encontrada ($P = 0,001$) al analizar las firmas de minicírculos entre las cohortes de pacientes, ocurrió en la evaluación de efectividad del tratamiento entre 2 a 6 meses posteriores a la administración del BZN (**Figura 20A**). En este periodo de tiempo (cercano a la culminación del tratamiento con BZN por 60 días), las poblaciones parasitarias presentes en los brotes de EChO presentaron una mayor diversidad genética ($CJ = 0,721$ [IQR= 0,651 – 0,762]) respecto a las poblaciones de *T. cruzi* presentes en los pacientes en fase crónica reclutados en el ECA-TRAENA ($CJ = 0,455$ [IQR= 0,423 – 0,577]). Dado que los pacientes reclutados en el ECA-TRAENA presentaban dos condicionantes de tratamiento, en la **Figura 20B** se procedió a desglosar las tendencias previamente descritas. Los resultados mostraron

diferencias significativas entre el grupo de pacientes con EChO y los grupos Tratados y Placebo del ECA-TRAENA ($P = 0,021$ y $0,012$; respectivamente).

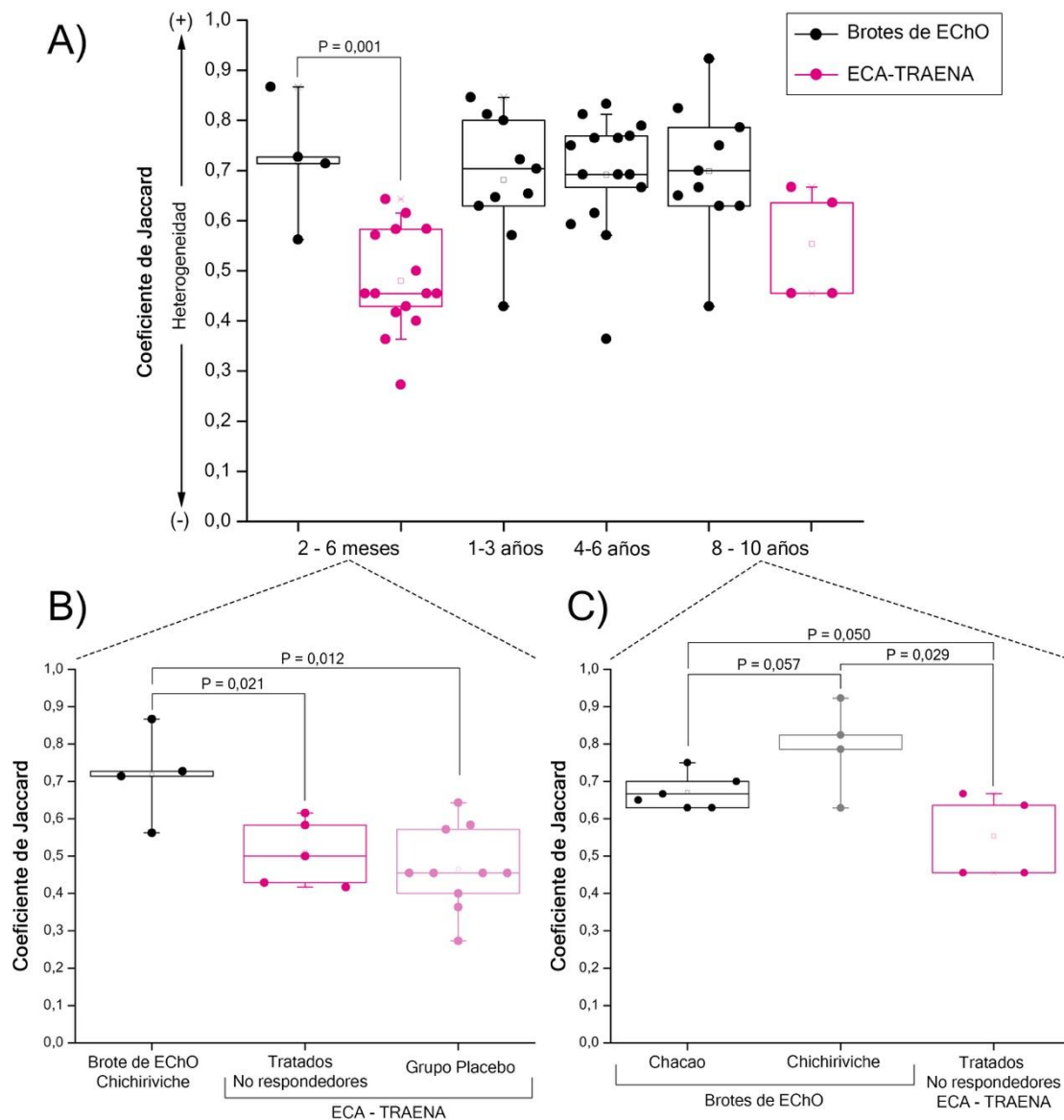


Figura 20. Perfiles de variabilidad en los Coeficientes de Jaccard entre las firmas de minicírculos de las muestras Pre-TTO y los respectivos puntos de seguimiento posteriores al tratamiento para cada cohorte de pacientes evaluados. **(A)** Comparación de los valores del Coeficiente de Jaccard entre las dos micro-epidemias de EChO ocurridas en Venezuela y Pacientes seleccionados del ensayo clínico TRAENA; **(B)** Detalle de los valores del Coeficiente de Jaccard obtenidos entre 2 a 6 meses Post-TTO; **(C)** Detalle de los valores del Coeficiente de Jaccard obtenidos entre 8 a 10 años Post-TTO

En el punto final de seguimiento para este trabajo (8-10 años Post-TTO), se puede observar una ligera tendencia a la significancia estadística ($P = 0,058$) en los perfiles de CJ entre las cohortes de pacientes. Por lo tanto, igual que el caso anteriormente descrito se procedió a desglosar el perfil de los valores del CJ entre las cohortes de pacientes (**Figura 20C**). Los resultados obtenidos al observar en detalle las firmas de minicírculos, evidencian nuevamente una diferencia significativa a la baja de los valores del CJ entre los dos brotes de EChO y los pacientes crónicos enrolados en el ECA-TRAENA ($P = 0,057$ y $0,029$; respectivamente).

Por otra parte, el análisis de diversidad de ambos grupos de pacientes (Tratados y Placebo) de la cohorte del ECA-TRAENA, no mostró diferencias significativas al comparar las distancias entre las muestras colectadas a lo largo del seguimiento respecto al Pre-TTO ($p > 0,05$).

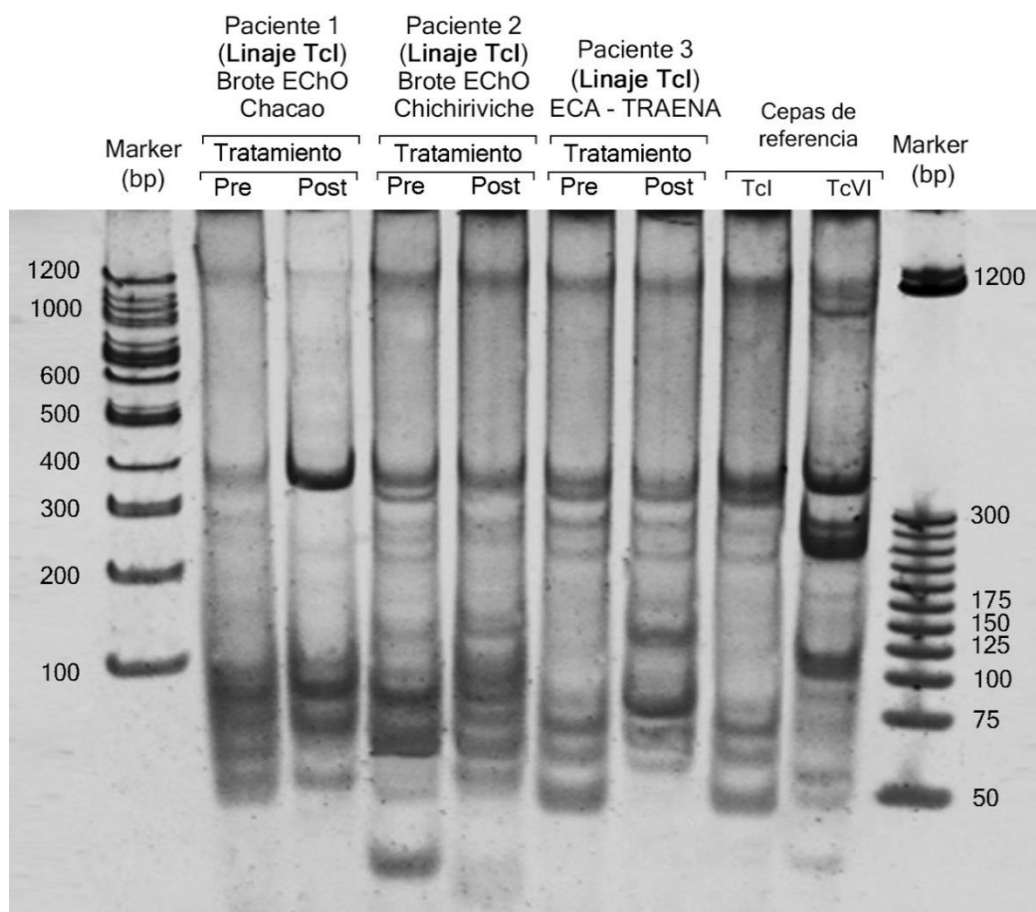


Figura 21. Ejemplificación del análisis comparativo del perfil de bandas de minicírculos, obtenidos mediante la metodología de Polimorfismos de Fragmentos de Restricción (RFLP) a partir de PCR-ADNk, entre las poblaciones de parásitos de las diferentes cohortes de pacientes.

En el caso de los grupos de pacientes con EChO, el hecho de contar con un mayor número de muestras que van desde los 3 meses hasta 8-9 años Post-TTO, permitió hacer un análisis más exhaustivo de los cambios en los perfiles de PCR-RFLP ADNk de las muestras de cada paciente (**Figura 21**). Se obtuvieron firmas de minicírculos de 25 muestras, que mostraron una media de 14 bandas de digestión, con un tamaño entre ~30 y 330 pb (**Figura 21**).

El primer punto que quisimos validar con estos perfiles de CJ es el proceso de selección clonal que presenta *T. cruzi*. Para ello se evaluaron en paralelo las firmas de minicírculos de cepas de *T. cruzi* Pre y Post-TTO mantenidas en cultivo axénico y que fueron aisladas de pacientes con EChO versus las firmas de minicírculos obtenidas de muestras clínicas de estos mismos pacientes antes y después del tratamiento. Los resultados mostrados en la **Figura 22**, reflejan una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de CJ obtenidos entre los perfiles de los aislados Pre-Tratamiento con las muestras clínicas (valor P de Mann-Whitney = 0,001), donde la mayor heterogeneidad y, por ende, mayor diversidad parasitaria es posible encontrarla en éstas últimas. Al analizar los perfiles entre aislados en cultivo axénico y las muestras clínicas Post-TTO, se evidencian valores de mediana muy similares entre ambas poblaciones de parásitos (0,673 [IQR= 0,631 – 0,756] y 0,700 [IQR= 0,529 – 0,877], respectivamente). Sin embargo, se puede evidenciar claramente que las poblaciones parasitarias presentes en las muestras clínicas Post-TTO presentan un mayor rango de heterogeneidad respecto a los aislados en cultivos axénicos. Adicionalmente, se encontró diferencia estadística cuando se compararon las firmas de minicírculos de los aislados en cultivos axénicos Pre y Post-TTO (valor P de Mann-Whitney = 0,002).

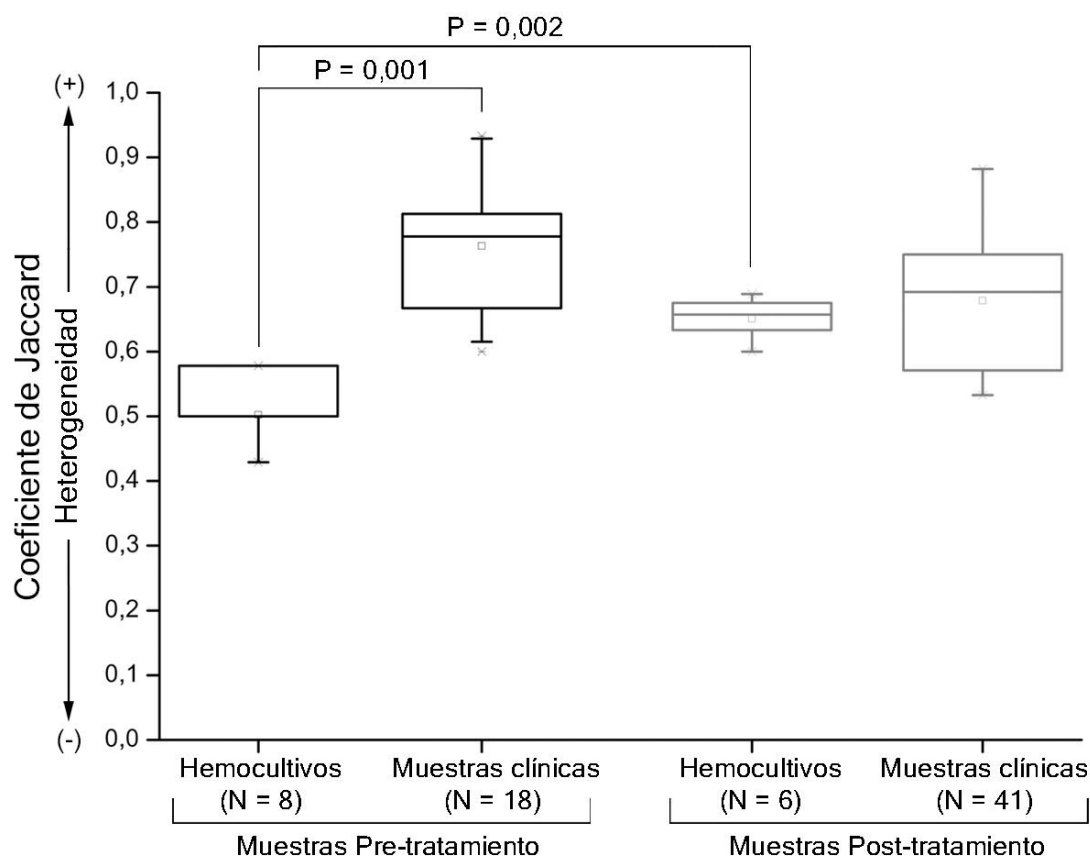


Figura 22. Comparación poblacional de las firmas de minicírculos entre cepas de *Trypanosoma cruzi* mantenidas en cultivo axénico y las obtenidas de muestras clínicas, tanto antes como después del tratamiento.

Una vez que confirmamos la presencia de una mayor heterogeneidad poblacional en las muestras clínicas, procedimos a la evaluación de 59 perfiles de firmas de minicírculos (33 y 26 perfiles para los brotes de EChO de Chacao y Chichiriviche, respectivamente). La primera evidencia obtenida de los análisis de bandas fue que ninguno de los perfiles analizados presentó un 100% de homología con su correspondiente firma de minicírculos Pre-TTO, revelando heterogeneidad entre las poblaciones parasitarias detectables en sangre periférica en el momento del diagnóstico y las diferentes visitas de seguimiento. Las firmas de minicírculos presentes en las muestras Post-TTO mostraron solamente un 40% de similitud con las muestras Pre-TTO en términos poblacionales, lo que refleja una alta heterogeneidad genética de las poblaciones de parásitos. Curiosamente, un porcentaje similar de homología (46%) se obtuvo al comparar las firmas de minicírculos entre las muestras Post-TTO.

Al analizar los perfiles de las firmas de minicírculos intra-TcI en los dos brotes de EChO (**Figura 23**), se puede observar que los valores del CJ se mantienen estables a lo largo del seguimiento parasitario, sin diferencias significativas entre las visitas Post-Tratamiento de 1-3 años (mediana del CJ = 0,68), 4-6 años (mediana del CJ = 0,69) y 8-10 años (mediana del CJ = 0,68). La única ocasión en la que se detectó una diferencia estadística próxima a la significancia fue entre los 8-10 años Post-Tratamiento, con una mediana del CJ de 0,66 [IQR= 0,63-0,69] y 0,81 [IQR= 0,70-0,85] para los brotes de EChO de Chacao y Chichiriviche, respectivamente (prueba U de Mann-Whitney $p = 0,057$).

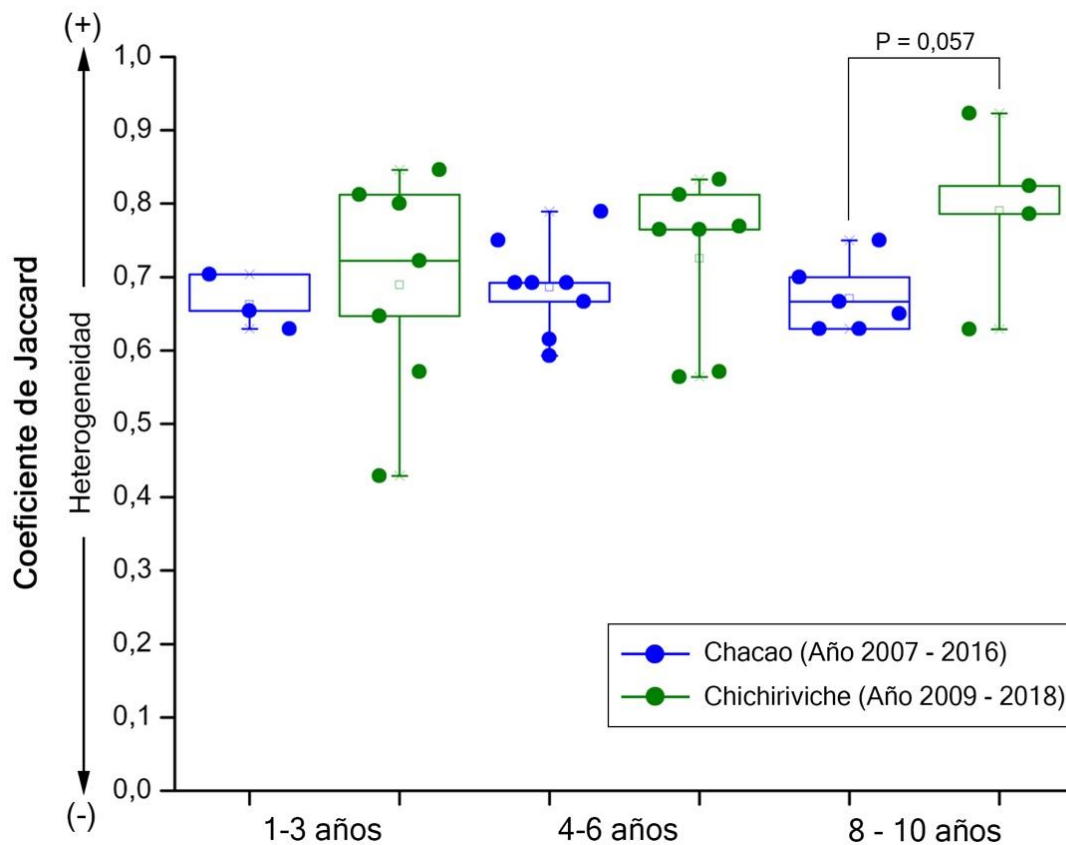


Figura 23. Perfiles de variabilidad a lo largo del seguimiento Post-TTO de los Coeficientes de Jaccard intra-UDT I obtenidos en pacientes con Enfermedad de Chagas Oral.

CAPITULO 4

Caracterización molecular de las enzimas de Trypanosoma cruzi TcNTR-1, TcOYE, TcAKR y TcABCG-1 relacionadas con el procesamiento de fármacos nitro-heterocíclicos

Los principales procesos relacionados con la resistencia a medicamentos, ya sea de forma natural o adquirida, abarcan la inactivación del fármaco, la alteración del objetivo del mismo, crear impedimentos para su correcta absorción y la expulsión activa del medicamento (Reygaert, 2018). Para obtener información sobre los mecanismos que llevan a la resistencia contra los fármacos nitro-heterocíclicos, se investigaron clones resistentes de *T. cruzi* obtenidos mediante selección de fármacos *in-vitro* (Wilkinson y col., 2008; Mejia-Jaramillo y col., 2012; Campos y col., 2014; Campos y col., 2017), identificando el gen que codifica la enzima TcNTR-1 como la responsable principal de activar los fármacos (Wilkinson y col., 2008) y, por tanto, un jugador importante en la resistencia adquirida a BZN y NFX. Estudios posteriores han revelado el papel de otras enzimas de la familia nitroreductasas involucradas en el procesamiento farmacológico y de detoxificación de BZN y NFX (TcOYE y TcAKR, respectivamente) (Andrade y col., 2008; Díaz-Viraqué y col., 2018; Díaz-Viraqué y col., 2023). Adicionalmente, se ha informado que el gen del transportador TcABCG-1 (posiblemente involucrado en la translocación de los fármacos), se encuentra sobreexpresado en cepas de *T. cruzi* consideradas naturalmente resistentes a BZN (Petravicius y col., 2019).

En todos estos estudios, se ha observado la acumulación a nivel del genoma de mutaciones en poblaciones parasitarias resistentes (Murta y col., 2006; Wilkinson y col., 2008; Franco y col., 2015). Sin embargo, hasta el momento no se ha encontrado una correlación directa entre los cambios de aminoácidos y el fenotipo de resistencia a BZN (Franco y col., 2015).

4.1. Análisis sobre la secuencia nucleotídica de los genes *Tcntr-1*, *Tcoye*, *Tcakr* y *Tcabcg-1*, para establecer la existencia de Polimorfismos de Nucleótido Único (SNPs) diferenciales entre poblaciones de *Trypanosoma cruzi*, en un contexto epidemiológico y como posibles biomarcadores de respuesta a fármacos nitro-heterocíclicos

Luego de realizar el ensamblaje y alineamiento de las secuencias para cada uno de los genes evaluados, se obtuvo una media de 1000pb para cada muestra, exceptuando las secuencias para el gen *Tcabcg-1* que promediaron 1998pb. Los datos de secuenciación brutos para cada muestra se filtraron y alinearon con un genoma de referencia de *T. cruzi* representativo de cepas susceptibles a BZN (Cepa SylvioX10/1 /1 - TriTrypDB rel. 42, 2019-MAR-07), utilizando el algoritmo MAFFT. La similitud de secuencia obtenida al comparar con el genoma de referencia fue de alrededor del 96% (93% *Tcntr-1*, 98,5% *Tc oye*, 95,88% *Tc akr* y 99% *Tcabcg-1*, respectivamente).

A nivel de la secuencia genética, las sustituciones de nucleótidos se clasificaron como transiciones (mutaciones entre el mismo tipo de bases - purina a purina o pirimidina a pirimidina) o transversiones (mutaciones entre diferentes tipos de bases - purina a pirimidina o pirimidina a purina). Las transversiones (Tv) tienen una mayor probabilidad de alterar la secuencia de aminoácidos de las proteínas en comparación con las transiciones (Ti), y las desviaciones locales en la relación Ti/Tv son indicativas de una selección evolutiva en los genes. Los resultados generales mostraron un total de 1192 SNPs entre los 4 genes evaluados, con un número mayor de transiciones (N= 729) respecto a las transversiones (N= 463) y una proporción de transición a transversión (Ti/Tv) igual a 1,57 (**Tabla 8**).

Tabla 8. Número total de sustituciones de nucleótidos halladas en el alineamiento de los genes *Tcntr-1*, *Tcoye*, *Tcakr* y *Tcabcg-1*

	<i>Tcntr-1</i>	<i>Tcoye</i>	<i>Tcakr</i>	<i>Tcabcg-1</i>	N Total
Transiciones	165	177	159	228	729
Transversiones	132	123	140	68	463
Ti/Tv	1,25	1,44	1,14	3,35	1,57

Las mutaciones más frecuentes fueron transversiones de T→G (65/1192), C→G (65/1192), C→A (58/1192), y transiciones de G↔A (396/1192) (**Tabla 9**). En menos del 2% de las muestras secuenciadas y de los 4 genes evaluados, fue posible observar evidencias de heterocigosidad.

Tabla 9. Mutaciones más frecuentes encontradas para los genes de las enzimas NAD(P)H dependientes y transportador ABCG bajo estudio.

	Mutación	<i>Tcntr-1</i>	<i>Tcoye</i>	<i>Tcakr</i>	<i>Tcabcg-1</i>	Total
Transiciones	A-G	47	37	41	60	185
	T-C	29	44	33	58	164
	C-T	28	55	39	47	169
	G-A	61	41	46	63	211
Transversiones	A-T	16	14	14	10	54
	A-C	15	16	17	8	56
	T-A	15	13	19	8	55
	T-G	20	17	20	8	65
	C-A	15	16	19	8	58
	C-G	20	17	20	8	65
	G-T	16	14	14	10	54
	G-C	15	16	17	8	56

Los detalles de las sustituciones de nucleótidos (mostrados como Ti/Tv) en las seis variantes genéticas de *T. cruzi* se muestran en la **Tabla 10**. En general, los datos muestran una proporción de alrededor de 1, por lo que al comparar las relaciones Ti/Tv entre todos los UDTs, no se observaron diferencias significativas, exceptuando a los resultados obtenidos en las secuencias del gen *Tcabcg-1* para los UDT TcI y el complejo TcIII-IV, que presentó valores de transiciones mucho mayores que el de transversiones (Ti/Tv= 80/18 y 83/16, respectivamente).

Por otra parte, se observó que la frecuencia de la mutación G↔A (transición) era mayor en las poblaciones TcI y del complejo TcIII-IV, mientras que, en el caso de las transversiones, las relaciones T→G y C→G resultaron ser las más abundantes para todos los UDTs evaluados.

Tabla 10. Proporción de transición a transversión (Ti/Tv) según la unidad discreta de tipificación (UDT)

UDT	<i>Tcntr-1</i>	<i>Tcoye</i>	<i>Tcacr</i>	<i>Tcabcg-1</i>
TcI	0,94	1,63	1,02	4,44
TcII-V-VI	1,06	0,96	1,33	1,91
TcIII-IV	1,97	1,94	1,08	5,19

Finalmente, al evaluar la frecuencia de aparición de cada uno de estos SNPs sobre las secuencias de los genes evaluados (**Figura 24**), no se pudo observar un patrón específico, por el contrario, los resultados demuestran que la aparición de las mutaciones puntuales parece tener un perfil aleatorio, ocurriendo en cualquier posición de la secuencia genética.

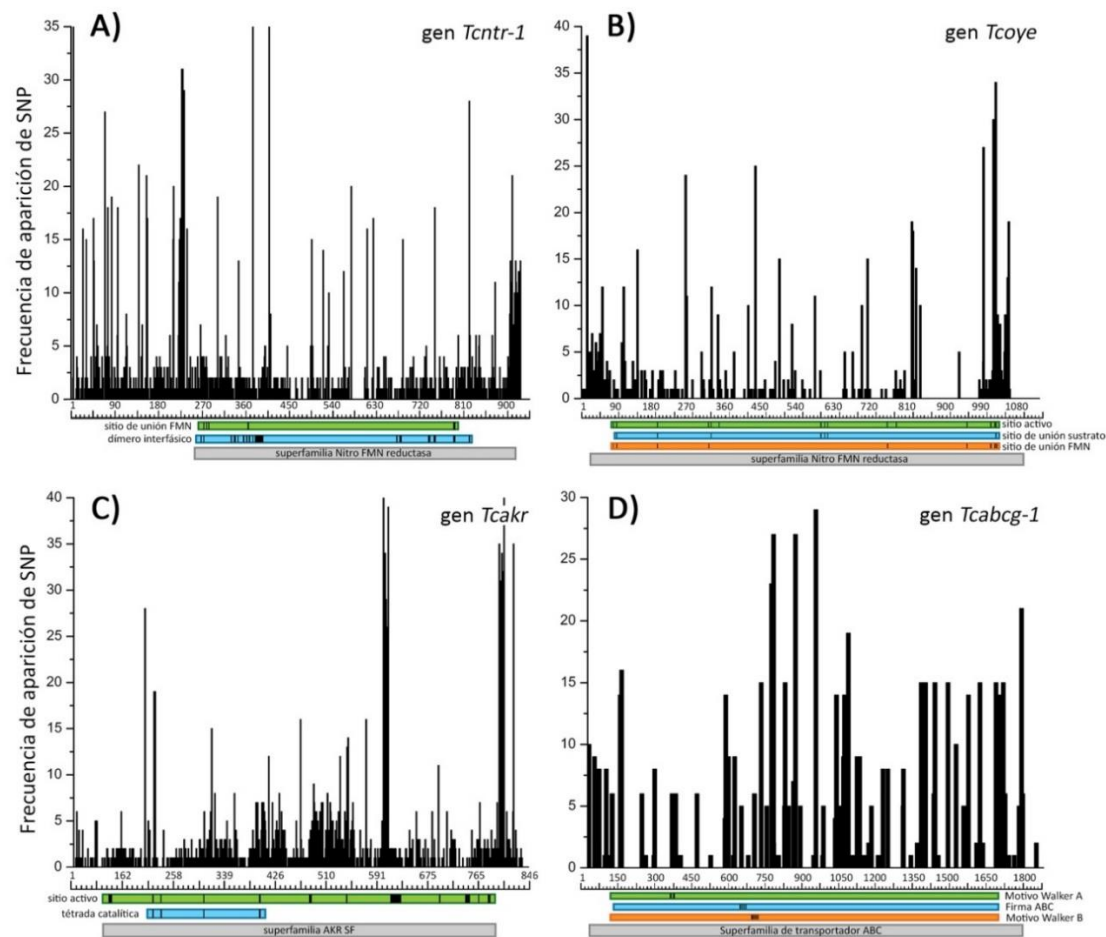


Figura 24. Frecuencia de aparición de los Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs) en las secuencias de los genes de las enzimas NAD(P)H dependientes y transportador ABCG bajo estudio. (A) Gen de Nitroreductasa 1 (*Tcntr-1*); (B) gen de la Prostaglandina F2 α sintasa (*Tcoye*); (C) Gen de la Aldoketoreductasa (*Tcacr*); (D) Gen para el transportador ABC (*Tcabcg-1*)

4.2.- Polimorfismos de nucleótido único (SNPs) como biomarcador de resistencia farmacológica.

Teniendo en cuenta la diversidad mutacional encontrada en las secuencias nucleotídicas de los 4 genes de *T. cruzi* evaluados, decidimos realizar análisis de Tipificación de Secuencias en Múltiples Loci (del inglés MLST) con las secuencias de los genes *Tcntr-1*, *Tcoye*, *Tcacr* y *Tcabcg-1* de cepas/aislados de los cuales contábamos con los valores de su respuesta farmacológica frente al BZN (**Tabla suplementaria 1**). La finalidad del análisis MLST fue evaluar si esta variabilidad genética podría estar asociada a poblaciones parasitarias poco susceptibles al tratamiento y, por ende, servir como biomarcadores de resistencia farmacológica.

El análisis MLST se aplicó a 25 aislamientos de *T. cruzi* con diferentes UDTs y niveles de susceptibilidad al fármaco BZN. La capacidad mínima discriminatoria del análisis fue de 2 genes, para lograr separar claramente poblaciones parasitarias según su UDT.

Adicionalmente, a partir de los datos obtenidos del análisis de MLST se construyeron árboles de máxima verosimilitud (**Figura 25**). En general, el análisis filogenético mostró la división de 4 clústers, tres de los cuales solamente agruparon poblaciones parasitarias TcI. El cuarto clúster agrupó poblaciones parasitarias TcII, V y VI, confirmando la presencia de mutaciones puntuales UDTs dependientes. Adicionalmente, se pudo observar que el análisis no fue capaz de asignar tres cepas/aislados (PalV2, M5631 y CANIII) en ninguno de dichos clústers.

En relación con la aplicación del análisis MLST como biomarcador de resistencia farmacológica, se observó que este enfoque no ha logrado diferenciar de manera significativa entre poblaciones susceptibles y resistentes a BZN. En consecuencia, nos encontramos ante la restricción de no poder asignar una clasificación en aquellas poblaciones parasitarias que presentan diversos SNPs en algunos de los genes bajo estudio, sin contar previamente con información acerca de su respuesta farmacológica *in-vitro*.

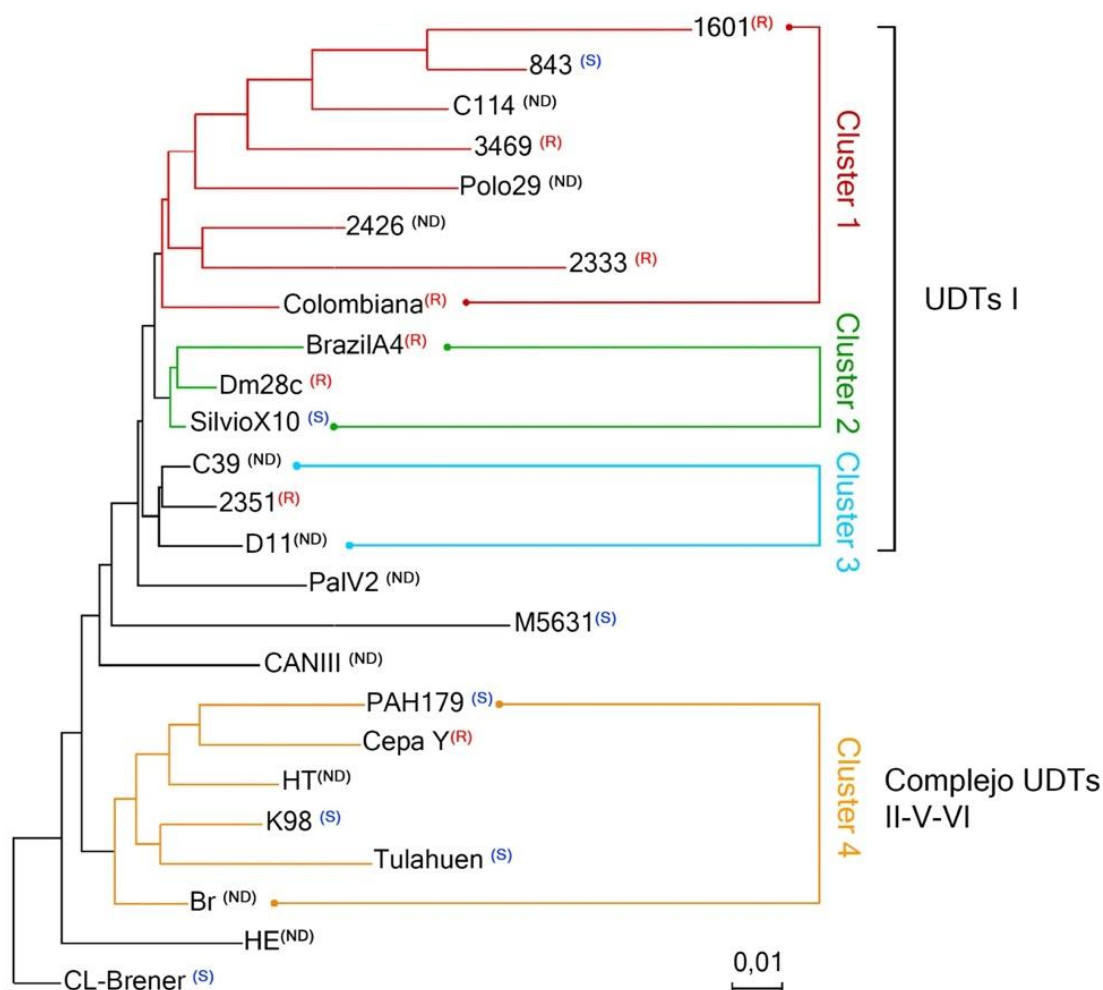


Figura 25. Relaciones filogenéticas de máxima verosimilitud de las cepas/aislados de *Trypanosoma cruzi* a partir del análisis de datos de secuencias de múltiples loci (MLSTest). Los valores en cada nodo fueron calculados basados en bootstrap de 500 repeticiones. (S) Cepa/aislado caracterizado como Susceptible al Benznidazol; (R) Cepa/aislado caracterizado como Resistente al Benznidazol; (ND) Respuesta farmacológica No Determinada.

4.3.- Análisis de la secuencia aminoacídica de las enzimas TcNTR-1, TcOYE, TcAKR y el transportador TcABCG-1, para establecer la existencia de polimorfismos diferenciales entre poblaciones de *Trypanosoma cruzi* y su posible rol como biomarcadores de respuesta a fármacos nitroheterocíclicos.

Las secuencias de aminoácidos de las enzimas TcNTR-1, TcOYE, TcAKR y del transportador TcABCG-1, fueron obtenidas a partir de las secuencias de nucleótidos (mostradas con anterioridad) mediante una traducción de aminoácidos *in-silico*, utilizando el software UGENE V40.1.

Un total de 240 secuencias aminoacídicas, distribuidas en 84 secuencias de la enzima TcNTR-1, 79 secuencias de la enzima TcOYE, 47 secuencias de la enzima TcAKR, y 30 secuencias del transportador TcABCG-1. Estas secuencias fueron alineadas con un genoma de referencia de *T. cruzi* representativo de cepas susceptibles a BZN (Cepa SylvioX10/1 /1 - TriTrypDB rel. 42, 2019-MAR-07), utilizando el algoritmo MAFFT. y se procedió a calcular la frecuencia de ocurrencia de mutaciones. (Figura 26).

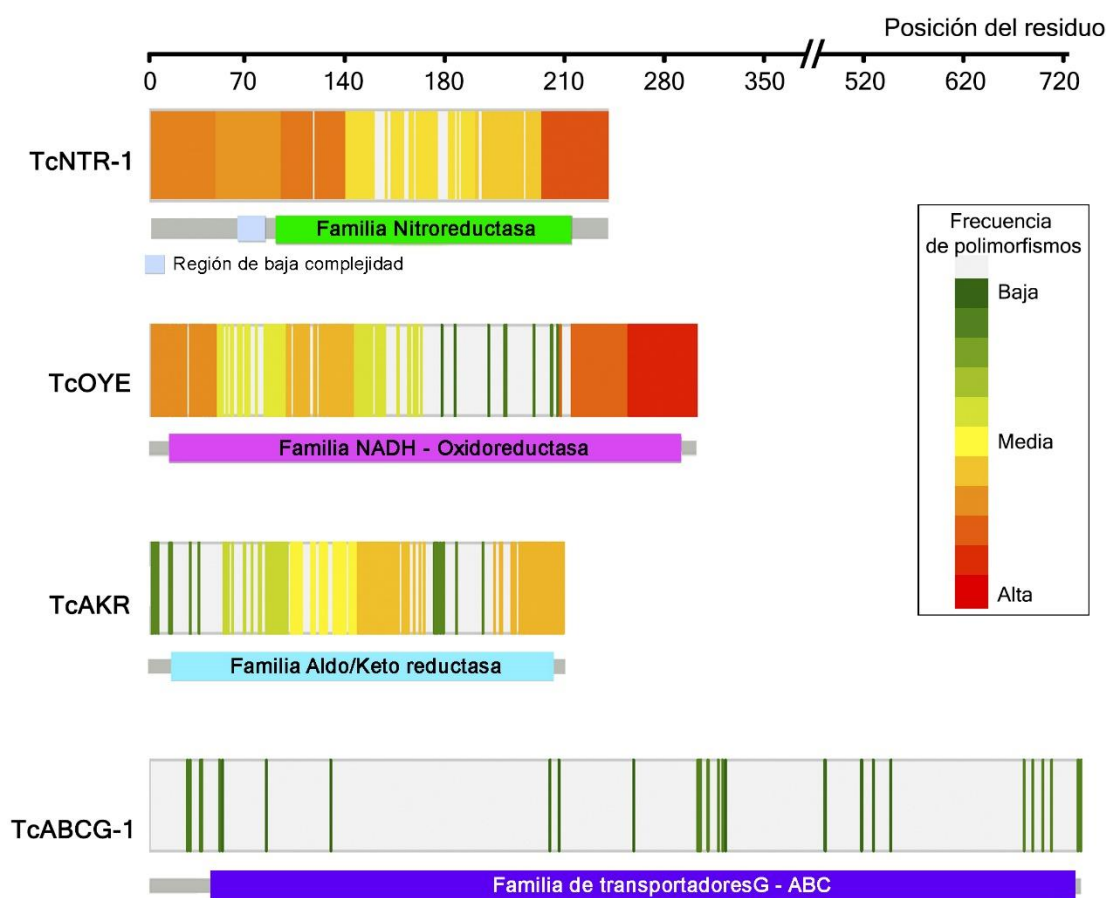


Figura 26. Gráfico de densidad de polimorfismos para cada una de las proteínas de *Trypanosoma cruzi* evaluadas, dentro de una ventana de 720 residuos aminoacídicos. El eje horizontal muestra la longitud de la proteína (Residuos) y la ubicación de los dominios catalíticos representativos de cada familia de proteína; los diferentes colores representan la densidad de polimorfismos.

En líneas generales, es posible evidenciar una alta frecuencia de polimorfismos a lo largo de las secuencias aminoacídicas de las enzimas nitroreductasas TcNTR-1 y TcOYE, abarcando los extremos amino y carboxilo-terminal, así también como sus dominios catalíticos. Respecto a la frecuencia de polimorfismos encontrada para la enzima nitro-reductasa TcAKR, se evidencia una proporción mucho menor que en

el caso de las enzimas TcNTR-1 y TcOYE. Sin embargo, estas mutaciones en la enzima TcAKR se distribuyen en zonas críticas para el funcionamiento de la enzima (región central del dominio activo de la enzima y del extremo carboxi-terminal). Finalmente, los resultados obtenidos para el transportador TcABCG-1 demuestran una baja frecuencia de polimorfismos, revelando que la mayoría de los SNPs observados en la secuencia nucleotídica estaban referidos a sustituciones sinónimas (Ks) (**Figura 27**). Adicionalmente, se puede observar que los cambios de aminoácidos encontrados a lo largo de la secuencia, son producto de polimorfismos UDT dependientes (datos no mostrados).

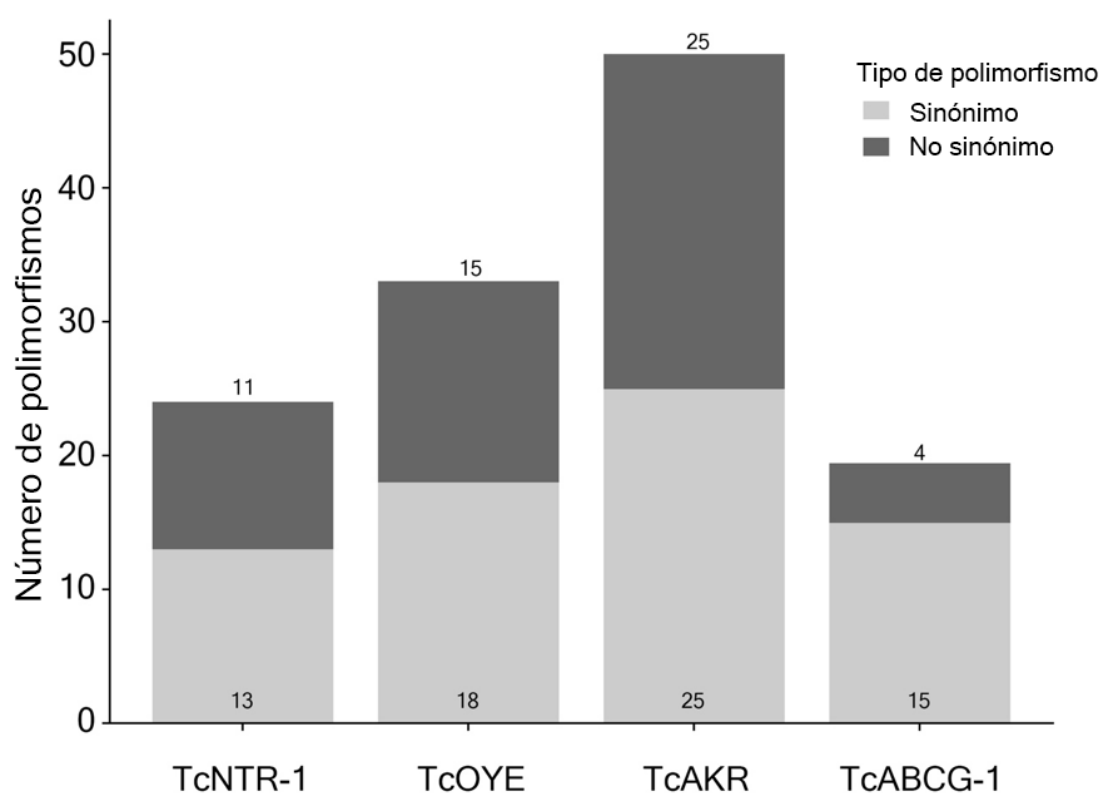


Figura 27. Número total y tipo de polimorfismo caracterizados en las secuencias aminoacídicas de las proteínas de *Trypanosoma cruzi* evaluadas.

Con la finalidad de determinar si los cambios aminoacídicos en las secuencias de estas enzimas han sido parte de un proceso adaptativo (producto de alguna presión de selección) o de mutaciones neutras que se fijaron en estas poblaciones parasitarias con el pasar del tiempo, decidimos realizar una prueba de ajuste a modelos de evolución neutra (análisis Ka/Ks) (**Figura 28**).

Tal como era de esperarse, la mayoría de los polimorfismos encontrados a lo largo de las secuencias aminoacídicas correspondieron a mutaciones sinónimas que generan un balance mutacional negativo. No obstante, en el caso de las tres enzimas NAD(P)H-dependientes analizadas, se identificó en un reducido conjunto de poblaciones parasitarias secuencias con polimorfismos caracterizados por un equilibrio positivo. Esta tendencia fue especialmente notable en el caso de la enzima TcOYE.

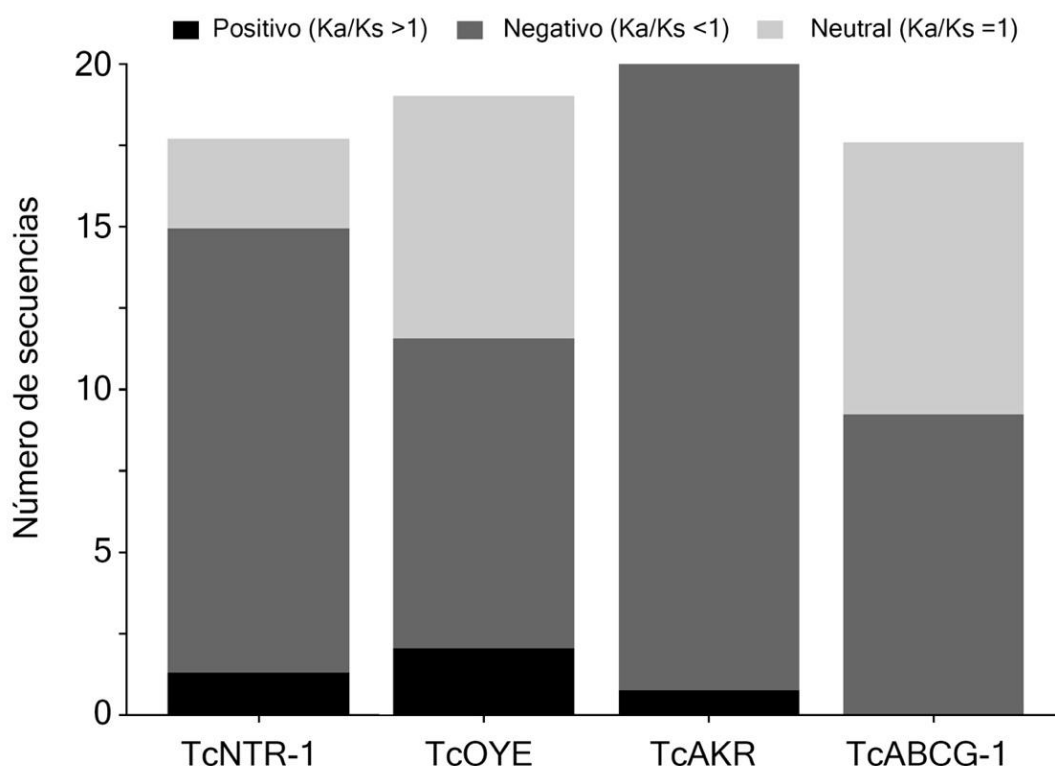


Figura 28. Proporción del equilibrio mutacional (K_a/K_s) obtenido en las secuencias aminoacídicas de las proteínas de *Trypanosoma cruzi* evaluadas.

Los resultados obtenidos en la caracterización del transportador TcABCG-1 mostraron un equilibrio de casi el 50% entre polimorfismos neutros y negativos, por lo tanto, dada la alta conservación de secuencia que presenta este transportador, no ha sido considerado en los análisis subsiguientes.

Al descomponer los resultados obtenidos de este análisis en tres complejos genéticos de *T. cruzi* medianamente relacionados entre sí (TcI, TcII/V/VI y TcIII/IV), fue posible observar que la mayor proporción de secuencias que presentaron selección positiva pertenecían al UDT I (85 secuencias), seguidas por secuencias de poblaciones del complejo TcII/V/VI (12 secuencias) y tan solo una sola secuencia

perteneciente al complejo TcII/IV (**Figura 29**). Adicionalmente a la proporción en el número de secuencias, se observó que aquellas pertenecientes a UDT I presentaron índices de Ka/Ks similares entre las secuencias aminoacídicas TcNTR-1 y TcOYE con una mediana de 1,51 [IQR=1,29 - 1,63], respecto a los valores obtenidos para el mismo UDT en la enzima TcAKR (1,13 [IQR=1,02 - 1,23]).

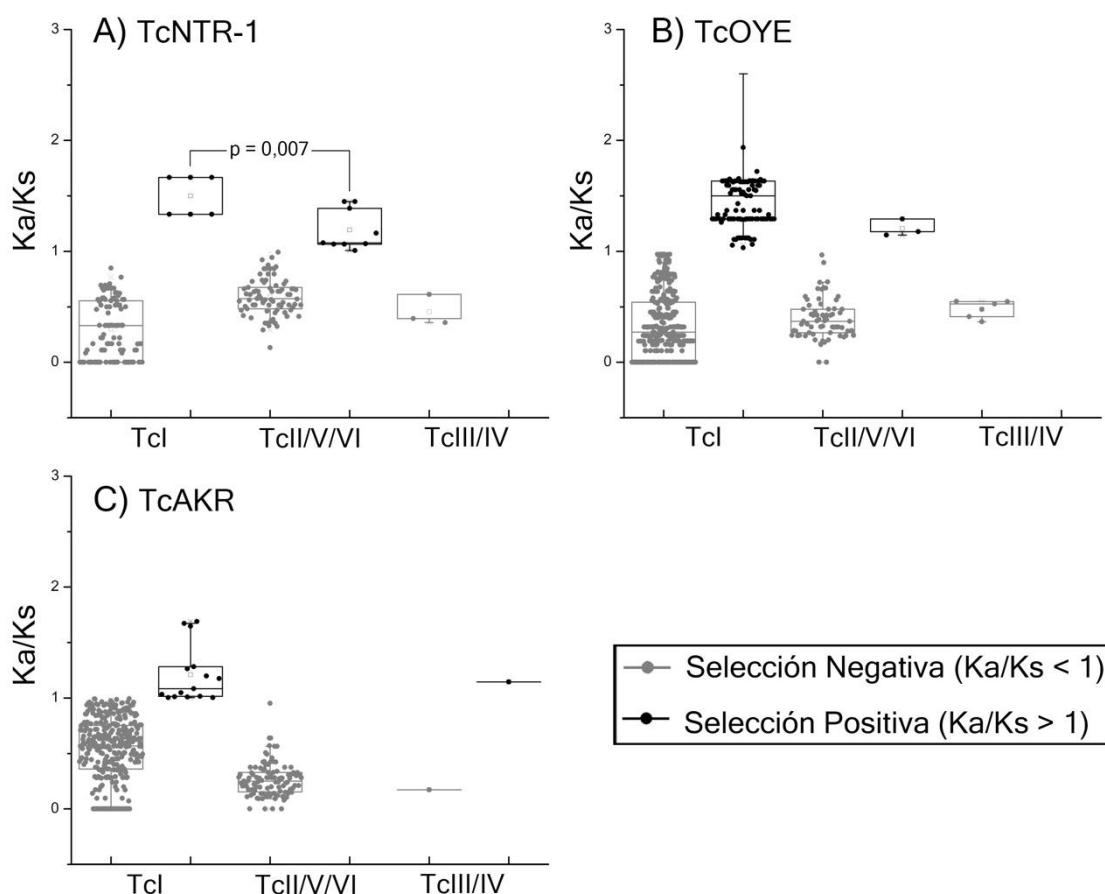


Figura 29. Análisis comparativo de la distribución del equilibrio mutacional (Ka/Ks) obtenido en las secuencias aminoacídicas de las proteínas de *Trypanosoma cruzi*, según la UDT.

4.4.- Polimorfismos proteicos y su asociación como biomarcadores de resistencia farmacológica.

Tomando en cuenta que la aplicación del análisis MLST como biomarcador de resistencia farmacológica no logró diferenciar de manera significativa entre poblaciones susceptibles y resistentes al BZN, decidimos enfocar el estudio a la correlación de los polimorfismos de aminoácidos encontrados en las secuencias de las enzimas NAD(P)H-dependientes TcNTR-1, TcOYE y TcAKR, con la finalidad de

poder establecer la existencia de un patrón de mutaciones que pudiesen estar asociados a mecanismos de susceptibilidad al BZN.

Para este propósito, se eligieron 19 cepas de *T. cruzi* que abarcaran diversas UDTs, de las cuales se disponía de la secuencia aminoacídica correspondiente a las enzimas TcNTR-1, TcOYE y TcAKR y se les hubiese medido su respuesta farmacológica al BZN *in-vitro* (valor de IC₅₀). Posteriormente, para cada enzima realizamos un análisis multivariable de componentes principales (ACP), para evidenciar la posible correlación de los polimorfismos observables y la clasificación de susceptibilidad farmacológica (**Figura 30**).

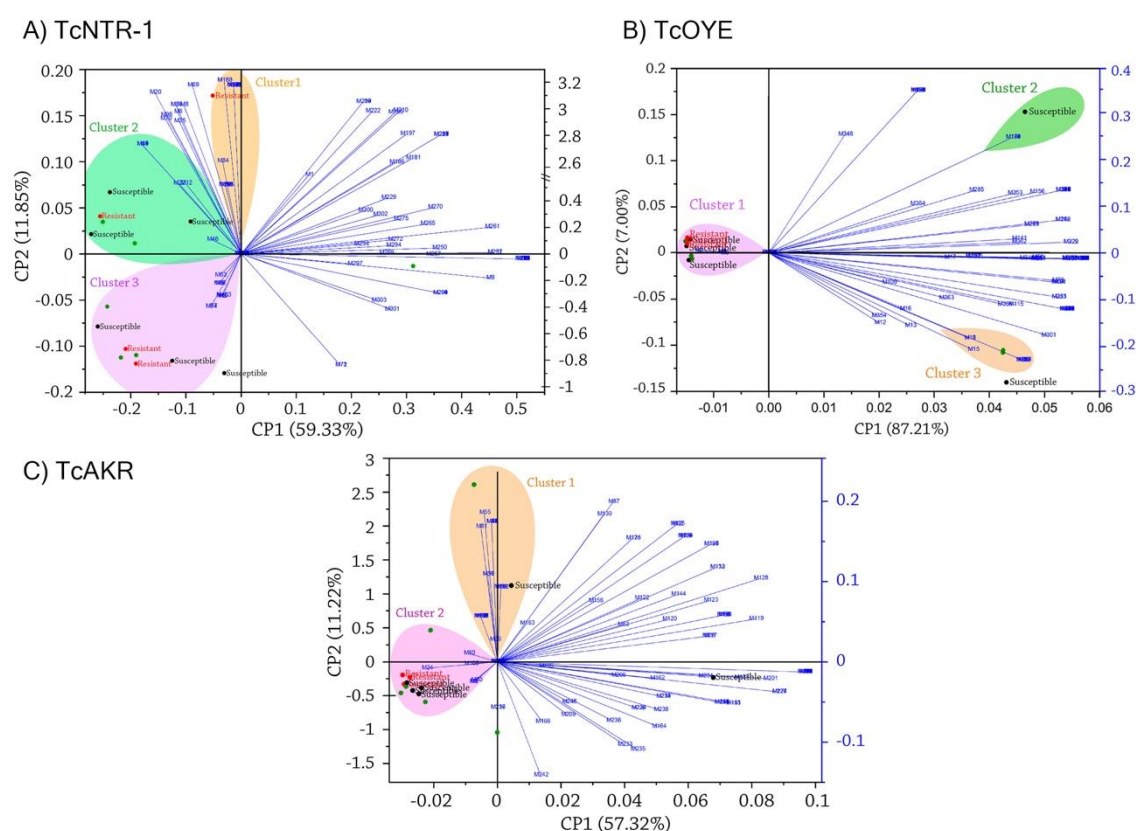


Figura 30. Gráfico de Análisis de Componentes Principales (PCA). Cada una de las líneas azules se corresponde con polimorfismos obtenidos para alguna de las tres enzimas NAD(P)H-dependientes. Los globos de colores, representan los agrupamientos de muestras con un valor asignado de susceptibilidad (puntos negros) o resistencia (puntos rojos), que presentan polimorfismos en común. Los ejes XY, representan el porcentaje de variabilidad explicada por las variables dentro del componente principal.

Los resultados derivados de este análisis multivariado inicial no revelaron una asociación definida entre los polimorfismos de aminoácidos correspondiente a las enzimas bajo estudio y la clasificación de susceptibilidad al BZN. En términos generales, más del 50% de la varianza en los datos utilizados no pudo ser explicada mediante correlaciones identificables. No obstante, en cada uno de los tres escenarios, ciertos polimorfismos demostraron tendencia a formar patrones de agrupación con cepas de *T. cruzi* clasificadas como resistentes o susceptibles al BZN. Por lo tanto, se decidió excluir del análisis aquellos polimorfismos que carecían de asociaciones significativas, seleccionando únicamente aquellos que exhibían agrupamientos con valores de susceptibilidad farmacológica. Estos últimos fueron sometidos a un nuevo análisis multivariado (**Figura 31**).

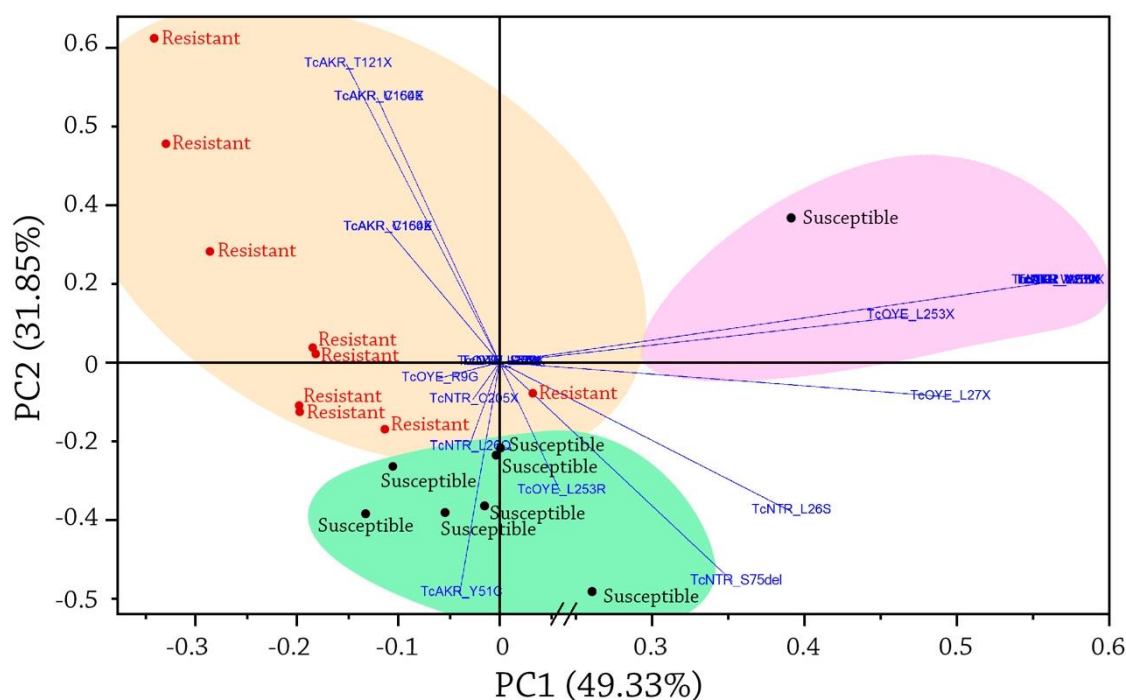


Figura 31. Gráfico de Análisis de Componentes Principales (PCA) depurado. Cada una de las líneas azules se corresponde con polimorfismo obtenido para alguna de las tres enzimas NAD(P)H-dependientes. Los globos de colores, representan los agrupamientos de muestras con un valor asignado de susceptibilidad (puntos negros) o resistencia (puntos rojos), que presentan polimorfismos en común. Los ejes XY, representan el porcentaje de variabilidad explicada por las variables dentro del componente principal.

Los resultados de este nuevo ACP, mostró asociación entre poblaciones parasitarias clasificadas como resistentes o susceptibles al BZN basado en sus valores de CI_{50} *in-vitro* y ciertos polimorfismos aminoacídicos. Se observa que la mayoría de los

polimorfismos que muestran tendencia a asociarse con parásitos resistentes (con valores de $CI_{50} > 30 \mu M$) corresponden a codones de detención de la traducción prematuros, independientemente de la secuencia proteica a la que pertenezca dicho polimorfismo. Por otra parte, los polimorfismos que tienden a asociarse con poblaciones de parásitos susceptibles a BZN consisten en mutaciones sinónimas o deleciones, como se evidencia en el caso del aminoácido Serina en la secuencia de la enzima TcNTR-1 (p.Ser75del). Los polimorfismos que se agruparon en la zona violeta de la **Figura 31**, fueron considerados como atípicos y no se consideraron para futuros análisis.

Finalmente, con los resultados de agrupamiento obtenidos se describió un perfil de polimorfismos que pueden estar relacionados con mecanismos de susceptibilidad farmacológica al BZN (**Tabla 11**).

Tabla 11. Perfil de polimorfismos de aminoácidos para explorar su potencial como biomarcador de resistencia/susceptibilidad farmacológica.

Proteína	Mutaciones con mayor frecuencia (cepas Susceptibles vs Resistentes)
TcNTR-1	p.Asp5*, p.Ile15Phefs*11, p.Trp18*, p.Leu26Ser, p.Leu26*, p.Ser24Asn, p.Leu72Pro, p.Leu72Ser, p.Leu72Tyr, p.Ser77del, p.Ser77_Leu78insSer, p.Ser77_Leu78insSerSer, p.Ser76*, p.Met85*, p.Pro232*, p.Trp239*, p.Met243*, p.Tyr284*
TcOYE	p.Leu13Try, p.Leu13*, p.Arg19Valfs*9, p.His106*, p.Arg169Glyfs*85, p.Ala187Valfs*67, p.Cys238Alafs*16, p.Glu361*
TcAKR	p.Tyr51*, p.Val75Ile, p.Val75*, p.Ser82*, p.Thr121*, p.Ile137*, p.Pro144*, p.Val160*, p.Trp188*, p.Asp195Tyr, p.Trp248*, p.Arg268*

4.5.- Evaluación *in-silico*, caracterización estructural, estudios de Dinámica Molecular y Docking de las variantes mutantes con mayor frecuencia de cada una de las enzimas NAD(P)H-dependientes de *Trypanosoma cruzi*, a fin de determinar posibles cambios en el sitio catalítico que expliquen diferencias funcionales en la respuesta farmacológica frente al fármaco Benznidazol.

Con el objetivo de determinar si los polimorfismos presentes en las secuencias aminoacídicas, identificados en las poblaciones naturales de *T. cruzi*, inducen cambios estructurales de relevancia en las enzimas de interés, se llevaron a cabo predicciones estructurales a partir de sus conformaciones nativas, mediante el algoritmo de Machine-Learnig AlphaFold.

Dado que solamente una de las tres enzimas NAD(P)H-dependientes ha sido cristalizada, la estructura tridimensional de estas proteínas aún no se conoce en profundidad. Por lo tanto, como primer paso, para las tres enzimas se realizaron predicciones sobre la secuencia nativa del clon SylvioX10/1 (perteneciente al UDT I y clasificado como susceptible a BZN). Esto se hizo con el propósito de establecer un patrón de comparación para las predicciones de estructura de las poblaciones naturales de *T. cruzi* obtenidas de muestras clínicas.

A fin de validar los resultados de la predicción estructural, cada uno de los resultados mostrados a continuación consistirá en:

- i. Un modelo estructural de la enzima, acompañado por un gráfico de cobertura de secuencia, un gráfico de IDDT (del inglés *Local Distance Difference Test*) y un diagrama de Ramachandran.
- ii. Un análisis comparativo de estructuras entre el modelo de referencia Susceptible a BZN, un modelo de referencia Resistente a BZN y 4 variantes caracterizadas a partir de poblaciones naturales de *T. cruzi* presentes en muestras clínicas.
- iii. Simulaciones de Dinámica Molecular (DM), con la finalidad de discernir el comportamiento de los átomos presentes en las enzimas dentro de un sistema biológico simulado, siendo una forma eficaz de comprender la relación dinámica entre la estructura y la función.

- iv. Finalmente, se mostrarán comparaciones de la interacción entre el cofactor FMN y los modelos de referencia Susceptible y Resistente a BZN, y las 4 variantes caracterizadas a partir de poblaciones naturales de *T. cruzi* presentes en muestras clínicas.

4.6.- Análisis estructural *in-silico* y Dinámica Molecular de variantes de la enzima Nitroreductasa de tipo 1 de *Trypanosoma cruzi* (TcNTR-1)

Los resultados comparativos para la predicción de la estructura secundaria de TcNTR-1 sugieren que es una proteína dividida en tres regiones distintas: los residuos 1 a 14 se predicen que llevan un péptido señal dirigido a la mitocondria, los residuos 37 a 76 corresponden a una región intrínsecamente desordenada (RID), y los residuos 78 en adelante se refieren al dominio catalítico (**Figura 31**).

En términos de estructura tridimensional, los modelos obtenidos muestran que TcNTR-1 está conformada por cinco láminas β paralelas y antiparalelas, y nueve α -hélices. En los 5 modelos predichos, la región α -hélice más larga fue de 36 residuos (Met1 a Gly36). Por otra parte, la región catalítica de la enzima, se encuentra ubicada entre las cinco láminas β y las cuatro α -hélices conformadas por los residuos 103-117, 133-144, 231-255 y 265-273 (**Figura 31C**).

En cuanto a la predicción de su estructura 3D, el grado de similitud de la secuencia de residuos de TcNTR-1 hacia el extremo N-terminal tanto en cobertura, como en los gráficos IDDT no son muy altos. Sin embargo, el sitio ortostérico correspondiente a la familia Nitro-FMN-Reductasa está muy bien conservado (**Figura 31 A y B**). El gráfico resultante de IDDT muestra de forma más exacta, la presencia de la región desordenada entre los residuos 37 a 76 predicha en los análisis 2D. Esta región de aminoácidos, se caracteriza por no tener homología alguna con secuencias de residuos caracterizados en las bases de datos de proteínas, por lo tanto, los resultados de predicción son poco confiables (al menos en esa región). Por su parte, la región C-terminal, obtuvo puntuaciones IDDT más altas entre los 5 mejores modelos predichos, lo que indica una homología de secuencia considerable en el modelado de la región.

Finalmente, las estructuras fueron validadas de forma global mediante gráficos de Ramachandran, el cual se utiliza como indicador de posibles errores en el modelo,

revelando conformaciones estructurales estables basado en la búsqueda de contactos cercanos entre átomos.

Después de varios ciclos de minimización de energía, el 98.3% y el 98.6% de los ángulos diédricos φ y ψ del esqueleto de la proteína ocuparon las regiones permitidas de los gráficos de Ramachandran, mientras que aproximadamente el 1% ocuparon las regiones no permitidas, es decir, aquellas regiones que implican impedimento estérico entre el grupo metileno C-beta de la cadena lateral y los átomos de la cadena principal. Sin embargo, este porcentaje de residuos no forman parte de las regiones del sitio activo (**Figura 31D**). Estos porcentajes, junto con la ausencia de choques y anomalías en las longitudes y ángulos de enlace, destacan la precisión de las proteínas modeladas.

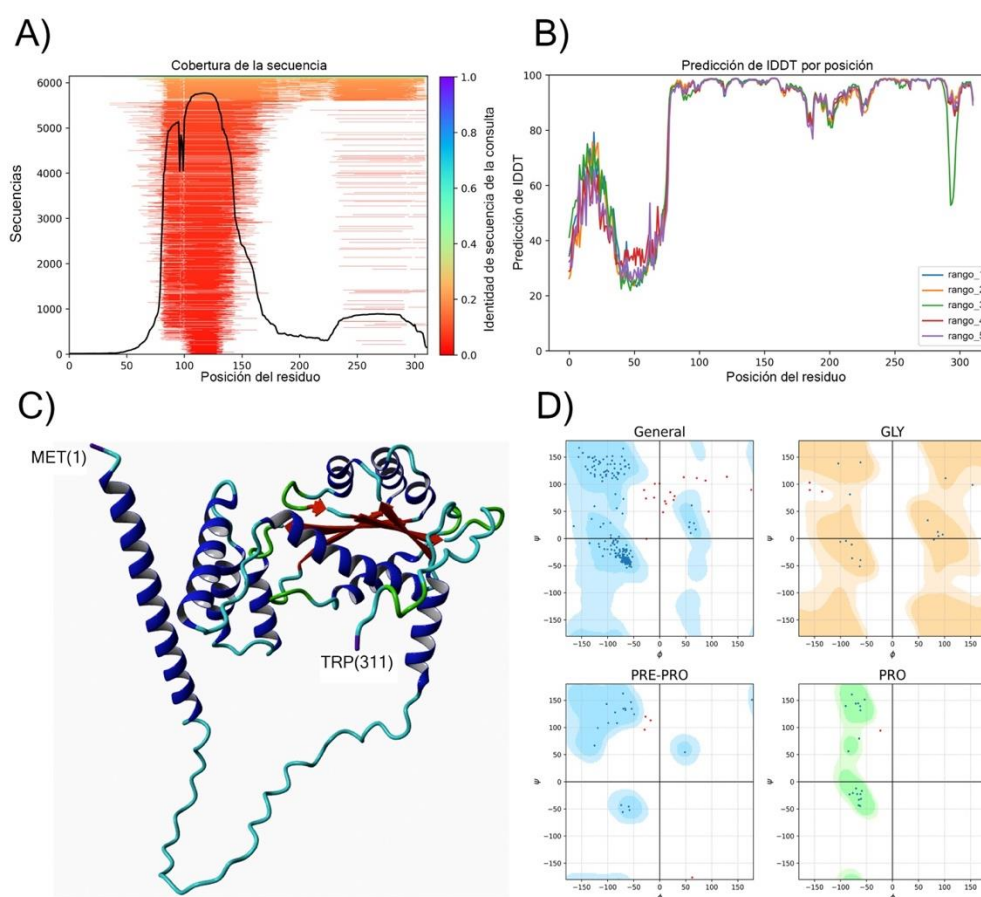


Figura31. Métricas de confianza para la predicción de la estructura de TcNTR-1 en su conformación silvestre (Wild-Type). **(A)** Cobertura de secuencia de MSA, que representa el número de secuencias alineadas en cada posición. Las secuencias más similares se presentan de color azul y están más cerca de la parte superior. La línea negra representa el número de coincidencias con la consulta en un residuo dado. **(B)** Puntuación de la prueba de diferencia de distancia local (LDDT) predicha por superposición de los cinco modelos generados por AlphaFold2. La posición de los aminoácidos se representa en función del LDDT predicho. Los valores entre 70-90 indican una predicción confiable de la cadena principal de la proteína. Los valores de pLDDT superiores a 90 indican una precisión

muy alta, equivalente a estructuras determinadas por experimentos. Los valores entre 50-70 indican una precisión más baja, pero es probable que las predicciones de las estructuras secundarias individuales sean correctas. (C) Modelado 3D de la estructura de TcNTR_1 (Wild-Type); (D) Gráfico de Ramachandran de la estructura predicha con mejor score.

La **Figura 32** muestra el modelo de referencia susceptible y resistente a BZN de TcNTR, alineado con las predicciones de 4 variantes enzimáticas caracterizadas en poblaciones naturales de *T. cruzi* obtenidas de muestras clínicas. El alineamiento se realizó con el programa UCSF Chimera utilizando la herramienta MatchMaker. Los resultados obtenidos, muestran que el alineamiento de estructuras presenta un 98% de homología en la región donde se encuentran ubicadas las cinco conformaciones láminas β y las cuatro α -hélices que constituyen la zona catalítica de la enzima, con un TM-score medio igual a 0,91 (rango: 0,90–0,95).

Desde el residuo Met1 hasta la Ser76 fue posible observar que ninguna de las estructuras modeladas presenta homología con la predicción obtenida para la conformación susceptible a BZN, hecho causado muy probablemente por la presencia de la región intrínsecamente desordenadas (RID) que se ubica desde el residuo Arg37 hasta la Ser76, el cual le aporta a la estructura modelada plasticidad conformacional en el extremo N-terminal. Sin embargo, en líneas generales, se puede asumir que existe consenso estructural en gran parte de la estructura en la estructura.

De manera notable, en la predicción realizada sobre la secuencia TcNTR-1, derivada de poblaciones naturales de *T. cruzi* presentes en la muestra de seguimiento del paciente EChO_1601 transcurrido un año del tratamiento etiológico, se evidencia la ausencia de modelado de las α -hélices características en la región que abarca desde el residuo Met1 hasta el Arg8, pudiendo afectar el dominio estructural del péptido señal predicho en la región del N-terminal de la enzima. Al comparar la secuencia aminoacídica de esta muestra de pacientes respecto a la secuencia de la cepa de referencia susceptible, se puede observar el polimorfismo TcNTR-1_p.Lys2Arg.

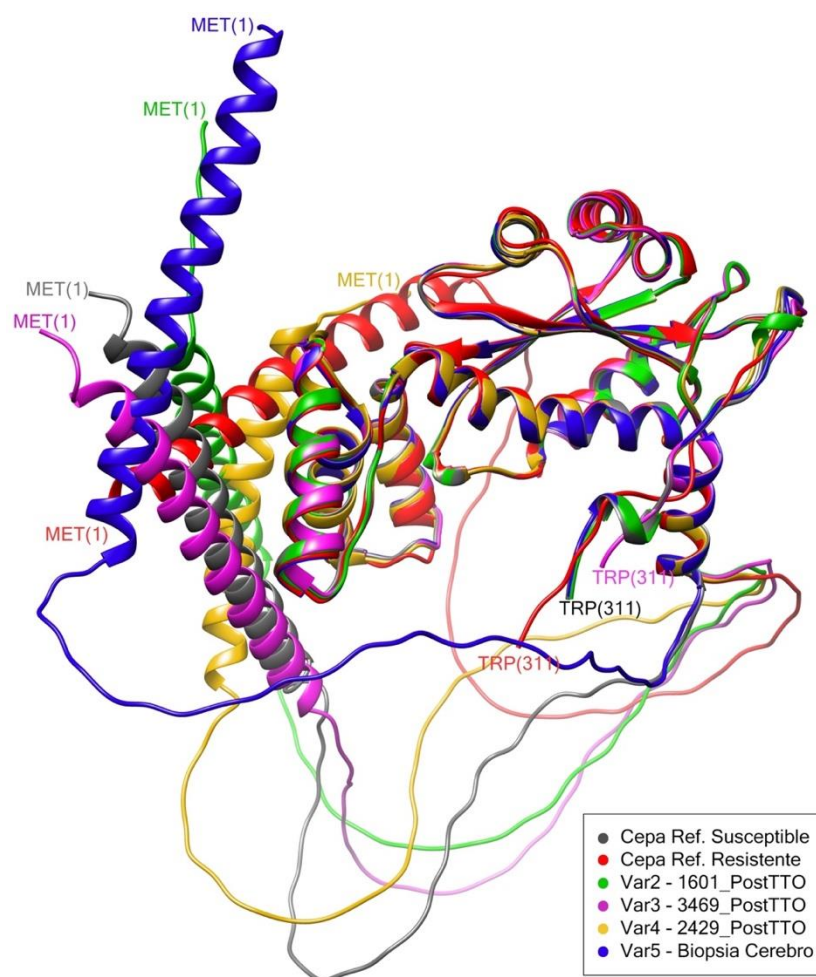


Figura 32. Superposición de las predicciones de TcNTR-1 obtenidos a partir de poblaciones parasitarias presentes en muestras clínicas. Las predicciones y modelados 3D se generaron mediante el algoritmo AlphaFold2 y la estructura predicha de la conformación Wild-Type del clon SylvioX10/1 (Tcl) se utilizó como molde para la comparación.

Para explorar el comportamiento estructural y funcional de las variables mutantes encontradas en las poblaciones naturales de *T. cruzi*, se realizaron estudios de simulaciones de dinámica molecular (DM). A partir de una simulación de DM de 500ms, se analizaron los archivos de trayectoria para evaluar el impacto estructural mediante la Fluctuación Cuadrática Media por Residuo (del inglés RMSF), la desviación cuadrática media (del inglés RMSD), y movimiento general mediante APC.

La **Figura 33A** presenta el gráfico de RMSF de los átomos de C α , que caracteriza el comportamiento dinámico de los residuos y la flexibilidad de la enzima TcNTR-1. El gráfico muestra la estabilidad de los átomos de C-alfa y los residuos en la predicción de la estructura en la cepa susceptible a BZN (línea punteada negra), contrastando

con la mayor flexibilidad observada en la estructura de la cepa resistente a BZN y las variantes polimórficas presentes en las poblaciones naturales de *T. cruzi*, evidenciado por los picos elevados en múltiples posiciones a lo largo de la secuencia. Por su parte, el RMSD midió la convergencia de la proteína en el sistema dinámico utilizando los átomos del esqueleto de la estructura predicha. En la **Figura 33B** se comparó el gráfico de RMSD de la estructura perteneciente a la cepa susceptible a BZN, con las cinco variantes polimórficas descritas anteriormente. El RMSD de la estructura “susceptible a BZN”, representada como una línea punteada negra, muestra una trayectoria estable a lo largo del tiempo de medición. Por el contrario, las trayectorias de RMSD para las variantes polimórficas de TcNTR-1, mostraron una mayor desviación respecto a la estructura parental (Cepa susceptible a BZN). Las mayores desviaciones en la trayectoria de RMSD, se pudieron observar en las muestras obtenidas de los pacientes EChO_2426_PostTTO y EChO_2429_PostTTO. Por último, se realizó un análisis de dinámica esencial o análisis de componentes principales (ACP), con la finalidad de obtener una visión más amplia de las propiedades dinámicas con respecto a los resultados de la simulación de MD. El análisis de comparación se realizó mediante la proyección de los vectores para la enzima de la cepa de referencia susceptible y resistente a BZN y las cuatro variantes polimórficas de las poblaciones naturales de *T. cruzi* (**Figura 33 C, D y E**). La proyección de los vectores pertenecientes a la cepa susceptible y resistente a BZN, así como los obtenidos de las variantes polimórficas presentes en los pacientes EChO_1601 y EChO_3469, mostraron perfiles similares, demostrando estabilidad estructural sin importar la configuración espacial en que se encuentre. Sin embargo, se pudo observar un patrón diferente en las variantes polimórficas presentes en las poblaciones de *T. cruzi* en los pacientes EChO_2426 y EChO_2429 (**Figura 33 C, D y E**, respectivamente). En el primero de los casos, la proyección de la variante polimórfica presentó una mayor flexibilidad en los átomos de C-alfa en comparación con la predicción estructural de la cepa de referencia susceptible hacia el extremo C-terminal. Respecto a la variante polimórfica presente en el paciente EChO_2429, la proyección demostró un perfil altamente expandido y también en la dirección opuesta en comparación con la estructura de referencia susceptible a BZN, mostrando un cambio significativo en el movimiento general de la variante TcNTR-1.

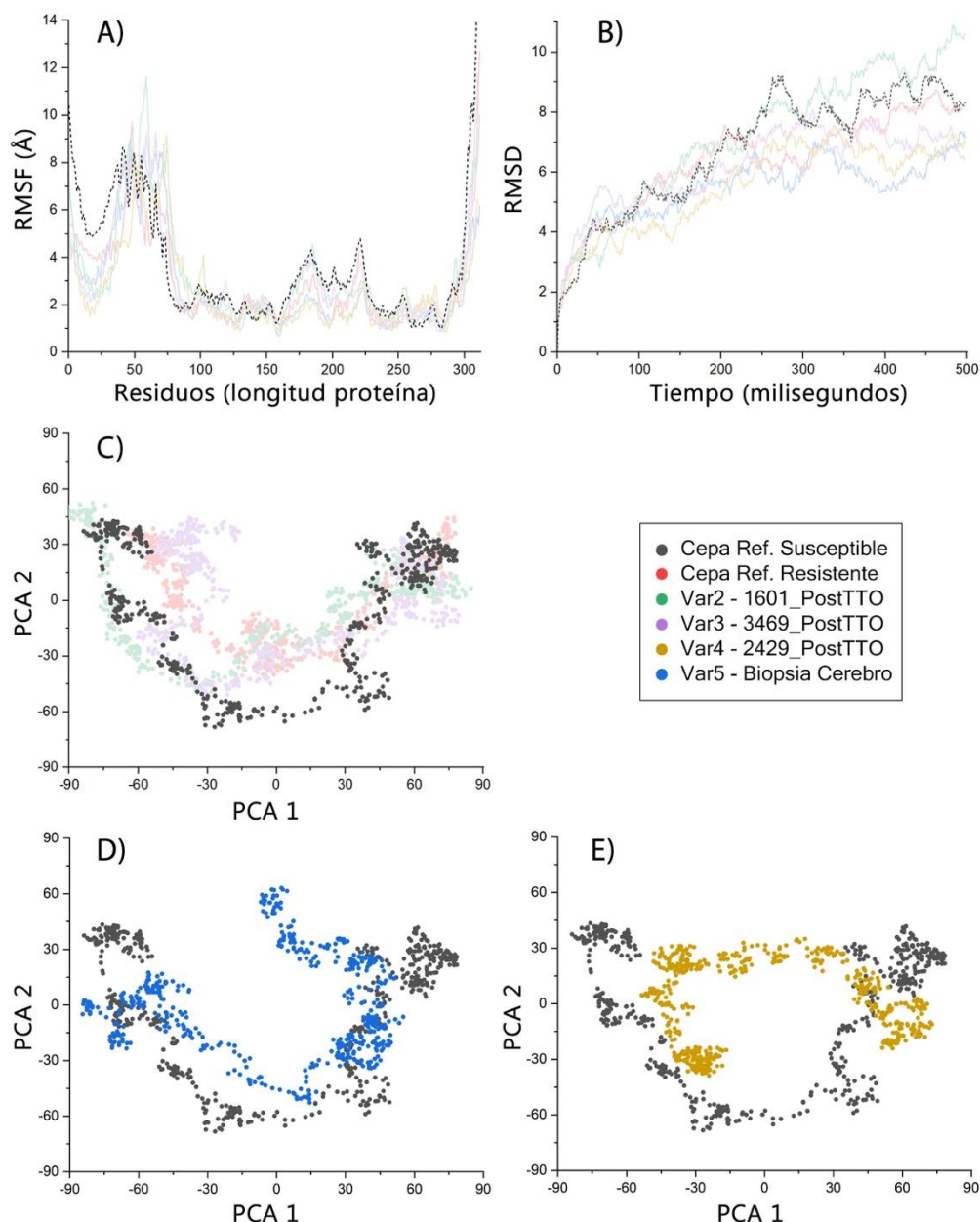


Figura33. Simulaciones de dinámica molecular de las estructuras tridimensionales predichas de TcNTR-1. **(A)** Gráfico de fluctuación cuadrática media por residuo (RMSF) que representa la simulación durante 500 ms de las conformaciones aminoacídicas de la estructura Wild-Type y mutantes. **(B)** Comparación de los gráficos de desviación cuadrática media (RMSD) de la secuencia aminoacídica de las variantes mutantes TcNTR-1 con respecto a la conformación Wild-Type durante el curso de la simulación (500 ms). **(C)** Gráfico de análisis de componentes principales en átomos de Cα en el espacio conformacional a 300 K de temperatura. Los cambios estructurales de la conformación Wild-Type siempre se presenta como líneas punteadas o puntos de color gris oscuro.

Con el objeto de llevar a cabo un enfoque *in-silico*, para evaluar si las variantes polimórficas caracterizadas en las poblaciones naturales de *T. cruzi* podrían afectar la funcionalidad de la enzima TcNTR-1 y favorecer la resistencia del parásito a los compuestos nitro-heterocíclicos (afectando la activación del fármaco), realizamos

análisis de Docking molecular entre las estructuras predichas por el algoritmo de machine-learning AlphaFold y el cofactor FMN (**Figura 34**). Para ello, el primer pase fue detectar los posibles bolsillos de unión al cofactor mediante el algoritmo DoGSite3.1. Este algoritmo, calcula las propiedades globales que describen tamaño, forma y características químicas de todos los posibles bolsillos de unión dentro de la estructura modelada. Una vez seleccionado el bolsillo de unión con el mejor puntaje, se procedió a realizar el análisis de interacción con el cofactor FMN mediante el software CB-Dock2, seleccionando la predicción que pudiese generar el contacto con residuos más estable y por ende con el menor puntaje Vina (kcal/mol). Dado a que la enzima no se encuentra cristalizada y no existen estudios de interacción con el cofactor FMN, los residuos de interacción obtenidos en los análisis de Docking fueron comparados con lo predicho en la base de datos de Dominios Conservados (CDD) del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>). Esta base de datos, utiliza información de estructura 3D para definir explícitamente los límites de los dominios y proporciona información sobre las relaciones secuencia/estructura/función, así como modelos de dominio importados de varias bases de datos externas (Pfam, SMART, COG, PRK, TIGRFAMs). Los resultados obtenidos para la cepa de referencia susceptible a BZN, mostró que la interacción de la FMN y la estructura de la enzima TcNTR-1 ocurre mediante enlaces de hidrógeno con los residuos Gly263 y el Gln147 con los átomos O4 y N3 del anillo de isoaloxazina, respectivamente. Por otra parte, el átomo O12 de la región central hidroxilada interacciona con el residuo Lys94, mientras que la cola del grupo prostético es estabilizada mediante los átomos O16 y O17 con los residuos Arg91, Ser92, a través de enlaces de hidrógeno (**Figura 34C**). Posteriormente, decidimos comparar la interacción del cofactor FMN con las predicciones de las 4 variantes enzimáticas caracterizadas en poblaciones naturales de *T. cruzi* obtenidas de muestras clínicas (**Figura 34**).

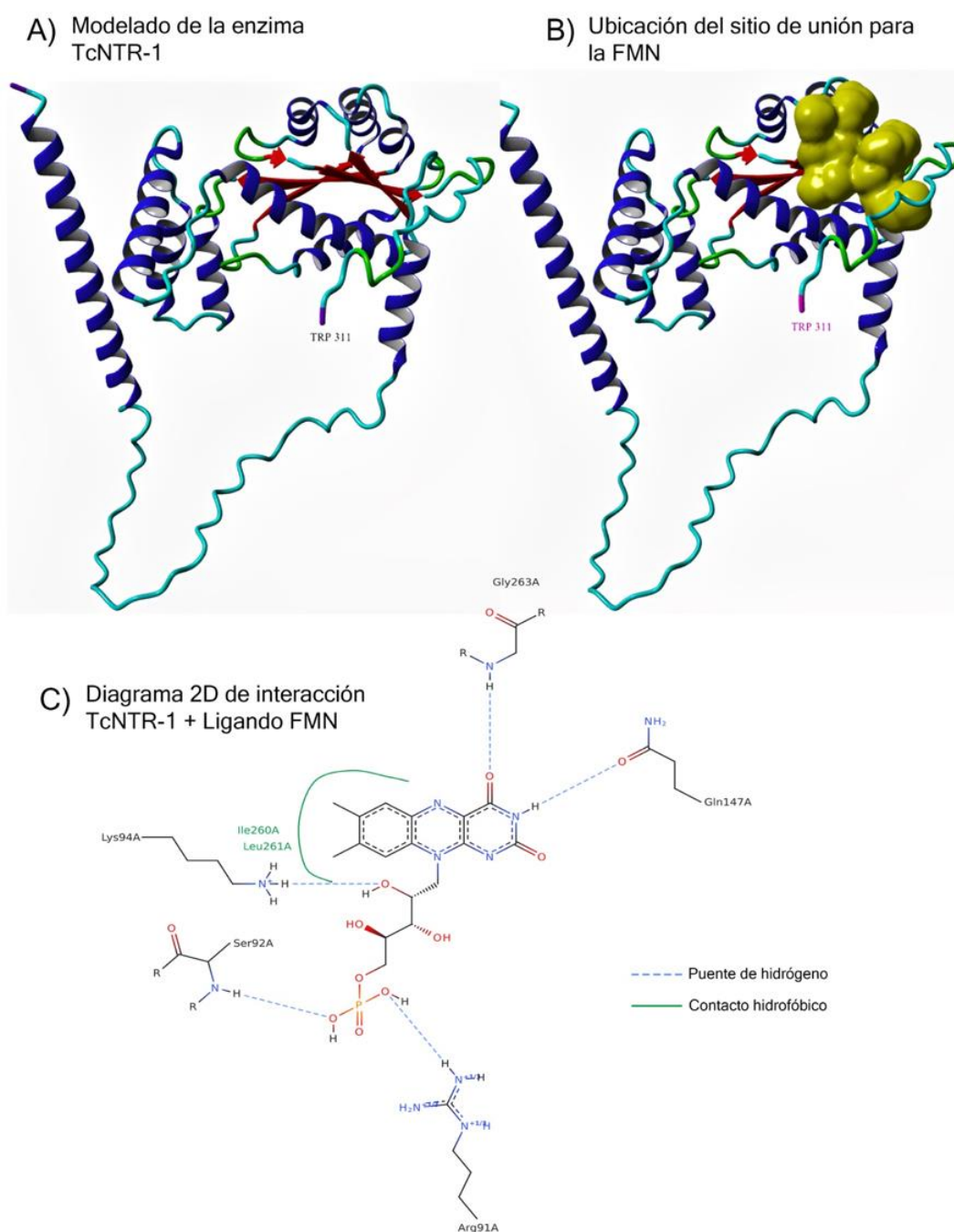


Figura 34. Visualización del docking molecular entre la estructura Wild-Type de la enzima TcNTR-1 y el cofactor Flavin-Mononucleotido (FMN). (A) Representación 3D de la estructura 3D de TcNTR-1 de la cepa SylvioX10/1 (TcI). (B) Representación gráfica del bolsillo de interacción predicho por el software DoGSite3.1; (C) Diagrama de interacción 2D entre la FMN y el bolsillo presente en TcNTR-1 generado por el software PoseEdit (Diedrich y col., 2023).

Los resultados obtenidos del análisis de Docking en las variantes enzimáticas, mostraron que tanto la cepa de referencia Resistente a BZN como las 4 predicciones de estructura obtenidas de poblaciones naturales de *T. cruzi* presentan una interacción con la FMN totalmente diferente a la descrita con anterioridad. En general, las variantes enzimáticas presentaron interacción dentro del mismo bolsillo de unión predicho por el software DoGSite3.1. Sin embargo, la posición en que la FMN se ubica dentro del bolsillo es totalmente diferente y los principales residuos de interacción (Arg93, Arg97, Lus96 y Ser299), pueden ofrecer diversos tipos de interacción química con la FMN. En especial, la variante enzimática obtenida de las poblaciones parasitarias Post-TTO del paciente 3469 presentó una interacción entre los residuos y la FMN totalmente diferente a las otras variantes caracterizadas, donde el anillo de isoaloxazina parece apilarse generando enlaces pi-pi con el residuo Arg93 (**Figura 35**).

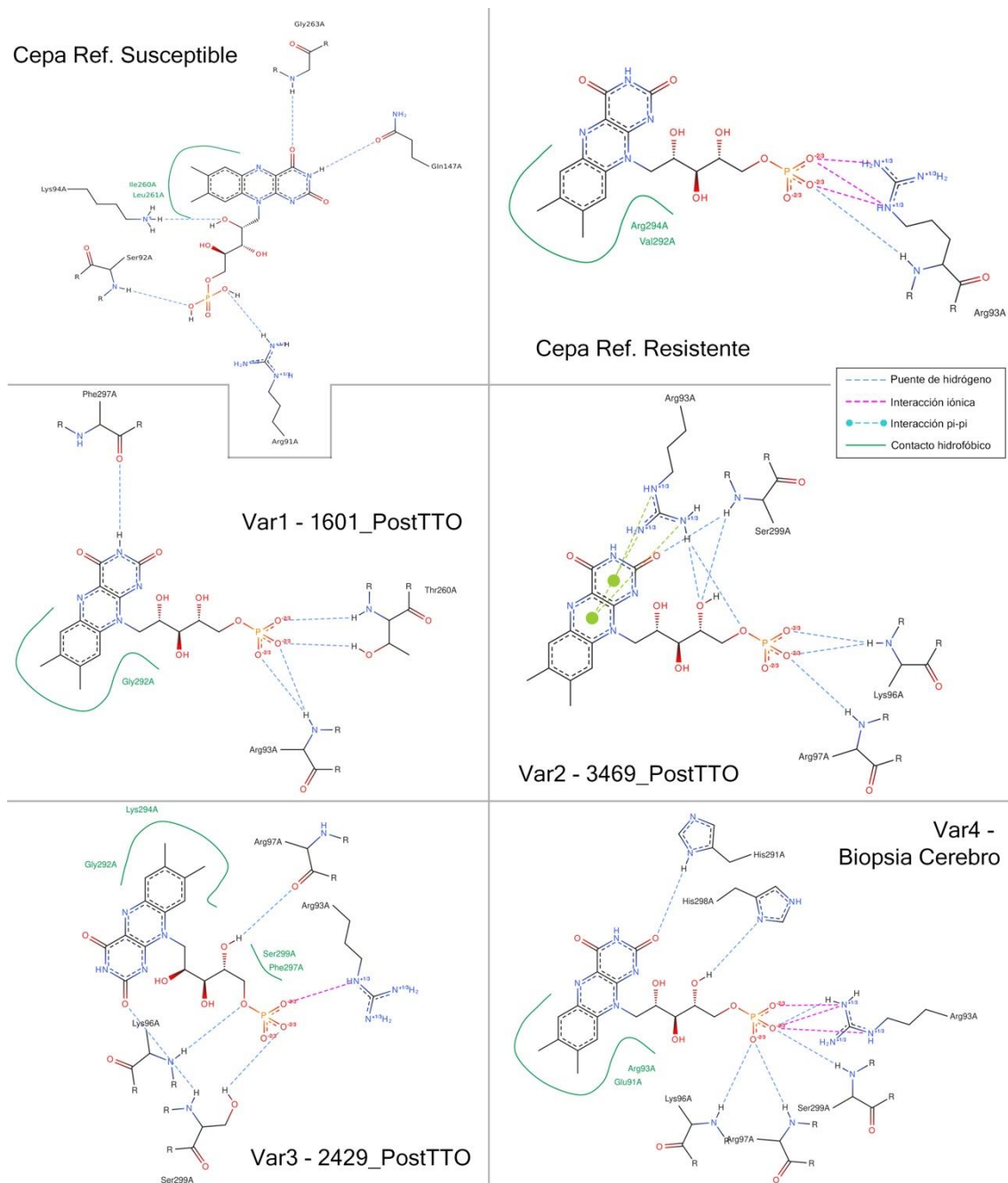


Figura 35. Diagramas de interacción 2D entre la FMN y el bolsillo presente en las diferentes variantes mutantes de TcNTR-1. Los diagramas fueron generados mediante el software PoseEdit (Diedrich y col., 2023).

4.7.-. Análisis estructural *in-silico* y Dinámica Molecular de variantes de la enzima Prostaglandina F₂ α sintasa de *Trypanosoma cruzi* (TcOYE)

Los resultados obtenidos para la predicción de la estructura de TcOYE, basados en la estructura cristalográfica realizada por Murakami y col. (2013) y las OYEs caracterizadas estructuralmente en las especies *Solanum lycopersicum* (PDB: 1ICP), *Shewanella oneidensis* (PDB: 2GOU) y *Burkholderia pseudomallei* (PDB: 3GKA), sugieren que es una proteína dividida en regiones claramente diferenciadas. TcOYE muestra un plegamiento en forma de barril (α/β)₈ con un grupo prostético FMN ubicado en la cavidad central del sitio activo (**Figura 36C**). Adicionalmente, se pueden definir una horquilla- β N-terminal (residuos 10–19) que cierra la parte inferior del barril, un subdominio “capping” (105–164), que participa en la formación del bolsillo del sitio activo, un motivo α -helicoidal (196–222) relacionado con el reconocimiento del sustrato, y finalmente, una hélice interna (336–341) que contribuye a la unión de la FMN.

En cuanto al grado de similitud de la predicción realizada por Alpha-Fold (**Figura 36A**), como el los gráficos IDDT (**Figura 36B**), se evidencia una alta confianza en los valores de predicción estructural, tanto en los extremos N y C-terminal como en las regiones catalíticas, revelando una arquitectura estructural muy conservada. Finalmente, el modelo final de la predicción estructural de TcOYE mostró una excelente estereoquímica general con la mayoría de los residuos (96.5%) situados en regiones favorecidas del gráfico de Ramachandran (**Figura 36D**).

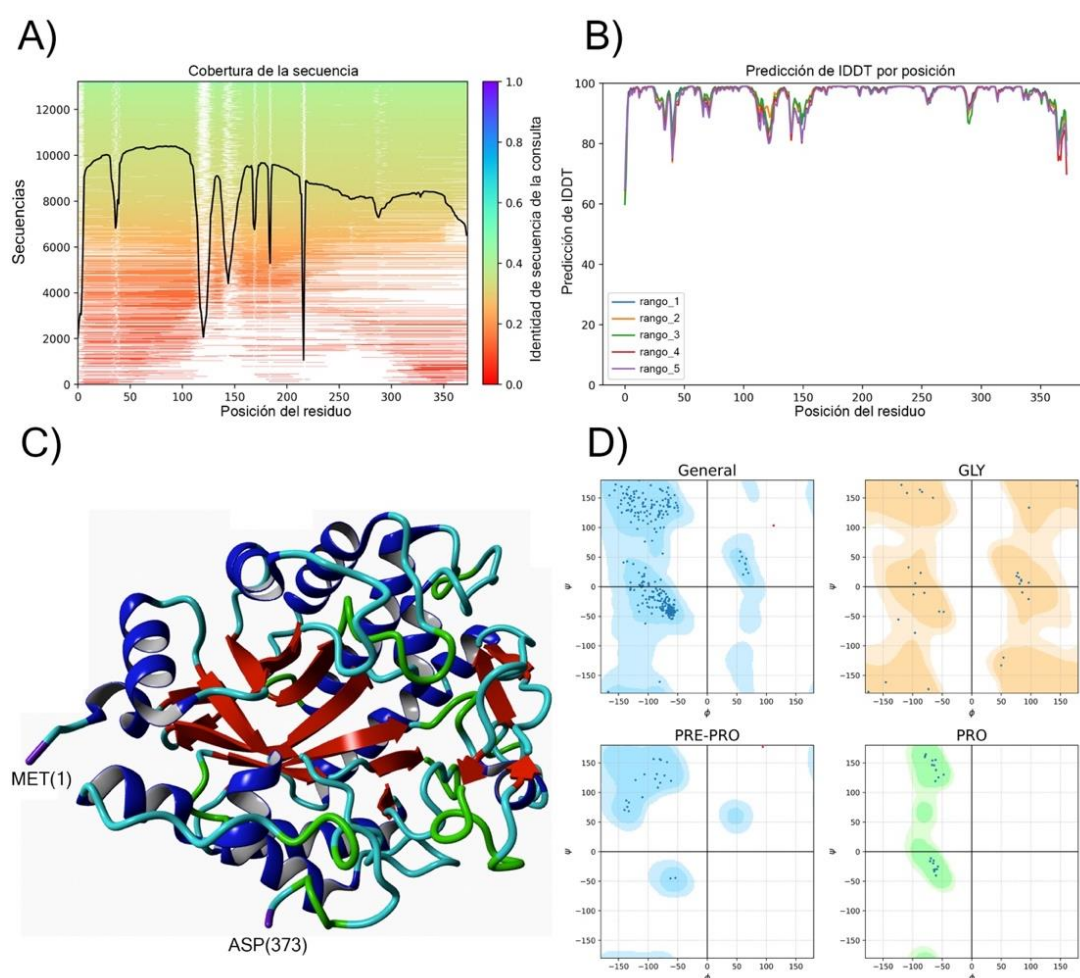


Figura 36. Métricas de confianza para la predicción de la estructura de TcOYE en su conformación Wild-Type. (A) Cobertura de secuencia de MSA, que representa el número de secuencias alineadas en cada posición. Las secuencias más similares se presentan de color azul y están más cerca de la parte superior. La línea negra representa el número de coincidencias con la consulta en un residuo dado. (B) Puntuación de la prueba de diferencia de distancia local (LDDT) predicha por superposición de los cinco modelos generados por AlphaFold2. La posición de los aminoácidos se representa en función del LDDT predicho. Los valores entre 70-90 indican una predicción confiable de la cadena principal de la proteína. Los valores de pLDDT superiores a 90 indican una precisión muy alta, equivalente a estructuras determinadas por experimentos. Los valores entre 50-70 indican una precisión más baja, pero es probable que las predicciones de las estructuras secundarias individuales sean correctas. (C) Modelado 3D de la estructura de TcOYE (Wild-Type); (D) Gráfico de Ramachandran de la estructura predicha con mejor score.

El análisis comparativo realizado con el software UCSF Chimera, entre las predicciones de los modelos de referencia susceptible y resistente a BZN junto a las 4 variantes enzimáticas de TcOYE caracterizadas en poblaciones naturales de *T. cruzi* obtenidas de muestras clínicas, es mostrado en la **Figura 37**. Los resultados muestran una alta precisión a nivel estructural, con un TM-score medio igual a 0,95 (rango: 0,94–0,95). Todos los residuos catalíticamente relevantes y el sitio de unión

del grupo prostético están completamente conservados, siendo las regiones más divergentes los extremos N (residuos 2-11) y C-terminal (residuos 363-372) presentando variabilidad en la composición de residuos.

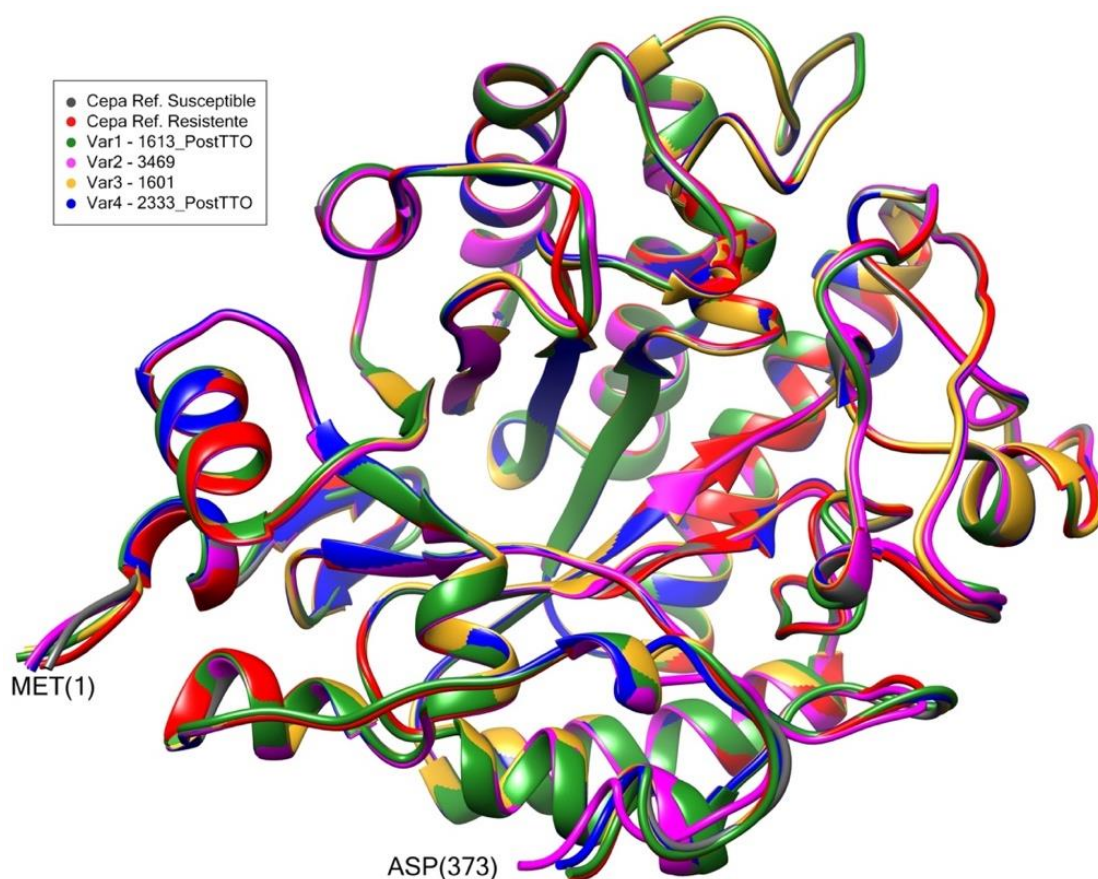


Figura 37. Superposición de las predicciones de TcOYE obtenidas a partir de poblaciones parasitarias presentes en muestras clínicas. Las predicciones y modelados 3D se generaron mediante el algoritmo AlphaFold2, y la estructura predicha de la conformación Wild-Type del clon Sylvio X10/1 (TcI) se utilizó como molde para la comparación.

Explorando las simulaciones de Dinámica Molecular, el gráfico de RMSF (**Figura 38A**), mostró estabilidad en los átomos de C-alfa y los residuos para la estructura predicha en la cepa susceptible a BZN (línea punteada negra). Sin embargo, se puede observar flexibilidad estructural en la variante 4 (muestra Post-TTO del paciente 1613), evidenciada por un pico elevado alrededor del residuo 150. Esta variabilidad en la estructura puede verse favorecida por los polimorfismos Ala146Val, Ala149Gly y Ser151Arg presentes en la secuencia aminoacídica.

Por otra parte, el análisis de RMSD que mide la convergencia de la proteína en el sistema dinámico utilizando los átomos del esqueleto de la estructura predicha (**Figura 38B**). El RMSD de la predicción de la cepa susceptible a BZN (línea punteada negra), muestra una trayectoria estable a lo largo del tiempo de medición. Por el contrario, las trayectorias de RMSD para las variantes polimórficas de TcOYE, en específico la cepa de referencia resistente a BZN y las variantes 1 (1613_Post-TTO) y 4 (2333_Post-TTO), mostraron una mayor desviación respecto a la estructura de referencia susceptible, demostrando que, en situaciones de simulación, las estructuras predichas en estas poblaciones parasitarias tienen una vibración y movimiento diferente a la estructura de referencia susceptible.

Con el fin de obtener una visión más amplia de las propiedades dinámicas de las predicciones realizadas por el algoritmo Alpha-Fold, la proyección de los vectores APC (**Figura 38C, D y E**) mostraron perfiles similares, demostrando estabilidad estructural sin importar la configuración espacial en que se encuentren las predicciones estructurales Var2-3469_Post-TTO, Var3-1601_Post-TTO y Var4-2333_Post-TTO. Sin embargo, se pudo corroborar que tanto la estructura perteneciente a la cepa de referencia resistente como la Var1-1613_Post-TTO presentan un patrón de proyección diferente a la estructura parental. En ambos casos, las proyecciones muestran una mayor flexibilidad en los átomos de C-alfa en los extremos N-terminal. Respecto a la proyección de la cepa de referencia resistente (Colombiana), la región más divergente presenta una expansión en la dirección opuesta respecto a la estructura de referencia susceptible, lo cual podría afectar el volumen de los bolsillos de interacción y por ende la accesibilidad al sitio activo de la enzima (**Figura 38D**).

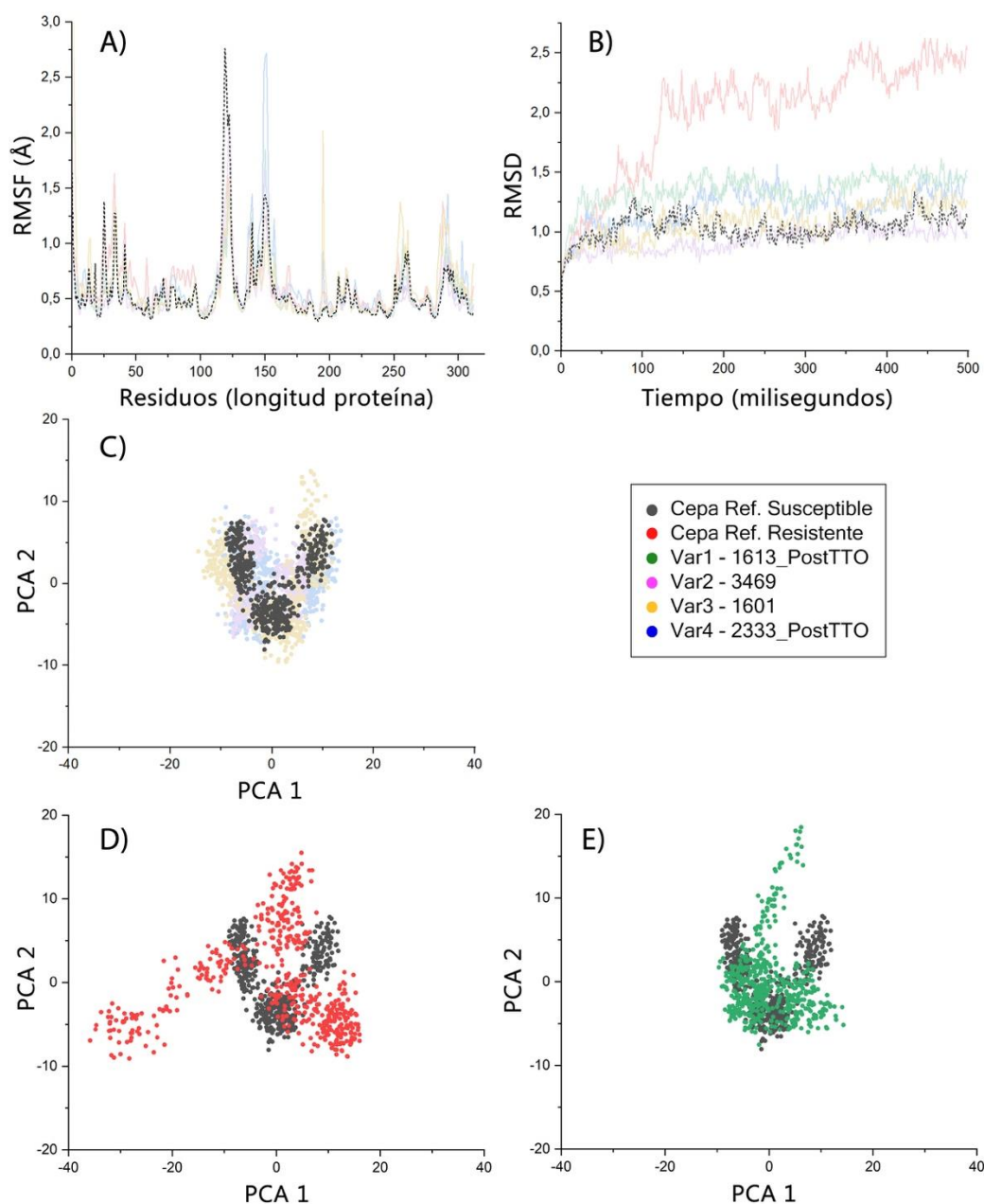


Figura 38. Simulaciones de dinámica molecular de las estructuras tridimensionales predichas de TcOYE. **(A)** Gráfico de fluctuación cuadrática media por residuo (RMSF) que representa la simulación durante 500 ms de las conformaciones aminoacídicas de la estructura Wild-Type y mutantes. **(B)** Comparación de los gráficos de desviación cuadrática media (RMSD) de la secuencia aminoacídica de las variantes mutantes TcOYE con respecto a la conformación Wild-Type durante el curso de la simulación (500 ms). **(C)** Gráfico de análisis de componentes principales en átomos de Cα en el espacio conformacional a 300 K de temperatura. Los cambios estructurales de la conformación Wild-Type siempre se presenta como líneas punteadas o puntos de color gris oscuro.

Finalmente, mediante los análisis de Docking molecular en la predicción estructural de la enzima TcOYE de la referencia susceptible, fue posible describir el modo de interacción con el grupo prostético FMN (**Figura 39**). En general, el análisis de Docking mostró que el anillo de isoaloxazina se aloja en un bolsillo hidrofóbico adyacente al subdominio de “capping”, compuesta por los residuos Leu27, Thr28, His195, Arg249, Gly363 y Tyr364. La estabilización del grupo prostético se logra con la interacción del átomo N5 del anillo de isoaloxazina mediante enlaces de hidrógeno con el residuo Thr28, mientras que el átomo O2 del anillo establece con la cadena laterales del residuo His195. Por su parte, la región medial hidroxilada está fuertemente unida al residuo Arg249. La región de la cola, que comprende el grupo fosforilo, está estabilizada por los residuos Gly336 y Ala337.

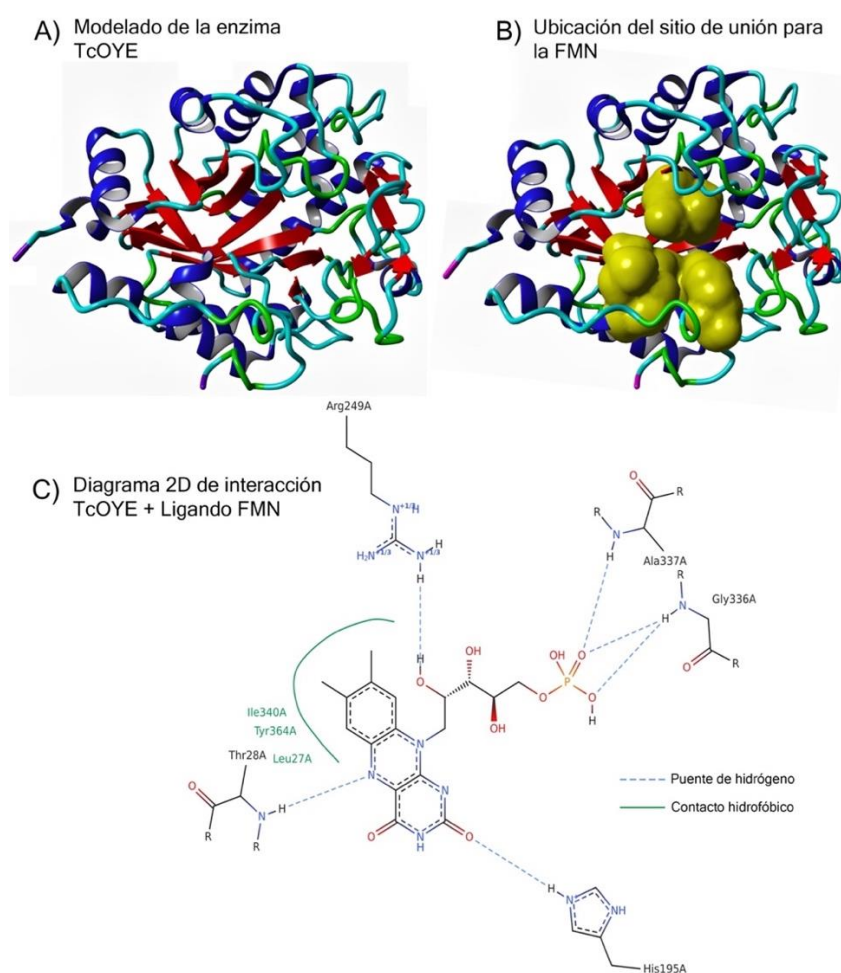


Figura 39. Visualización del docking molecular entre la estructura Wild-Type de la enzima TcOYE y el cofactor Flavin-Mononucleotido (FMN). (A) Representación 3D de la estructura 3D de TcOYE de la cepa Sylvio X10/1 (TcI). (B) Representación gráfica del bolsillo de interacción predicho por el software DoGSite3.1; (C) Diagrama de interacción 2D entre la FMN y el bolsillo presente en TcOYE generado por el software PoseEdit (Diedrich y col., 2023).

Los resultados obtenidos del análisis de docking en las variantes enzimáticas, mostraron que tanto la cepa de referencia Resistente a BZN como las 4 predicciones de estructura obtenidas de poblaciones naturales de *T. cruzi*, presentan similitudes en ciertos residuos de interacción con la FMN respecto a la descrita con la referencia susceptible (**Figura 40**). En general, se pudo evidenciar que el bolsillo de interacción parece ser similar entre todas las variantes, estando presentes al menos uno de residuos Leu27, Thr28, Ile340, Gly363 y Tyr364. Respecto a la estabilización del grupo prostético dentro del bolsillo de interacción, se puede apreciar que las únicas variantes que mantienen similitud en el residuo de interacción con el átomo de O2 del anillo de isoaloxazina son las Var1-1613_PostTTO y Var4-2333_PostTTO. Sin embargo, en estas variantes la posición e interacción del grupo prostético con el resto del bolsillo de interacción es totalmente diferente respecto a la estructura de referencia susceptible. Otro de los residuos de interacción que no presenta variabilidad entre las variantes obtenidas de las poblaciones naturales de *T. cruzi* y la estructura de referencia es la Ala337. Este residuo, se encontró interaccionando con el átomo O18 presente en la cola de la FMN en las 4 variantes obtenidas de muestras clínicas. Sin embargo, al igual que en la estabilización del anillo de isoaloxazina en las variantes 1613_PostTTO y 2333_PostTTO, la interacción del átomo O18 con el residuo Ala337 no garantizó que la interacción del grupo prostético con el resto del bolsillo de interacción fuese totalmente diferente a la estructura de referencia susceptible. Caso extremo, se ha evidenciado en la Var4-2333_PostTTO donde la interacción con la FMN se ha establecido con 9 residuos (Arg249, Thr28, Ala61, Gln103, Asn198, Gly36, Ala337, Arg315 y Leu314), comparado con los 5 residuos con los que interacciona el mismo grupo prostético con otra configuración estructural de la misma enzima (referencia susceptible).

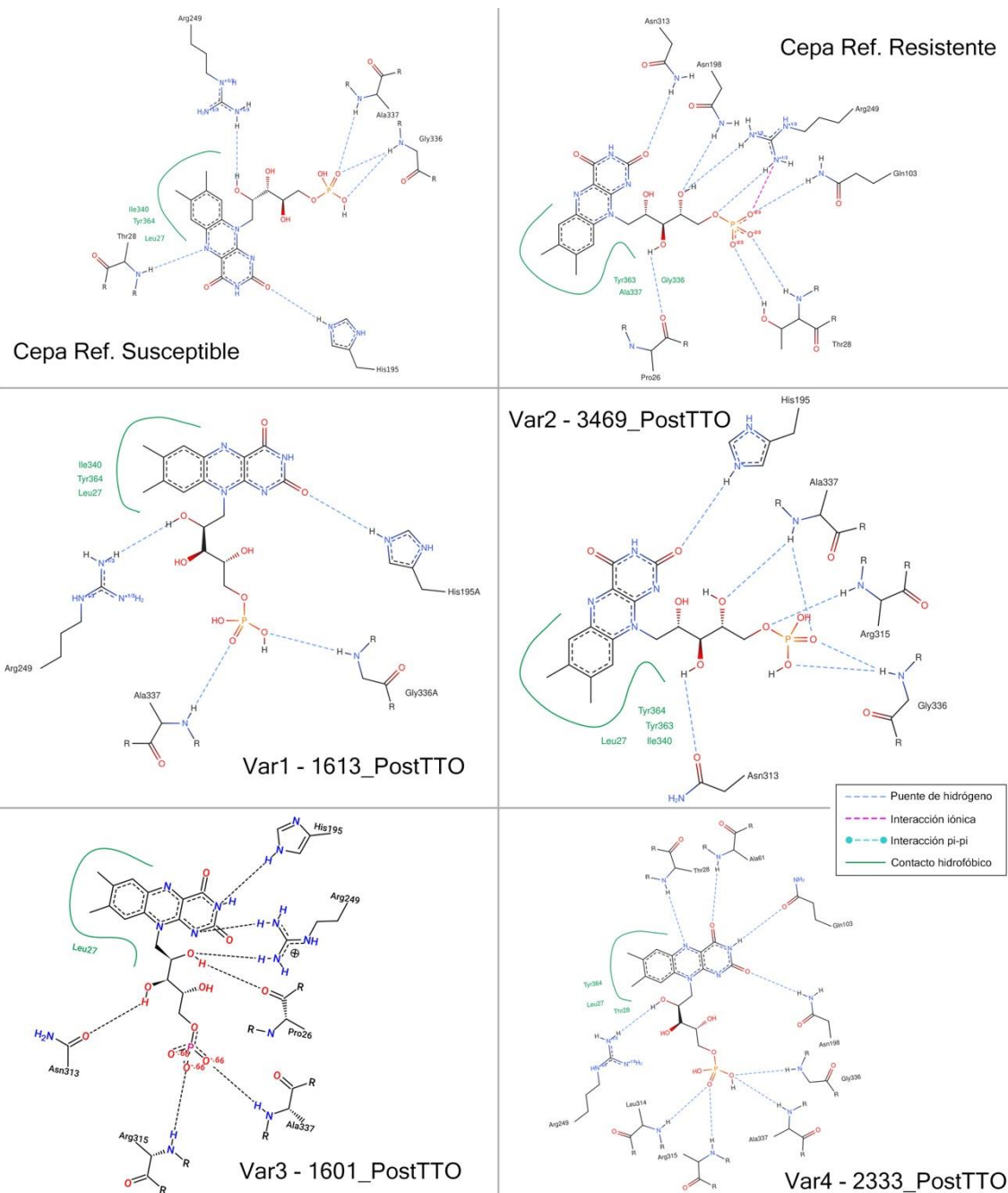


Figura 40. Diagramas de interacción 2D entre la FMN y el bolsillo presente en las diferentes variantes mutantes de TcOYE. Los diagramas fueron generados mediante el software PoseEdit (Diedrich y col., 2023).

4.8.- Análisis estructural *in-silico* y Dinámica Molecular de variantes de la enzima Aldo-keto reductasa de *Trypanosoma cruzi* (TcAKR)

La predicción de estructura realizada por el algoritmo de Machine-Learning de Alpha-Fold presentó un plegamiento que comprende un motivo de barril beta-10/alfa-10 paralelo $[(\alpha/\beta)_{10}]$, interrumpido por dos α -hélices en la cara C-terminal del barril (entre $\beta 7$ y $\alpha 7$ y después de $\alpha 8$, respectivamente), y un conjunto de ocho láminas β que cubre la cara N-terminal del barril "en forma de embudo", en la cual se ubica el sitio activo de la enzima (**Figura 41C**). Este sitio de unión a grupos prostéticos presenta un bolsillo grande, profundo y elíptico, donde la naturaleza hidrofóbica del bolsillo podría favorecer a sustratos aromáticos y apolares sobre aquellos altamente polares.

El grado de similitud en la predicción de la estructura, tanto en términos de cobertura (**Figura 41A**) como en los gráficos IDDT (**Figura 41B**), de los cinco mejores modelos predichos es alto. Esto se determinó utilizando como modelos de referencia estructuras de AKR pertenecientes a *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major*, *Bacillus subtilis*, *Rattus norvegicus* y *Homo sapiens*, entre otras. Sin embargo, se observa una disminución significativa en las puntuaciones de IDDT en los primeros residuos de la región N-terminal, la región del C-terminal y aproximadamente entre los residuos 180-200. Finalmente, la validación global de la predicción estructural final mediante gráficos de Ramachandran, reveló conformaciones estables con una valoración cercana al 94% (**Figura 41D**).

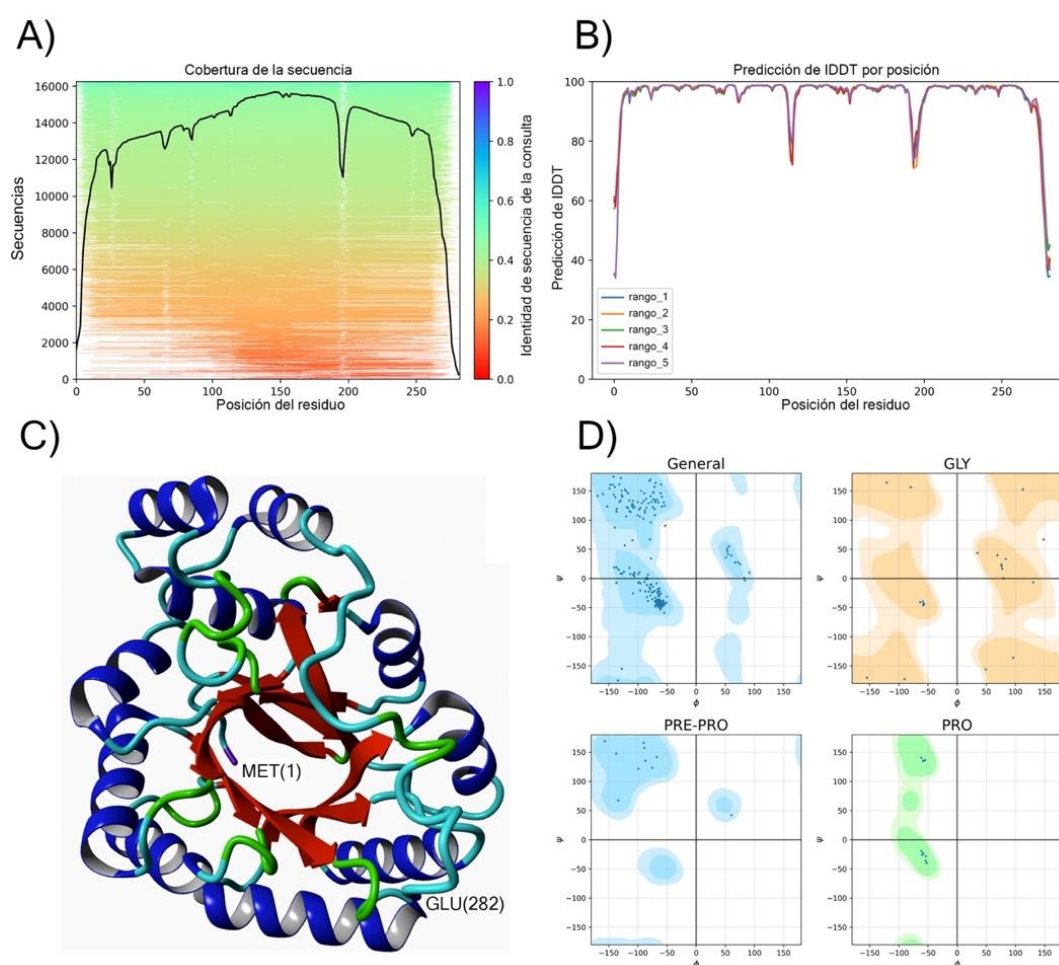


Figura 41. Métricas de confianza para la predicción de la estructura de TcAKR en su conformación Wild-Type. **(A)** Cobertura de secuencia de MSA, que representa el número de secuencias alineadas en cada posición. Las secuencias más similares se presentan de color azul y están más cerca de la parte superior. La línea negra representa el número de coincidencias con la consulta en un residuo dado. **(B)** Puntuación de la prueba de diferencia de distancia local (LDDT) predicha por superposición de los cinco modelos generados por AlphaFold2. La posición de los aminoácidos se representa en función del LDDT predicho. Los valores entre 70-90 indican una predicción confiable de la cadena principal de la proteína. Los valores de pLDDT superiores a 90 indican una precisión muy alta, equivalente a estructuras determinadas por experimentos. Los valores entre 50-70 indican una precisión más baja, pero es probable que las predicciones de las estructuras secundarias individuales sean correctas. **(C)** Modelado 3D de la estructura de TcAKR (Wild-Type); **(D)** Gráfico de Ramachandran de la estructura predicha con mejor score.

El análisis comparativo realizado entre las predicciones del modelo de referencia susceptible y resistente a BZN, junto a las 4 variantes enzimáticas de TcAKR caracterizadas en poblaciones naturales de *T. cruzi* obtenidas de muestras clínicas, es mostrado en la **Figura 42**. Los resultados muestran que todas las estructuras presentan el plegamiento y la arquitectura del bolsillo de interacción muy similar. El TM-score medio igual a 0,97 (rango: 0,95–0,98), estando la mayoría de los

residuos catalíticamente relevantes completamente conservados. En líneas generales, el análisis comparativo parece indicar que al menos a nivel estructural no parece haber diferencias entre las variantes resistentes o susceptibles de la TcAKR.

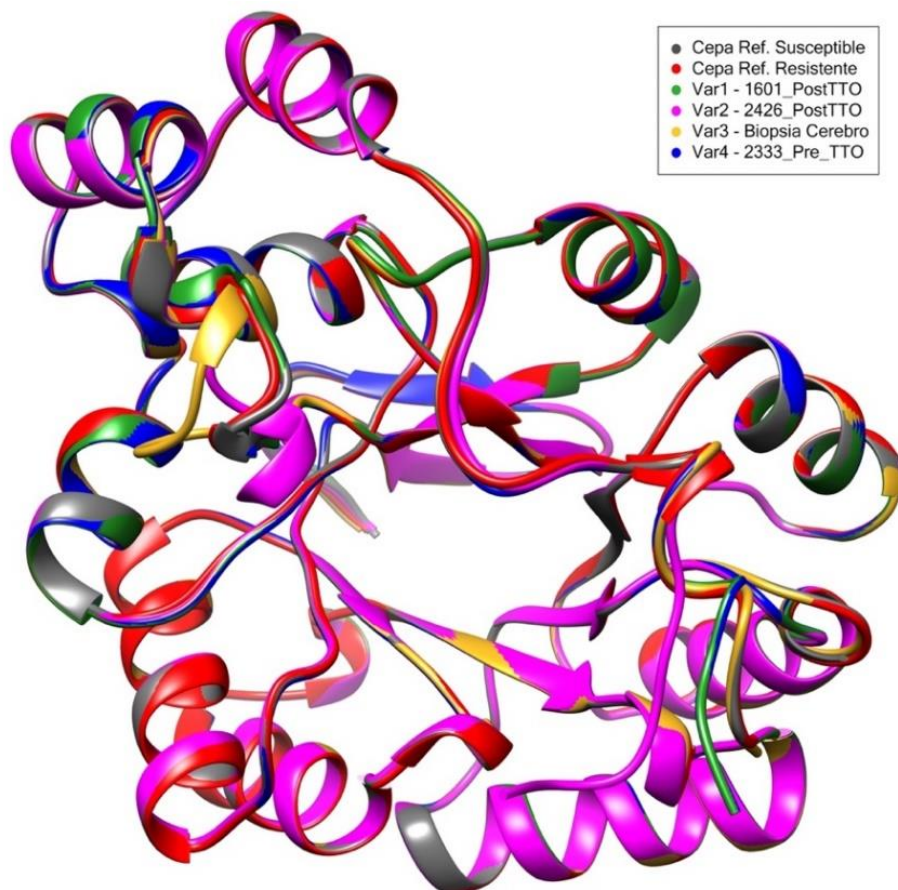


Figura 42. Superposición de las predicciones de TcAKR obtenidos a partir de poblaciones parasitarias presentes en muestras clínicas. Las predicciones y modelados 3D se generaron mediante el algoritmo AlphaFold2, y la estructura predicha de la conformación Wild-Type de la cepa Sylvio X10/1 (TcI) se utilizó como molde para la comparación.

Los estudios de simulaciones de dinámica molecular (DM) muestran una fluctuación cuadrática media (RMSF) estable de los átomos de C-Alpha para la predicción de la estructura en la cepa susceptible a BZN (línea punteada negra) y las cuatro variantes enzimáticas provenientes de las poblaciones naturales de *T. cruzi*, exceptuando los últimos residuos ubicados en el C-terminal y una región cercana a los residuos 180-200, donde se evidencian un par de picos elevados en la secuencia aminoacídica (**Figura 43A**). Estas zonas se corresponden a los valores de escasa cobertura obtenidos anteriormente y, por ende, mostrando errores en la estabilidad de la estructura. Por su parte, el RMSD mostró resultados contrarios a los ya descritos. En

la **Figura 43B** se pudo observar que, salvo la var3-Biopsia_Cerebro, todas las demás presentaron valores de trayectorias con índices inferiores a la cepa de referencia susceptible, lo que puede demostrar poca plasticidad estructural en estas variantes polimórficas a lo largo del tiempo.

Como última validación de las predicciones estructurales de TcAKR, en las figuras **Figura 43C, D y E** se muestran las proyecciones de vectores pertenecientes al análisis de APC. El análisis de comparación mostró que las proyecciones en la mayoría de variantes polimórficas de TcAKR (4/5 variantes), presentaron diferencias respecto a la estructura de referencia susceptible. Este hallazgo, podría implicar cierto nivel de cambio en el espacio conformacional de las enzimas debido a su flexibilidad. Sin embargo, la predicción de la referencia resistente y la Var3-Biopsia_Cerebro, fueron las que presentaron las proyecciones con mayor divergencia respecto a la referencia susceptible, mostrando una mayor amplitud en los dos componentes principales, indicando más movimientos de flexión y torsión de los residuos.

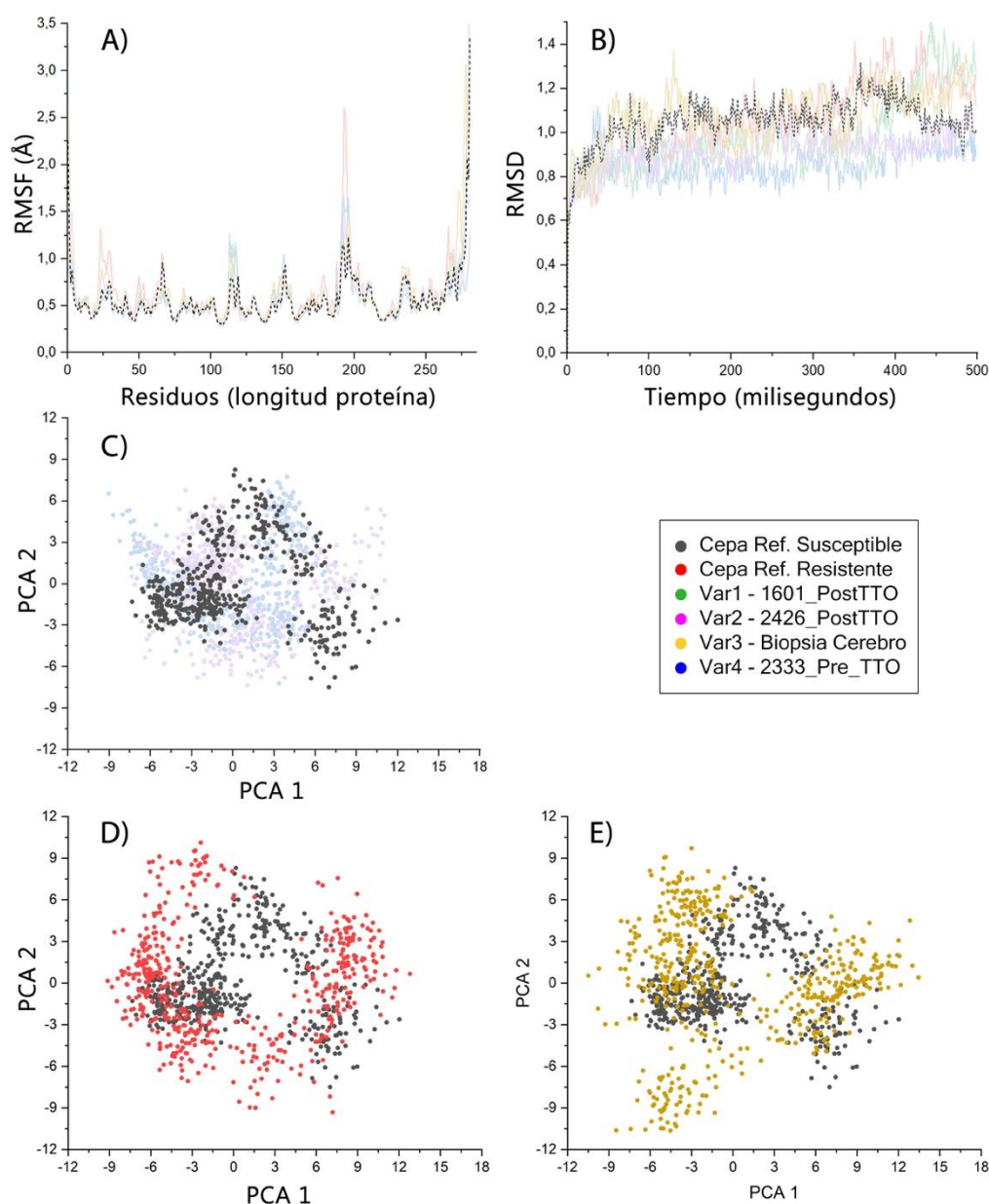


Figura 43. Simulaciones de dinámica molecular de las estructuras tridimensionales predichas de TcAKR. (A) Gráfico de fluctuación cuadrática media por residuo (RMSF) que representa la simulación durante 500 ms de las conformaciones aminoacídicas de la estructura Wild-Type y mutantes. (B) Comparación de los gráficos de desviación cuadrática media (RMSD) de la secuencia aminoacídica de las variantes mutantes TcAKR con respecto a la conformación Wild-Type durante el curso de la simulación (500 ms). (C) Gráfico de análisis de componentes principales en átomos de Cα en el espacio conformacional a 300 K de temperatura. Los cambios estructurales de la conformación Wild-Type siempre se presenta como líneas punteadas o puntos de color gris oscuro.

Finalmente, tomando como referencia la predicción realizada sobre la secuencia aminoacídica de la cepa Sylvio-X10 (referencia susceptible), se determinó el bolsillo de interacción con mejor relación de volumen [$\text{\AA}^3$] y superficie [$\text{\AA}^2$] y el posterior análisis de docking molecular para el grupo prostético FMN (Figura 44B y C,

respectivamente). Los resultados de docking indicaron que el anillo de isoaloxazina se encuentra alojado en un bolsillo hidrofóbico conformado por los residuos Trp24, Trp188, Phe276 y Gly270. Adicionalmente, la estabilización de toda la molécula de FMN ocurre mediante la interacción de tres residuos. El anillo de isoaloxazina del grupo prostético presenta apilamiento e interacción con el residuo Try24, generando un enlace de tipo pi-pi. Por su parte, la región media hidroxilada se encuentra interaccionando con el átomo de O14 y la cadena lateral del residuo Tyr53 mediante un enlace de hidrógeno. En última instancia, la cola del grupo protético se encuentra interaccionando a través del átomo de O16 con los residuos Tyr53 y Lys78 mediante un enlace de hidrógeno y un enlace iónico, respectivamente (**Figura 44C**).

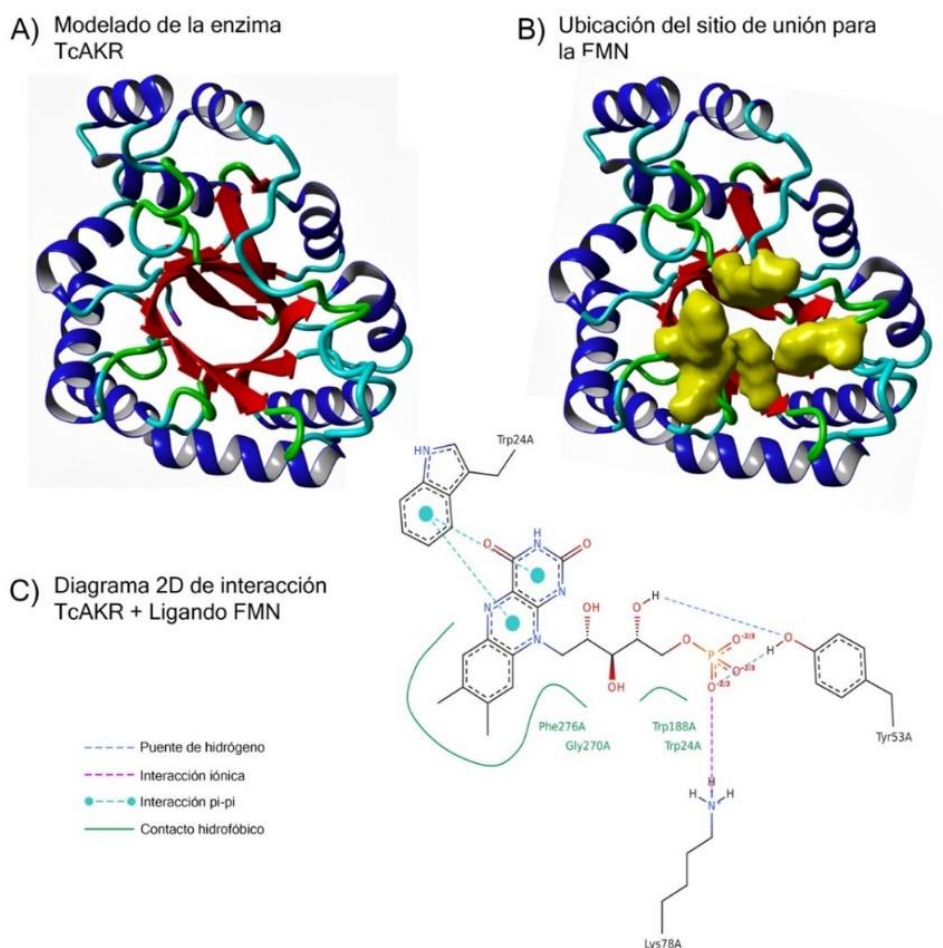


Figura 44. Visualización del docking molecular entre la estructura Wild-Type de la enzima TcAKR y el cofactor Flavín-Mononucleótido (FMN). (A) Representación 3D de la estructura 3D de TcAKR de la cepa Sylvio X10/1 (TcI). (B) Representación gráfica del bolsillo de interacción predicho por el software DoGSite3.1; (C) Diagrama de interacción 2D entre la FMN y el bolsillo presente en TcAKR generado por el software PoseEdit (Diedrich y col., 2023).

Los análisis de interacción comparativos entre las estructuras de TcAKR predichas a partir de secuencias obtenidas de pacientes y el cofactor FMN, demostraron que a pesar que el bolsillo de interacción fue similar en cuanto a los parámetros de volumen y superficie, la forma en que el grupo prostético se acopla a la estructura puede ser diferente (**Figura 45**), muy probablemente debido a pequeñas variaciones en la composición de aminoácidos dentro del bolsillo, producto de los polimorfismos presentes en cada variante estudiada.

En líneas generales, se pudo observar que las variantes obtenidas de las poblaciones naturales de *T. cruzi* presente en los pacientes 1601_PostTTO, 2426_PostTTO y Biopsia_Cerebro (Var1, Var2 y Var3, respectivamente), a pesar de ubicarse en un bolsillo hidrofóbico con composición aminoacídica similar a la descrita anteriormente y de generar interacciones de tipo pi-pi entre el anillo de isoaloxazina y el residuo Trp24, tanto la región media hidroxilada y la cola del cofactor FMN presentan interacciones con residuos y tipos de enlaces no descritos en la referencia susceptible. Por ejemplo, se puede apreciar que la variante de TcAKR presente en el paciente 2426_PostTTO (Var2) se encuentra interaccionando con el anillo de isoaloxazina de la FMN mediante tres residuos hidrofóbicos (Trp188, Trp24 y Phe269) y con dos Argininas (residuos 25 y 281) en la cola de la FMN mediante enlaces iónicos.

En el caso de la estructura de referencia resistente a BZN y la variante de TcAKR identificada en el paciente 2333_PostTTO (Var4), a pesar de estar localizadas espacialmente dentro del bolsillo de interacción con la mejor valoración, exhiben interacciones con residuos específicos que difieren completamente de los descritos en la estructura de referencia susceptible. La estabilización de la FMN dentro del bolsillo ocurre casi exclusivamente a través de la región media hidroxilada y la cola del grupo prostético, mediante enlaces de hidrógeno.

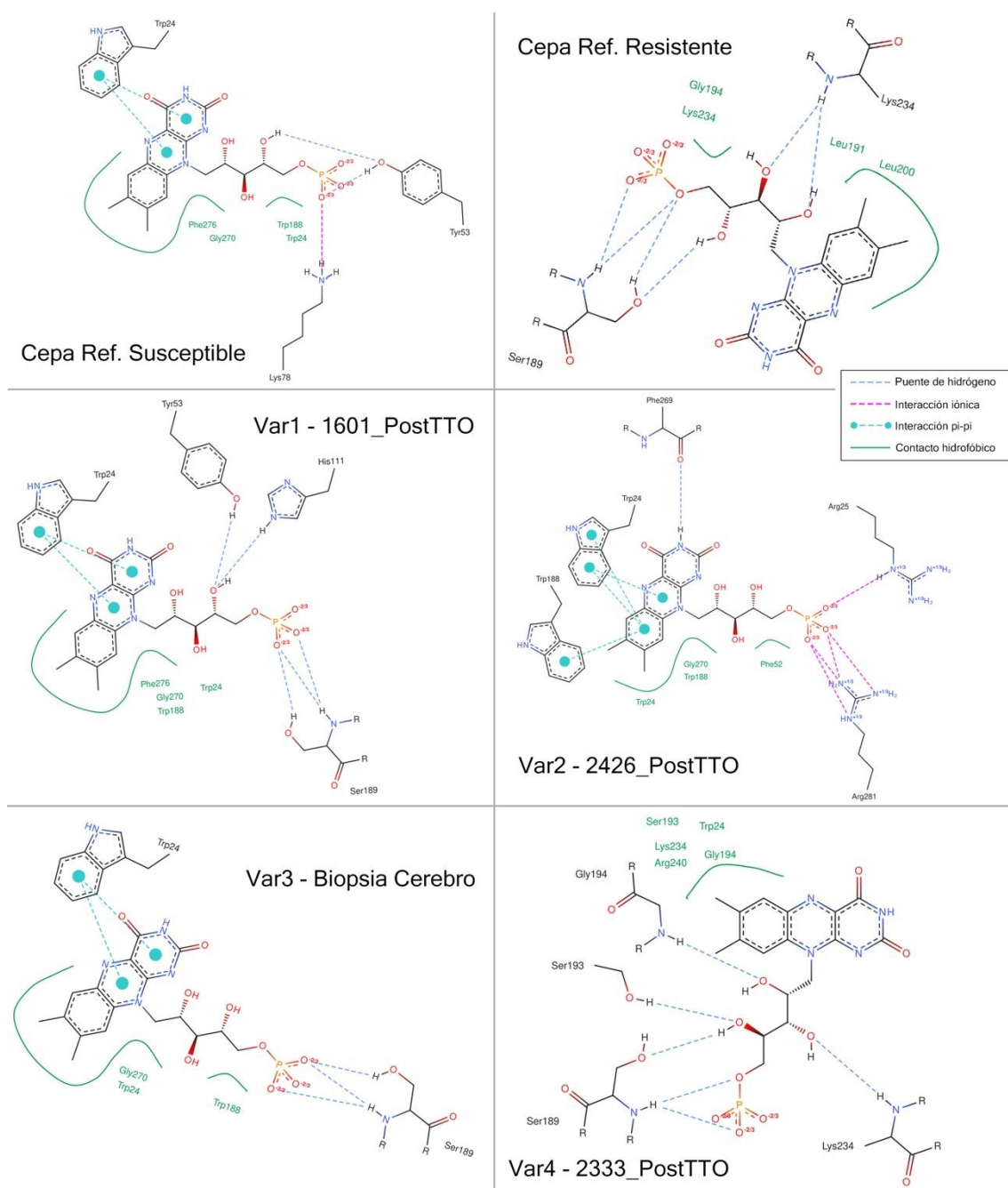


Figura 45. Diagramas de interacción 2D entre la FMN y el bolsillo presente en las diferentes variantes mutantes de TcAKR. Los diagramas fueron generados mediante el software PoseEdit (Diedrich y col., 2023).

CAPITULO 5

Validación de enzimas NAD(P)H-dependientes como potenciales biomarcadores de Resistencia Farmacológica

Una vez establecido un patrón de polimorfismos que pueden estar asociados a poblaciones parasitarias farmacológicamente resistentes, decidimos realizar una validación empleando secuencias aminoacídicas de las enzimas TcNTR-1, TcOYE y TcAKR, obtenidas de poblaciones naturales de *T. cruzi* presentes en muestras clínicas de pacientes afectados por la ECh. El objetivo subyacente consistió en investigar la idoneidad de estas enzimas como biomarcadores para evaluar la resistencia o susceptibilidad farmacológica en el contexto de la enfermedad.

Para ello, se seleccionaron 22 muestras clínicas (3 muestras Pre-TTO y 19 muestras Post-TTO) pertenecientes a 18 pacientes con cargas parasitarias cuantificadas con valores <10 Eq.Par./mL. El 90,1% de las muestras pertenecen a pacientes venezolanos involucrados en brotes de ECh por transmisión oral ocurridos entre 2007 y 2010. El resto de las muestras pertenece a pacientes argentinos que recibieron trasplantes de órganos de donantes con ECh confirmada y a los cuales se les realizó el seguimiento parasitológico en el Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas (LabMECh) del INGBI-CONICET.

5.1.- Validación de la enzima TcNTR-1 como potencial biomarcador de Resistencia Farmacológica.

Las secuencias aminoacídicas de las muestras clínicas pertenecientes a los 18 pacientes con ECh, fueron comparadas con secuencias homólogas a la enzima TcNTR-1 de las cepas de referencia internacional SylvioX10/1 (TcI y susceptible a BZN), Y (TcII y resistente a BZN) y Colombiana (TcI y resistente a BZN).

En la **Figura 46** se muestra el alineamiento de los 313 residuos.

Luego del análisis bioinformático, fue posible describir 30 secuencias consenso de la enzima TcNTR-1 en la cohorte de pacientes bajo estudio. El elevado número de secuencias obtenidas (tomando en cuenta que solo fueron seleccionadas 22 muestras clínicas), se debe a que en el 45,5% de las muestras evaluadas (10/22), fue posible encontrar al menos 2 variantes diferentes de secuencias consenso.

Los resultados mostraron un 85,6% de homología de las secuencias de aminoácidos presentes en las poblaciones naturales de *T. cruzi* respecto a la cepa de referencia SylvioX10/1 (susceptible a BZN), encontrándose un total de 1138 polimorfismos a lo largo de la secuencia. Del total de polimorfismos se encontraron que 46 polimorfismos correspondían a inserciones de aminoácidos Serina (todas ubicadas entre el aminoácido Ser77 y Leu78), 2 deleciones de aminoácidos (Ser76 y Ser77) y 32 codones de parada prematuros.

Del total de polimorfismos encontrados, se pudo determinar que solamente 21 de ellos presentaron alta frecuencia de aparición en las poblaciones naturales de *T. cruzi* presente en estos pacientes (**Figura 46**). Curiosamente, ninguno de los polimorfismos encontrados en las muestras clínicas, coincidió con los polimorfismos presentes en las secuencias aminoacídicas de las cepas de referencia clasificadas como resistentes.

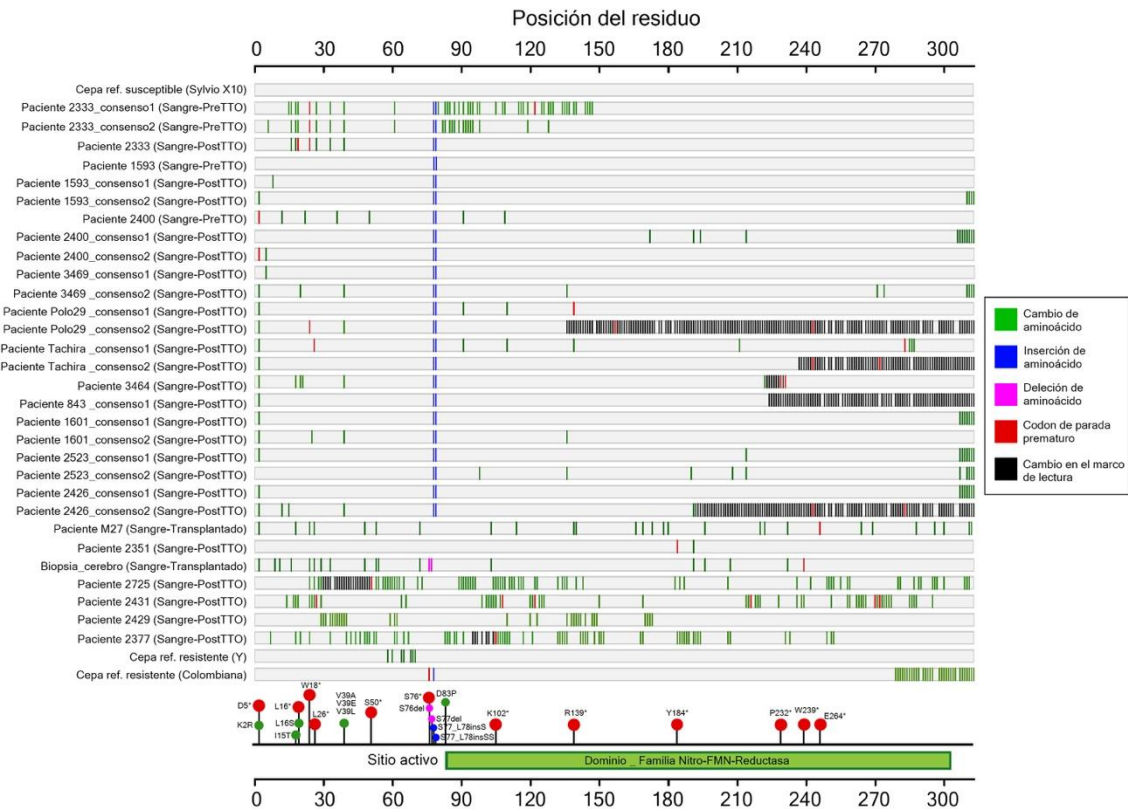
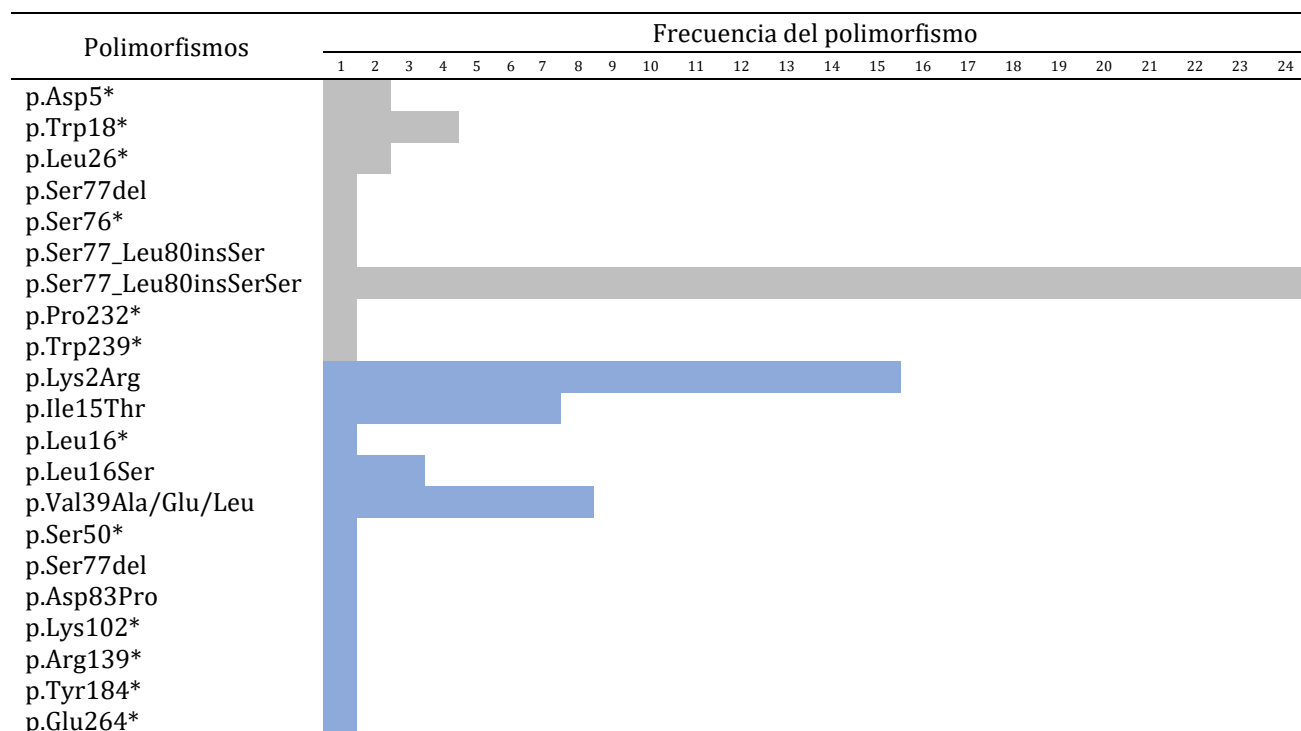


Figura 46. Distribución de los polimorfismos caracterizados para la enzima TcNTR-1 en todas las secuencias obtenidas a partir de las poblaciones naturales de *Trypanosoma cruzi* presentes en muestras clínicas.

Al comparar los polimorfismos encontrados en las muestras clínicas con los hallados en las variantes establecidas como posibles biomarcadores en los análisis de ACP, fue posible encontrar un 36% de aciertos (9/25 polimorfismos), siendo el polimorfismo más frecuente la inserción de dos residuos de Serina entre los aminoácidos Ser77 y Leu78 (24/30 secuencias), seguido de los codones de terminación prematuros ubicados en los residuos Trip18 y Leu26 (4/30 y 2/30 secuencias, respectivamente) (**Tabla 12**).

El análisis de las muestras clínicas permitió establecer 12 nuevos polimorfismos no descritos previamente en secuencias TcNTR-1 a partir de cepas de *T. cruzi* (**Tabla 12**), siendo los más frecuentes p.Lys2Arg (15/30 secuencias), un sitio polimórfico en el residuo p.Val39 (8/30 secuencias), p.Ile15Thr (7/30 secuencias) y p.Leu16Ser (3/30 secuencias). Por otra parte, a partir del análisis de secuencia se pudo establecer que, en 7 muestras clínicas, alguna de las variantes alélicas encontradas presentó un polimorfismo en los residuos N28 (g.*Tcntr-1_42delA*), D83 (g.*Tcntr-1_248G>C*; 249C>A; 251G>A; 252C>G; 253C>T; 254A>G; 255T>G), E136 (g.*Tcntr-1_406delG*), A191 (g.*Tcntr-1_572delG*), G224 (g.*Tcntr-1_670delT*) o Y237 (g.*Tcntr-1_711delA*) que derivaron en cambios en el marco de lectura del gen, y como consecuencia dieron lugar a codones de terminación de la traducción prematuros.

Tabla 12. Tabla 14. Número de muestras de pacientes con Enfermedad de Chagas que presenta alguno de los polimorfismos de residuos caracterizados para la enzima TcNTR-1.



5.2.- Validación de la enzima TcOYE como potencial biomarcador de Resistencia Farmacológica.

A partir del proceso de amplificación genética y clonado para esta enzima, se logró caracterizar un conjunto de 17 secuencias consenso en la cohorte de muestras clínicas bajo estudio. Los resultados revelaron un alto grado de homología, del 94,6% entre las secuencias de aminoácidos presentes en las poblaciones naturales de *T. cruzi* y la cepa de referencia SylvioX10/1 (susceptible a BZN). Se identificó un total de 429 polimorfismos de aminoácidos a lo largo de la secuencia, dentro de los cuales solamente tres correspondieron a codones de terminación temprana (**Figura 47**).

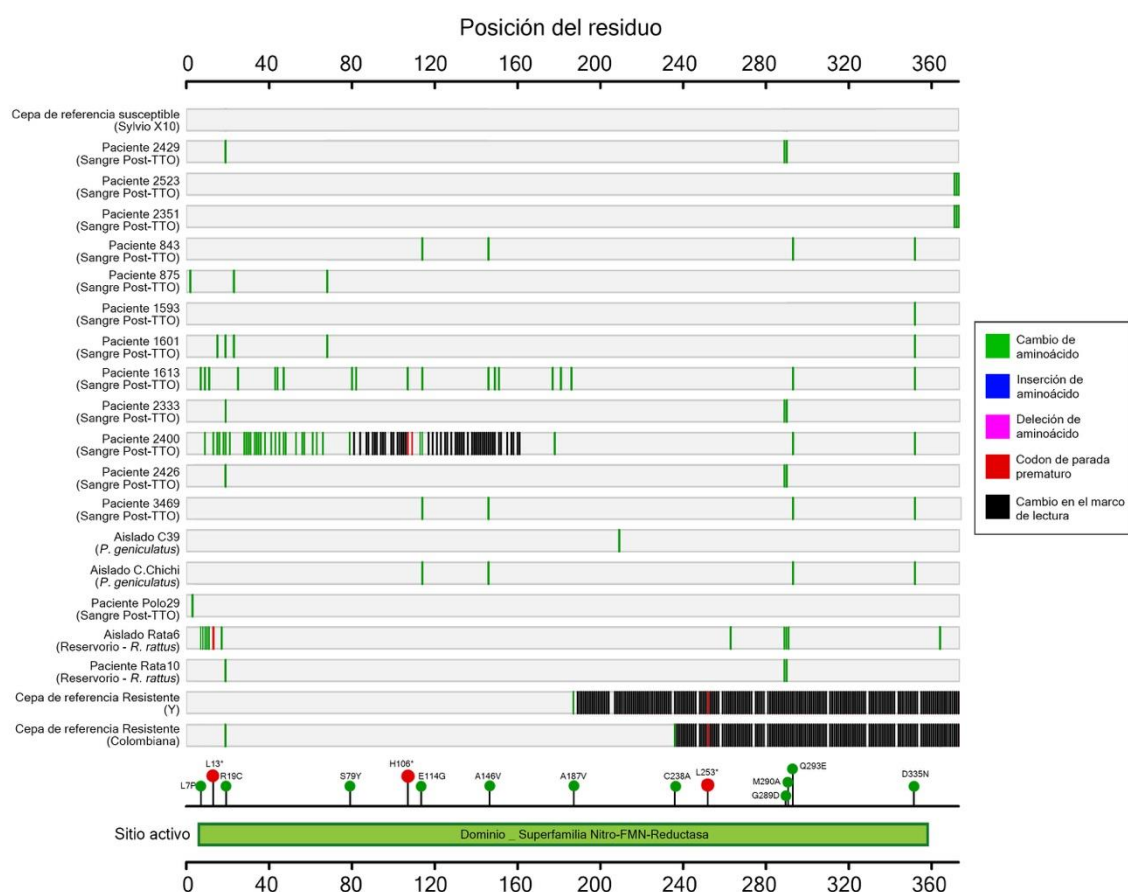


Figura 47. Distribución de los polimorfismos caracterizados para la enzima TcOYE en todas las secuencias obtenidas a partir de las poblaciones naturales de *Trypanosoma cruzi* presentes en muestras clínicas.

De la totalidad de polimorfismos identificados, se pudo establecer que son frecuentes solo 14 de ellos en las poblaciones naturales de *T. cruzi* presentes en esta cohorte de pacientes.

Al igual que en el caso anteriormente descrito, ninguno de los polimorfismos detectados en las muestras clínicas coincidió con aquellos presentes en las secuencias aminoacídicas de las cepas de referencia clasificadas como resistentes. En ambos casos (Colombiana y cepa Y), los mecanismos de resistencia parecen derivarse de la producción de enzimas no funcionales debido a cambios en el marco de lectura hacia los extremos carboxilo terminal, que terminan con un codón de terminación prematuro (**Figura 47**).

Tabla 13. Número de muestras de pacientes con Enfermedad de Chagas que presenta alguno de los polimorfismos de residuos caracterizados para la enzima TcOYE.

Polimorfismos	Frecuencia del polimorfismo						
	1	2	3	4	5	6	7
p.Leu13*	1						
p.His106*	1						
p.Leu7Pro	1	1					
p.Arg19Cys	1	1	1	1	1	1	1
p.Ser79Tyrfs*28	1	1					
p.Glu114Gly	1	1	1	1	1		
p.Ala146Val	1	1	1	1	1		
p.Met290Ala	1	1	1	1	1		
p.Gly289Asp	1	1	1	1	1		
p.Gln293Glu	1	1	1	1	1	1	
p.Asp335Asn	1	1	1	1	1	1	1

Al contrastar los polimorfismos identificados en las muestras clínicas con las variantes previamente definidas como potenciales biomarcadores en los análisis de ACP, se logró obtener un índice de concordancia del 25% (2/8 polimorfismos). Los únicos dos polimorfismos que coincidieron con el análisis previo, fueron dos codones de terminación prematuros encontrados en la población parasitaria aislada de un ejemplar de *Rattus rattus* inmerso dentro del ciclo de transmisión de uno de los brotes de EChO ocurridos en Venezuela (p.TcOYE_Leu13*), y en la muestra de seguimiento del paciente no respondedor 2400, obtenida una año después de su tratamiento con BZN (p.TcOYE_His106*) (**Tabla 12**).

Este análisis permitió identificar nueve polimorfismos no descritos en las secuencias de la enzima TcOYE provenientes de cepas de *T. cruzi* (**Tabla 12**). Entre los más frecuentes se destacan los polimorfismos p.TcOYE_Arg19Cys y p.TcOYE_Asp335Asn (7/14 secuencias), p.TcOYE_Gln293Glu (5/14 secuencias), y los polimorfismos p.TcOYE_Glu114Gly, p.TcOYE_Ala146Val, p.TcOYE_Met290Ala y p.TcOYE_Gly289Asp (observados en 4/14 secuencias, respectivamente).

5.3.- Validación de la enzima TcAKR como potencial biomarcador de Resistencia Farmacológica.

A través de los procesos de amplificación génica por PCR o Nested-PCR, se logró la caracterización de un conjunto de 16 secuencias consenso en la cohorte de muestras clínicas objeto de estudio. Los resultados obtenidos revelaron una homología del

78,2% entre las secuencias de aminoácidos presentes en las poblaciones naturales de *T. cruzi* comparado con la cepa de referencia SylvioX10/1 (susceptible a BZN). Fueron identificados un total de 1019 polimorfismos de aminoácidos a lo largo de la secuencia, de los cuales 19 correspondieron a codones de terminación temprana (Figura 48).

De la totalidad de polimorfismos descritos, se logró identificar 16 de ellos con una alta prevalencia en las poblaciones naturales de *T. cruzi* pertenecientes a la cohorte de pacientes bajo estudio. Para el caso de la enzima TcAKR, fue el único caso en el que algunos de los polimorfismos identificados en las muestras clínicas mostraron concordancia con aquellos presentes en las secuencias aminoacídicas de las cepas de referencia catalogadas como resistentes. Para ambos casos (cepas Y y Colombiana), los polimorfismos en los residuos Cys51, Phe52, Ala197 y Asp272 también fueron encontrados en el 56,3% de las secuencias obtenidas de poblaciones naturales de *T. cruzi* (9/16 secuencias).

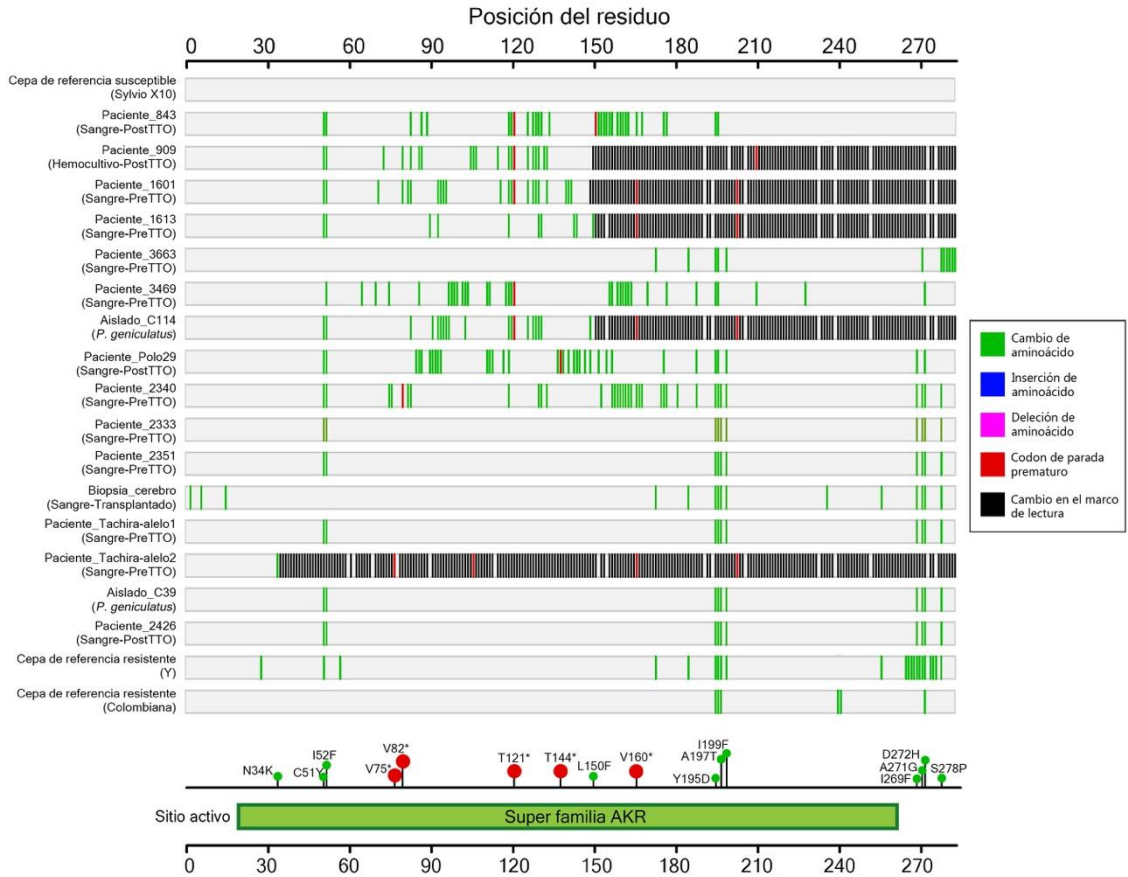
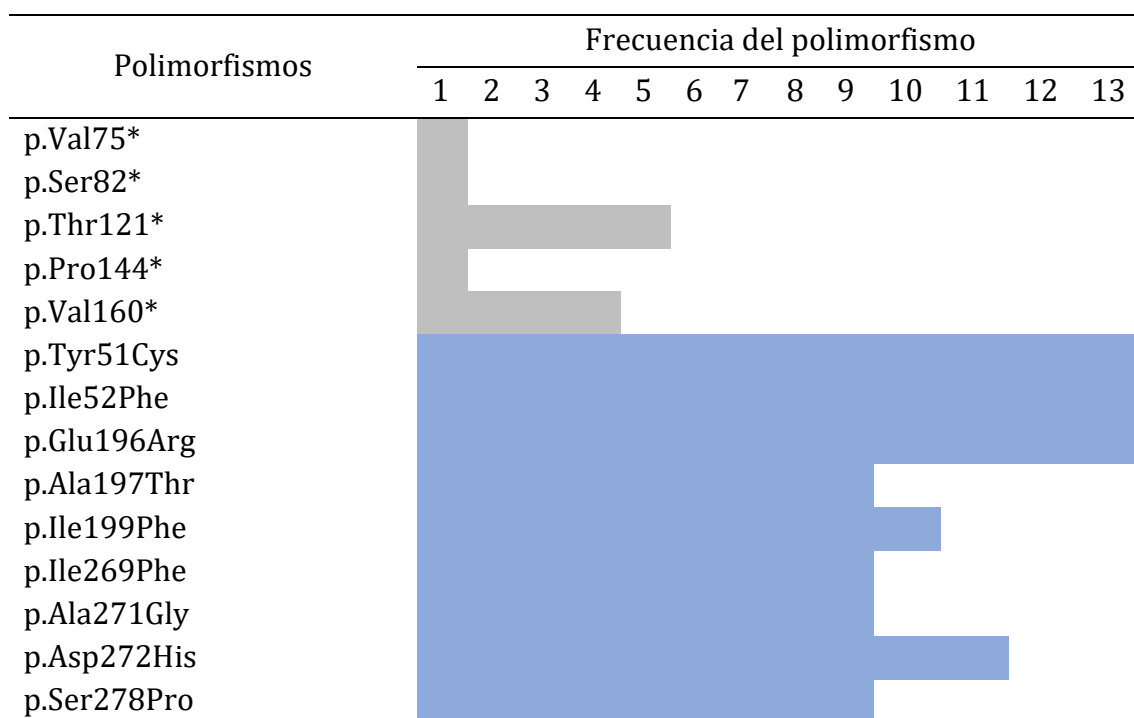


Figura 48. Distribución de los polimorfismos caracterizados para la enzima TcAKR en todas las secuencias obtenidas a partir de las poblaciones naturales de *Trypanosoma cruzi* presentes en muestras clínicas.

Al comparar los polimorfismos identificados en las muestras clínicas con las variantes previamente definidas como posibles biomarcadores en los análisis de ACP, se obtuvo un índice de concordancia del 41,7% (5/12 polimorfismos). Los polimorfismos que coincidieron con el análisis previo, corresponden en su totalidad a codones de terminación prematuros. Dos de ellos, específicamente TcAKR_p.Thr121* y TcAKR_p.Val160*, exhiben una prevalencia significativa en las poblaciones naturales de *T. cruzi*, siendo detectados con frecuencias del 31% y 25%, respectivamente (**Tabla 14**).

Adicionalmente, este análisis ha posibilitado la identificación de nueve polimorfismos hasta ahora no descritos en las secuencias de la enzima TcAKR provenientes de cepas de *T. cruzi*. Estos nuevos polimorfismos presentaron una alta predominancia en la cohorte de pacientes evaluados. Entre los más frecuentes destacan los polimorfismos TcAKR_p.Tyr51Cys, TcAKR_p.Ile52Phe y TcAKR_p.Glu196Arg observados en 13 de las 16 secuencias evaluadas; los polimorfismos TcAKR_p.Asp272His y TcAKR_p.Ile199Phe (presentes en 11/16 y 10/16 secuencias, respectivamente) y los polimorfismos TcAKR_p.Ala197Thr, TcAKR_p.Ile269Phe, TcAKR_p.Ala271Gly y TcAKR_p.Ser278Pro, presentes en el 56% de las muestras (9/16 secuencias).

Tabla 14. Número de muestras de pacientes con Enfermedad de Chagas que presenta alguno de los polimorfismos de residuos caracterizados para la enzima TcAKR.



5.4.- Correlación del polimorfismo en las enzimas NADH-dependientes TcNTR-1, TcOYE y TcAKR y la respuesta farmacológica *in-vitro* como potencial biomarcador de resistencia farmacológica.

Finalmente, con el propósito de establecer la posible asociación entre los polimorfismos identificados en las secuencias de las enzimas TcNTR-1, TcOYE y TcAKR y el fenotipo de resistencia al BZN (determinado mediante los valores de IC₅₀ *in-vitro*), y por ende, obtener un perfil de polimorfismos que puedan asociarse clínicamente como biomarcadores de resistencia farmacológica, se decidió realizar dos análisis con enfoques estadísticos diferentes: un diagrama de red de coeficientes de correlación y un modelo de reducción de dimensionalidad (MDR).

Para ambos análisis, se seleccionaron muestras clínicas de 10 pacientes con EChO, de los cuales se obtuvieron cultivos axénicos de *T. cruzi* cuya respuesta farmacológica *in-vitro* frente al BZN fue evaluada (Muñoz-Calderón y col., 2012; Muñoz-Calderón y col., 2019) y adicionalmente, se pudieron determinar las secuencias aminoacídicas de las tres enzimas en estudio.

La construcción del diagrama de red de coeficientes de correlación reveló distintos niveles de correlación, destacándose especialmente aquellos que vincularon a los aislados clasificados como resistentes (CI₅₀ ≥ 30,70 μM) con los polimorfismos TcNTR-1_p.Val39Glu, TcNTR-1_p.Val39Leu, TcNTR-1_p.Ser77del, TcNTR-

en las enzimas TcOYE (TcOYE_L13W) y TcAKR (AKR_T121*), que exhibieron un mayor valor de precisión equilibrada de prueba (0,8687) pero presentaron una tasa de riesgo CVC menor (7/10) al modelo de dos vías.

Tabla 15. Análisis de la interacción gen-gen mediante el análisis de reducción de la dimensionalidad multifactorial (MDR)

Modelo	BTA	CVC	Valor de P
NTR_S77_L78InsSS	0,773	10	0,033
NTR_S77_L78InsSS / NTR_W18*	0,823	9	0,014
NTR_S77_L78InsSS / NTR_S76* / OYE_L13W / AKR_T121*	0,869	7	0,006

BTA: Balanced Testing accuracy CVC: Consistencia de Validación Cruzada

Todos estos modelos resultaron estadísticamente significativos con el test de 1000 permutaciones ($p < 0,05$) y en base a los parámetros BTA y CVC, decidimos seleccionar el modelo de dos loci y cuatro polimorfismos como el modelo que podría clasificar y predecir la resistencia farmacológica con mayor precisión, siguiendo las siguientes reglas:

1)	NTR_S77_L78InsSS	0	NTR_S76*	0	OYE_L13W	0	AKR_T121*	0	Paciente Susceptible
2)	NTR_S77_L78InsSS	0	NTR_S76*	0	OYE_L13W	1	AKR_T121*	0	Paciente Susceptible
3)	NTR_S77_L78InsSS	0	NTR_S76*	1	OYE_L13W	1	AKR_T121*	0	Paciente Resistente
4)	NTR_S77_L78InsSS	1	NTR_S76*	1	OYE_L13W	1	AKR_T121*	1	Paciente Resistente
5)	NTR_S77_L78InsSS	1	NTR_S76*	1	OYE_L13W	0	AKR_T121*	0	Paciente Resistente
6)	NTR_S77_L78InsSS	1	NTR_S76*	1	OYE_L13W	0	AKR_T121*	1	Paciente Resistente

Ausencia **(0)**

Presencia **(1)**

El gráfico de interacción obtenido a partir del algoritmo MDR muestra los efectos de interacción entre genes polimórficos (sinergia o redundancia) (**Figura 50**). Este modelo de interacción describe el porcentaje de entropía (GI) por cada vector de interacción. En este gráfico de interacción, un nodo (punto) representa un polimorfismo, y las líneas de color representan la interacción entre los nodos. Los valores de entropía se representan como un valor porcentual, indicando una interacción aditiva/sinérgica cuando el porcentaje es positivo, mientras que los valores de entropía negativa indican redundancia entre genes polimórficos.

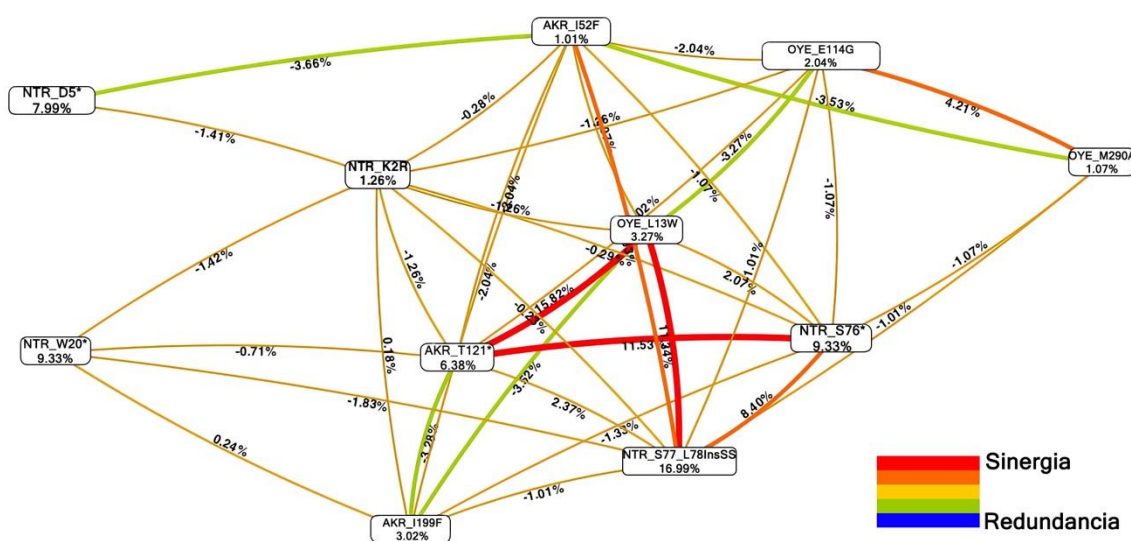


Figura 50. Análisis de redes basado en el algoritmo de red Fruchterman-Reingold comparando la interacción de los polimorfismos más significativos de las tres enzimas NAD(P)H-dependientes en relación a la susceptibilidad farmacológica frente a Benznidazol. Los valores numéricos dentro de los nodos evalúan los efectos independientes, y los números en las líneas de conexión evalúan los efectos de interacción. El rojo indica un alto nivel de sinergia, el naranja representa un bajo nivel de sinergia y el dorado significa el punto medio. El azul representa el nivel más alto de redundancia y el verde muestra el nivel secundario de redundancia.

El diagrama de interacción Fruchterman-Reingold, reveló una fuerte sinergia en tres de los cuatro polimorfismos previamente mencionados (TcNTR-1_S76*, TcOYE_L13W y TcAKR_T121*). Los puntajes de interacción de los polimorfismos se muestran con líneas rojas, sugiriendo que estos en conjunto contribuyen de manera más significativa a un presunto fenotipo de resistencia farmacológica en *T. cruzi* que de forma individual, siendo el más importante, la interacción de los polimorfismos TcOYE_L13W y TcAKR_T121* (Porcentaje de interacción = 15,82). Adicionalmente, a partir del diagrama de interacción se pudo evidenciar que el nodo del polimorfismo TcNTR-1_S77_L78InsSS representa el mayor de los valores de

entropía con un GI = 16,99%, definiéndolo como el polimorfismo con mayor presencia en el conjunto de datos analizado. Los otros dos valores de entropía con porcentajes de riesgo superiores al 7%, se corresponden con codones de detención de la traducción prematuros en la secuencia de la enzima TcNTR-1 (TcNTR-1_D5* y TcNTR-1_W20*).

A partir de los análisis ya mostrados, proponemos el siguiente perfil de polimorfismos como posibles biomarcadores de respuesta farmacológica en pacientes con ECh a ser validados clínicamente:

**p.TcNTR-1_D5*; TcNTR-1_W20*; p.TcNTR-1_S77_L78InsSS;
p.TcNTR-1_S76*; p.TcOYE_L13W y p.TcAKR_T121***

DISCUSIÓN

Benznidazol y Nifurtimox son los únicos fármacos disponibles actualmente para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas. Sin embargo, se ha evidenciado que su eficacia varía según la región geográfica donde se aplica, además de presentar preocupantes problemas de seguridad y tolerabilidad (Urbina, 2010). Entre estos dos medicamentos, el BZN generalmente se considera la opción inicial debido a su mejor tolerabilidad; sin embargo, ambos fármacos están asociados con efectos secundarios significativos (Meymandi y col., 2018). En relación con la eficacia del tratamiento, su evaluación se presenta como un desafío con las actuales herramientas de diagnóstico, basada principalmente en la detección de ADN parasitario mediante PCR. No obstante, la PCR demuestra ser poco fiable para verificar la erradicación parasitaria, ya que, por motivos metodológicos y bioéticos, la persistencia parasitaria solo puede determinarse a partir de muestras de sangre periférica y no en los tejidos blanco, originando resultados variables durante la evolución de la infección crónica debido a las fluctuaciones naturales de la parasitemia. A pesar de ello, la identificación del ADN del parásito en la circulación sanguínea después del tratamiento constituye una clara indicación de insuficiencia terapéutica (Britto, 2009; Pinazo y col., 2014; Alonso-Padilla y col., 2019; Schijman, 2023).

En este contexto, surgen al menos tres interrogantes de relevancia científica:

- ¿Cuál es la causa de tanta variabilidad en la respuesta al tratamiento?
- ¿Se observan diferencias de susceptibilidad farmacológica según la región geográfica?
- ¿Cuáles son los motivos subyacentes a los fracasos terapéuticos?

Hasta la fecha, no se ha establecido ninguna respuesta concluyente. No obstante, diversos factores han sido contemplados, entre ellos, el relacionado con la influencia de la diversidad genética del parásito (Miles y col., 1981; Macedo y Pena, 1998; Macedo y col., 2004; Urbina, 2010).

En años recientes, se ha observado un aumento en la disponibilidad de datos genómicos de diversas cepas de *T. cruzi*, y se ha desarrollado una amplia gama de

herramientas moleculares para explorar su variabilidad genética (Ackermann y col., 2012). Estos avances han impulsado significativamente nuestro entendimiento sobre la estructura poblacional de *T. cruzi*, su evolución, eco-epidemiología, y sus interacciones hospedero-vector (Macedo y Pena, 1998; Campbell y col., 2004; Miles y col., 2009; Sturm y Campbell, 2010; Zingales y col., 2012; Messenger y col., 2015).

Se ha sugerido que esta variabilidad genética podría influir en la respuesta diferencial de *T. cruzi* a los tratamientos tripanocidas, aunque hasta el momento, tal correlación no se ha podido demostrar (Murta y Romanha, 1998; Villarreal y col., 2004; Moreno y col., 2010). Investigaciones recientes han revelado una amplia gama de respuestas a fármacos en cepas de *T. cruzi* de distintos linajes (Muñoz-Calderón y col., 2012; Moraes y col., 2014b; Muñoz-Calderón y col., 2019). Sin embargo, la mayoría de los estudios farmacológicos *in-vitro* fueron realizados sobre el estadio epimastigote de *T. cruzi*, lo que ha llevado a proponer que la evaluación de nuevos compuestos tripanocidas se realice sobre los estadios parasitarios de importancia clínica y utilizando un conjunto de cepas que representen la diversidad genética de este parásito (Don y Ioset, 2014; Zingales y col., 2014; Vela y col., 2021).

En este sentido, el meta-análisis realizado en este trabajo sobre la revisión bibliográfica de 153 ensayos *in-vitro* individuales sobre estadios tripomastigote de *T. cruzi*, reveló diferencias significativas en los valores de CI_{50} promedio entre cepas de TcI y las cepas/aislados pertenecientes del tipo TcII y TcVI. Cabe destacar que las cepas/aislados TcI fueron significativamente menos susceptibles que las cepas TcII y TcVI (**Figuras 13, 14**). Este hallazgo, al menos en primera instancia, corrobora los primeros informes que sugirieron que las cepas TcI podrían ser más resistentes al BZN que las cepas de otras UDTs (Toledo y col., 2003). Sin embargo, estudios recientes utilizando paneles de cepas/aislados más amplios (compuestos en su mayoría por UDTs TcI, TcII y TcV), confirmaron la ausencia de correlación entre la susceptibilidad al BZN en pruebas de laboratorio y la diversidad genética de *T. cruzi* (Villarreal y col., 2004; Moreno y col., 2010; Moraes y col., 2014a; Revollo y col., 2019). Adicionalmente, se pudo observar un amplio rango de susceptibilidad intra-UDT al BZN (Moraes y col., 2014b; Quebrada Palacio y col., 2018). Los resultados de nuestro sub-estudio respaldan esta observación, ya que el análisis de los ensayos *in-*

vitro en parásitos TcII reveló un amplio rango en los valores de IC₅₀, oscilando entre 1,1μM y 282μM, aun teniendo en cuenta que más del 80% de los ensayos utilizaron la misma cepa (Cepa Y). Esta diversidad en la respuesta a los fármacos podría vincularse con la variabilidad genómica intra-UDT determinada mediante aneuploidías, eventos de recombinación, introgresiones mitocondriales y cambios en el número copias del gen (Reis-Cunha y col., 2018; Reis-Cunha y col., 2022). Estos fenómenos genéticos fueron observados durante la secuenciación completa del genoma de siete cepas TcII provenientes de pacientes brasileños, promoviendo que estas diferencias genéticas subyacentes entre cepas estrechamente relacionadas podrían estar relacionadas con la resistencia a fármacos (Reis-Cunha y col., 2018).

No obstante, basándonos solamente en la información disponible en la literatura, resulta difícil establecer una correlación directa entre la susceptibilidad al BZN y una UDT específica. A pesar de ello, sería imprudente pasar por alto la variabilidad genética del parásito y no considerar la necesidad de establecer condiciones experimentales uniformes. Esto es especialmente relevante durante la fase de diagnóstico parasitológico, el seguimiento del tratamiento; así como en la investigación y evaluación de nuevos candidatos a fármacos destinados al tratamiento de la ECh.

Variabilidad genética de poblaciones naturales de Trypanosoma cruzi presentes en muestras clínicas de pacientes con Enfermedad de Chagas:

Dinámica de la circulación parasitaria en pacientes con Enfermedad de Chagas

Como se mencionó con anterioridad, la variabilidad genética de *T. cruzi* afecta la comprensión de distintos aspectos de la biología parasitaria. Uno de los aspectos más relevantes en el marco de la salud humana, es el relacionado con el diagnóstico y el seguimiento de la carga parasitaria en pacientes tratados, con la finalidad de establecer falla terapéutica o cura parasitológica.

La cuantificación de la carga parasitaria mediante qPCR ha abierto posibilidades para monitorear el fracaso del tratamiento etiológico en pacientes con ECh, así como la reactivación de la infección en pacientes inmunodeprimidos, ya sea por trasplante de órganos de un donante infectado con *T. cruzi*, coinfección *T. cruzi*-VIH, o la presencia de enfermedades autoinmunes o bajo quimioterapias oncológicas (Cura y col., 2013; Molina y col., 2014; Torrico y col., 2018; Muñoz-Calderón y col., 2019; Álvarez y col., 2020). Adicionalmente, en ensayos clínicos multi-céntricos, los ensayos de qPCR se han utilizado durante mucho tiempo para comparar las cargas parasitarias entre cohortes de pacientes de diferentes países o regiones (Moreira y col., 2013). Para llevar a cabo estas comparaciones, desde la última década se han reportado varios protocolos, utilizando curvas estándar de diferentes cepas/UDTs de *T. cruzi* como referencias (Piron y col., 2007; Duffy y col., 2009; Qvarnstrom y col., 2012; Duffy y col., 2013; Moreira y col., 2013; Ramírez y col., 2015). En general, estos estudios utilizaron diferentes curvas estándar, empleando aislamientos parasitarios con la mayor prevalencia en cada región, lo que permite una cuantificación más precisa para la mayoría de las muestras de pacientes, asumiendo que estaban infectados por poblaciones pertenecientes a una sola UDT. Sin embargo, este enfoque podría estar generando un sesgo para la comparación directa de las cargas parasitarias entre muestras clínicas de diferentes pacientes, incluso dentro de la misma región geográfica, ya que pueden coexistir diferentes poblaciones de *T. cruzi* superpuestas pertenecientes a UDTs distintas, con contenido genómico variable y, por lo tanto, presentar diferencias en el número de copias del gen blanco (Burgos y col., 2005; Burgos y col., 2008a; Burgos y col., 2010).

Para superar estas limitaciones, en la presente tesis se propuso el uso de una curva estándar única de ADN sintético que permitiera la cuantificación comparativa de las cargas parasitarias (independientemente de la UDT de las poblaciones parasitarias infectantes), al expresar la carga parasitaria como números de copias de ADNsat/ μ L. La curva estándar sintética de ADNsat de doble cadena presentó una linealidad y eficiencia en concordancia con las curvas estándar reportadas previamente para otros patógenos de ADN como los virus de la hepatitis A y E (Tourinho y col., 2015) el virus del herpes humano 1 y 2 (Lima y col., 2017) y *Plasmodium falciparum* (Wang y col., 2018). Al realizarse la cuantificación del número de copias de ADNsat en

cepas/clones representativos de UDTs I-VI, fue posible observar diferencias significativas entre TcI y TcIII, y TcI y TcVI. El clon Dm28c (TcI) presentó el número de copias de ADNsat más bajo de todas las muestras de ADN parasitario evaluadas, incluyendo cepas pertenecientes a TcII y TcVI. Este resultado fue similar al reportado previamente mediante la cuantificación relativa de copias de ADNsat contra un gen de mantenimiento (*house keeping*) de copia única (Duffy y col., 2009).

En estudios previos, cuando se estimaron la inclusividad y la sensibilidad analítica de la qPCR basada en ADNsat utilizando ADNg de diferentes cepas de parásitos, se detectaron diferentes valores de sensibilidad, los cuales correlacionaron con los distintos dosajes génicos de ADNsat. Además, los límites de cuantificación de esta qPCR variaron según la cepa (Duffy y col., 2013; Ramírez y col., 2015). Esta situación llevó a recomendaciones de utilizar diferentes curvas estándar para la cuantificación de cargas parasitarias (Moreira y col., 2013; Ramírez y col., 2015). Al emplear el oligonucleótido sintético para ADNsat, los valores LOD₉₅ arrojaron resultados similares que al utilizar sangre contaminada con cepas de *T. cruzi* Dm28c (TcI) o CL-Brener (TcVI) (ambas con dosajes génicos de ADNsat diferentes). Esto permitió proponer el ADN sintético como herramienta para facilitar la comparación directa de las cargas parasitarias determinadas por qPCR en muestras infectadas con diferentes UDTs.

Una vez establecida la herramienta de cuantificación para realizar comparaciones entre cohortes de pacientes, se procedió a realizar el monitoreo de la carga parasitaria sobre las muestras evaluadas en esta tesis (**Tablas 1-3**), permitiendo la caracterización de la dinámica natural de la circulación de *T. cruzi* en sangre periférica en la fase aguda y crónica de la enfermedad durante un periodo cercano a una década de seguimiento.

Para las tres series de conveniencia de pacientes evaluados, se pudo evidenciar resultados intermitentes entre qPCRs positivas y no detectables a lo largo de todo el seguimiento clínico-parasitológico. A pesar de esto, la positividad en la qPCR de muestras entre los 9-10 años posteriores al tratamiento, demuestra la sensibilidad de esta herramienta diagnóstica y aporta indicios sobre una posible falla terapéutica

(Díaz-Bello y col., 2021; Muñoz-Calderón y col., 2021a; Muñoz-Calderón y col., 2023). Adicionalmente, a lo largo del seguimiento Post-TTO de los pacientes con EChO, la mediana de la carga parasitaria se ubicó en un valor de -0,18 [IQR = -0,79 – 0,66] $\log_{10}$ copias ADNsat/ μ L, lo que resulta en muestras positivas para el marcador de ADNsat, pero que se encuentran por debajo del límite de cuantificación de la técnica.

Este carácter discontinuo de la parasitemia con una baja carga, podría estar relacionado con la persistencia del parásito en algunos tejidos del paciente durante la fase crónica de la enfermedad (Rassi y Marin-Neto, 2010; Nagajyothi y col., 2012; Sánchez-Valdéz y col., 2018), así como el comportamiento pan-infectivo que presenta *T. cruzi* (Añez y Crisante, 2021; das Chagas Xavier y María Jansen, 2022; Malheiros Araújo Silvestrini y col., 2023). Por otro lado, la acción del sistema inmune juega un papel fundamental en el control de los niveles de parásitos circulantes una vez que las formas tripomastigote intracelulares son liberadas al torrente sanguíneo (Cerbán y col., 2020; Macaluso y col., 2023). De hecho, se han reportado numerosos casos de reactivación de la infección con aumento de la parasitemia y las manifestaciones clínicas de la enfermedad en pacientes inmunosuprimidos (Schijman y col., 2000; Diez y col., 2007; Biro y col., 2023; Fernandez y col., 2023).

Análisis del polimorfismo genético de poblaciones naturales de *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre y aislamientos de pacientes crónicos en ensayos clínicos con drogas tripanocidas.

Como se ha mencionado previamente, las poblaciones naturales de *T. cruzi* están formadas por múltiples clones, lo que crea una estructura policlonal compleja. Este panorama poblacional se ve muy influenciado por el cambio drástico de entorno desde el vector invertebrado hasta el hospedero humano. Este proceso, junto con la respuesta del sistema inmunitario, conduce a la eliminación de algunos clones durante la progresión de la infección (Macedo y col., 2002). Además, debido al polimorfismo genético de *T. cruzi*, diferentes clones pueden alojarse en distintos tejidos, lo que hace que la diversidad de clones infectantes sean factores determinantes en la evolución clínica de la enfermedad (Macedo y Segatto, 2010).

Por ejemplo, en pacientes con la forma cardio-digestiva de la enfermedad se han encontrado diferentes perfiles de PCR-RFLP de ADNk en las muestras de cada órgano, lo que indica una distribución diferencial de poblaciones de *T. cruzi* genéticamente distintas (Vago y col., 2000). Asimismo, se ha confirmado la existencia de diversas poblaciones parasitarias en muestras de sangre periférica y del sistema nervioso central en pacientes reactivados debido a la coinfección por VIH (Burgos y col., 2005; Burgos y col., 2008b). Por otro lado, en un estudio que analizó muestras de sangre colectadas en intervalos de 10 días de pacientes con infección crónica, se observó que aquellos que presentaban infecciones mixtas en la muestra inicial, solo presentaron solamente una UDT en las muestras sucesivas (Sánchez y col., 2013). Incluso se han detectado diferentes UDTs en muestras antes y después del tratamiento en pacientes con falla terapéutica (Martinez-Perez y col., 2016).

Por tal motivo, se ha postulado que el polimorfismo genético de *T. cruzi* podría estar implicado en su respuesta diferencial a drogas tripanocidas, sin embargo, la existencia y naturaleza de esa relación aún no han podido ser confirmadas (Murta y col., 1998; Villarreal y col., 2004; Zingales, 2018; Muñoz-Calderón y col., 2021a; Muñoz-Calderón y col., 2023). Por otro lado, aún no se ha dilucidado por completo el papel que desempeña la diversidad genética de este parásito en los contextos clínicos y terapéuticos de diferentes regiones endémicas. Hasta la fecha, no existen estudios genéticos de poblaciones naturales de *T. cruzi* que infecten a hospedadores humanos y que hayan permitido asociar genotipos específicos del parásito con eventos de falla terapéutica, ni esclarecer si este fenómeno se debe a resistencia natural o inducida.

En este sentido, tanto en décadas anteriores como en la actualidad, la mayoría de los estudios de diversidad genética y respuesta farmacológica realizados con muestras de pacientes, son llevados a cabo con poblaciones parasitarias obtenidas de estos parásitos y mantenidas en cultivos *in-vitro* (Filardi y Brener, 1987; Moreno y col., 2010; Vela y col., 2021; Jayawardhana y col., 2023; Rusman y col., 2023). Sin embargo, un detalle importante a considerar en estos estudios de caracterización molecular es que, durante el proceso de aislamiento y cultivo parasitario pueden

ocurrir eventos de selección clonal, por lo que las poblaciones de *T. cruzi* resultantes dependerán del método utilizado para su aislamiento a partir de la muestra de sangre del paciente y de las condiciones de cultivo en medio axénico (Macedo y col., 2002). En consecuencia, el perfil genético de las cepas aisladas en cultivo podría no coincidir con el de las poblaciones detectadas tanto en muestras directas de sangre periférica como de tejidos infectados. Estas observaciones fueron reafirmadas mediante los valores de CJ obtenidos al comparar poblaciones parasitarias mantenidas en cultivo axénico y poblaciones naturales de *T. cruzi* de los mismos pacientes (antes como después del tratamiento). En líneas generales, los valores de CJ fueron menores en las poblaciones de parásitos enriquecidos en cultivos, reflejando una menor diversidad genética.

Por lo tanto, con la finalidad de minimizar posibles efectos de selección clonal la caracterización genética mediante PCR-RFLP de estas poblaciones parasitarias, se realizó directamente sobre muestras de sangre periférica, sin procesos de enriquecimiento previo. Los resultados mostraron una variabilidad en los patrones electroforéticos entre las muestras de sangre antes y después del tratamiento. Esta variabilidad en las firmas de minicírculos se evidenció claramente en las muestras de las dos cohortes de pacientes con EChO (todas ellas identificadas como TcI). Sin embargo, este perfil de variabilidad no fue apreciado en los pacientes enrolados en el ensayo clínico de TRAENA, donde el 83% de las muestras tipificadas correspondieron a TcVI.

Según Lages-Silva y col. (2006), esta variabilidad intra-específica puede atribuirse, en términos generales, a la interacción entre el hospedero y el parásito, la cual está influenciada fuertemente por la respuesta inmune del primero. Asimismo, debido al elevado número de copias y las altas tasas de mutación en las regiones hipervariables del ADNk (Tarleton, 2001), la presión selectiva del huésped puede provocar la pérdida de copias de ADNk, lo que lleva al establecimiento de nuevos clones en las poblaciones parasitarias (Shapiro y Englund, 1995). Esto podría ser evidenciado en aquellos pacientes con CJ diferentes entre muestras recolectadas en diferentes momentos.

Por otra parte, la variabilidad genética del análisis de PCR-RFLP permitió observar menos del 40% de homología en las firmas de minicírculos entre las muestras Pre-TTO de diferentes pacientes pertenecientes a la misma micro-epidemia de transmisión oral de *T. cruzi*. Es decir, cada paciente presentó prácticamente un perfil único y exclusivo en su firma genética. Resultados similares han sido reportados mediante el análisis del ADNk utilizando la técnica de LSSP-PCR (Pena y col., 1994; Salazar y col., 2006).

Este resultado fue contradictorio a lo esperado, ya que los eventos de EChO ocurridos en Venezuela en 2007 y 2009 sugirieron eco-epidemiológicamente a poblaciones de *T. cruzi* UDT I haplotipo d, como una fuente única y homogénea de infección (Muñoz-Calderón y col., 2013; Díaz-Bello y col., 2014). En efecto, se esperaba encontrar perfiles muy similares en las firmas de minicírculos en las poblaciones naturales de *T. cruzi*, sugiriendo que poblaciones de *T. cruzi* dentro de una misma región geográfica y relacionadas genéticamente, puedan estar cumpliendo una función importante en la forma de transmisión de la enfermedad. Sin embargo, las caracterizaciones genéticas realizadas por Muñoz-Calderón y col. (2013) y Díaz-Bello y col. (2014) se llevaron a cabo utilizando cepas de *T. cruzi* aisladas de vectores, reservorios y pacientes, mantenidas en hemocultivos, sugiriendo que durante el proceso de cultivo *in-vitro* ocurrió una selección de subpoblaciones. Por lo tanto, los hallazgos de este estudio indican que la variabilidad genética observada directamente en las poblaciones naturales presentes en las muestras clínicas, respaldan la hipótesis de una fuente de infección policlonal.

***Trypanosoma cruzi* resistente a fármacos: Desde su caracterización molecular a la descripción de potenciales biomarcadores de respuesta farmacológica**

A pesar que en la literatura se han reportado múltiples casos de falla en el tratamiento con NFX y/o BZN, estos siguen siendo los fármacos de primera línea para tratar las infecciones por *T. cruzi* (Molina y col., 2014; Morillo y col., 2015; Morillo y col., 2017). Las razones subyacentes de estos resultados negativos en la respuesta farmacológica aún no se han resuelto. Se ha implicado a varios factores,

incluyendo los efectos de la toxicidad del fármaco (Caldas y col., 2019), el largo período de administración (60–90 días) (Olivera y col., 2017), la adherencia del paciente (Olivera y col., 2017), y la diversidad genética de *T. cruzi* (Mejia-Jaramillo y col., 2012; Francisco y col., 2017). Adicionalmente, se han propuesto mecanismos potenciales para la evasión farmacológica de *T. cruzi*, como la latencia parasitaria espontánea (Sánchez-Valdéz y col., 2018), la detención del ciclo celular inducida por el estrés (Dumoulin y Burleigh, 2018) y una disminución en la tasa de proliferación durante la etapa crónica (Ward y col., 2020). No obstante, hasta la fecha, ninguno de estos fenómenos ha podido relacionarse directamente con la marcada variabilidad en los niveles de susceptibilidad al BZN dentro de las poblaciones naturales de *T. cruzi* (Magalhães y col., 2022).

Aunque el modo preciso de acción de estos fármacos aún no se encuentra definido por completo, las pruebas actuales respaldan un mecanismo en el que los metabolitos altamente mutagénicos del NFX y BZN (incluyendo el glicoxal), causan daños generalizados al ADN genómico (Hall y Wilkinson, 2012; Rajao y col., 2014; Campos y col., 2017). Sin embargo, para que estos metabolitos sean liberados, tanto NFX como BZN deben ser activados dentro del parásito por alguna enzima, dado su carácter de prodroga (Kubata y col., 2002; Wilkinson y col., 2008; Mejia-Jaramillo y col., 2012).

Hasta la fecha, alrededor de 93 genes han sido vinculados con la respuesta al BZN, con diversas funciones biológicas como: activación de fármacos, transporte, defensa contra ROS y metabolismo, entre otros (Villarreal y col., 2005; Murta y col., 2006; Nogueira y col., 2006; Andrade y col., 2008; Campos y col., 2009). Se asume que estos genes participan en rutas de resistencia molecular en parásitos inducidos *in-vitro*, posiblemente actuando como mecanismos temporales y/o permanentes para contrarrestar y sobrevivir a la acción del BZN. Sin embargo, menos del 5% de estos genes han sido validados en su papel como precursores de los mecanismos de resistencia, y solamente uno, el gen TcNTR-1, ha sido directamente asociado con la resistencia inducida por NFX en *T. cruzi* (Wilkinson y col., 2008; Hall y col., 2011).

Por otra parte, de igual forma que en el caso de los estudios de diversidad genética de las firmas de minicírculos, la totalidad de los trabajos relacionados con el estudio de los mecanismos moleculares inherentes a la resistencia farmacológica de *T. cruzi* se han realizado utilizando como modelo, poblaciones parasitarias mantenidas en hemocultivos. Por lo tanto, como ya lo hemos discutido anteriormente, son poblaciones de parásitos que han podido sufrir selección de clones y disminución en la variabilidad natural de la población infectante original. Por esta razón, en esta tesis decidimos elegir 4 genes propuestos como involucrados en la evasión de los efectos citotóxicos del BZN, con la finalidad de realizar una caracterización genética de las poblaciones naturales de *T. cruzi* presentes en muestras clínicas de pacientes con ECh.

En líneas generales, hemos podido evidenciar la presencia de mutaciones puntuales en la caracterización genética de las 4 enzimas estudiadas. Dentro de estos SNPs caracterizados, cerca del 20% corresponden a mutaciones del tipo transición dependiente del UDT de la cepa/aislado. Este hallazgo pudo corroborarse al realizar el análisis de MLSTest sobre 25 cepas/aislados de *T. cruzi* con diferentes UDTs y niveles de susceptibilidad al fármaco BZN, donde la capacidad mínima discriminatoria del análisis solamente logró separar poblaciones parasitarias según su UDT en 4 *clusters* bien diferenciados, pero sin relacionarse directamente con su nivel de susceptibilidad farmacológica (**Figura 25**). Resulta intrigante, que el análisis de MLSTest no haya logrado asignar a tres cepas/aislados a ninguno de dichos *clusters* (PalV2, M5631 y CANIII). Esto puede deberse al origen biológico y a los UDTs correspondientes a cada una de ellas. El aislado PalV2, corresponde a una población TcI obtenida en la región norte de la Argentina a partir de un insecto vector (*T. infestans*) (Cura y col., 2010), por lo tanto, puede estar presentando mutaciones puntuales que la relacionan pobremente con las secuencias representantes del clúster TcI, conformado en su mayoría por cepas/aislados TcI provenientes del norte del continente (Venezuela, Colombia y Brasil). Respecto a las cepas M5631 y CANIII, aisladas de reservorio y humano respectivamente, pertenecen a las UDTs TcIII y TcIV, respectivamente (Stevens y col., 1998; Zingales y col., 2009), lo que sugiere que la presencia de SNPs diferentes entre sí pueden ser producto de su divergencia evolutiva (Sturm y Campbell, 2010; Reis-Cunha y col.,

2022). Será necesario caracterizar otras cepas pertenecientes a estos UDTs para constatar si los SNPs diferenciales hallados son características conservadas dentro de estos UDTs, o son características particulares de las cepas analizadas.

Ya se ha mencionado sobre la gran variabilidad genética que presenta *T. cruzi* independientemente del UDT al que pertenezca la cepa/aislado, sin embargo, también está claramente identificado que las mutaciones que dan origen a fenotipos resistentes a fármacos pueden aparecer en un sinfín de combinaciones complejas.

La resistencia de un organismo a un fármaco determinado puede ser el resultado de ciertos polimorfismos presentes en un solo gen, mientras que para otros fármacos, puede originarse por la aparición de mutaciones primarias que, combinadas con polimorfismos en otros genes, generan los fenotipos resistentes (Teppa y col., 2020). En este trabajo de Tesis observamos que conjuntos de secuencias de los genes *Tcntr-1*, *Tcoye* y *Tcacr* obtenidas a partir de poblaciones naturales de *T. cruzi* presentes en muestras clínicas, pueden ser utilizadas para extraer información sobre la respuesta de *T. cruzi* en pacientes tratados con NFX/BZN. En este sentido, consideramos que esta caracterización aporta nuevos conocimientos potencialmente útiles para avanzar en el abordaje integral de pacientes con ECh con diagnóstico de falla terapéutica, ya que por primera vez se ha logrado integrar la caracterización molecular de poblaciones de *T. cruzi* presentes en muestras de sangre (antes y/o después del tratamiento), al análisis *in-silico* de docking y dinámica molecular. Todo ello, basado en predicciones y modelados 3D a partir de las secuencias aminoacídicas de las enzimas TcNTR-1, TcOYE y TcAKR presentes en estas poblaciones naturalmente infectantes.

El presente análisis mostró patrones que contienen mutaciones sinónimas o no sinónimas presentes en residuos ubicados dentro o fuera de los dominios catalíticos de las tres enzimas estudiadas, pudiéndose correlacionar (al menos a nivel estadístico) alguna de estas mutaciones con valores de IC₅₀ que definen a esas poblaciones de *T. cruzi* como resistentes a BZN.

El análisis de las mutaciones en la enzima TcNTR-1 reveló que las poblaciones naturales de *T. cruzi* (inclusive a nivel intra-UDT) pueden presentar más de un tipo de mutaciones en su secuencia aminoacídica. Por ejemplo, se pudieron caracterizar 18 polimorfismos asociados a muestras tanto Pre-TTO como Post-TTO, siendo el 50% de ellos codones de terminación temprana (p.TcNTR-1_Asp5*, p. TcNTR-1_Trp18*, p. TcNTR-1_Leu26*, p. TcNTR-1_Ser76*, p. TcNTR-1_Met85*, p. TcNTR-1_Pro232*, p. TcNTR-1_Trp239*, p. TcNTR-1_Met243* y p. TcNTR-1_Tyr284*). Resultados similares fueron encontrados por Campos y col. (2014), quienes después del aislamiento *in-vitro* de tres clones resistentes a BZN (partiendo de una misma población parental de *T. cruzi* expuesta a presión selectiva con BZN), logró identificar una mutación generadora de un codón de terminación en el gen *Tcntr-1*. Sin embargo, a pesar de que esta mutación por sí sola fue insuficiente para explicar la diversidad inter-clonal de la resistencia al BZN observada (Campos y col., 2014), debemos tener en cuenta que la resistencia en estas poblaciones parasitarias fue alcanzada mediante presión farmacológica, lo que pudo haber alterado algún otro mecanismo molecular/celular de dichos parásitos.

Resultó intrigante que ninguno de los polimorfismos descritos en este estudio, fueron descritos previamente en secuencias del gen *Tcntr-1* caracterizadas a partir de 28 cepas colombianas, a pesar de presentar divergencias en la susceptibilidad *in-vitro* al BZN (CI₅₀ 1,5–35 µM) (Mejia-Jaramillo y col., 2012). Todos estos hallazgos podrían estar sugiriendo, que la resistencia a BZN originada por polimorfismos en la secuencia de TcNTR-1, es un rasgo adquirido que requiere de presión farmacológica (Petravicius y col., 2019).

Sin embargo, los polimorfismos que resultan en la formación de codones de terminación temprana o cambios en el marco de lectura, identificados en esta tesis a partir de poblaciones de parásitos aisladas por hemocultivo (antes del tratamiento) o de poblaciones naturales de *T. cruzi* presentes en muestras clínicas Pre-TTO, respaldan la hipótesis de la existencia de poblaciones naturalmente resistentes a NFX/BZN propuesta por Filardi & Brener (1987).

Al momento de caracterizar molecularmente la enzima TcNTR-1, pudimos observar que la zona que presentó mayor variabilidad de secuencia fue la región N-terminal (residuos 1 al 60). Resultados similares fueron hallados por Mejía-Jaramillo y col. (2012). En esta región, se ha reconocido filogenéticamente la presencia de una secuencia de direccionamiento mitocondrial (Wilkinson y col., 2008; Montenegro y col., 2017), inferida tanto en tripanosomátidos sensibles como resistentes al BZN. Sin embargo, solamente en poblaciones parasitarias de *Trypanosoma brucei* se ha podido demostrar experimentalmente que la secuencia ubicada en el extremo 5' dirige proteínas hacia la mitocondria (Wilkinson y col., 2008).

Análisis realizados sobre las secuencias de TcNTR-1 obtenidas en este trabajo mediante la herramienta MitProt-Pred (Mirza y col., 2013), identificaron la secuencia peptídica N-terminal de 18 residuos MKRNDIKRGLWDSLILYW, como un péptido de direccionamiento a mitocondria presente en todas las muestras clínicas evaluadas. Esta secuencia peptídica, fue previamente descrita para *T. cruzi* por Wilkinson y col. (2008), muestra un grado de conservación de aproximadamente 98% en las especies del género *Trypanosoma*, siendo una excepción *Trypanosoma rangeli*. Esta especie carece por completo del péptido de direccionamiento a mitocondria, por lo cual se ha hipotetizado que la señal mitocondrial se perdió en algún punto, probablemente durante la división de los subgéneros *Schizotrypanum* (*T. cruzi*) y *Herpetosoma* (*T. rangeli*) (Montenegro y col., 2017).

Los análisis realizados en este trabajo demostraron un alto grado de polimorfismo intra-*T. cruzi*, pudiéndose describir siete mutaciones a nivel de residuos, siendo identificadas tres de ellas como UDT dependientes (p.TcNTR-1_Gly9Arg, p.TcNTR-1_Trp11Leu y p.TcNTR-1_Leu16Ser), apareciendo exclusivamente en cepas/aislados del tipo TcII/V/VI. (**Figura 51**).

Como se ha señalado previamente, en el análisis de secuencias de TcNTR-1 realizado en este estudio, se han identificado diez codones de terminación temprana que hasta el momento no han sido descritos en la literatura científica. Resulta intrigante, que dos de dichos codones de terminación temprana se localicen dentro de este tracto de 18 residuos (p.TcNTR-1_Asp5* y p.TcNTR-1_Trp18*). Considerando que esta

región podría estar relacionada con funciones de direccionamiento a la mitocondria, este hallazgo podría estar sugiriendo una posible implicación funcional y reguladora específica de esta región en la biología subcelular de la enzima TcNTR-1.



Figura 51. Representación gráfica de la secuencia consenso de los primeros 18 residuos, a partir del alineamiento múltiple de 50 secuencias de la enzima TcNTR-1 obtenidas de poblaciones naturales de *Trypanosoma cruzi*.

Hasta el momento, no existe información que indique si este péptido señal es importante para la bioactivación del BZN. De hecho, la actividad de TcNTR-1 solo ha sido medida a partir de enzimas recombinantes que contienen solamente el dominio catalítico (Wilkinson y col., 2008; Voak y col., 2013). No obstante, estos datos sugieren la necesidad de verificar experimentalmente si estas secuencias peptídicas realmente direccionan hacia la mitocondria, si intervienen en los procesos de procesamiento del fármaco y si alguna modificación en su estructura puede incidir en fenotipos parasitarios resistentes a fármacos.

A diferencia de la región N-terminal, el alineamiento de las proteínas TcNTR-1 obtenidas en este trabajo, logró demostrar un porcentaje del 87,43% en la conservación de los residuos críticos involucrados en la interacción de su cofactor, la FMN. Al no contar con un modelo cristalizado de la enzima, la totalidad de los estudios de interacción entre la enzima TcNTR-1 y su cofactor presentados en la bibliografía, se han realizado basados en predicciones *in-silico*. Motivado a esto, no existe a la actualidad una definición exacta sobre cuáles son los residuos de contacto específicos entre la FMN y la enzima TcNTR-1. Sin embargo, Wilkinson y col. (2008) mediante comparación con la estructura cristalizada de la enzima NTR-1 de *Escherichia coli* B, logro definir a los residuos Arg92, Gln151, Gly265 y Arg304 como los de mayor importancia en la interacción Enzima-FMN, mediante la utilización del

programa TURBO y refinamiento con PROCHECK versión 2.0. Por su parte, tanto Araque Marin & Soto-Ospina (2018) como Cirqueira y col. (2022), realizando predicciones de estructura mediante I-TASSER y Swiss-Model, respectivamente, ubican el presunto sitio de interacción con la FMN entre los residuos Arg88, Ser90 y Arg300 (estabilizando el grupo fosfato de la cola de la FMN), y los residuos Lys92, Gln149 y Glu264 (estabilizando la región central del anillo de isoaloxazina).

Este estudio no fue una excepción en el uso de herramientas de simulación para definir la interacción enzima-cofactor. Se decidió realizar las predicciones de modelado utilizando el algoritmo más actual de predicción de estructuras proteicas basado en Machine Learning, AlphaFold. Los resultados obtenidos fueron similares a los descritos anteriormente, por lo que podría concluirse que la interacción de la FMN con la enzima TcNTR-1 se encuentra ubicada alrededor de los residuos Arg92, Ser92, Lys96, Gln147 y Gly263. Este hallazgo se respalda mediante cuatro análisis *in-silico* diferentes e independientes.

Respecto a las tasas de mutación de estos residuos de interacción, poco se conoce hasta el momento. No obstante, se ha reportado que la mutación en el residuo Arg88 provoca la pérdida completa de interacción con la FMN y, consecuentemente, de la actividad enzimática (Cirqueira y col., 2022). Por otro lado, las mutaciones en los residuos Ser92 y Arg300 resultan en una pérdida parcial de la actividad nitro-reductasa sin que ocurra una diferencia significativa en la unión de la FMN, lo que sugiere la poca relevancia de estos residuos en la interacción con los sustratos (Hall y Wilkinson, 2012). En nuestros datos, estos residuos muestran una identidad de secuencia cercana al 95% entre todas las muestras evaluadas. Encontramos polimorfismos exclusivamente en aquellas secuencias que presentaron cambios en el marco de lectura, los cuales fueron causados por mutaciones no sinónimas o codones de parada prematuros.

Uno de las evidencias más intrigantes obtenidas del análisis de secuencias para la enzima TcNTR-1 fue la caracterización de un polipéptido de Serina entre los residuos 72 y 78 (**Figura 52**). Este polipéptido es producto de una secuencia de microsatélite TCA ubicada entre los nucleótidos 211-237 y hasta el momento no

había sido descrito en las caracterizaciones moleculares de TcNTR-1 realizadas por Wilkinson y col. (2008), Mejia-Jaramillo y col. (2012), Campos y col. (2014, 2017), Araque Marín & Soto-Ospina (2018) y Cirqueira y y col. (2022). Esta región con repeticiones de Serina presenta dos características específicas:

- La primera de ellas es su ubicación, la cual ocurre entre la región N-terminal que contiene al péptido señal de direccionamiento a mitocondria y el dominio catalítico de la enzima.
- La segunda característica corresponde a su longitud. A partir del alineamiento múltiple de secuencia se pudo corroborar que este polipéptido de Serina presentaba una longitud variable entre 5 y 7 residuos.



Figura 52. Representación gráfica de la secuencia consenso del bloque de residuos 69 al 95, a partir del alineamiento múltiple de 50 secuencias de la enzima TcNTR-1 obtenidas de poblaciones naturales de *Trypanosoma cruzi*.

Inicialmente, pensamos que esta variación podría corresponderse a un polimorfismo UDT-dependiente, debido a que el polipéptido más largo (7 residuos) siempre fue caracterizado en poblaciones parasitarias TcI. Sin embargo, al ir sumando al estudio un mayor número de secuencias de la enzima obtenidas de poblaciones pertenecientes a diversos UDTs, se determinó que esta característica también podía ser encontrada en cepas/aislados TcIII o TcVI, aunque en mucha menor proporción (aproximadamente el 5% de las secuencias con esta característica). Posteriormente, hipotetizamos que la longitud del polipéptido podría estar asociada a susceptibilidad o resistencia farmacológica, pero los análisis de correlación entre la longitud del repetido de Serina y los valores de IC₅₀ de cepas/aislados caracterizados como susceptibles o resistentes a BZN, no resultaron estadísticamente significativos.

El análisis de bases de datos de secuencias ha demostrado que las repeticiones de un solo aminoácido no son raras en las proteínas (Katti y col., 2000). Sin embargo, se pueden encontrar registros que indican que la repetición de ciertos aminoácidos, como la Glutamina, Alanina, Glicina, Ácido Glutámico, puede influir en la estructura tridimensional y estabilidad de las proteínas y, por lo tanto, en su función (Green y Wang, 1994). Se ha demostrado que péptidos sintéticos de poli-Glutamina forman láminas β y podrían funcionar como cierres polares en interacciones proteína-proteína (Perutz y col., 1994). Por su parte, la Serina es un aminoácido que puede ser fosforilado, lo que sugiere que la presencia de repeticiones de Serina en ciertas regiones de una proteína podría influir en su capacidad para ser fosforilada. Esto sin duda afectará mecanismos importantes para la regulación en muchas vías metabólicas y de señalización celular (Sellis y col., 2012). Finalmente, análisis realizados en la base de datos SWISS-PROT sobre proteínas que contienen repeticiones de aminoácidos en tándem (aproximadamente 10 repeticiones), indican que las repeticiones de un solo aminoácido no han sido asignadas a ningún dominio funcional. De hecho, en muchos casos las repeticiones de un solo aminoácido muestran variaciones en longitud en la misma proteína entre especies, por lo que probablemente no cumplan ninguna función y sean solo un mecanismo para aumentar el tamaño de la proteína (Green y Wang, 1994), o simplemente estén actuando como separadores entre dominios (Golding, 1999). Por lo tanto, se puede especular que las expansiones de repeticiones de aminoácidos, especialmente de aminoácidos hidrofílicos (como la Serina), podrían ser toleradas hasta cierto punto si ocurren en las regiones de enlace y si pueden ser fácilmente solvatadas en la superficie de la proteína (Katti y col., 2000). Sin embargo, este es un campo todavía por explorar en poblaciones parasitarias con la plasticidad genómica de *T. cruzi*.

Ya se ha mencionado con anterioridad que en el caso de los fármacos NFX y BZN, los fenotipos de resistencia pueden surgir mediante un mecanismo de "pérdida de función". Un ejemplo claro de esto, son los aislados obtenidos por Wilkinson y col. (2008) que carecen de una copia completa del cromosoma que contiene el gen *Tcncr-1*. Sin embargo, estudios recientes han mostrado casos contrarios, es decir, poblaciones parasitarias que presentan resistencia farmacológica asociada con aumentos en el número de copias en los cromosomas 11 y 13, partiendo de

poblaciones parentales que presentan genes de copia simple (Campos y col., 2017). La explicación más simple para este hallazgo, es que el aumento en la expresión de uno o más de los genes relacionados contribuye al establecimiento del fenotipo resistente (Campos y col., 2017). Sin embargo, dada la plasticidad genética de *T. cruzi* ya ampliamente mencionada, no podemos excluir la posibilidad que estos aumentos en el número de copias hayan sido adquiridos independientemente por ciertos clones de la población parasitaria, y estos se hayan fijado en la población mediante procesos de selección clonal.

Ahora bien, en el genoma de *T. cruzi* podemos encontrar genes relacionados con el metabolismo de fármacos tripanocidas que presentan múltiples copias y/o su actividad está directamente relacionada, con los niveles de expresión en los estadios parasitarios. Este es el caso de las enzimas con actividad oxidorreductasa dependiente de NAD(P)H TcOYE y TcAKR.

Queda claro en la bibliografía que las enzimas TcOYE y TcAKR pueden reducir compuestos nitro-heterocíclicos, pero se conoce muy poco acerca de cuál es el rol biológico de estas enzimas, qué función cumplen en beneficio del parásito y finalmente, cuál es su implicancia en la interacción hospedero-patógeno y en la generación de resistencia parasitaria.

A partir de la caracterización molecular y posterior modelado *in-silico* de las estructuras terciarias de las enzimas TcOYE y TcAKR realizada con más de 30 secuencias de cepas/aislados de referencia, y de 17 secuencias obtenidas de poblaciones naturales de *T. cruzi*, pudimos determinar que ambas enzimas poseen estructuras terciarias muy similares con plegamiento del tipo $(\alpha/\beta)_{8-10}$ barril que corresponde a ocho o diez laminas β rodeadas de ocho a diez hélices α .

También se observó que, a pesar del gran número de polimorfismos presentes en las secuencias de la enzima TcAKR en comparación con TcOYE, tanto el análisis de evolución neutra (análisis Ka/Ks) como las predicciones *in-silico* de las estructuras terciarias, revelaron una alta conservación en ciertas regiones de la proteína, especialmente en los residuos catalíticos y el sitio de unión al cofactor. Estos

hallazgos respaldan investigaciones previas que sugieren una conservación significativa en ambas enzimas (Jez y col., 1997; Toogood y col., 2010; Díaz-Viraqué y col., 2018; Díaz-Viraqué y col., 2023). Gracias a su similitud estructural, y conservación de secuencias entre diversas especies de Kinetoplastideos (Díaz-Viraqué y col., 2018; Díaz-Viraqué y col., 2023), OYE y AKR han sido propuestas como potenciales dianas para el diseño de fármacos para terapias conjuntas dirigidas a especies del género *Leishmania*, *T. cruzi* y *T. brucei*. Sin embargo, la similitud estructural de la enzima TcAKR y la PGF₂ α sintasa de *Leishmania major* con su homólogo en humanos (PDB: 1ry8) constituye un obstáculo para estos diseños farmacológicos (Moen y col., 2015).

Varias características revelan la importancia de la actividad de las enzimas con capacidad PGF₂ α sintasa para los tripanosomátidos. Reportes previos han demostrado que parásitos con sobreexpresión de TcOYE, produjeron un pico de parasitemia más temprano y una carga parasitaria cardíaca aumentada en modelos de ratones (Benziger y col., 2017). Adicionalmente, estos parásitos con sobreexpresión de TcOYE presentaron una capacidad reducida para completar el ciclo de vida, lo que podría explicar la presencia de una mayor carga parasitaria en el tejido cardíaco en ratones infectados (Benziger y col., 2017). Además, la sobreexpresión de TcOYE también otorga a *T. cruzi* una mayor susceptibilidad frente al NFX (Díaz-Viraqué y col., 2018). Sin embargo, se ha observado que bajo exposición continua al fármaco NFX, el gen TcOYE se inactiva, lo que sugiere su participación en mecanismos de resistencia farmacológica (Murakami y col., 2013; García-Huertas y col., 2017).

Con respecto a TcAKR, estudios funcionales recientes determinaron que la enzima está implicada en el metabolismo reductor de BZN (Garavaglia y col., 2016), pero no hay ningún reporte *in-vivo* que corrobore su actividad reductora frente a NFX. En cuanto a los niveles de proteína, se ha descrito que su sobreexpresión en *T. brucei* no afecta la susceptibilidad frente a NFX (Hall y col., 2011). Sin embargo, tanto Díaz-Viraqué y col. (2023), Garavaglia y col., (2016) y González y col. (2017), han demostrado que la sobreexpresión de AKR originó un aumento de la resistencia de *T. cruzi* frente a BZN.

Los resultados provistos por esta tesis, no se basaron en el estudio de los valores de expresión del gen TcOYE o TcAKR, pero a través del estudio de caracterización genética fue posible asociar cambios en los marcos de lectura y/o codones de terminación temprana con muestras de pacientes con un diagnóstico establecido de falla terapéutica (p.TcOYE_Leu13*, p.TcOYE_Arg19Valfs*9, p.TcOYE_His106*, p.TcOYE_Arg169Glyfs*85, p.TcOYE_Ala187Valfs*67, p.TcOYE_Cys238Alafs*16, p.TcOYE_Glu361*, p.TcAKR_Tyr51*, p.TcAKR_Val75*, p.TcAKR_Ser82*, p.TcAKR_Thr121*, p.TcAKR_Ile137*, p.TcAKR_Pro144*, p.TcAKR_Val160*, p.TcAKR_Trp188*, p.TcAKR_Trp248* y p.TcAKR_Arg268*). Estos codones de terminación temprana en ciertas copias de TcOYE y TcAKR, darán como resultado una síntesis de proteína incompleta, disminuyendo la cantidad de enzima total disponible en las poblaciones parasitarias en estos pacientes y, por lo tanto, disminución en la susceptibilidad frente a los fármacos NFX/BZN.

A pesar de estas limitaciones derivadas del tratamiento de la ECh con los fármacos disponibles, su actividad anti-*T. cruzi* es particularmente interesante, dado que una sola dosis administrada puede disminuir rápidamente la carga parasitaria en un 90% o más, y los protocolos de tratamiento abreviados pueden lograr la cura parasitológica en ratones y humanos (Sánchez-Valdéz y col., 2018). Sin embargo, los regímenes de tratamiento convencionales de 30 días e incluso de 60 días tienen tasas de fracaso que superan el 50% (Añez y col., 2015). Las diferencias en los resultados del tratamiento son multifactoriales, donde podemos mencionar el inóculo inicial de infección, la genética parasitaria, el tiempo de infección, la respuesta inmunitaria del huésped, entre otros.

Si a esto le sumamos que, existe evidencia experimental que tanto TcOYE como TcAKR se encuentran reguladas de manera diferencial a lo largo del ciclo de vida de *T. cruzi* (Díaz-Viraqué y col., 2018; Díaz-Viraqué y col., 2023), el panorama se complica mucho más. Se ha podido demostrar, que ambas enzimas son expresadas solamente en las formas replicativas del parásito (epimastigote y amastigote) a nivel de proteína y ARNm, pero no son detectables en las formas tripomastigote. En particular, para el caso de TcOYE no es posible su detección en las formas tripomastigote antes que ocurra la infección de células mamíferas y tampoco cuando

los parásitos comienzan a diferenciarse en formas tripomastigote intracelulares (antes de liberarse del citoplasma de la célula infectada), lo que sugiere que esta proteína no es relevante al principio y al final del ciclo de infección intracelular (Díaz-Viraqué y col., 2018).

Por lo tanto, teniendo en cuenta que NFX y BZN son prodrogas que necesitan ser metabolizadas por los parásitos para liberar sus compuestos activos, que han demostrado un efecto tripanocida confirmado contra las formas tripomastigote y amastigote de *T. cruzi*, que las enzimas TcOYE y TcAKR están expresadas en las formas replicativas del parásito pero no en los estadios tripomastigote, y que investigaciones recientes han sugerido que algunas formas amastigotes podrían entrar en un estado de latencia (Sánchez-Valdéz y col., 2018; Barrett y col., 2019; Bustamante y col., 2020), podríamos inferir que una de las principales causas de evasión de fármacos por parte del parásito, y que eventualmente podría llevar al fracaso terapéutico, radica en las limitadas vías de metabolización de NFX y/o BZN por parte de *T. cruzi* durante la infección. Esto indica que la búsqueda de tratamientos farmacológicos con mecanismos de acción diferentes a los disponibles actualmente se vuelve una prioridad.

Uno de los principales obstáculos para el desarrollo clínico de nuevos medicamentos para la ECh sin duda alguna, es la falta de una prueba adecuada que pueda evaluar el éxito del tratamiento de manera oportuna. La definición de criterios de cura para la ECh ha sido motivo de debate desde hace años, motivado al desarrollo y la patología complicadas de la enfermedad, complejidades del ciclo de vida del parásito y sus interacciones con el huésped. Otro problema es la falta de consenso sobre la evaluación de la eficacia del tratamiento y las herramientas inadecuadas para abordarlo (Ruiz-Lancheros y col., 2019).

Todos los esfuerzos actuales de desarrollo de nuevos medicamentos para la ECh están centrados en estrategias para eliminar al parásito por completo del organismo. Sin embargo, no existe una prueba absoluta que demuestre que la cura parasitológica es sinónimo de cura clínica. Hasta el momento, la única herramienta para evaluar eficacia del tratamiento son las pruebas serológicas (seroconversión)

(Falk y col., 2022). Sin embargo, para que pueda observarse seroconversión en un paciente adulto tratado, pueden transcurrir décadas, haciéndola poco útil para concluir la eficacia de tratamiento en ensayos clínicos (Alonso-Padilla y col., 2020).

Los ensayos clínicos son y seguirán siendo el estándar de oro para medir la eficacia de los medicamentos, pero cuando es posible contar con marcadores de resistencia molecular bien caracterizados en el modelo de estudio, su simplicidad de uso, robustez y escalabilidad los convierten en un complemento potencialmente poderoso para los ensayos clínicos (Plowe y col., 2007).

Por ejemplo, en el contexto de la malaria, el valor potencial para la salud pública que ha significado caracterizar marcadores de resistencia molecular radica en su utilidad como herramientas para la vigilancia de los valores de sensibilidad de las diversas especies de *Plasmodium* frente a los medicamentos (Denis y col., 2006; Plowe y col., 2007). Un ejemplo claro de la utilidad de los marcadores moleculares de resistencia en salud pública, ocurrió cuando Tanzania necesitó urgentemente un reemplazo del tratamiento antimalárico. La prevalencia de los marcadores de resistencia a Sulfadoxina-Pirimetamina (SP) predijo que inicialmente sería más efectiva que la Cloroquina, pero su eficacia pronto se vería comprometida. Basándose en esta información, el Ministerio de Salud de dicho país adoptó a la SP como fármaco de primera línea disponible, mientras buscaba activamente un tratamiento más efectivo (Djimdé y col., 2004).

En el panorama de la ECh, esta tesis aporta la primera caracterización molecular de polimorfismos en genes posiblemente involucrados en mecanismos de activación de los dos medicamentos disponibles para el tratamiento, presentes directamente en una muestra representativa de la variabilidad genética de *T. cruzi*, así como en muestras clínicas de pacientes. Para evaluar su importancia clínica, los marcadores moleculares obtenidos mediante análisis de correlación y MDR fueron evaluados en un reducido número de muestras de pacientes que fueron caracterizados con falla terapéutica, encontrándose un 34,2% de concordancia. Sin embargo, lograr establecer el valor predictivo de estos marcadores moleculares todavía implica un

gran desafío por delante, principalmente porque distintos factores de la resistencia intrínseca del parásito afectan estos resultados.

A pesar de que los marcadores seleccionados en este trabajo (TcNTR-1_D5*, TcNTR-1_W20*, TcNTR_S77_L78InsSS, TcNTR_S76*, TcOYE_L13W y TcAKR_T121*) correlacionan casi perfectamente con valores de resistencia *in-vitro*, otros factores como la inmunidad adquirida, la carga parasitaria, el cumplimiento de los regímenes de tratamiento, la dosificación y la farmacocinética inciden en los procesos de selección clonal y selección de poblaciones parasitarias resistentes.

Por lo tanto, la utilización de modelos multivariantes que tengan en cuenta la farmacocinética y otros factores que contribuyan a explicar la eficacia del tratamiento mejorarían la capacidad predictiva de los marcadores moleculares para la resistencia (Plowe y col., 2007).

Consideraciones finales y perspectivas a futuro

Diversos estudios han mostrado que los efectos mutagénicos inducidos por el tratamiento con BZN pueden ser extensos y afectar a todo el genoma de *T. cruzi*, con una variedad de consecuencias fenotípicas, incluida una capacidad reducida de reparación del ADN y resistencia a múltiples fármacos. Estos resultados tienen muchos paralelismos con la situación de resistencia farmacológica evidenciada en diversos tipos de cáncer, donde la presión selectiva, junto con la adquisición temprana de defectos en la maquinaria de activación de fármacos o reparación del ADN, pueden impulsar al desarrollo de resistencia.

Independientemente del mecanismo exacto responsable de la resistencia farmacológica en *T. cruzi* o del desarrollo de nuevos fármacos con mecanismos de acción diferentes al NFX o BZN, con el fin de poder realizar terapias combinadas, es crucial llevar a cabo un monitoreo cuidadoso de los pacientes. Esto es indispensable, incluso cuando se emplea una segunda línea de tratamiento, debido a la plasticidad genética que presenta *T. cruzi*. En este sentido, los resultados obtenidos a partir del meta-análisis realizado en esta tesis pretenden reforzar la importancia del

seguimiento farmacológico de *T. cruzi* sobre estadios relevantes para la infección humana (formas tripomastigote o amastigote). Esto puede derivar en una perspectiva experimental más real de la susceptibilidad de *T. cruzi* frente a NFX/BZN, con la finalidad de obtener un mapa epidemiológico de resistencia más completo que, sin duda alguna, favorecerá al desarrollo de nuevas formulaciones para el tratamiento de la ECh.

Por otro lado, aunque debemos ser cuidadosos al extrapolar los resultados obtenidos *in-vitro* a la clínica, los resultados obtenidos en esta tesis subrayan la necesidad de continuar realizando estudios de caracterización genética en poblaciones naturalmente infectantes de *T. cruzi*, utilizando muestras de sangre de pacientes con ECh. La heterogeneidad poblacional identificada en este tipo de muestras (tanto Pre-TTO como Post-TTO), en comparación con las poblaciones parasitarias del mismo paciente establecidas en cultivos *in-vitro*, ha demostrado la importancia de considerar la subestimación de la variabilidad genética al clasificar un aislado de *T. cruzi* como susceptible o resistente al tratamiento etiológico. El conocimiento de la heterogeneidad en las poblaciones de *T. cruzi*, es crucial para determinar si la aparición de polimorfismos en genes asociados a resistencia farmacológica, es resultado de la presión selectiva del fármaco (análisis Post-TTO) o proviene de mutaciones naturales que han contribuido al fracaso terapéutico.

Consideramos importante destacar que, la vigilancia epidemiológica de los cambios genéticos en agentes causales de enfermedades desatendidas ha logrado ser útil para predecir la resistencia farmacológica, mejorar los tratamientos y prevenir la propagación de enfermedades como la Malaria. Para realizar lo mismo en la ECh, es crucial realizar un estudio más detallado de los polimorfismos presentes en genes como *Tcntr-1*, *Tcoye* y *Tcacr* en diversas poblaciones de pacientes infectados con *T. cruzi*. Además, es imprescindible identificar nuevos genes que puedan servir como marcadores de resistencia. No obstante, para avanzar en esta línea de investigación, resulta fundamental disponer de una amplia base de datos que contenga estructuras proteicas cristalizadas mediante difracción de rayos X.

Finalmente, dado que la regulación de la expresión génica en *T. cruzi* ocurre principalmente a nivel post-transcripcional, es crucial verificar si los niveles de expresión de aquellos transcritos que presenten los polimorfismos caracterizados más frecuentes, se traducen en una cierta abundancia de estas enzimas en cuestión. También será interesante verificar si, los parásitos transfectados con genes que contienen estas variantes polimórficas muestran un incremento en la resistencia a BZ y a otros fármacos. Experimentos en esta dirección están en marcha en el laboratorio, utilizando para ello herramientas de CRISPR-Cas9.

BIBLIOGRAFIA

- Ackermann, A.A., Panunzi, L.G., Cosentino, R.O., Sánchez, D.O., yAgüero, F. (2012). A genomic scale map of genetic diversity in *Trypanosoma cruzi*. *BMC genomics* 13, 1-17.
- Alarcón de Noya, B., Díaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Mauriello, L., Muñoz-Calderón, A., y col. (2015). Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 110, 377-386.
- Alarcón de Noya, B., Díaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Mauriello, L., Zavala-Jaspe, R., y col. (2010). Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *The Journal of infectious diseases* 201(9), 1308-1315.
- Alarcón de Noya, B., Díaz-Bello, Z., Colmenares, C., Zavala-Jaspe, R., Abate, T., yContreras, R. (Year). "Clinical and laboratory follow-up of the two largest oral outbreaks of Chagas disease", in: *XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII congress of the Brazilian society of tropical medicine*, 97-98.
- Alarcón de Noya, B., yMartinez, J. (2009). Transmisión oral de la enfermedad de Chagas en Venezuela: un segundo brote escolar. *Salus* 13(2), 9.
- Alarcón de Noya, B., yNoya González, O. (2019). Orally Transmitted Chagas Disease: Biology, Epidemiology, and Clinical Aspects of a Foodborne Infection. *Chagas Disease: A Clinical Approach*, 225-241.
- Alarcon de Noya, B., Ruiz-Guevara, R., Noya, O., Castro, J., Ossenkopp, J., Díaz-Bello, Z., y col. (2017). Long-term comparative pharmacovigilance of orally transmitted Chagas disease: first report. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 15(3), 319-325.
- Alonso-Padilla, J., Abril, M., Alarcón de Noya, B., Almeida, I.C., Angheben, A., Araujo Jorge, T., y col. (2020). Target product profile for a test for the early assessment of treatment efficacy in Chagas disease patients: An expert consensus. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 14(4), e0008035.
- Alonso-Padilla, J., Cortés-Serra, N., Pinazo, M.J., Bottazzi, M.E., Abril, M., Barreira, F., y col. (2019). Strategies to enhance access to diagnosis and treatment for Chagas disease patients in Latin America. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 17(3), 145-157.
- Álvarez, M.G., Ramírez, J.C., Bertocchi, G., Fernández, M., Hernández, Y., Lococo, B., y col. (2020). New scheme of intermittent benznidazole administration in patients chronically infected with *Trypanosoma cruzi*: clinical, parasitological, and serological assessment after three years of follow-up. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 64(9), 10.1128/aac.00439-00420.
- Andrade, D.V., Gollob, K.J., yDutra, W.O. (2014). Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. *PLoS neglected tropical diseases* 8(7), e3010.
- Andrade, H.M., Murta, S.M., Chapeaurouge, A., Perales, J., Nirdé, P., yRomanha, A.J. (2008). Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to benznidazole. *Journal of proteome research* 7(6), 2357-2367.
- Andrade, S.G., Andrade, V., Brodskyn, C., Magalhaes, J., yNetto, M.B. (1985). Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 79(4), 397-407.

- Andrade, S.G., yMagalhães, J.B. (1997). Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 30, 27-35.
- Anselmi, A., yMoleiro, F. (Year). "Pathogenic mechanisms in Chagas' cardiomyopathy", in: *Ciba Foundation Symposium 20-Trypanosomiasis and Leishmaniasis (with Special Reference to Chagas' Disease)*: Wiley Online Library), 125-136.
- Antinori, S., Galimberti, L., Bianco, R., Grande, R., Galli, M., yCorbellino, M. (2017). Chagas disease in Europe: a review for the internist in the globalized world. *European Journal of Internal Medicine* 43, 6-15.
- Añez, N., yCrisante, G. (2021). The tissue specific tropism in *Trypanosoma cruzi*. Is it true? *Acta tropica* 213, 105736.
- Añez, N., Crisante, G., Rojas, A., Araujo, S., Liuzza, A., Mesa, J., y col. (2015). A follow-up study of chagasic patients with special reference to *Trypanosoma cruzi* persistence and criteria of Chagas disease cure. *Int J Clin Med Res* 2(3), 20-29.
- Apt, W., Llancaqueo, M., Zulantay, I., Canals, M., Kara, S., Arribada, A., y col. (2021). Clinical, electrocardiographic and echocardiographic evolution of chronic Chagas disease treated with nifurtimox on prolonged follow-up in Chile: observational study. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 27, 160-166.
- Arantes, P.R., Polêto, M.D., Pedebos, C., yLigabue-Braun, R. (2021). Making it rain: cloud-based molecular simulations for everyone. *Journal of Chemical Information and Modeling* 61(10), 4852-4856.
- Avila, H., Goncalves, A.M., Nehme, N.S., Morel, C.M., ySimpson, L. (1990). Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. *Molecular and biochemical parasitology* 42(2), 175-187.
- Baldoni, N.R., de Oliveira-da Silva, L.C., Gonçalves, A.C.O., Quintino, N.D., Ferreira, A.M., Bierrenbach, A.L., y col. (2024). Gastrointestinal Manifestations of Chagas Disease: A Systematic Review with Meta-Analysis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, tpmd230323.
- Balzi, E., yGoffeau, A. (1994). Genetics and biochemistry of yeast multidrug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1187(2), 152-162.
- Barcan, L.A., Smud, A., Besuschio, S.A., Giorgio, P.L., Temporiti, E., Salgueira, C., y col. (2023). Quantitative PCR-based diagnosis and follow-up of Chagas disease primary infection after solid organ transplant: a multicentre study. *The Journal of Infectious Diseases* 228(9), 1304-1308.
- Barrett, M.P., Kyle, D.E., Sibley, L.D., Radke, J.B., yTarleton, R.L. (2019). Protozoan persister-like cells and drug treatment failure. *Nature Reviews Microbiology* 17(10), 607-620.
- Bastos, C.J., Aras, R., Mota, G., Reis, F., Dias, J.P., Jesus, R.S.d., y col. (2010). Clinical outcomes of thirteen patients with acute Chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. *PLoS neglected tropical diseases* 4(6), e711.
- Benjamin, R.J., Stramer, S.L., Leiby, D.A., Dodd, R.Y., Fearon, M., yCastro, E. (2012). *Trypanosoma cruzi* infection in North America and Spain: evidence

- in support of transfusion transmission (CME). *Transfusion* 52(9), 1913-1921.
- Benziger, C.P., do Carmo, G.A.L., yRibeiro, A.L.P. (2017). Chagas cardiomyopathy: clinical presentation and management in the Americas. *Cardiology clinics* 35(1), 31-47.
- Bermudez, J., Davies, C., Simonazzi, A., Real, J.P., yPalma, S. (2016). Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta tropica* 156, 1-16.
- Bern, C. (2015). Chagas' disease. *New England Journal of Medicine* 373(5), 456-466.
- Biro, M., Hill, A.L., Cardis, M., Pasieka, H.B., yFarhat, F.Z. (2023). Chagas disease reactivation associated with cutaneous vasculitis in a heart transplant patient. *JAAD Case Reports* 42, 42-44.
- Borst, P., yOuellette, M. (1995). New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annual review of microbiology* 49, 427-461.
- Braunwald, E. (1989). Harrison: Principios de medicina interna.
- Brener, Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Reviews in Microbiology* 27(1), 347-382.
- Brener, Z. (1979). "*Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas," in *Trypanosoma Cruzii e doença de Chagas*.), 463-463.
- Brenière, S.F., Waleckx, E., yBarnabé, C. (2016). Over six thousand *Trypanosoma cruzi* strains classified into discrete typing units (DTUs): attempt at an inventory. *PLoS neglected tropical diseases* 10(8), e0004792.
- Brisse, S., Barnabé, C., yTibayrenc, M. (2000). Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *International journal for parasitology* 30(1), 35-44.
- Britto, C.C. (2009). Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 122-135.
- Buckner, F.S. (2008). Sterol 14-demethylase inhibitors for *Trypanosoma cruzi* infections. *Drug targets in kinetoplastid parasites*, 61-80.
- Burgos, J.M., Altcheh, J., Bisio, M., Duffy, T., Valadares, H.M., Seidenstein, M.E., y col. (2007). Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *International journal for parasitology* 37(12), 1319-1327.
- Burgos, J.M., Begher, S., Silva, H.M.V., Bisio, M., Duffy, T., Levin, M.J., y col. (2008a). Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* I tropism for central nervous system in Chagas reactivation due to AIDS. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 78(2), 294-297.
- Burgos, J.M., Begher, S., Valadares Silva, H.M., Bisio, M., Duffy, T., Levin, M.J., y col. (2008b). Case report: Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* I tropism for central nervous system in Chagas reactivation due to AIDS. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 78(2), 294-297.
- Burgos, J.M., Bergher, S.B., Freitas, J.M., Bisio, M.M.C., Altcheh, J.M., Teixeira, R., y col. (2005). Molecular diagnosis and typing of *Trypanosoma cruzi* populations and lineages in cerebral Chagas disease in a patient with AIDS.

- Burgos, J.M., Diez, M., Vigliano, C., Bisio, M., Risso, M., Duffy, T., y col. (2010). Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clinical Infectious Diseases* 51(5), 485-495.
- Bustamante, J.M., Sanchez-Valdez, F., Padilla, A.M., White, B., Wang, W., yTarleton, R.L. (2020). A modified drug regimen clears active and dormant trypanosomes in mouse models of Chagas disease. *Science translational medicine* 12(567), eabb7656.
- Bustos, P.L., Milduberger, N., Volta, B.J., Perrone, A.E., Laucella, S.A., yBua, J. (2019). *Trypanosoma cruzi* infection at the maternal-fetal interface: implications of parasite load in the congenital transmission and challenges in the diagnosis of infected newborns. *Frontiers in Microbiology* 10, 1250.
- Cafferata, M.L., Toscani, M.A., Althabe, F., Belizán, J.M., Bergel, E., Berrueta, M., y col. (2020). Short-course Benznidazole treatment to reduce *Trypanosoma cruzi* parasitic load in women of reproductive age (BETTY): a non-inferiority randomized controlled trial study protocol. *Reproductive Health* 17, 1-23.
- Caldas, I.S., Santos, E.G., yNovaes, R.D. (2019). An evaluation of benznidazole as a Chagas disease therapeutic. *Expert opinion on pharmacotherapy* 20(15), 1797-1807.
- Camandaroba, E., Thé, T.S., Pessina, D.H., yAndrade, S.G. (2006). *Trypanosoma cruzi*: clones isolated from the Colombian strain, reproduce the parental strain characteristics, with ubiquitous histotropism. *International journal of experimental pathology* 87(3), 209-217.
- Campbell, D.A., Westenberger, S.J., ySturm, N.R. (2004). The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Current molecular medicine* 4(6), 549-562.
- Campos, F.M., Liarte, D.B., Mortara, R.A., Romanha, A.J., yMurta, S.M. (2009). Characterization of a gene encoding alcohol dehydrogenase in benznidazole-susceptible and-resistant populations of *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropica* 111(1), 56-63.
- Campos, M.C., Leon, L.L., Taylor, M.C., yKelly, J.M. (2014). Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: evidence that distinct mechanisms can act in concert. *Molecular and biochemical parasitology* 193(1), 17-19.
- Campos, M.C., Phelan, J., Francisco, A.F., Taylor, M.C., Lewis, M.D., Pain, A., y col. (2017). Genome-wide mutagenesis and multi-drug resistance in American trypanosomes induced by the front-line drug benznidazole. *Scientific reports* 7(1), 14407.
- Cançado, J. (2000). Tratamento etiológico da doença de Chagas pelo benzonidazol. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas* 2, 389-405.
- Cançado, J.R. (2002). Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 44, 29-37.
- Cancino-Faure, B., Fisa, R., Riera, C., Bula, I., Girona-Llobera, E., yJimenez-Marco, T. (2015). Evidence of meaningful levels of *Trypanosoma cruzi* in platelet concentrates from seropositive blood donors. *Transfusion* 55(6), 1249-1255.
- Carlier, Y., Altcheh, J., Angheben, A., Freilij, H., Luquetti, A.O., Schijman, A.G., y col. (2019). Congenital Chagas disease: updated recommendations for prevention, diagnosis, treatment, and follow-up of newborns and siblings,

- girls, women of childbearing age, and pregnant women. *PLoS neglected tropical diseases* 13(10), e0007694.
- Carneiro, M., Romanha, A., yChiari, E. (1991). Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 86, 387-393.
- Casadei, D. (Year). "Chagas' disease and solid organ transplantation", in: *Transplantation proceedings*, 3354-3359.
- Cerbán, F.M., Stempin, C.C., Volpini, X., Silva, E.A.C., Gea, S., yMotran, C.C. (2020). Signaling pathways that regulate *Trypanosoma cruzi* infection and immune response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1866(5), 165707.
- Chirac, P., yTorreele, E. (2006). Global framework on essential health R&D. *Lancet* 367(9522), 1560-1560.
- Cirqueira, M.L., Bortot, L.O., Bolean, M., Aleixo, M.A., Luccas, P.H., Costa-Filho, A.J., y col. (2022). *Trypanosoma cruzi* nitroreductase: Structural features and interaction with biological membranes. *International Journal of Biological Macromolecules* 221, 891-899.
- Cortes-Serra, N., Losada-Galvan, I., Pinazo, M.-J., Fernandez-Becerra, C., Gascon, J., yAlonso-Padilla, J. (2020). State-of-the-art in host-derived biomarkers of Chagas disease prognosis and early evaluation of anti-*Trypanosoma cruzi* treatment response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1866(7), 165758.
- Coura, J.R. (2006). Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39, 113-117.
- Coura, J.R. (2014). The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-A comprehensive review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 110, 277-282.
- Coura, J.R., de Abreu, L., Pereira, J.B., yWillcox, H.P. (1985). Morbidity in Chagas' disease. IV. longitudinal study of 10 years in Pains and Iguatama, Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 80(1), 73-80.
- Coura, J.R., yDe Castro, S.L. (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97, 3-24.
- Cuervo, P., Domont, G.B., yDe Jesus, J.B. (2010). Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *Journal of Proteomics* 73(5), 845-867.
- Cura, C., ySchijman, A.G. (2013). Relación entre los genotipos de *T. cruzi* y la presentación clínica de la Enfermedad de Chagas. *Revista Española de Salud Pública*, 9-16.
- Cura, C.I., Duffy, T., Lucero, R.H., Bisio, M., Péneau, J., Jimenez-Coello, M., y col. (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.
- Cura, C.I., Lattes, R., Nagel, C., Gimenez, M., Blanes, M., Calabuig, E., y col. (2013). Early molecular diagnosis of acute Chagas disease after transplantation with organs from *Trypanosoma cruzi*-infected donors. *American Journal of Transplantation* 13(12), 3253-3261.
- Cura, C.I., Mejía-Jaramillo, A.M., Duffy, T., Burgos, J.M., Rodriguez, M., Cardinal, M.V., y col. (2010). *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite

- motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes. *International journal for parasitology* 40(14), 1599-1607.
- D'Ávila, D.A., Macedo, A.M., Valadares, H.M.S., Gontijo, E.D., de Castro, A.M., Machado, C.R., y col. (2009). Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. *Journal of Clinical Microbiology* 47(6), 1718-1725.
- da Costa, K.M., Valente, R.d.C., Fonseca, L.M.d., Freire-de-Lima, L., Previato, J.O., yMendonça-Previato, L. (2022). The History of the ABC Proteins in Human Trypanosomiasis Pathogens. *Pathogens* 11(9), 988.
- Da Silva, N.N., Clausell, D.T., Nolibos, H., de Mello, A.L., Ossanai, J., Raponte, T., y col. (1968). Surto epidêmico da doença de Chagas com provável contaminação oral. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 10(5), 265-276.
- das Chagas Xavier, S.C., yMaría Jansen, A. (2022). Enzootic cycle of *Trypanosoma cruzi*: Environmental diagnosis and sentinel dogs. *Biomédica: Revista del Instituto Nacional de Salud* 42.
- De Araújo, F., Corrêa-Oliveira, R., Rocha, M.O.d.C., Chaves, A.T., Fiuza, J.A., Fares, R.C.G., y col. (2012). Foxp3+ CD25high CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. *Immunobiology* 217(8), 768-777.
- Deane, M.P., Sousa, M.A., Pereira, N.M., Gonçalves, A.M., Momen, H., yMOREL, C.M. (1984). *Trypanosoma cruzi*: Inoculation Schedules and Re-isolation Methods Select Individual Strains from Doubly Infected Mice, as Demonstrated by Schizodeme and Zymodeme Analyses 1. *The Journal of protozoology* 31(2), 276-280.
- Denis, M.B., Tsuyuoka, R., Lim, P., Lindegardh, N., Yi, P., Top, S.N., y col. (2006). Efficacy of artemether–lumefantrine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in northwest Cambodia. *Tropical medicine & international health* 11(12), 1800-1807.
- Desale, H., Buekens, P., Alger, J., Cafferata, M.L., Harville, E.W., Herrera, C., y col. (2022). Epigenetic signature of exposure to maternal *Trypanosoma cruzi* infection in cord blood cells from uninfected newborns. *Epigenomics* 14(15), 913-927.
- Di Noia, J.M., Buscaglia, C.A., De Marchi, C.R., Almeida, I.C., yFrasch, A.C. (2002). A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *The Journal of experimental medicine* 195(4), 401-413.
- Dias, J.C.P. (1989). The indeterminate form of human chronic Chagas' disease: a clinical epidemiological review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 22, 147-156.
- Dias, J.C.P. (2006). The treatment of Chagas disease (South American trypanosomiasis). *Annals of internal medicine* 144(10), 772-774.
- Dias, J.P., Bastos, C., Araújo, E., Mascarenhas, A.V., Martins Netto, E., Grassi, F., y col. (2008). Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41, 296-300.
- Diaz de Toranzo, E., Castro, J., Franke de Cazzulo, B., yCazzulo, J. (1988). Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia* 44, 880-881.

- Díaz-Bello, Z., de Noya, B.A., Muñoz-Calderón, A., Ruiz-Guevara, R., Mauriello, L., Colmenares, C., y col. (2021). Ten-year follow-up of the largest oral Chagas disease outbreak. laboratory biomarkers of infection as indicators of therapeutic failure. *Acta Tropica* 222, 106034.
- Díaz-Bello, Z., Thomas, M.d.C., Lopez, M., Zavala-Jaspe, R., Noya, O., de Noya, B.A., y col. (2014). Trypanosoma cruzi genotyping supports a common source of infection in a school-related oral outbreak of acute Chagas disease in Venezuela. *Epidemiology & Infection* 142(1), 156-162.
- Díaz-Viraqué, F., Chiribao, M.L., Paes-Vieira, L., Machado, M.R., Faral-Tello, P., Tomasina, R., y col. (2023). New Insights into the Role of the Trypanosoma cruzi Aldo-Keto Reductase Tc AKR. *Pathogens* 12(1), 85.
- Díaz-Viraqué, F., Chiribao, M.L., Trochine, A., González-Herrera, F., Castillo, C., Liempi, A., y col. (2018). Old Yellow Enzyme from Trypanosoma cruzi exhibits in vivo prostaglandin F2 α synthase activity and has a key role in parasite infection and drug susceptibility. *Frontiers in immunology* 9, 345469.
- Diedrich, K., Krause, B., Berg, O., y Rarey, M. (2023). PoseEdit: Enhanced ligand binding mode communication by interactive 2D diagrams. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 37(10), 491-503.
- Diez, M., Favaloro, L., Bertolotti, A., Burgos, J., Vigliano, C., Lastra, M.P., y col. (2007). Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas' disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation. *American Journal of Transplantation* 7(6), 1633-1640.
- Diosque, P., Barnabé, C., Padilla, A.M., Marco, J.D., Cardozo, R.M., Cimino, R.O., y col. (2003). Multilocus enzyme electrophoresis analysis of Trypanosoma cruzi isolates from a geographically restricted endemic area for Chagas' disease in Argentina. *International Journal for Parasitology* 33(10), 997-1003.
- Djimdé, A.A., Dolo, A., Ouattara, A., Diakité, S., Plowe, C.V., y Doumbo, O.K. (2004). Molecular diagnosis of resistance to antimalarial drugs during epidemics and in war zones. *Journal of Infectious Diseases* 190(4), 853-855.
- Don, R., y Ioset, J.-R. (2014). Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. *Parasitology* 141(1), 140-146.
- Duffy, T., Bisio, M., Altcheh, J., Burgos, J.M., Diez, M., Levin, M.J., y col. (2009). Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *PLoS neglected tropical diseases* 3(4), e419.
- Duffy, T., Cura, C.I., Ramirez, J.C., Abate, T., Cayo, N.M., Parrado, R., y col. (2013). Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of Trypanosoma cruzi satellite DNA in blood samples. *PLoS neglected tropical diseases* 7(1), e2000.
- Dumoulin, P.C., y Burleigh, B.A. (2018). Stress-induced proliferation and cell cycle plasticity of intracellular Trypanosoma cruzi amastigotes. *MBio* 9(4), 10.1128/mbio.00673-00618.
- Dutra, W.O., Menezes, C.A.S., Villani, F.N.A., Costa, G.C.d., Silveira, A.B.M.d., Reis, D.d.Á., y col. (2009). Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 208-218.

- DVORAK, J.A., HALL, T.E., CRANE, M.S.J., ENGEL, J.C., McDANIEL, J.P., yURIEGAS, R. (1982). Trypanosoma cruzi: Flow Cytometric Analysis. I. Analysis of Total DNA/Organism by Means of Mithramycin-Induced Fluorescence 1, 2. *The Journal of protozoology* 29(3), 430-437.
- Edwards, M.S., Stimpert, K.K., Bialek, S.R., yMontgomery, S.P. (2019). Evaluation and management of congenital Chagas disease in the United States. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society* 8(5), 461-469.
- Elias, M.C., Nardelli, S.C., ySchenkman, S. (2009). Chromatin and nuclear organization in Trypanosoma cruzi. *Future microbiology* 4(8), 1065-1074.
- Falk, N., Berenstein, A., Moscatelli, G., Moroni, S., González, N., Ballering, G., y col. (2022). Effectiveness of Nifurtimox in the Treatment of Chagas Disease: a Long-Term Retrospective Cohort Study in Children and Adults. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, e02021-02021.
- Fernandes, C.D., Murta, S.M.F., Cerávolo, I.P., Krug, L.P., Vidigal, P.G., Steindel, M., y col. (1997). Characterization of Trypanosoma cruzi strains isolated from chronic chagasic patients, triatomines and opossums naturally infected from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 92, 343-351.
- Fernandes, O., Sturm, N.R., Derré, R., yCampbell, D.A. (1998). The mini-exon gene: a genetic marker for zymodeme III of Trypanosoma cruzi.
- Fernandez, M.L., Albizu, C.L., Nicita, D., Besuschio, S., Giomi, C., Biondi, M.L., y col. (Year). "Molecular characterization of Trypanosoma cruzi reactivation and follow-up in a case series of people with HIV", in: *Open Forum Infectious Diseases*: Oxford University Press US), ofad357.
- Ferreira, R.R., Waghabi, M.C., Bailly, S., Feige, J.-J., Hasslocher-Moreno, A.M., Saraiva, R.M., y col. (2022). The search for biomarkers and treatments in Chagas disease: insights from TGF-beta studies and immunogenetics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11, 767576.
- Filardi, L., yBrenner, Z. (1987). Susceptibility and natural resistance of Trypanosoma cruzi strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 81(5), 755-759.
- Francisco, A.F., Jayawardhana, S., Lewis, M.D., Taylor, M.C., yKelly, J.M. (2017). Biological factors that impinge on Chagas disease drug development. *Parasitology* 144(14), 1871-1880.
- Francisco, A.F., Saade, U., Jayawardhana, S., Pottel, H., Scandale, I., Chatelain, E., y col. (2022). Comparing in vivo bioluminescence imaging and the Multi-Cruzi immunoassay platform to develop improved Chagas disease diagnostic procedures and biomarkers for monitoring parasitological cure. *PLoS neglected tropical diseases* 16(10), e0010827.
- Franco, J., Ferreira, R.C., lenne, S., yZingales, B. (2015). ABCG-like transporter of Trypanosoma cruzi involved in benznidazole resistance: gene polymorphisms disclose inter-strain intragenic recombination in hybrid isolates. *Infection, Genetics and Evolution* 31, 198-208.
- Garavaglia, P.A., Laverrière, M., Cannata, J.J., yGarcía, G.A. (2016). Putative role of the aldo-keto reductase from Trypanosoma cruzi in benznidazole metabolism. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 60(5), 2664-2670.
- García-Huertas, P., Mejía-Jaramillo, A.M., Machado, C.R., Guimarães, A.C., yTriana-Chávez, O. (2017). Prostaglandin F2 α synthase in Trypanosoma

- cruzi plays critical roles in oxidative stress and susceptibility to benznidazole. *Royal Society Open Science* 4(9), 170773.
- Golding, G. (1999). Simple sequence is abundant in eukaryotic proteins. *Protein science* 8(6), 1358-1361.
- Gómez-Ochoa, S.A., Rojas, L.Z., Echeverría, L.E., Muka, T., yFranco, O.H. (2022). Global, regional, and national trends of Chagas disease from 1990 to 2019: comprehensive analysis of the global burden of disease study. *Global heart* 17(1).
- Gonçalves, A., Nehme, N., yMorel, C. (1984). Trypanosomatid characterization by schizodeme analysis.
- Gonçalves, A.M., Nehme, N.S., Saravia, N., Segura, I., yMorel, C.M. (1991). Schizodeme analysis with the restriction endonuclease Rsa I differentiates between *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*.
- Gonzalez, J., Muñoz, S., Ortiz, S., Anaconda, D., Salgado, S., Galleguillos, M., y col. (1995). Biochemical, immunological, and biological characterization of *Trypanosoma cruzi* populations of the Andean north of Chile. *Experimental Parasitology* 81(1), 125-135.
- González, L., García-Huertas, P., Triana-Chávez, O., García, G.A., Murta, S.M.F., yMejía-Jaramillo, A.M. (2017). Aldo-keto reductase and alcohol dehydrogenase contribute to benznidazole natural resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular microbiology* 106(5), 704-718.
- Graef, J., Ehrt, C., yRarey, M. (2023). Binding site detection remastered: enabling fast, robust, and reliable binding site detection and descriptor calculation with DoGSite3. *Journal of Chemical Information and Modeling* 63(10), 3128-3137.
- Green, H., yWang, N. (1994). Codon reiteration and the evolution of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(10), 4298-4302.
- Guhl, F., yRamírez, J.D. (2013). Retrospective molecular integrated epidemiology of Chagas disease in Colombia. *Infection, Genetics and Evolution* 20, 148-154.
- Hall, B.S., Bot, C., yWilkinson, S.R. (2011). Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *Journal of Biological Chemistry* 286(15), 13088-13095.
- Hall, B.S., yWilkinson, S.R. (2012). Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56(1), 115-123.
- Hasslocher-Moreno, A.M. (2022). Laboratory-acquired acute Chagas disease: A case report.
- Hasslocher-Moreno, A.M., do Brasil, P.E., de Sousa, A.S., Xavier, S.S., Chambela, M.C., ySperandio da Silva, G.M. (2012). Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 67(5), 1261-1266.
- Hasslocher-Moreno, A.M., Sperandio-da-Silva, G.M., ySaraiva, R.M. (2023). Trypanocidal treatment in chronic Chagas disease: critical evaluation of cure criteria.
- Hermann, E., Truyens, C., Vega, C.A., Rodriguez, P., Berthe, A., Torrico, F., y col. (2004). Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon- γ in response to parasite antigens. *Journal of Infectious Diseases* 189(7), 1274-1281.

- Herwaldt, B.L. (2001). Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clinical microbiology reviews* 14(4), 659-688.
- Heyneman, D., yMc Kerrow, H. (1991). Parasitic Diseases In: Stites PD, Terr IA; eds. *Basic and Clinical Immunology* 7, 672-681.
- Higgins, C.F., yLinton, K.J. (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Nature structural & molecular biology* 11(10), 918-926.
- Hofflin, J.M., Sadler, R.H., Araujo, F.G., Page, W.E., yRemington, J.S. (1987). Laboratory-acquired Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 81(3), 437-440.
- Hoft, D.F. (1996). Differential mucosal infectivity of different life stages of *Trypanosoma cruzi*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 55(4), 360-364.
- Hoft, D.F., Farrar, P.L., Kratz-Owens, K., yShaffer, D. (1996). Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infection and immunity* 64(9), 3800-3810.
- Institute, C.a.L.S. (2018). Validation and Verification of Multiplex Nucleic Acid Assays. . 2nd ed.
- Jaccard, P. (1901). Comparative study of floral distribution in a portion of the Alps and Jura. *The Company Vaudoise Bulletin of Natural Sciences* 37(5), 547-579.
- Jannin, J., yVilla, L. (2007). An overview of Chagas disease treatment. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102, 95-98.
- Jayawardhana, S., Ward, A.I., Francisco, A.F., Lewis, M.D., Taylor, M.C., Kelly, J.M., y col. (2023). Benznidazole treatment leads to DNA damage in *Trypanosoma cruzi* and the persistence of rare widely dispersed non-replicative amastigotes in mice. *PLoS pathogens* 19(11), e1011627.
- Jez, J.M., Bennett, M.J., Schlegel, B.P., Lewis, M., yPenning, T.M. (1997). Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochemical Journal* 326(3), 625-636.
- Juiz, N.A., Torrejón, I., Burgos, M., Torres, A.M., Duffy, T., Cayo, N.M., y col. (2018). Alterations in placental gene expression of pregnant women with chronic Chagas disease. *The American Journal of Pathology* 188(6), 1345-1353.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., y col. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596(7873), 583-589.
- Junior, P.A.S., Molina, I., Murta, S.M.F., Sánchez-Montalvá, A., Salvador, F., Corrêa-Oliveira, R., y col. (2017). Experimental and clinical treatment of Chagas disease: a review. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 97(5), 1289.
- Kaplinski, M., Jois, M., Galdos-Cardenas, G., Rendell, V.R., Shah, V., Do, R.Q., y col. (2015). Sustained domestic vector exposure is associated with increased Chagas cardiomyopathy risk but decreased parasitemia and congenital transmission risk among young women in Bolivia. *Clinical Infectious Diseases* 61(6), 918-926.
- Kasai, H., Iwamoto-Tanaka, N., yFukada, S. (1998). DNA modifications by the mutagen glyoxal: adduction to G and C, deamination of C and GC and GA cross-linking. *Carcinogenesis* 19(8), 1459-1465.

- Katti, M.V., Sami-Subbu, R., Ranjekar, P.K., yGupta, V.S. (2000). Amino acid repeat patterns in protein sequences: their diversity and structural-functional implications. *Protein Science* 9(6), 1203-1209.
- Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D., yBarratt, J. (2017). The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites & vectors* 10, 1-17.
- Kelly, J.M., yWilkinson, S.R. (2013). Mechanisms of resistance to antiparasitic drugs in *Trypanosoma cruzi*. Correlations between genotype and resistance. *Revista Española de Salud Pública*, 17-23.
- Kimura, M. (1983). *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press.
- Kinoshita-Yanaga, A.T., Toledo, M.J.d.O., Araújo, S.M.d., Vier, B.P., yGomes, M.L. (2009). Accidental infection by *Trypanosoma cruzi* follow-up by the polymerase chain reaction: case report. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 51, 295-298.
- Krogstad, D. (1994). Protozoarios de la sangre y los tejidos. *Schaechter M, Medoff G, Eisenstein B, Guerra H. Microbiología. Mecanismos de las enfermedades infecciosas. 2ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana*, 630-649.
- Kubata, B.K., Kabututu, Z., Nozaki, T., Munday, C.J., Fukuzumi, S., Ohkubo, K., y col. (2002). A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of experimental medicine* 196(9), 1241-1252.
- Kun, H., Moore, A., Mascola, L., Frank, S., Gena, L., Kubak, B., y col. (2009). Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. *Clinical Infectious Diseases* 48(11), 1534-1540.
- Kuraku, S., Zmasek, C.M., Nishimura, O., yKatoh, K. (2013). aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. *Nucleic acids research* 41(W1), W22-W28.
- Laurent, J.-P., Barnabe, C., Quesney, V., Noel, S., yTibayrenc, M. (1997). Impact of clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 114(3), 213-218.
- Lee, G.R., Won, J., Heo, L., ySeok, C. (2019). GalaxyRefine2: simultaneous refinement of inaccurate local regions and overall protein structure. *Nucleic acids research* 47(W1), W451-W455.
- Leon, W., Frasch, A., Hoeijmakers, J., Fase-Fowler, F., Borst, P., Brunel, F., y col. (1980). Maxi-circles and mini-circles in kinetoplast DNA from *Trypanosoma cruzi*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis* 607(2), 221-231.
- Lewis, M.D., Llewellyn, M.S., Yeo, M., Messenger, L., yMiles, M. (2017). "Experimental and natural recombination in *Trypanosoma cruzi*," in *American Trypanosomiasis Chagas Disease*. Elsevier), 455-473.
- Lidani, K.C.F., Andrade, F.A., Bavia, L., Damasceno, F.S., Beltrame, M.H., Messias-Reason, I.J., y col. (2019). Chagas disease: from discovery to a worldwide health problem. *Frontiers in public health* 7, 166.
- Lima, L., Espinosa-Álvarez, O., Ortiz, P.A., Trejo-Varón, J.A., Carranza, J.C., Pinto, C.M., y col. (2015). Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta tropica* 151, 166-177.

- Lima, L.R.P., Silva, A.P.d., Schmidt-Chanasit, J., yPaula, V.S.d. (2017). Diagnosis of human herpes virus 1 and 2 (HHV-1 and HHV-2): use of a synthetic standard curve for absolute quantification by real time polymerase chain reaction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 112, 220-223.
- Lippert, T., yRarey, M. (2009). Fast automated placement of polar hydrogen atoms in protein-ligand complexes. *Journal of Cheminformatics* 1, 1-12.
- Liu, Y., Yang, X., Gan, J., Chen, S., Xiao, Z.-X., yCao, Y. (2022). CB-Dock2: Improved protein–ligand blind docking by integrating cavity detection, docking and homologous template fitting. *Nucleic acids research* 50(W1), W159-W164.
- Lugo, M.R. (2011). ¿ Qué ha pasado en Venezuela cuando el ambiente urbano invade el hábitat natural de los triatominos vectores de la Enfermedad de Chagas? *Vitae* (47).
- Macaluso, G., Grippi, F., Di Bella, S., Blanda, V., Gucciardi, F., Torina, A., y col. (2023). A Review on the Immunological Response against *Trypanosoma cruzi*. *Pathogens* 12(2), 282.
- Macedo, A., yPena, S. (1998). Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitology Today* 14(3), 119-124.
- Macedo, A.M., Machado, C.R., Oliveira, R.P., yPena, S.D. (2004). *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 99, 1-12.
- Macedo, A.M., Oliveira, R.P., yPena, S.D. (2002). Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert reviews in molecular medicine* 4(5), 1-16.
- Macedo, A.M., ySegatto, M. (2010). "Implications of *Trypanosoma cruzi* intraspecific diversity in the pathogenesis of Chagas disease," in *American Trypanosomiasis*. Elsevier), 489-522.
- Machado-de-Assis, G.F., Diniz, G.A., Montoya, R.A., Dias, J.C.P., Coura, J.R., Machado-Coelho, G.L.L., y col. (2013). A serological, parasitological and clinical evaluation of untreated Chagas disease patients and those treated with benznidazole before and thirteen years after intervention. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 108, 873-880.
- Magalhães, L.M., Gollob, K.J., Zingales, B., yDutra, W.O. (2022). Pathogen diversity, immunity, and the fate of infections: lessons learned from *Trypanosoma cruzi* human–host interactions. *The Lancet Microbe*.
- Malheiros Araújo Silvestrini, M., Alessio, G.D., Frias, B.E., Sales Júnior, P.A., Araujo, M., Silvestrini, C.M., y col. (2023). New insights into *Trypanosoma cruzi* genetic diversity, and its influence on parasite biology and clinical outcomes. *Frontiers in Immunology* 15, 1342431.
- Marcili, A., Lima, L., Cavazzana, M., Junqueira, A., Veludo, H., Da Silva, F.M., y col. (2009). A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology* 136(6), 641-655.
- Martín, A., Alarcón de Noya, B., Montero, R., Rojas, C., Garrido, E., Ruiz-Guevara, R., y col. (2009). Epidemia de Chagas agudo adquirido por vía

- oral en una escuela de Caracas: descripción del caso índice. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría* 72(3), 97-100.
- Martin, E.R., Ritchie, M., Hahn, L., Kang, S., y Moore, J. (2006). A novel method to identify gene–gene effects in nuclear families: the MDR-PDT. *Genetic Epidemiology: The Official Publication of the International Genetic Epidemiology Society* 30(2), 111-123.
- Martín-Escolano, J., Marín, C., Rosales, M.J., Tsaousis, A.D., Medina-Carmona, E., y Martín-Escolano, R. (2022). An updated view of the *Trypanosoma cruzi* life cycle: intervention points for an effective treatment. *ACS Infectious Diseases* 8(6), 1107-1115.
- Martinez-Perez, A., Poveda, C., Ramírez, J.D., Norman, F., Gironés, N., Guhl, F., y col. (2016). Prevalence of *Trypanosoma cruzi*'s Discrete Typing Units in a cohort of Latin American migrants in Spain. *Acta tropica* 157, 145-150.
- Mason, R.P., y Holtzman, J.L. (1975). The role of catalytic superoxide formation in the O₂ inhibition of nitroreductase. *Biochemical and biophysical research communications* 67(4), 1267-1274.
- Maya, J.D., Cassels, B.K., Iturriaga-Vásquez, P., Ferreira, J., Faúndez, M., Galanti, N., y col. (2007). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 146(4), 601-620.
- Mejía-Jaramillo, A.M., Fernández, G.J., Palacio, L., y Triana-Chávez, O. (2011). Gene expression study using real-time PCR identifies an NTR gene as a major marker of resistance to benznidazole in *Trypanosoma cruzi*. *Parasites & vectors* 4(1), 1-12.
- Mejía-Jaramillo, A.M., Hall, B.S., Taylor, M.C., Gómez-Palacio, A., Wilkinson, S.R., Triana-Chávez, O., y col. (2012). Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. *The Journal of infectious diseases* 206(2), 220-228.
- Meng, E.C., Goddard, T.D., Pettersen, E.F., Couch, G.S., Pearson, Z.J., Morris, J.H., y col. (2023). UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. *Protein Science* 32(11), e4792.
- Messenger, L.A., y Bern, C. (2018). Congenital Chagas disease: current diagnostics, limitations and future perspectives. *Current opinion in infectious diseases* 31(5), 415-421.
- Messenger, L.A., Garcia, L., Vanhove, M., Huaranca, C., Bustamante, M., Torrico, M., y col. (2015). Ecological host fitting of *Trypanosoma cruzi* T c l in B olivia: mosaic population structure, hybridization and a role for humans in A ndean parasite dispersal. *Molecular ecology* 24(10), 2406-2422.
- Meymandi, S., Hernandez, S., Park, S., Sanchez, D.R., y Forsyth, C. (2018). Treatment of Chagas disease in the United States. *Current treatment options in infectious diseases* 10, 373-388.
- Miles, M., Llewellyn, M., Lewis, M., Yeo, M., Baleela, R., Fitzpatrick, S., y col. (2009). The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology* 136(12), 1509-1528.
- Miles, M., Pova, M., Prata, A., Cedillos, R., De Souza, A., y Macedo, V. (1981). DO RADICALLY DISSIMILAR *TRYPANOSOMA CRUZI* STRAINS

- (ZYMODEMES) CAUSE VENEZUELAN AND BRAZILIAN FORMS OF CHAGAS'DISEASE? *The Lancet* 317(8234), 1338-1340.
- Miles, M.A. (2010). Orally acquired Chagas disease: lessons from an urban school outbreak. *The Journal of infectious diseases* 201(9), 1282-1284.
- Miles, M.A., Souza, A., Povoas, M., Shaw, J.J., Lainson, R., yToye, P.J. (1978). Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature* 272(5656), 819-821.
- Mirza, M.T., Khan, A., Tahir, M., yLee, Y.S. (2013). MitProt-Pred: Predicting mitochondrial proteins of *Plasmodium falciparum* parasite using diverse physiochemical properties and ensemble classification. *Computers in biology and medicine* 43(10), 1502-1511.
- Moen, S.O., Fairman, J.W., Barnes, S.R., Sullivan, A., Nakazawa-Hewitt, S., Van Voorhis, W.C., y col. (2015). Structures of prostaglandin F synthase from the protozoa *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* with NADP. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications* 71(5), 609-614.
- Molina, I., Gómez i Prat, J., Salvador, F., Treviño, B., Sulleiro, E., Serre, N., y col. (2014). Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *New England Journal of Medicine* 370(20), 1899-1908.
- Montenegro, M., Cuervo, C., Cardenas, C., Duarte, S., Díaz, J.R., Thomas, M.C., y col. (2017). Identification of a type I nitroreductase gene in non-virulent *Trypanosoma rangeli*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 112, 504-509.
- Moraes, C.B., Giardini, M.A., Kim, H., Franco, C.H., Araujo-Junior, A.M., Schenkman, S., y col. (2014a). Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. *Scientific reports* 4(1), 4703.
- Moraes, C.B., Giardini, M.A., Kim, H., Franco, C.H., Araujo-Junior, A.M., Schenkman, S., y col. (2014b). Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. *Scientific reports* 4(1), 1-11.
- Moreira, O.C., Ramírez, J.D., Velázquez, E., Melo, M.F.D., Lima-Ferreira, C., Guhl, F., y col. (2013). Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. *Acta Tropica* 125(1), 23-31.
- Morel, C., Chiari, E., Camargo, E.P., Mattei, D., Romanha, A., ySimpson, L. (1980). Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77(11), 6810-6814.
- Morel, C., Deane, M., yGonçalves, A. (1986). The heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*. The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis.
- Moreno, M., D'ávila, D.A., Silva, M.N., Galvão, L., Macedo, A.M., Chiari, E., y col. (2010). *Trypanosoma cruzi* benznidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 105, 918-924.

- Moreno, S., Mason, R.P., yDocampo, R. (1984). Reduction of nifurtimox and nitrofurantoin to free radical metabolites by rat liver mitochondria. Evidence of an outer membrane-located nitroreductase. *Journal of Biological Chemistry* 259(10), 6298-6305.
- Morillo, C.A., Marin-Neto, J.A., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi Jr, A., Rosas, F., y col. (2015). Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine* 373(14), 1295-1306.
- Morillo, C.A., Waskin, H., Sosa-Estani, S., del Carmen Bangher, M., Cuneo, C., Milesi, R., y col. (2017). Benznidazole and posaconazole in eliminating parasites in asymptomatic T. cruzi carriers: the STOP-CHAGAS trial. *Journal of the American College of Cardiology* 69(8), 939-947.
- Mortara, R.A., Andreoli, W.K., Taniwaki, N.N., Fernandes, A.B., Silva, C.V.d., Fernandes, M.C.D., y col. (2005). Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by Trypanosoma cruzi infective forms. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 77, 77-94.
- Moscatelli, G., yMoroni, S. (2019). Acute Vector-Borne Chagas Disease. *Chagas Disease: A Clinical Approach*, 161-178.
- Muñoz-Calderón, A., Díaz-Bello, Z., Alarcón de Noya, B., Noya-González, O.O., ySchijman, A.G. (2021a). Characterization and follow-up of Trypanosoma cruzi natural populations refractory to etiological chemotherapy in oral Chagas disease patients. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11, 665063.
- Muñoz-Calderón, A., Díaz-Bello, Z., Ramírez, J.L., Noya, O., yde Noya, B.A. (2019). Nifurtimox response of Trypanosoma cruzi isolates from an outbreak of Chagas disease in Caracas, Venezuela. *Journal of vector borne diseases* 56(3), 237.
- Muñoz-Calderón, A., Díaz-Bello, Z., Valladares, B., Noya, O., López, M., De Noya, B.A., y col. (2013). Oral transmission of Chagas disease: typing of Trypanosoma cruzi from five outbreaks occurred in Venezuela shows multiclonal and common infections in patients, vectors and reservoirs. *Infection, Genetics and Evolution* 17, 113-122.
- Muñoz-Calderón, A., Ramírez, J.L., Díaz-Bello, Z., Alarcón de Noya, B., Noya, O., ySchijman, A.G. (2023). Genetic Characterization of Trypanosoma cruzi I Populations from an Oral Chagas Disease Outbreak in Venezuela: Natural Resistance to Nitroheterocyclic Drugs. *ACS Infectious Diseases* 9(3), 582-592.
- Muñoz-Calderón, A., Santaniello, A., Pereira, A., Yannuzzi, J., Díaz-Bello, Z., yAlarcón 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.
- Muñoz-Calderón, A., Silva-Gomes, N.L., Apodaca, S., de Noya, B.A., Díaz-Bello, Z., Souza, L.R.Q., y col. (2021b). Toward the establishment of a single standard curve for quantification of Trypanosoma cruzi natural populations using a synthetic satellite unit DNA sequence. *The Journal of Molecular Diagnostics* 23(5), 521-531.
- Murakami, M.T., Rodrigues, N.C., Gava, L.M., Honorato, R.V., Canduri, F., Barbosa, L.R., y col. (2013). Structural studies of the Trypanosoma cruzi Old Yellow Enzyme: insights into enzyme dynamics and specificity. *Biophysical chemistry* 184, 44-53.

- Murphy, N., Cardinal, M.V., Bhattacharyya, T., Enriquez, G.F., Macchiaverna, N.P., Alvedro, A., y col. (2021). Assessing antibody decline after chemotherapy of early chronic Chagas disease patients. *Parasites & vectors* 14, 1-12.
- Murta, S., yRomanha, A. (1998). In vivo selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitology* 116(2), 165-171.
- Murta, S.M., Gazzinelli, R.T., Brener, Z., yRomanha, A.J. (1998). Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Molecular and biochemical parasitology* 93(2), 203-214.
- Murta, S.M., Krieger, M.A., Montenegro, L.R., Campos, F.F., Probst, C.M., Avila, A.R., y col. (2006). Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD (P) H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology* 146(2), 151-162.
- Nagajyothi, F., Machado, F.S., Burleigh, B.A., Jelicks, L.A., Scherer, P.E., Mukherjee, S., y col. (2012). Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. *Cellular microbiology* 14(5), 634-643.
- Nattan-Larrier, L. (1921). Infections à Trypanosomes et voies de penetrations des virus. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 14, 537-542.
- Negrette, O.S., Mora, M.C., yBasombrío, M.Á. (2005). High prevalence of congenital *Trypanosoma cruzi* infection and family clustering in Salta, Argentina. *Pediatrics* 115(6), e668-e672.
- Nóbrega, A.A., Garcia, M.H., Tatto, E., Obara, M.T., Costa, E., Sobel, J., y col. (2009). Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. *Emerging infectious diseases* 15(4), 653.
- Nogueira, F.B., Krieger, M.A., Nirdé, P., Goldenberg, S., Romanha, A.J., yMurta, S.M. (2006). Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with in vitro-induced resistance to benznidazole. *Acta tropica* 100(1-2), 119-132.
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., yTeam, U. (2012). Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28(8), 1166-1167.
- Oliveira, R.P., Broude, N.E., Macedo, A.M., Cantor, C.R., Smith, C.L., yPena, S.D. (1998). Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(7), 3776-3780.
- Olivera, M.J., Cucunubá, Z.M., Valencia-Hernández, C.A., Herazo, R., Agreda-Rudenko, D., Flórez, C., y col. (2017). Risk factors for treatment interruption and severe adverse effects to benznidazole in adult patients with Chagas disease. *PloS one* 12(9), e0185033.
- Organization, W.H. (2002). *Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee*. World Health Organization.
- Orozco, V.H.G., Navarro, J.E.V., Aguirre, C.S., Ocampo, C.M.I., Sandoval, C.I.D., Gallegos, C.A.O., y col. (2022). "Digestive Disorders in Chagas Disease: Megaesophagus and Chagasic Megacolon," in *Chagas Disease-From Cellular and Molecular Aspects of Trypanosoma cruzi-Host Interactions to the Clinical Intervention*. IntechOpen).
- Ouellette, M. (2001). Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. *Tropical Medicine & International Health* 6(11), 874-882.

- Ouellette, M., Légaré, D., Haimeur, A., Grondin, K., Roy, G., Brochu, C., y col. (1998). ABC transporters in Leishmania and their role in drug resistance. *Drug Resistance Updates* 1(1), 43-48.
- Ouellette, M., Légaré, D., yPapadopoulou, B. (2001). Multidrug resistance and ABC transporters in parasitic protozoa. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 3(2), 201-206.
- Papadopoulou, B., Roy, G., Dey, S., Rosen, B.P., yOuellette, M. (1994). Contribution of the Leishmania P-glycoprotein-related gene ltpgpA to oxanion resistance. *Journal of Biological Chemistry* 269(16), 11980-11986.
- Parada, H., Carrasco, H., Añez, N., Fuenmayor, C., Arriaga, A., Palacios, E., y col. (1996). La enfermedad de Chagas aguda. Características clínicas, parasitológicas e histopatológicas. *Av Cardiol* 16, 10-17.
- Parrado, R., Ramirez, J.C., de la Barra, A., Alonso-Vega, C., Juiz, N., Ortiz, L., y col. (2019). Usefulness of serial blood sampling and PCR replicates for treatment monitoring of patients with chronic Chagas disease. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 63(2), 10.1128/aac. 01191-01118.
- Patterson, S., yWyllie, S. (2014). Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends in parasitology* 30(6), 289-298.
- Pena, S., Barreto, G., Vago, A.R., De Marco, L., Reinach, F.C., Dias Neto, E., y col. (1994). Sequence-specific" gene signatures" can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(5), 1946-1949.
- Pérez-Molina, J.A., yMolina, I. (2018). Chagas disease. *The Lancet* 391(10115), 82-94.
- Pérez-Ayala, A., Pérez-Molina, J., Norman, F., Monge-Maillo, B., Faro, M., yLópez-Vélez, R. (2011). Gastro-intestinal Chagas disease in migrants to Spain: prevalence and methods for early diagnosis. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 105(1), 25-29.
- Perutz, M.F., Johnson, T., Suzuki, M., yFinch, J.T. (1994). Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(12), 5355-5358.
- Peters, E.J., yMcLeod, H.L. (2008). Ability of whole-genome SNP arrays to capture 'must have' pharmacogenomic variants.
- Petravicius, P.O., Costa-Martins, A.G., Silva, M.N., Reis-Cunha, J.L., Bartholomeu, D.C., Teixeira, M.M., y col. (2019). Mapping benzimidazole resistance in trypanosomatids and exploring evolutionary histories of nitroreductases and ABCG transporter protein sequences. *Acta tropica* 200, 105161.
- Pinazo, M.-J., Thomas, M.C., Bua, J., Perrone, A., Schijman, A.-G., Viotti, R.-J., y col. (2014). Biological markers for evaluating therapeutic efficacy in Chagas disease, a systematic review. *Expert review of anti-infective therapy* 12(4), 479-496.
- Piron, M., Fisa, R., Casamitjana, N., López-Chejade, P., Puig, L., Vergés, M., y col. (2007). Development of a real-time PCR assay for Trypanosoma cruzi detection in blood samples. *Acta tropica* 103(3), 195-200.

- Plowe, C.V., Roper, C., Barnwell, J.W., Happi, C.T., Joshi, H.H., Mbacham, W., y col. (2007). World Antimalarial Resistance Network (WARN) III: molecular markers for drug resistant malaria. *Malaria journal* 6, 1-10.
- Quebrada Palacio, L.P., González, M.N., Hernandez-Vasquez, Y., Perrone, A.E., Parodi-Talice, A., Bua, J., y col. (2018). Phenotypic diversity and drug susceptibility of *Trypanosoma cruzi* TcV clinical isolates. *PLoS One* 13(9), e0203462.
- Qvarnstrom, Y., Schijman, A.G., Veron, V., Aznar, C., Steurer, F., yDa Silva, A.J. (2012). Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. *PLoS neglected tropical diseases* 6(7), e1689.
- Rajao, M.A., Furtado, C., Alves, C.L., Passos-Silva, D.G., De Moura, M.B., Schamber-Reis, B.L., y col. (2014). Unveiling benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Environmental and molecular mutagenesis* 55(4), 309-321.
- Ramírez, J.C., Cura, C.I., da Cruz Moreira, O., Lages-Silva, E., Juiz, N., Velázquez, E., y col. (2015). Analytical validation of quantitative real-time PCR methods for quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *The Journal of Molecular Diagnostics* 17(5), 605-615.
- Ramírez, J.D., Guhl, F., Rendón, L.M., Rosas, F., Marin-Neto, J.A., yMorillo, C.A. (2010). Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic Chagasic patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4(11), e899.
- Ramírez, J.D., Hernández, C., Montilla, M., Zambrano, P., Flórez, A., Parra, E., y col. (2014). First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to TcBat genotype. *Zoonoses and public health* 61(7), 477-479.
- Ramírez, J.D., yLlewellyn, M. (2015). "Response to Tibayrenc and Ayala: reproductive clonality in protozoan pathogens—truth or artefact?". Wiley Online Library).
- Ranjita, S. (2013). Nanosuspensions: a new approach for organ and cellular targeting in infectious diseases. *Journal of Pharmaceutical Investigation* 43(1), 1-26.
- Rassi, A., yLuquetti, A.O. (1992). Therapy of Chagas disease. *Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rassi A. Chagas disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. Sao Paulo: International Society of Blood Transfusion*, 237-247.
- Rassi, A., yMarin, J.A. (2017). Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 112, 224-235.
- Rassi, A., yMarin-Neto, J.A. (2010). Chagas disease. *The Lancet* 375(9723), 1388-1402.
- Rassi, A., Rassi, A., yMarin-Neto, J.A. (2015). Chagas disease. *Neglected Tropical Diseases-Latin America and the Caribbean*, 45-71.
- Rassi Jr, A., Rassi, S.G., yRassi, A. (2001). Sudden death in Chagas' disease. *Arquivos brasileiros de cardiologia* 76(1), 86-96.
- Reis-Cunha, J.L., Baptista, R.P., Rodrigues-Luiz, G.F., Coqueiro-dos-Santos, A., Valdivia, H.O., de Almeida, L.V., y col. (2018). Whole genome sequencing of *Trypanosoma cruzi* field isolates reveals extensive genomic variability

- and complex aneuploidy patterns within TcII DTU. *BMC genomics* 19, 1-17.
- Reis-Cunha, J.L., Coqueiro-dos-Santos, A., Pimenta-Carvalho, S.A., Marques, L.P., Rodrigues-Luiz, G.F., Baptista, R.P., y col. (2022). Accessing the Variability of Multicopy Genes in Complex Genomes using Unassembled Next-Generation Sequencing Reads: The Case of *Trypanosoma cruzi* Multigene Families. *Mbio* 13(6), e02319-02322.
- Rendell, V.R., Gilman, R.H., Valencia, E., Galdos-Cardenas, G., Verastegui, M., Sanchez, L., y col. (2015). *Trypanosoma cruzi*-infected pregnant women without vector exposure have higher parasitemia levels: implications for congenital transmission risk. *PLoS One* 10(3), e0119527.
- Revollo, S., Oury, B., Laurent, J.-P., Barnabé, C., Quesney, V., Carrière, V., y col. (1998). *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Experimental parasitology* 89(1), 30-39.
- Revollo, S., Oury, B., Vela, A., Tibayrenc, M., ySerenó, D. (2019). In vitro benznidazole and nifurtimox susceptibility profile of *Trypanosoma cruzi* strains belonging to discrete typing units TcI, TcII, and TcV. *Pathogens* 8(4), 197.
- Reygaert, W.C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology* 4(3), 482.
- Riarte, A., Velázquez, E., Prado, N., Schijman, A., Ramírez, J., yDe Rissio, A. (2012a). TRAENA": TRAtamiento EN pacientes Adultos. *Una evaluación preliminar de un ensayo clínico aleatorizado con benznidazol en la enfermedad de Chagas crónica. VIII taller sobre la enfermedad de Chagas importada. Avances en el tratamiento antiparasitario. Libro de Resumen.*
- Riarte, A., Velázquez, E., Prado, N., Schijman, A., Ramírez, J., yDe Rissio, A. (2012b). "'TRAENA": TRAtamiento EN pacientes Adultos. Una evaluación preliminar de un ensayo clínico aleatorizado con benznidazol en la enfermedad de Chagas crónica," in 8°. *Taller sobre la enfermedad de Chagas importada: Avances en el tratamiento antiparasitario. Libro de Resumen.* Esmon Barcelona).
- Roberts, A.J., Dunne, J., Scullion, P., Norval, S., yFairlamb, A.H. (2018). A role for trypanosomatid aldo-keto reductases in methylglyoxal, prostaglandin and isoprostane metabolism. *Biochemical Journal* 475(16), 2593-2610.
- Rodrigues-dos-Santos, I., Melo, M.F., de Castro, L., Hasslocher-Moreno, A.M., do Brasil, P.E.A., Silvestre de Sousa, A., y col. (2018). Exploring the parasite load and molecular diversity of *Trypanosoma cruzi* in patients with chronic Chagas disease from different regions of Brazil. *PLoS neglected tropical diseases* 12(11), e0006939.
- Rodríguez Durán, J., Muñoz-Calderón, A., Gómez, K.A., yPotenza, M. (2021). In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes into metacyclic trypomastigotes using a biphasic medium. *STAR protocols* 2(3), 100703.
- Ruiz-Lancheros, E., Chatelain, E., yNdao, M. (2019). Chagas disease treatment efficacy biomarkers: myths and realities. *Chagas disease: a clinical approach*, 323-349.
- Rusman, F., Díaz, A.G., Ponce, T., Floridia-Yapur, N., Barnabé, C., Diosque, P., y col. (2023). Wide reference databases for typing *Trypanosoma cruzi* based on amplicon sequencing of the minicircle hypervariable region. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 17(11), e0011764.

- Sabino, E.C., Ribeiro, A.L., Salemi, V.M., Di Lorenzo Oliveira, C., Antunes, A.P., Menezes, M.M., y col. (2013). Ten-year incidence of Chagas cardiomyopathy among asymptomatic *Trypanosoma cruzi*-seropositive former blood donors. *Circulation* 127(10), 1105-1115.
- Salazar, A., Schijman, A.G., y Triana-Chávez, O. (2006). High variability of Colombian *Trypanosoma cruzi* lineage I stocks as revealed by low-stringency single primer-PCR minicircle signatures. *Acta Tropica* 100(1-2), 110-118.
- Salvador, F., Treviño, B., Sulleiro, E., Pou, D., Sánchez-Montalvá, A., Cabezas, J., y col. (2014). *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic country: epidemiological and clinical profile. *Clinical Microbiology and Infection* 20(7), 706-712.
- Salvatella, R. (2006). "Organizacion panamericana de la salud. Estimacion cuantitativa de la enfermedad de chagas en las Americas". Report no. OPS/HDM/CD/425-6. Montevideo (Uruguay): Organizacion Panamericana ...).
- Sánchez, L.V., Bautista, D.C., Corredor, A.F., Herrera, V.M., Martinez, L.X., Villar, J.C., y col. (2013). Temporal variation of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in asymptomatic Chagas disease patients. *Microbes and Infection* 15(10-11), 745-748.
- Sánchez-Valdéz, F.J., Padilla, A., Wang, W., Orr, D., y Tarleton, R.L. (2018). Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. *Elife* 7, e34039.
- Santos, E.F., Silva, A.A., Leony, L.M., Freitas, N.E., Daltro, R.T., Regis-Silva, C.G., y col. (2020). Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: A nationwide spatiotemporal analysis. *PLoS neglected tropical diseases* 14(8), e0008445.
- Sathler-Avelar, R., Vitelli-Avelar, D.M., Massara, R.L., de Lana, M., Dias, J.C.P., Teixeira-Carvalho, A., y col. (2008). Etiological treatment during early chronic indeterminate Chagas disease incites an activated status on innate and adaptive immunity associated with a type 1-modulated cytokine pattern. *Microbes and infection* 10(2), 103-113.
- Sauvage, V., Aubert, D., Escotte-Binet, S., y Villena, I. (2009). The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites. *Molecular and biochemical parasitology* 167(2), 81-94.
- Scapellato, P.G., Bottaro, E.G., y Rodríguez-Brieschke, M.T. (2009). Mother-child transmission of Chagas disease: could coinfection with human immunodeficiency virus increase the risk? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42, 107-109.
- Schaub, G.A., Meiser, C.K., y Balczun, C. (2011). Interactions of *Trypanosoma cruzi* and triatomines. *Progress in parasitology*, 155-178.
- Schijman, A.G. (2023). Unveiling Challenges in Real-Time PCR Strategies for Detecting Treatment Failure: Observations from Clinical Trials on Chronic Chagas Disease. *Frontiers in Parasitology* 2, 1260224.
- Schijman, A.G., Altcheh, J., Burgos, J.M., Biancardi, M., Bisio, M., Levin, M.J., y col. (2003). Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52(3), 441-449.
- Schijman, A.G., Vigliano, C., Burgos, J., Favaloro, R., Perrone, S., Laguens, R., y col. (2000). Early diagnosis of recurrence of *Trypanosoma cruzi* infection

- by polymerase chain reaction after heart transplantation of a chronic Chagas' heart disease patient. *The Journal of heart and lung transplantation* 19(11), 1114-1117.
- Sellis, D., Drosou, V., Vlachakis, D., Voukkalis, N., Giannakouros, T., yVlassi, M. (2012). Phosphorylation of the arginine/serine repeats of lamin B receptor by SRPK1—Insights from molecular dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1820(1), 44-55.
- Seremeta, K.P., Arrúa, E.C., Okulik, N.B., ySalomon, C.J. (2019). Development and characterization of benznidazole nano-and microparticles: a new tool for pediatric treatment of Chagas disease? *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 177, 169-177.
- Sguassero, Y., Cuesta, C.B., Roberts, K.N., Hicks, E., Comandé, D., Ciapponi, A., y col. (2015). Course of chronic *Trypanosoma cruzi* infection after treatment based on parasitological and serological tests: a systematic review of follow-up studies. *PLoS One* 10(10), e0139363.
- Shapiro, T.A., yEnglund, P.T. (1995). The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annual review of microbiology* 49(1), 117-143.
- Shaw, J., Lainson, R., yFraiha, H. (1969). Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. *Revista de saude publica* 3, 153-157.
- Shikanai-Yasuda, M.A., Brisola Marcondes, C., Guedes, L., Siqueira, G., Barone, A.A., Dias, J., y col. (1991). Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 33, 351-357.
- Silveira, C.A., Castillo, E., yCastro, C. (2000). Specific treatment evaluation for *Trypanosoma cruzi* in children, in the evolution of the indeterminate phase. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 33(2).
- Solari, A., Ortiz, S., Soto, A., Arancibia, C., Campillay, R., Contreras, M., y col. (2001). Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected children with nifurtimox: a 3 year follow-up by PCR. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48(4), 515-519.
- Sosa Estani, S., Segura, E.L., Ruiz, A.M., Velazquez, E., Porcel, B.M., yYampotis, C. (1998). Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 59(4), 526-529.
- Sosa-Estani, S., Viotti, R., ySegura, E.L. (2009). Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 167-180.
- Souto, R.P., Fernandes, O., Macedo, A.M., Campbell, D.A., yZingales, B. (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology* 83(2), 141-152.
- Souza, P.E., Rocha, M.O., Menezes, C.A., Coelho, J.S., Chaves, A.C., Gollob, K.J., y col. (2007). *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. *Infection and immunity* 75(4), 1886-1894.
- Souza, R.T., Lima, F.M., Barros, R.M., Cortez, D.R., Santos, M.F., Cordero, E.M., y col. (2011). Genome size, karyotype polymorphism and chromosomal evolution in *Trypanosoma cruzi*. *PloS one* 6(8), e23042.

- Souza, W.D. (2002). Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current pharmaceutical design* 8(4), 269-285.
- Sperandio da Silva, G.M., Felix Mediano, M.F., Hasslocher-Moreno, A.M., Holanda, M.T.d., Silvestre de Sousa, A., Sangenis, L.H.C., y col. (2017). Benzimidazole treatment safety: the Médecins Sans Frontières experience in a large cohort of Bolivian patients with Chagas' disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72(9), 2596-2601.
- Stevens, J., Noyes, H., yGibson, W. (1998). The evolution of trypanosomes infecting humans and primates. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93, 669-676.
- Storino, R., Galleano, R., ySosa, R. (2014). Tratamiento antiparasitario específico. *Mosby. Doyma-Argentina S.A.* Cap. 28., 557-568.
- Streeter, A.J., yHoener, B.-a. (1988). Evidence for the involvement of a nitrenium ion in the covalent binding of nitrofurazone to DNA. *Pharmaceutical research* 5, 434-436.
- Sturm, N.R., yCampbell, D.A. (2010). Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropica* 115(1-2), 35-43.
- Sturm, N.R., Degraeve, W., Morel, C., ySimpson, L. (1989). Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Molecular and biochemical parasitology* 33(3), 205-214.
- Sturm, N.R., Vargas, N.S., Westenberger, S.J., Zingales, B., yCampbell, D.A. (2003). Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *International journal for parasitology* 33(3), 269-279.
- Suárez, J., de Suárez, C.B., de Noya, B.A., Espinosa, R., Chiurillo, M.A., Villaroel, A., y col. (2010). Enfermedad de Chagas sistémico en fase aguda por transmisión oral: diagnóstico integral de un caso autopsiado. *Gaceta Médica de Caracas* 118(3), 212-222.
- Tarleton, R.L. (2001). Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *International journal for parasitology* 31(5-6), 550-554.
- Tavanti, A., Gow, N.A., Senesi, S., Maiden, M.C., yOdds, F.C. (2003). Optimization and validation of multilocus sequence typing for *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology* 41(8), 3765-3776.
- Teixeira, A.R., Nascimento, R.J., ySturm, N.R. (2006). Evolution and pathology in Chagas disease: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101, 463-491.
- Telleria, J., yTibayrenc, M. (2017). *American trypanosomiasis Chagas disease: one hundred years of research*. Elsevier.
- Temperton, N.J., Wilkinson, S.R., Meyer, D.J., yKelly, J.M. (1998). Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benzimidazole. *Molecular and biochemical parasitology* 96(1-2), 167-176.
- Teppa, E., Nadalin, F., Combet, C., Zea, D.J., David, L., yCarbone, A. (2020). Coevolution analysis of amino-acids reveals diversified drug-resistance solutions in viral sequences: a case study of hepatitis B virus. *Virus Evolution* 6(1), veaa006.
- Tibayrenc, M., yAyala, F.J. (1988). ISOZYME VARIABILITY IN *TRYPANOSOMA CRUZI*, THE AGENT OF CHAGAS'DISEASE: GENETICAL,

- TAXONOMICAL, AND EPIDEMIOLOGICAL SIGNIFICANCE. *Evolution* 42(2), 277-292.
- Tibayrenc, M., yAyala, F.J. (2002). The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends in parasitology* 18(9), 405-410.
- Tibayrenc, M., yAyala, F.J. (2013). How clonal are Trypanosoma and Leishmania? *Trends in parasitology* 29(6), 264-269.
- Tibayrenc, M., yAyala, F.J. (2022). Microevolution and subspecific taxonomy of Trypanosoma cruzi. *Infection, Genetics and Evolution* 103, 105344.
- Tibayrenc, M., yBrenière, S.F. (1988). Trypanosoma cruzi: major clones rather than principal zymodemes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 83, 249-255.
- Toledo, M.J.d.O., Bahia, M.T., Carneiro, C.M., Martins-Filho, O.A., Tibayrenc, M., Barnabé, C., y col. (2003). Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different Trypanosoma cruzi clonal genotypes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47(1), 223-230.
- Toledo O, M., de Lana, M., Carneiro, C.M., Bahia, M.T., Machado-Coelho, G., Veloso, V.M., y col. (2002). Impact of Trypanosoma cruzi clonal evolution on its biological properties in mice. *Experimental Parasitology* 100(3), 161-172.
- Tomasini, N., Lauthier, J.J., Llewellyn, M.S., yDiosque, P. (2013). MLSTest: novel software for multi-locus sequence data analysis in eukaryotic organisms. *Infection, Genetics and Evolution* 20, 188-196.
- Toogood, H.S., Gardiner, J.M., yScrutton, N.S. (2010). Biocatalytic reductions and chemical versatility of the old yellow enzyme family of flavoprotein oxidoreductases. *ChemCatChem* 2(8), 892-914.
- Torrico, F., Gascón, J., Barreira, F., Blum, B., Almeida, I.C., Alonso-Vega, C., y col. (2021). New regimens of benznidazole monotherapy and in combination with fosravuconazole for treatment of Chagas disease (BENDITA): a phase 2, double-blind, randomised trial. *The Lancet Infectious Diseases* 21(8), 1129-1140.
- Torrico, F., Gascon, J., Ortiz, L., Alonso-Vega, C., Pinazo, M.-J., Schijman, A., y col. (2018). Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases* 18(4), 419-430.
- Tourinho, R., de Almeida, C., Lemos, A., Gardinali, N., Vieira, Y., Schmidt-Chanasit, J., y col. (2015). Application of synthetic standard curves for absolute quantification of hepatitis A and E by real-time PCR. *J Genet Genome Res* 2(1), 1-3.
- Urbina, J., Moreno, B., Vierkotter, S., Oldfield, E., Moreno, S., Bailey, B., y col. (1999). Pyrophosphate is the most abundant high-energy phosphate compound in trypanosomatid and apicomplexan parasites and non-metabolizable analogs inhibit their proliferation in vitro and in vivo. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93(Suppl II), 72.
- Urbina, J.A. (2009). Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 311-318.
- Urbina, J.A. (2010). Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta tropica* 115(1-2), 55-68.
- Urbina, J.A., yDocampo, R. (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *TRENDS in Parasitology* 19(11), 495-501.

- Vago, A.R., Andrade, L.O., Leite, A.A., Reis, D.d.Á., Macedo, A.M., Adad, S.J., y col. (2000). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *The American journal of pathology* 156(5), 1805-1809.
- Valadares, H.M.S., Pimenta, J.R., de Freitas, J.M., Duffy, T., Bartholomeu, D.C., de Paula Oliveira, R., y col. (2008). Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. *International Journal for Parasitology* 38(7), 839-850.
- Vargas, N., Pedroso, A., yZingales, B. (2004). Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. *Molecular and Biochemical Parasitology* 138(1), 131-141.
- Vela, A., Coral-Almeida, M., Sereno, D., Costales, J.A., Barnabé, C., yBrenière, S.F. (2021). In vitro susceptibility of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (DTUs) to benznidazole: A systematic review and meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases* 15(3), e0009269.
- Veloso, V.M., Carneiro, C., Toledo, M., Lana, M., Chiari, E., Tafuri, W., y col. (2001). Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parental strains. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96, 1005-1011.
- Venegas, J., Ortiz, S., Munoz, S., ySolari, A. (1997). Molecular karyotype and schizodeme analyses of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chilean triatomines. *Parasitology* 115(1), 41-46.
- Villarreal, D., Barnabé, C., Sereno, D., yTibayrenc, M. (2004). Lack of correlation between in vitro susceptibility to benznidazole and phylogenetic diversity of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Experimental Parasitology* 108(1-2), 24-31.
- Villarreal, D., Nirdé, P., Hide, M., Barnabé, C., yTibayrenc, M. (2005). Differential gene expression in benznidazole-resistant *Trypanosoma cruzi* parasites. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49(7), 2701-2709.
- Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Alvarez, M.G., Petti, M., Bertocchi, G., y col. (2009). Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert review of anti-infective therapy* 7(2), 157-163.
- Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Bertocchi, G., Petti, M., Alvarez, M.G., y col. (2006). Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Annals of internal medicine* 144(10), 724-734.
- Vives, E., Ventriglia, M., Medvedovsky, D., Rothlin, R., yIl, F. (2004). Nitroimidazoles y nitrofuranos. *Farmacología II*, 1-6.
- Voak, A.A., Gobalakrishnapillai, V., Seifert, K., Balczo, E., Hu, L., Hall, B.S., y col. (2013). An essential type I nitroreductase from *Leishmania major* can be used to activate leishmanicidal prodrugs. *Journal of Biological Chemistry* 288(40), 28466-28476.
- Vogel, F. (Year). "Moderne probleme der humangenetik", in: *Ergebnisse der inneren medizin und kinderheilkunde*: Springer), 52-125.
- Wang, C.Y., McCarthy, J.S., Stone, W.J., Bousema, T., Collins, K.A., yBialasiewicz, S. (2018). Assessing *Plasmodium falciparum* transmission in mosquito-feeding assays using quantitative PCR. *Malaria journal* 17, 1-11.

- Ward, A.I., Olmo, F., Atherton, R.L., Taylor, M.C., yKelly, J.M. (2020). Trypanosoma cruzi amastigotes that persist in the colon during chronic stage murine infections have a reduced replication rate. *Open biology* 10(12), 200261.
- WHO (2023). *World Chagas Disease Day* [Online]. Available: <https://www.who.int/campaigns/world-chagas-disease-day> [Accessed].
- Wilkinson, S.R., yKelly, J.M. (2009). Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert reviews in molecular medicine* 11, e31.
- Wilkinson, S.R., Taylor, M.C., Horn, D., Kelly, J.M., yCheeseman, I. (2008). A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(13), 5022-5027.
- Yeo, M., Mauricio, I.L., Messenger, L.A., Lewis, M.D., Llewellyn, M.S., Acosta, N., y col. (2011). Multilocus sequence typing (MLST) for lineage assignment and high resolution diversity studies in Trypanosoma cruzi. *PLoS neglected tropical diseases* 5(6), e1049.
- Yoshida, N. (2008). Trypanosoma cruzi infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitology international* 57(2), 105-109.
- Yoshioka, K., Manne-Goehler, J., Maguire, J.H., yReich, M.R. (2020). Access to Chagas disease treatment in the United States after the regulatory approval of benznidazole. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 14(6), e0008398.
- Yun, O., Lima, M.A., Ellman, T., Chambi, W., Castillo, S., Flevaud, L., y col. (2009). Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-year experience of Médecins Sans Frontières. *PLoS neglected tropical diseases* 3(7), e488.
- Zingales, B. (2018). Trypanosoma cruzi genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta tropica* 184, 38-52.
- Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.d.S., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., y col. (2009). A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 1051-1054.
- Zingales, B., Araujo, R.G.A., Moreno, M., Franco, J., Aguiar, P.H.N., Nunes, S.L., y col. (2015). A novel ABCG-like transporter of Trypanosoma cruzi involved in natural resistance to benznidazole. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 110, 433-444.
- Zingales, B., Golgher, D.B., Marmorato, P.G., Souto, R.P., yGruber, A. (1993). Molecular approaches to diagnosis of Chagas' disease: use of defined antigens and a target ribosomal RNA sequence. *Biological Research* 26, 89-89.
- Zingales, B., yMacedo, A.M. (2023). Fifteen Years after the Definition of Trypanosoma cruzi DTUs: What Have We Learned? *Life* 13(12), 2339.
- Zingales, B., Miles, M.A., Campbell, D.A., Tibayrenc, M., Macedo, A.M., Teixeira, M.M., y col. (2012). The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, genetics and evolution* 12(2), 240-253.

Zingales, B., Miles, M.A., Moraes, C.B., Luquetti, A., Guhl, F., Schijman, A.G., y col. (2014). Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 109, 828-833.

Abreviaturas

°C	Grados centígrados
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNk	Ácido desoxirribonucleico del kinetoplasto
ADNsat	Ácido desoxirribonucleico satélite
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ACP	Análisis de Componentes Principales
BENEFIT	Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis
BZN	Benznidazol
BTA	Balanced testing accuracy
Ct	Ciclo umbral
CVC	Cross-validation consistency
CJ	Coeficiente de Jaccard
dNTPs	Dideoxynucleótidos trifosfato
ECh	Enfermedad de Chagas
EChO	Enfermedad de Chagas Oral
EDTA	Ácido tetra-acético de etilendiamina
Eq.Par/mL	Equivalente parasitario por mililitro
FMN	Flavin Mononucleótido
GEB	Buffer Guanidina EDTA
GSH	Glutación
IAC	Control interno de amplificación
IG	Information gain
μL	microlitro
μM	micromolar
MLEE	Multi-Locus Enzyme Electrophoresis
mM Milimolar	Milimolar
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótida
NADPH	Nicotinamida-Adenina Dinucleótido Fosfato

NFX	Nifurtimox
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR en tiempo real cuantitativa
Pre-TTO	Antes del Tratamiento
Post-TTO	Despues del Tratamiento
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RMSD	la desviación cuadrática media
RMSF	Fluctuación Cuadrática Media por Residuo
Rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
TRAENA	TRAtamiento EN pacientes Adultos
Tcntr-1	Gen de Nitroreductasa de tipo 1 de Trypanosoma cruzi
TcNTR-1	Enzima Nitroreductasa de tipo 1 de Trypanosoma cruzi
Tcoye	Gen de la Prostaglandina F2 α sintasa de Trypanosoma cruzi
TcOYE	Enzima Prostaglandina F2 α sintasa de Trypanosoma cruzi
Tcakr	Gen de la Aldo-Keto reductasa de Trypanosoma cruzi
TcAKR	Enzima Aldo-Keto reductasa de Trypanosoma cruzi
UDT	Unidad Discreta de Tipificación

Tabla Suplementaria 1. Características epidemiológicas de las cepas de referencia de *Trypanosoma cruzi* presentes en el biobanco del laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas (INGEBI) - CONICET.

Código Cepa/Aislado	UDT	Tipo de muestra	Origen geográfico	Origen biológico	Condición frente al NFX/BZN
SylvioX10/1	I	Cultivo <i>in-vitro</i>	Brasil	Humano	Susceptible
Dm28c	I	Cultivo <i>in-vitro</i>	Venezuela	Reservorio	Resistente
Colombiana	I	Cultivo <i>in-vitro</i>	Colombia	Humano	Resistente
BrazilA4	I	ADNg	Brasil	Desconocido	Resistente
DA	I	ADNg	Colombia	Humano	Resistente
Yuyu	I	ADNg	Brasil	Vector	Resistente
MG10	I	ADNg	Colombia	Vector	Susceptible
B51	I	ADNg	Colombia	Vector	Resistente
LB53	I	ADNg	Colombia	Vector	Susceptible
OV1	I	ADNg	Colombia	Vector	Susceptible
OV17	I	ADNg	Colombia	Vector	Resistente
SN3	I	ADNg	Colombia	Vector	Resistente
SN5	I	ADNg	Colombia	Vector	Resistente
SN6	I	ADNg	Colombia	Vector	Susceptible
STP33	I	ADNg	Colombia	Vector	Susceptible
GAL61	I	ADNg	Colombia	Reservorio	Susceptible
Gal4	I	Cultivo <i>in-vitro</i>	Colombia	Reservorio	Resistente
K98	I	ADNg	Argentina	Humano	Susceptible
DM	I	ADNg	Brasil	Humano	Susceptible
QUE	I	ADNg	México	Vector	Susceptible
HA	I	ADNg	Colombia	Humano	Susceptible
Col1.7G2	I	ADNg	Colombia	Humano	ND
PALV2_cl1	I	ADNg	Argentina	Vector	ND
PAN4	I	ADNg	Panamá	Humano	ND
TCC90	I	ADNg	Chile	Humano	ND
PAV00c17	I	ADNg	Argentina	Vector	ND
Tehuantepec	I	ADNg	México	Vector	Susceptible
Barra_Seca	I	ADNg	Brasil	Vector	Susceptible
Y	II	Cultivo <i>in-vitro</i>	Brasil	Humano	Resistente
CBB	II	ADNg	Chile	Humano	Susceptible
VL-10	II	ADNg	Brasil	Humano	Resistente
Esmeraldo	II	ADNg	Brasil	Humano	Resistente
Br	II	ADNg	Argentina	Humano	ND
JG	II	ADNg	Brasil	Humano	ND
Berenice62	II	ADNg	Brasil	Humano	Susceptible
893	III	ADNg	Brasil	Reservorio	Resistente
INPA_3663	III	ADNg	Brasil	Vector	ND

M5631	III	ADNg	Brasil	Reservorio	ND
CANIII	IV	ADNg	Brasil	Humano	ND
3.1	IV	ADNg	Perú	Vector	ND
INPA-4167	IV	ADNg	Brasil	Vector	ND
STC10r	IV	ADNg	USA	Reservorio	ND
92122102R	IV	ADNg	USA	Reservorio	ND
HT	V	Cultivo <i>in-vitro</i>	Argentina	Humano	ND
HE	V	Cultivo <i>in-vitro</i>	Argentina	Humano	ND
VD	V	Cultivo <i>in-vitro</i>	Argentina	Humano	Susceptible
PAH179	V	ADNg	Argentina	Humano	Susceptible
Sc43	V	ADNg	Bolivia	Vector	Resistente
SO3	V	ADNg	Bolivia	Vector	Susceptible
LL014	V	ADNg	Argentina	Vector	ND
Arguilea	V	ADNg	Argentina	Humano	ND
ChVal	V	ADNg	Argentina	Humano	ND
TCC	VI	ADNg	Chile	Humano	ND
CA15	VI	ADNg	Bolivia	Vector	ND
Tulahuen	VI	Cultivo <i>in-vitro</i>	Chile	Humano	Susceptible
RA	VI	ADNg	Argentina	Humano	Susceptible
CL-Brener	VI	Cultivo <i>in-vitro</i>	Brasil	Vector	Susceptible

ADNg: ADN genómico UDT: Unidad Discreta de Tipificación BZN: Benznidazol

NFX: Nifurtimox

BD: Base de Datos

ND: No determinado