



Artículo original

## Sensibilidad *in vitro* a benznidazol, nifurtimox y posaconazol de cepas de *Trypanosoma cruzi* de Paraguay

Nidia Acosta<sup>1</sup>, Gloria Yaluff<sup>1</sup>, Elsa López<sup>1</sup>, Christopher Bobadilla<sup>1</sup>, Analía Ramírez<sup>1</sup>, Ivana Fernández<sup>1</sup>, Patricia Escobar<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Medicina Tropical, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Asunción, Paraguay

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales-CINTROP, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

**Introducción.** *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, exhibe una sustancial heterogeneidad fenotípica y genotípica que puede influir en las variaciones epidemiológicas y clínicas de la enfermedad, así como en la sensibilidad a los fármacos utilizados en el tratamiento.

**Objetivo.** Evaluar la sensibilidad *in vitro* al benznidazol, el nifurtimox y el posaconazol de 40 cepas clonadas de *T. cruzi* de Paraguay, con distintos genotipos, huéspedes y localidades de origen.

**Materiales y métodos.** En su estado epimastigote, los parásitos se incubaron en medio de cultivo LIT (*Liver Infusion Tryptose*) con diferentes concentraciones de cada fármaco en ensayos por triplicado. El grado de sensibilidad se estimó a partir de las concentraciones inhibitorias del 50 y el 90% (IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub>) y se obtuvieron los valores promedio y la desviación estándar de cada cepa y fármaco. La significación estadística entre grupos se determinó mediante análisis de varianzas con el test no paramétrico de Wilcoxon/Kruskal-Wallis y valores de  $p < 0,05$ .

**Resultados.** Se observó un amplio rango de respuesta a los fármacos. Se identificaron dos grupos de parásitos (A y B) con diferencias significativas en la sensibilidad al benznidazol ( $p < 0,0001$ ), y tres grupos (A, B, C) en cuanto a la sensibilidad al nifurtimox y el posaconazol ( $p < 0,0001$ ).

**Conclusiones.** En general, las cepas fueron más sensibles al nifurtimox que al benznidazol y el posaconazol. Estas diferencias evidencian la heterogeneidad de las poblaciones de *T. cruzi* que circulan en Paraguay, lo que debe considerarse en el tratamiento y el seguimiento de las personas afectadas.

**Palabras clave:** *Trypanosoma cruzi*; enfermedad de Chagas; nitroimidazoles; nifurtimox; triazoles; Paraguay.

### In vitro susceptibility to benznidazole, nifurtimox and posaconazole of *Trypanosoma cruzi* isolates from Paraguay

**Introduction:** *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, shows substantial phenotypic and genotypic heterogeneity, which can influence the epidemiological and clinical variations of the disease and the sensitivity to the drugs used in the treatment.

**Objective:** To assess the in vitro susceptibility to benznidazole, nifurtimox, and posaconazole of 40 cloned strains of *T. cruzi* isolated in Paraguay belonging to different genotypes, hosts, and localities.

**Materials and methods:** We incubated the parasites in their epimastigote stage in LIT culture medium with different concentrations of each drug in triplicate assays. The degree of susceptibility was estimated by the inhibitory concentrations of 50 and 90% (IC<sub>50</sub> and IC<sub>90</sub>) to obtain the average values and the standard deviation for each strain and drug. We determined the statistical significance between groups by analysis of variances with the Wilcoxon/Kruskal-Wallis non-parametric test and values of  $p < 0.05$ .

**Results:** A wide range of drug response was observed. Two groups of parasites (A and B) were identified as having significant differences in susceptibility to benznidazole ( $p < 0.0001$ ), and three groups (A, B, C) to nifurtimox and posaconazole ( $p < 0.0001$ ).

**Conclusions:** Overall, the isolates were more susceptible to nifurtimox than benznidazole and posaconazole. Such differences highlight the heterogeneity of *T. cruzi* populations circulating in Paraguay, an aspect to consider in the treatment and follow up of patients.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease; nitroimidazoles; nifurtimox; triazoles; Paraguay.

**Recibido:** 02/09/2019

**Aceptado:** 08/08/2020

**Publicado:** 13/08/2020

#### Citación:

Acosta N, Yaluff G, López E, Bobadilla C, Ramírez A, Fernández I, Escobar P. Sensibilidad *in vitro* a benznidazol, nifurtimox y posaconazol de cepas de *Trypanosoma cruzi* de Paraguay. Biomédica. 2020;40:749-63.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.5187>

#### Correspondencia:

Nidia Acosta, Departamento de Medicina Tropical, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Dr. Cecilio Báez casi Gaspar Villamayor, Campus San Lorenzo, Asunción, Paraguay  
Teléfono: (595) (21) 326 5507  
nidacostag@gmail.com

#### Contribución de los autores:

Nidia Acosta: concepción, diseño e implementación del estudio, análisis e interpretación de resultados, y redacción del manuscrito  
Gloria Yaluff y Elsa López: ensayos experimentales y discusión de resultados  
Christopher Bobadilla, Analía Ramírez e Ivana Fernández: ejecución de los ensayos experimentales, clonación y discusión de resultados  
Patricia Escobar: asesoría en el diseño e implementación de los ensayos experimentales, análisis, interpretación y discusión de los resultados

#### Financiación:

Este trabajo fue financiado por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) de Paraguay a través del programa PROCENCIA con recursos del Fondo para la Excelencia de la Educación e Investigación – FEEI del FONACIDE, contrato N° 020/2015-14-inv-150.

#### Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

*Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, exhibe una sustancial heterogeneidad fenotípica y genotípica que podría tener cierto grado de influencia en las variaciones epidemiológicas y clínicas observadas en la enfermedad, así como en la sensibilidad a los fármacos utilizados en el tratamiento.

La enfermedad de Chagas, presente principalmente en Suramérica, Centroamérica y México, se considera la infección parasitaria con la mayor carga socioeconómica en América Latina (1) y se estima que entre 6 y 7 millones de personas están actualmente infectadas (2). Debido a los crecientes movimientos de población, la enfermedad también se ha extendido a otros continentes, convirtiéndose en un problema emergente para la salud pública global (3). La cardiopatía chagásica, su principal manifestación clínica grave, limita la capacidad de los afectados para trabajar y reduce la expectativa de vida, en tanto que su atención médica tiene altos costos, lo que se suma a la carga social que todo esto implica (2).

Aunque en los últimos años ha habido grandes progresos en el control de la transmisión vectorial y por transfusión de esta enfermedad, especialmente por medio de iniciativas subregionales (Amazonia, América Central, Pacto Andino, Cono Sur) que han permitido la certificación de la interrupción de la transmisión por los vectores principales en varios países (2), aún restan ciertos desafíos, sobre todo en cuanto a la sostenibilidad de las estrategias de control y vigilancia entomológica en países endémicos, la transmisión congénita, y el acceso al tratamiento de las personas ya infectadas y de las que presentan reactivación de la infección por inmunosupresión debida al HIV, enfermedades autoinmunitarias, cáncer o trasplantes (4-6), lo que podría poner en riesgo los logros alcanzados.

En ausencia de una vacuna, el tratamiento farmacológico es el aspecto relevante y crítico en el manejo de la enfermedad de Chagas. Los dos únicos fármacos actualmente disponibles son el benznidazol y el nifurtimox, pero su eficacia es limitada en la fase crónica de la infección, además de tener serios efectos secundarios y requerir largos períodos de tratamiento y seguimiento de los pacientes (7,8).

Asimismo, no hay ensayos de rutina con marcadores “de certeza” de la persistencia del parásito después del tratamiento que evalúen su eficacia, a lo que se suma que en ensayos *in vitro* e *in vivo* se ha evidenciado la existencia de cepas de *T. cruzi* naturalmente resistentes a estos fármacos, que podrían provocar el fracaso terapéutico (9-11). También, se ha observado que la resistencia puede ser inducida por diferentes factores, como la administración de dosis inadecuadas y discontinuas con la consecuente aparición de cepas resistentes (12,13). Los esfuerzos recientes en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la enfermedad se han centrado en antifúngicos como el posaconazol y el ravuconazol, que se mostraban prometedores en los experimentos *in vitro* e *in vivo* (14,15), pero que, en los ensayos clínicos en humanos demostraron ser menos efectivos que los dos fármacos tradicionales (16,17).

Actualmente, *T. cruzi* se divide en seis grupos, o unidades taxonómicas discretas, clasificados de TcI a TcVI (18). Todos los grupos pueden ser infectivos para el humano y, hasta la fecha, no se ha podido establecer una clara correlación entre una unidad taxonómica discreta específica y las manifestaciones clínicas de la enfermedad; en parte, esto se debe a que, además de la diversidad del agente causal, las características genéticas del huésped tendrían un papel en la patología.

Asimismo, en las infecciones naturales las cepas, al ser multiclonales, por lo general están constituidas por varias poblaciones con diferentes tipos de tropismo tisular que modificarían su comportamiento biológico (19-21). En diversos estudios se ha evidenciado una gran variabilidad genética en las poblaciones de *T. cruzi* en Paraguay y se las ha encontrado infectando distintas clases de huéspedes: humanos, insectos triatomínicos domiciliarios animales silvestres, especialmente armadillos, marsupiales y, últimamente, primates, así como animales domésticos (perros) (22-27).

En el ciclo doméstico se han identificado los seis genotipos (unidades taxonómicas discretas) con predominio de los grupos TcII, TcV y TcVI, en tanto que, en el ciclo selvático se han identificado hasta la fecha tres genotipos, TcII, TcIII y TcV, con predominio del TcIII, todos ellos en animales silvestres. Esta diversidad genética podría tener implicaciones en las manifestaciones clínicas de la enfermedad, la capacidad infecciosa, la virulencia, la patogenicidad, la capacidad antigénica y la sensibilidad a los medicamentos, aspectos que hasta la fecha se han explorado poco en las cepas paraguayas.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la sensibilidad *in vitro* frente a los fármacos tripanocidas de cepas de *T. cruzi* aisladas de diferentes huéspedes en Paraguay, con el fin de conocer si existían diferencias en su sensibilidad e identificar aquellas con resistencia natural.

Esta información permitirá avanzar en el conocimiento de la biología de las poblaciones de *T. cruzi* que circulan en Paraguay, especialmente en cuanto a su grado de sensibilidad a los medicamentos, ya que el éxito del tratamiento es una de las principales estrategias para disminuir la oferta parasitaria y mejorar el pronóstico de la enfermedad de Chagas.

## **Materiales y métodos**

### **Parásitos**

Se utilizaron 40 cepas de *T. cruzi* obtenidas entre 1986 y 2013 y pertenecientes a la colección de cepas del Departamento de Medicina Tropical (IICS-UNA), provenientes de humanos, triatomínicos y animales silvestres de zonas endémicas para la enfermedad de Chagas en Paraguay (cuadro 1). Las cepas se mantenían con pasajes regulares en medio de cultivo y ratón, para luego someterlas de nuevo a criopreservación, con el fin de conservar sus características biológicas. Como cepas de referencia, se emplearon la CL Brener y la Y del Instituto René Rachou de Belo Horizonte (Brasil), consideradas, respectivamente, como sensible y medianamente resistente al benznidazol y nifurtimox, según Filardi, *et al.* (9).

### **Mantenimiento de los parásitos**

Los parásitos criopreservados a -80°C se recuperaron y se mantuvieron en medio de cultivo LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (28) con suplemento de 10 % de suero fetal bovino a 28 °C; se hicieron pasajes semanales en el medio de cultivo hasta la realización de los ensayos.

### **Clonación de los aislamientos**

Cada cepa de *T. cruzi* se clonó utilizando la técnica de plaqueo en medio sólido según Yeo, *et al.* (29), para utilizar un solo clon de cada cepa en todos los ensayos y evitar los posibles efectos de la 'multiclonalidad' característica

de este parásito (20,21). Se aislaron cuatro clones de cada cepa utilizando el que presentara el mayor crecimiento en cultivo. Los clones se denominaron con el nombre de la cepa original, seguido de "cl" y el número del respectivo clon, por ejemplo, clon RF cl1.

**Cuadro 1.** Valores de IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub> obtenidos con los clones de *Trypanosoma cruzi* estudiados en ensayos *in vitro* con tres fármacos tripanocidas. Se muestran los valores promedios de tres pruebas independientes hechas por triplicado ± la desviación estándar.

Cepa	UTD	Huésped	Origen	Benznidazol			Nifurtimox			Posaconazol		
				IC <sub>50</sub>	IC <sub>90</sub>	Grupo	IC <sub>50</sub>	IC <sub>90</sub>	Grupo	IC <sub>50</sub>	IC <sub>90</sub>	Grupo
				(µg/ml)	(µg/ml)		(µg/ml)	(µg/ml)		(mg/ml)	(mg/ml)	
				Promedio ± DE	Promedio ± DE		Promedio ± DE	Promedio ± DE		Promedio ± DE	Promedio ± DE	
T601cl1	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	5,35 ± 2,56	37,44 ± 0,32	A	2,35 ± 0,02	5,81 ± 0,04	A	0,95 ± 0,04	4,75 ± 0,04	A
T632cl1	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	5,01 ± 1,33	36,77 ± 0,51	A	2,13 ± 0,09	6,45 ± 0,02	A	1,34 ± 0,02	4,07 ± 0,04	A
T720cl1	ND	<i>T.s.</i>	CHA	4,23 ± 0,67	42,77 ± 3,31	A	2,34 ± 0,21	5,85 ± 0,18	A	1,19 ± 0,22	3,77 ± 0,16	A
MA125cl1	TcIII	<i>E.s.</i>	CHA	2,99 ± 0,02	36,21 ± 2,67	A	2,66 ± 0,09	5,96 ± 0,01	A	1,49 ± 0,13	3,66 ± 0,33	A
CON14cl1	TcVI	<i>T.i.</i>	CON	6,01 ± 0,01	37,11 ± 2,75	A	2,61 ± 0,24	6,31 ± 0,04	A	2,33 ± 0,24	4,02 ± 0,22	A
MA26 cl1	TcIII	<i>D.n.</i>	CHA	4,25 ± 1,56	35,04 ± 1,10	A	2,77 ± 0,19	6,49 ± 0,17	A	0,45 ± 0,15	3,48 ± 0,29	B
Armadillo20cl2	TcIII	<i>D.n.</i>	CHA	4,91 ± 1,61	35,43 ± 0,62	A	1,98 ± 0,01	5,77 ± 0,03	A	0,37 ± 0,12	4,07 ± 0,27	B
CON10cl1	TcII	<i>T.i.</i>	CON	6,71 ± 1,70	38,11 ± 0,27	A	1,77 ± 0,22	6,01 ± 0,02	A	0,43 ± 0,2	3,45 ± 0,09	B
RFcl1	TcII	HUM	COR	6,93 ± 2,76	37,90 ± 0,91	A	2,27 ± 0,38	5,93 ± 0,07	A	<0,089	2,32 ± 0,13	C
Pot7bug9cl1	TcII	<i>T.i.</i>	CHA	6,58 ± 0,06	41,88 ± 2,75	A	0,80 ± 0,06	5,29 ± 0,01	B	1,49 ± 0,34	4,03 ± 0,06	A
SPE3cl1	ND	<i>T.i.</i>	SP	5,98 ± 1,07	36,42 ± 0,34	A	0,86 ± 0,10	5,75 ± 0,11	B	1,33 ± 0,03	4,55 ± 0,66	A
CON11cl1	TcII	<i>T.i.</i>	CON	2,17 ± 0,70	35,82 ± 0,45	A	1,23 ± 0,03	5,66 ± 0,12	B	0,39 ± 0,19	3,98 ± 0,34	B
ARcl1	TcII	HUM	CEN	8,42 ± 2,66	43,98 ± 2,78	A	1,29 ± 0,40	7,84 ± 0,14	**	0,48 ± 0,16	2,90 ± 0,13	B
Chaco19cl1	TcIII	<i>T.i.</i>	CHA	5,54 ± 1,41	36,22 ± 1,58	A	1,82 ± 0,03	5,54 ± 0,21	B	0,35 ± 0,01	3,25 ± 0,01	B
Armadillo13cl1	TcIII	<i>D.n.</i>	CHA	4,33 ± 1,95	42,64 ± 1,88	A	1,31 ± 0,01	5,78 ± 0,06	B	0,68 ± 0,03	2,87 ± 0,30	B
T595cl2	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	7,69 ± 0,45	36,67 ± 0,29	A	1,29 ± 0,01	5,35 ± 0,08	B	<0,089	2,62 ± 0,05	C
MA239cl2	TcIII	<i>D.n.</i>	SP	6,60 ± 3,52	32,32 ± 2,87	A	0,93 ± 0,09	6,07 ± 0,07	B	<0,089	2,17 ± 0,03	C
MA194cl1	TcIII	<i>Ch. spp</i>	CHA	4,57 ± 1,08	42,45 ± 2,98	A	0,88 ± 0,22	5,88 ± 0,02	B	3,03 ± 0,17	5,91 ± 0,10	**
JFcl1	TcVI	HUM	AMA	8,50 ± 1,40	94,08 ± 9,24	**	1,84 ± 0,28	5,79 ± 0,12	A	2,09 ± 0,05	4,04 ± 0,86	A
T589cl1	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	14,14 ± 1,01	37,40 ± 1,01	**	2,90 ± 0,50	9,31 ± 0,89	**	3,28 ± 0,03	6,65 ± 0,09	**
MANUcl1	ND	HUM	SP	2,68 ± 1,14	34,23 ± 2,77	B	2,28 ± 0,34	6,55 ± 0,02	A	1,85 ± 0,01	4,41 ± 0,23	A
CON3cl1	TcII	<i>T.s.</i>	CON	< 0,625	27,09 ± 1,98	B+	2,18 ± 0,01	6,23 ± 0,05	A	1,24 ± 0,03	4,15 ± 0,03	A
T530cl1	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	3,58 ± 0,23	34,56 ± 1,73	B	1,88 ± 0,07	5,59 ± 0,02	A	0,47 ± 0,11	3,33 ± 0,24	B
T532cl4	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	2,01 ± 0,23	33,45 ± 2,30	B	2,11 ± 0,06	5,72 ± 0,04	A	0,36 ± 0,21	3,15 ± 0,05	B
MA111cl1	TcIII	<i>E.s.</i>	CHA	3,27 ± 1,32	34,13 ± 0,82	B	2,09 ± 0,10	5,77 ± 0,05	A	0,54 ± 0,06	2,72 ± 0,05	B
T503cl1	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	< 0,625	22,96 ± 3,11	B+	2,43 ± 0,32	6,18 ± 0,05	A	<0,089	2,55 ± 0,31	C
CON7cl1	TcII	<i>T.s.</i>	CON	< 0,625	26,78 ± 3,01	B+	0,92 ± 0,03	5,18 ± 0,18	B	2,25 ± 0,26	4,89 ± 0,09	A
Pot7bug3cl1	TcII	<i>T.i.</i>	CHA	< 0,625	24,89 ± 1,74	B+	0,82 ± 0,06	5,54 ± 0,03	B	1,93 ± 0,04	4,27 ± 0,08	A
Lengua15cl1	TcVI	<i>T.i.</i>	CHA	1,71 ± 0,73	35,86 ± 1,13	B	1,10 ± 0,57	5,38 ± 0,09	B	0,32 ± 0,12	3,01 ± 0,15	B
T583cl1	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	< 0,625	25,45 ± 2,09	B+	0,86 ± 0,22	6,13 ± 0,05	B	<0,089	2,15 ± 0,19	C
MJcl2	ND	HUM	ND	< 0,625	31,16 ± 1,34	B+	<0,156	4,68 ± 0,03	C	1,52 ± 0,002	2,79 ± 0,02	A
CON5cl2	TcII	<i>T.s.</i>	CON	< 0,625	28,44 ± 1,49	B+	<0,156	4,34 ± 0,18	C	<0,089	2,52 ± 0,01	C
MA87cl1	TcIII	<i>D.n.</i>	CHA	< 0,625	31,47 ± 1,17	B+	<0,156	5,05 ± 0,07	C	<0,089	2,34 ± 0,06	C
T592cl1	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	< 0,625	28,81 ± 2,54	B+	<0,156	4,78 ± 0,23	C	<0,089	2,19 ± 0,05	C
Armadillo9cl1	TcIII	<i>D.n.</i>	CHA	< 0,625	31,19 ± 1,35	B+	<0,156	5,15 ± 0,09	C	<0,089	2,40 ± 0,03	C
Chaco32cl2	TcIII	<i>T.i.</i>	CHA	< 0,625	22,49 ± 2,15	B+	<0,156	5,19 ± 0,04	C	<0,089	2,38 ± 0,22	C
T564cl1	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	< 0,625	23,56 ± 2,27	B+	<0,156	5,25 ± 0,06	C	<0,089	2,45 ± 0,22	C
T505cl1	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	< 0,625	25,66 ± 2,23	B+	<0,156	4,76 ± 0,15	C	<0,089	2,49 ± 0,14	C
T591cl1	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	< 0,625	29,21 ± 2,33	B+	<0,156	5,05 ± 0,08	C	<0,089	2,59 ± 0,05	C
T657cl1	TcV	<i>T.i.</i>	CHA	< 0,625	28,09 ± 3,54	B+	<0,156	4,98 ± 0,19	C	<0,089	2,44 ± 0,24	C
Y*	TcII	HUM	BRA	15,22 ± 3,10	43,34 ± 1,70	REF	1,42 ± 0,18	6,35 ± 0,56	REF	2,73 ± 0,05	7,09 ± 0,09	REF
CL Brener*	TcVI	<i>T.i.</i>	BRA	13,14 ± 0,21	39,47 ± 0,67	REF	1,55 ± 0,45	5,65 ± 0,15	REF	6,88 ± 0,17	15,08 ± 0,38	REF

UTD: unidades taxonómicas discretas, según Zingales, et al. (18); HUM: humano; *T.i.*: *Triatoma infestans*; *T.s.*: *Triatoma sordida*; *D.n.*: *Dasympus novemcinctus*; *E.s.*: *Euphractus sexcinctus*; CHA: Chaco; CON: Concepción; SP: San Pedro; COR: Cordillera; AMA: Amambay; BRA: Brasil; REF: cepas de referencia. ND: no determinado. DE: desviación estándar

\*\* Por separado

\* En el grupo C por IC<sub>50</sub>

### **Tipificación de los clones biológicos**

La extracción de ADN se hizo a partir de un número aproximado de  $1 \times 10^9$  parásitos por ml provenientes de cultivos de cada clon, utilizando el estuche DNeasy™ (Qiagen), según las instrucciones del fabricante.

Para la tipificación y asignación de las unidades taxonómicas discretas, se utilizó una combinación de cuatro marcadores, incluidos los productos de amplificación de las subunidades pequeña (18S) y grande (24Sα) del gen del ácido ribonucleico ribosómico (ARNr), la región intergénica del minixón y los perfiles de la reacción en cadena de la polimerasa del gen de la proteína de choque térmico 60 con la enzima de restricción Eco RV (*Hsp 60/Eco RV*-PCR-RFLP), según protocolos ya descritos (30,31).

Los productos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa (Sigma) con solución tampón tris-borato-EDTA (TBE) 0,5X teñida con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz ultravioleta. Se utilizaron como referencia las cepas X10 Clone I (TcI), Esmeraldo-CI3 (TcII), ARMA 13 (TcIII), CAN III (TcIV), SC43 (TcV) y CL Brener (TcVI).

### **Fármacos**

Se usaron benznidazol en comprimidos de 100 mg (Abarax®, Laboratorio Farmacéutico Elea, Argentina), nifurtimox en polvo (Sigma-Aldrich) y posaconazol en polvo (Sigma-Aldrich). Se prepararon soluciones madre (*stock*) de cada fármaco, disolviéndolo en dimetilsulfóxido (DMSO), soluciones que luego se diluyeron en diferentes concentraciones con medio de cultivo fresco para las pruebas *in vitro*, cuidando que la concentración del DMSO no excediera el 1 % (v/v) para evitar su efecto citotóxico en los parásitos.

### **Ensayos *in vitro* con los fármacos**

El inóculo inicial fue de  $5 \times 10^5$  parásitos/ml. Los parásitos en estadio epimastigote y fase exponencial de crecimiento, se incubaron en medio de cultivo LIT con diferentes concentraciones de los fármacos en placas de 96 pozos durante 72 horas a 28 °C. Cada prueba se hizo por triplicado en tres eventos independientes. Como controles, se utilizaron parásitos incubados en medio de cultivo sin fármacos, pero con la concentración equivalente de DMSO. La viabilidad de los parásitos se determinó por recuento microscópico en cámara de Neubauer (número de parásitos/ml).

### **Determinación de $IC_{50}$ y de $IC_{90}$**

La actividad tripanocida de los fármacos se estimó con base en los valores de la concentración inhibitoria del 50 % y la del 90 % ( $IC_{50}$  e  $IC_{90}$ , respectivamente). Para ello, se utilizaron los valores obtenidos en el recuento de parásitos y se calcularon estos parámetros mediante un análisis de regresión lineal utilizando el *software* Mxflfit™ (ID Business Solution, Guildford, UK). En cada prueba, se determinaron el promedio y la desviación estándar por cepa y por fármaco.

### **Análisis estadísticos**

Para determinar la significación estadística entre los valores de  $IC_{50}$  e  $IC_{90}$  en los grupos, se hizo un análisis de varianzas mediante el test no paramétrico de Wilcoxon/Kruskal-Wallis después de la corrección de

Bonferroni y con valores de  $p < 0,05$ . La prueba de diferencia honestamente significativa (*Honestly Significant Difference*, HSD) de Tukey-Kramer se utilizó para graficar las diferencias significativas entre grupos utilizando el *software* JMP, versión 9.2™ (SAS, Institute).

### Consideraciones éticas

El protocolo fue aprobado por el Comité Científico y el Comité Ético del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Asunción (código P25/13).

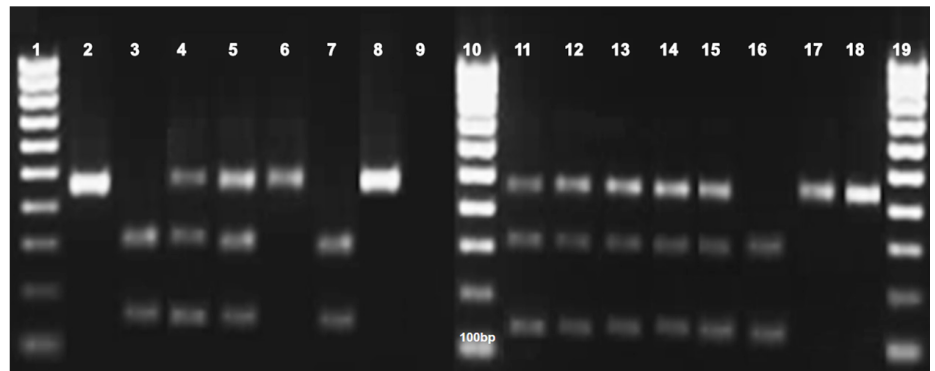
### Resultados

#### Conformación del panel de cepas y clonación

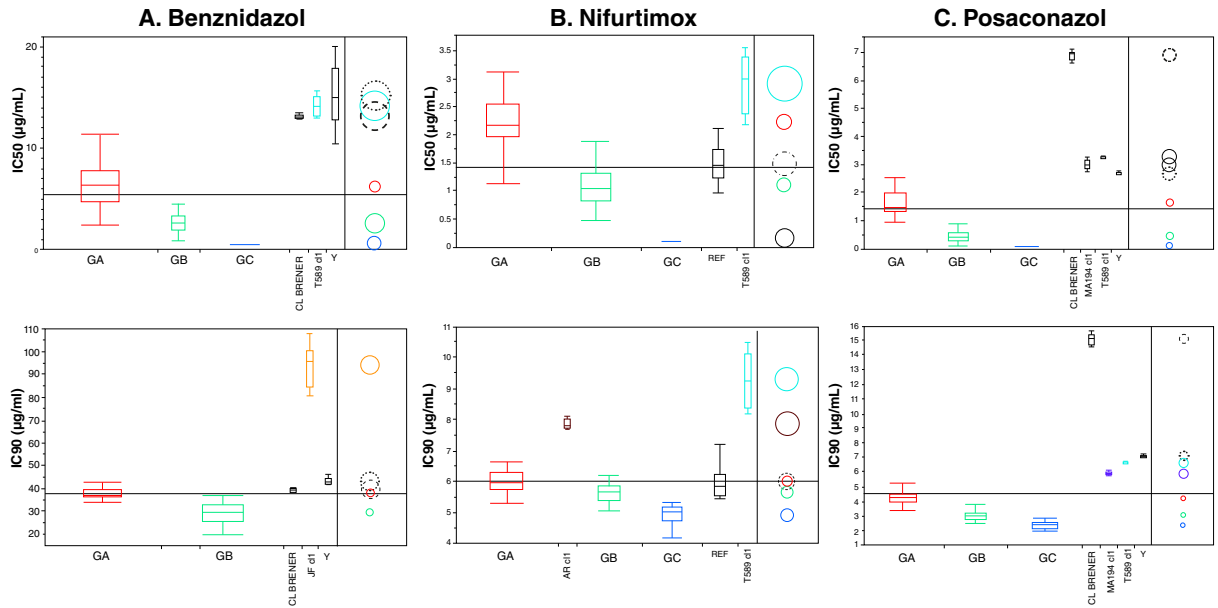
Todas las cepas de *T. cruzi* se sacaron de criopreservación y se clonaron (cuadro 1). Los clones caracterizados mostraron las bandas esperadas para las correspondientes unidades taxonómicas discretas según estudios previos (30,31). En su mayoría pertenecieron a la unidad taxonómica discreta TcV (32,5 %), seguida por TcIII (27,5 %), TcII (22,5 %) y TcVI (7,5 %). En cuatro clones (10 %) no fue posible determinar la unidad taxonómica discreta por inconvenientes con las muestras de ADN. En la figura 1 se muestran los productos de la PCR-RFLP del gen *Hsp 60/Eco RV* de un grupo de las cepas analizadas.

En cuanto al tipo de huésped, el 55 % (22/40) se aisló en ejemplares de *Triatoma infestans* intradomiciliarios, el 22,5 % (9/40) de diferentes especies de armadillos capturados en el medio silvestre, el 12,5 % (5/40) de casos clínicos humanos y el 10 % (4/40) de ejemplares domiciliarios de *T. sordida*.

Con respecto a la procedencia, el 67,5 % (27/40) provenía de la región del Chaco, el 15 % (6/40), del Departamento de Concepción, el 7,5 % (3/40), de San Pedro y, una cepa (2,5 %) de Cordillera, otra de Central y otra de Amambay, en tanto que uno de los aislamientos no tenía registro de la procedencia.



**Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR-RFLP del gen *Hsp60/Eco RV* en cepas de *Trypanosoma cruzi*. Líneas 1, 10 y 19: marcadores de peso molecular (100-1.000 bp); 2: cepa de referencia X10 Clone I (TcI) (462 bp); 3: cepa de referencia ARMA 13 (TcIII) (314/148 bp); 4: cepa de referencia SC43 (TcV) (462/314/148 bp); 5: cepa de referencia CL Brener (TcVI) (462/314/148 bp); 6: cepa de referencia Esmeraldo-Cl3 (TcII) (462 bp); 7: clon MA194cl1 (TcIII) (314/148 bp); 8: clon CON7cl1 (TcI o TcII o TcIV) (462 bp); 9: control negativo; 11: clon T595cl2 (TcV o TcVI) (462/314/148 bp); 12: clon T632cl1 (TcV o TcVI) (462/314/148 bp); 13: clon T589cl1 (TcV o TcVI) (462/314/148 bp); 14: clon T592cl1 (TcV o TcVI) (462/314/148 bp); 15: clon Lengua15cl1 (TcV o TcVI) (462/314/148 bp); 16: clon MA26cl1 (TcIII) (314/148 bp); 17: clon CON10cl1 (TcI o TcII o TcIV) (462 bp); 18: clon RFcl1 (TcI o TcII o TcIV) (462 bp)



GA: grupo A; GB: grupo B; GC: grupo C; REF: cepas de referencia

**Figura 2.** Comparación de los valores de  $IC_{50}$  y de  $IC_{90}$  de los grupos conformados por cepas de *Trypanosoma cruzi* de Paraguay en ensayos *in vitro* con benznidazol (A), nifurtimox (B) y posaconazol (C). Diagramas en caja de la distribución de los valores de  $IC_{50}$  e  $IC_{90}$  obtenidos en tres pruebas independientes hechas por triplicado con cada una de las cepas según grupo y fármaco. Se indican los percentiles 90 y 10, la mediana y el intervalo de confianza. Los círculos no superpuestos de la derecha indican diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) entre grupos según el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y la prueba de Tukey-Kramer (gráfico en el software JMP).

### Ensayos *in vitro*

**Benznidazol.** Los clones analizados fueron sensibles al benznidazol en las concentraciones evaluadas ( $\mu\text{g/ml}$ ): 50; 37,5; 25; 12,5; 6,25; 2,5; 1,25 y 0,625 (equivalente a un rango de 2,4 a 192  $\mu\text{M}$ ), con valores de  $IC_{50}$  e  $IC_{90}$  variables (cuadro 1). El análisis estadístico de los valores de la  $IC_{50}$  permitió clasificarlos en tres grupos (A, B y C), con diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad ( $p < 0,0001$ ) (figura 2A). El grupo A, conformado por 18 clones (45 %), fue el menos sensible, con valores de  $IC_{50}$  entre  $2,17 \pm 0,70 \mu\text{g/ml}$  y  $8,42 \pm 2,66 \mu\text{g/ml}$ . En el grupo B, se clasificaron cinco clones (12,5 %) de sensibilidad intermedia con valores de  $IC_{50}$  entre  $1,71 \pm 0,73 \mu\text{g/ml}$  y  $3,58 \pm 0,23 \mu\text{g/ml}$ , y en el grupo C, 15 clones (37,5 %) con mayor sensibilidad al fármaco e  $IC_{50}$  menor de 0,62  $\mu\text{g/ml}$  (la menor concentración evaluada).

Con base en la  $IC_{90}$ , se determinaron dos grupos, ya que los clones del grupo C quedaron agrupados con los del grupo B. El clon T589cl1, obtenido de un ejemplar intradomiciliario de *T. infestans*, registró el valor más alto de  $IC_{50}$  de los clones analizados ( $14,14 \pm 1,01 \mu\text{g/ml}$ ). El máximo porcentaje de inhibición alcanzado con este clon fue del 96 % en promedio. El clon JFcl1, aislado de un caso clínico humano, presentó el valor más alto de  $IC_{90}$  ( $94,08 \pm 9,24 \mu\text{g/ml}$ ) con una diferencia significativa frente a los clones del grupo A y B y las cepas de referencia ( $p < 0,0001$ ), aunque para la  $IC_{50}$  no mostró variación significativa frente a los valores del grupo A. El máximo porcentaje de inhibición alcanzado con este clon fue del 68 %.

**Nifurtimox.** Las concentraciones analizadas fueron de 7,8; 6,25; 3,12; 1,56; 0,625; 0,31 y 0,156  $\mu\text{g/ml}$  (equivalentes a un rango de 0,54 a 27,14  $\mu\text{M}$ ) (cuadro 1). Con base en los valores obtenidos de  $IC_{50}$  e  $IC_{90}$ , se determinaron tres grupos (A, B y C) con diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad

( $p < 0,0001$ ) (figura 2B). El grupo A fue el menos sensible, con valores de  $IC_{50}$  entre  $1,77 \pm 0,22 \mu\text{g/ml}$  y  $2,77 \pm 0,19 \mu\text{g/ml}$  y de  $IC_{90}$  entre  $5,72 \pm 0,04 \mu\text{g/ml}$  y  $6,55 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$ , e incluyó 16 clones (40 %). El grupo B, integrado por 13 clones (32,5 %), presentó sensibilidad intermedia al fármaco, con valores de  $IC_{50}$  entre  $0,80 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$  y  $1,82 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$ , y de  $IC_{90}$  entre  $5,18 \pm 0,18 \mu\text{g/ml}$  y  $6,13 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$ . El grupo C incluyó 10 clones (25 %) y fue el más sensible, con valores de  $IC_{50}$  menores de  $0,156 \mu\text{g/ml}$  (la menor concentración evaluada) y, de  $IC_{90}$ , entre  $4,34 \pm 0,18 \mu\text{g/ml}$  y  $5,25 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$ .

El clon T589cl1 registró los valores más altos de  $IC_{50}$  e  $IC_{90}$  ( $2,90 \pm 0,50 \mu\text{g/ml}$  y  $9,31 \pm 0,89 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente). El máximo porcentaje de inhibición alcanzado con este clon fue de 75 %. El clon ARcl1, aislado de un caso clínico humano, presentó valores de  $IC_{90}$  ( $7,84 \pm 0,14 \mu\text{g/ml}$ ) significativamente mayores que los de las cepas de referencia. El máximo porcentaje de inhibición alcanzado con este clon fue de 88 %.

*Posaconazol.* La actividad tripanocida de este fármaco se evaluó en un principio utilizando las mismas concentraciones del benznidazol y nifurtimox. Como no se observaba inhibición en el crecimiento de los parásitos, se fue aumentando la dosis y se pasó la concentración de  $\mu\text{g}$  a  $\text{mg}$ . Así, las concentraciones evaluadas fueron de 3,75; 2,68; 1,87; 1,25; 0,93; 0,71; 0,53; 0,35, 0,17 y 0,08  $\text{mg/ml}$  (equivalentes a un rango de 126,99 a 5.351,02  $\mu\text{M}$ ). Se determinaron tres grupos (A, B y C) con diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) (figura 2C). El grupo A fue el menos sensible, con valores de  $IC_{50}$  entre  $0,95 \pm 0,04 \text{mg/ml}$  y  $2,33 \pm 0,24 \text{mg/ml}$  y valores de  $IC_{90}$  entre  $2,79 \pm 0,02 \text{mg/ml}$  y  $4,89 \pm 0,09 \text{mg/ml}$ , e incluyó 13 (32,5 %) cepas (cuadro 1). El grupo B estuvo conformado por 11 clones (27,5 %) con sensibilidad intermedia y valores de  $IC_{50}$  entre  $0,32 \pm 0,12 \text{mg/ml}$  y  $0,68 \pm 0,03 \text{mg/ml}$ , y de  $IC_{90}$ , entre  $2,72 \pm 0,05 \text{mg/ml}$  y  $3,98 \pm 0,34 \text{mg/ml}$ . El grupo C incluyó 14 clones (35 %) con mayor sensibilidad al fármaco y una  $IC_{50}$  menor de  $0,089 \text{mg/ml}$  (la menor concentración evaluada), y de  $IC_{90}$ , entre  $2,15 \pm 0,19 \text{mg/ml}$  y  $2,62 \pm 0,05 \text{mg/ml}$ .

El clon T589cl1 registró los valores más altos de  $IC_{50}$  y de  $IC_{90}$  ( $3,28 \pm 0,03 \text{mg/ml}$  y  $6,65 \pm 0,09 \text{mg/ml}$ , respectivamente). El máximo porcentaje de inhibición alcanzado con este clon fue, en promedio, de 48 %. El clon MA194cl1, aislado de un armadillo (ciclo selvático), también presentó valores altos de  $IC_{50}$  e  $IC_{90}$  ( $3,03 \pm 0,17 \text{mg/ml}$  y  $5,91 \pm 0,10 \text{mg/ml}$ , respectivamente). El máximo porcentaje de inhibición alcanzado con este clon fue de 52 %. Se observó una acentuada diferencia entre las cepas de referencia con este fármaco, siendo la CL Brener menos sensible que la Y.

### **Comparación de la sensibilidad de los clones de *Trypanosoma cruzi* frente a los fármacos**

Los clones estudiados fueron más sensibles al nifurtimox que al benznidazol y poco sensibles al posaconazol, ya que fue necesario aumentar la concentración de este último para obtener los valores de las concentraciones inhibitorias en el mismo periodo (72 horas).

Se observó una amplia variación en la sensibilidad a estos fármacos, independientemente de la unidad taxonómica discreta, el huésped y la localidad de origen. Seis clones fueron los de menor sensibilidad a los tres fármacos simultáneamente: T589cl1 (TcV), T601cl1 (TcV), T632cl1 (TcV), T720cl1, MA125cl1 (TcIII) y CON14cl1 (TcVI) (cuadro 1), en tanto que nueve fueron los más sensibles: CON5cl2 (TcII), MA87cl1 (TcIII), T592cl1 (TcV),



Armadillo9cl1 (TcIII), Chaco32cl2 (TcIII), T564cl1 (TcV), T505cl1(TcV), T591cl1 (TcV) y T657cl1 (TcV). Los restantes clones mostraron variaciones en su sensibilidad, por ejemplo, el clon MJcl2 presentó sensibilidad intermedia al benznidazol (grupo B), alta al nifurtimox (grupo C) y baja al posaconazol (grupo A).

### Discusión

Entre los factores que pueden influir en la efectividad del tratamiento de la enfermedad de Chagas, están las características genéticas y biológicas de las cepas de *T. cruzi* que predominan en una determinada área geográfica. Por lo tanto, la resistencia natural de algunas cepas a los fármacos tripanocidas podría derivar en bajos porcentajes de cura en los pacientes chagásicos tratados.

En el presente estudio, se investigó la sensibilidad *in vitro* a tres fármacos en 40 cepas de *T. cruzi* de Paraguay. Se determinaron dos poblaciones con diferencias significativas en cuanto a su sensibilidad al benznidazol y tres grupos con respecto al nifurtimox y el posaconazol.

En estudios experimentales en otros países, se ha evidenciado también un amplio rango de respuesta a los fármacos tripanocidas entre las cepas de *T. cruzi*. En sus pruebas en ratones con cepas brasileras, Andrade, *et al.* (32), observaron diferencias en los porcentajes de cura, con valores menores de 20 %, entre 20 y 50 % y mayores de 50 %. Filardi, *et al.* (9), también reportaron diferencias en el grado de sensibilidad en cepas de Brasil, y encontraron cepas resistentes al benznidazol y al nifurtimox. En los estudios *in vitro* de Mejía-Jaramillo, *et al.* (11) con 33 cepas colombianas de *T. cruzi*, se observó que el 36 % fue sensible, el 48 % parcialmente resistente y el 16 % resistente al benznidazol. Luna, *et al.* (10), en ensayos *in vitro* con cepas de Colombia, y Muñoz-Calderón, *et al.* (33), con cepas de pacientes en Venezuela, también reportaron diferencias significativas en cuanto a su sensibilidad a los fármacos.

Las razones de estas diferencias entre las cepas de *T. cruzi* todavía no han sido esclarecidas y, hasta la fecha, no se han encontrado marcadores de resistencia natural. Varios autores han propuesto que tales diferencias podrían deberse a cambios en la expresión de importantes proteínas involucradas en la activación de los fármacos, como la enzima mitocondrial nitrorreductasa (NTR) de tipo I dependiente de NADH (34-36), en procesos de desintoxicación, como las enzimas aldo-ceto reductasa (TcAKR), alcohol deshidrogenasa (TcADH) (37) o prostaglandina F2 alfa sintetasa (*Old Yellow Enzyme*, OYE) (38,39), en el transporte de sustancias a través de la membrana, como la glucoproteína-P (bomba de eflujo) (40), y en el metabolismo de las purinas, como la enzima adenina fosforibosiltransferasa (APRT) (41), entre otras.

Nosaki, *et al.* (42), observaron que las cepas de *T. cruzi* con resistencia al nifurtimox presentaban cambios en el ADN, incluido el reordenamiento de cromosomas y la aneuploidía. García-Huertas, *et al.* (41), identificaron más de 130 genes involucrados en diferentes vías metabólicas que serían regulados por el parásito para resistir al fármaco, y propusieron que la resistencia en *T. cruzi* sería un proceso multigénico. En futuros estudios, se deben evaluar estos aspectos en las cepas analizadas en el presente estudio para dilucidar si tendrían alguna influencia en el grado de sensibilidad.

Las diferencias en la sensibilidad de los clones de Paraguay no parecen relacionadas con las unidades taxonómicas discretas, el tipo de huésped ni la procedencia. En estudios previos, se ha explorado esa posible asociación entre la diversidad filogenética y la sensibilidad a los fármacos. Al evaluar el efecto del benznidazol durante la fases aguda y crónica en la infección experimental en ratones BALB/c, Toledo, *et al.* (43), encontraron que las cepas de *T. cruzi* I (con la denominación de genotipo 20 en aquel tiempo) eran muy resistentes, en tanto que las cepas de *T. cruzi* II (genotipo 39) fueron parcialmente resistentes y otras cepas de *T. cruzi* II (genotipo 32) resultaron sensibles. Sin embargo, en pruebas *in vitro*, Villareal, *et al.* (44), determinaron la  $IC_{50}$  de 16 cepas pertenecientes a diferentes unidades taxonómicas discretas, huéspedes y regiones geográficas, y no encontraron asociación con el grado de sensibilidad al benznidazol. Asimismo, Luna, *et al.* (10) y Mejía-Jaramillo, *et al.* (11), al evaluar cepas pertenecientes a una misma unidad taxonómica discreta (Tcl) de diferentes huéspedes y áreas geográficas, observaron diferencias en cuanto al grado de sensibilidad al benznidazol. Teston, *et al.* (45), por su parte, en pruebas *in vivo* no observaron el predominio de cepas de una determinada unidad taxonómica discreta con un patrón particular de sensibilidad al benznidazol, como tampoco Gruending, *et al.* (46), en estudios experimentales en ratones inoculados con *T. cruzi* I, II y IV. Por lo tanto, se considera que las cepas pertenecientes a una misma unidad taxonómica discreta pueden mostrar diferentes rangos de sensibilidad, lo que, al parecer, es una característica inherente a cada cepa.

En general, los clones de Paraguay fueron más sensibles al nifurtimox que al benznidazol y poco sensibles al posaconazol. Estos resultados concuerdan con estudios previos en cepas de Colombia y Venezuela en los que, en ensayos *in vitro*, se encontró que el nifurtimox era más activo que el benznidazol (10,33). Si bien el mecanismo de activación de estos fármacos es parecido, presentan algunas diferencias en sus propiedades farmacológicas que podrían influir en su eficacia en las cepas de *T. cruzi* (47,48).

En el presente estudio, los clones evaluados resultaron poco sensibles al posaconazol en comparación con los otros dos fármacos, ya que fue necesario aumentar la concentración de este último para obtener los valores de las concentraciones inhibitorias en el mismo periodo (72 horas) y evidenciar las diferencias entre los clones en cuanto a la sensibilidad al fármaco. En estudios previos de evaluación del efecto del fármaco *in vitro*, se ha reportado que, comparado con los fármacos de referencia, el posaconazol era activo en menores concentraciones, en algunos casos incluso en el rango nanomolar, en diferentes cepas de *T. cruzi*, aunque sin alcanzar la eliminación completa del parásito en cultivos celulares infectados (49-51). Moraes, *et al.* (49), consideran al benznidazol y el nifurtimox como compuestos de acción tripanocida rápida y al posaconazol como de acción más lenta, y sugieren que, extendiendo el tiempo de exposición a este último fármaco, se podría alcanzar el 100 % de eficacia.

Los resultados obtenidos con el clon JFcl1 son muy interesantes (altos valores de  $IC_{90}$  con el benznidazol), más aún si se tiene en cuenta que la cepa original provenía de un caso clínico humano con reactivación de la infección por uso de inmunosupresores (52), aunque no se sabe si el paciente había recibido previamente tratamiento con benznidazol, por lo cual no puede deducirse si esa baja sensibilidad al fármaco es una característica natural del clon o fue inducida por el tratamiento previo. El clon ARcl1 presentó los valores de  $IC_{90}$  más altos con el nifurtimox en los

clones de Paraguay. Dicho clon correspondía a un caso clínico humano, y no se presumió un contacto previo con este fármaco, ya que en Paraguay el medicamento comúnmente usado es el benznidazol (53). Así pues, tal característica sería natural en este clon, lo que también sería el caso del MA194cl1, aislado de un armadillo en el que se registró la más baja sensibilidad al posaconazol.

El clon T589cl1 se destacó por sus altos valores de  $IC_{50}$  e  $IC_{90}$  con los tres fármacos. El aislamiento original provenía de un triatomino intradomiciliario del Chaco y, considerando que no había habido uso previo de estos fármacos (lo que podría haber inducido la baja sensibilidad observada), esta sería una característica inherente a este clon. En estudios previos tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha evidenciado que ciertas cepas de *T. cruzi* presentan resistencia cruzada a diferentes fármacos, por ejemplo, cepas resistentes simultáneamente al benznidazol y al nifurtimox (9,10,36) o al benznidazol y el posaconazol (54-56).

En el caso de la resistencia cruzada al benznidazol y el nifurtimox, algunos autores han propuesto que podría deberse a que comparten los mecanismos de activación y que las alteraciones en la expresión de las enzimas que participan en estos procesos llevarían a la aparición de esta característica (34,36). En cuanto a la resistencia cruzada al benznidazol y el posaconazol, poco se sabe, ya que los dos fármacos no comparten procesos bioquímicos similares en sus mecanismos de acción y no se han detectado alteraciones en el gen que codifica la enzima lanosterol 14 $\alpha$ -dimetilasa (CYP51), principal blanco del antifúngico posaconazol, ni en el cromosoma en el que se ubica este gen en las cepas de *T. cruzi* con resistencia a los dos fármacos (56). Estos aspectos deben ser abordados en mayor profundidad en futuros estudios.

Entre los clones de Paraguay estudiados, algunos fueron muy sensibles a un fármaco y menos sensibles a otro, mostrando así un comportamiento diferencial en cuanto a la sensibilidad. En estudios previos, se ha verificado esta resistencia selectiva de las cepas de *T. cruzi* a los medicamentos (43,57,58), aunque las causas se desconocen. Esto tiene su relevancia en el seguimiento del tratamiento, ya que es posible que el fármaco seleccionado sea más efectivo en algunas cepas de *T. cruzi* y otro lo sea en otras.

La información aquí presentada permite avanzar en el conocimiento de la biología básica de las poblaciones de *T. cruzi* que circulan en Paraguay, especialmente en lo referente a su grado de sensibilidad a los medicamentos utilizados en el tratamiento. Los clones biológicos que mostraron diferente grado de sensibilidad quedan disponibles para futuros estudios en modelo de ratón, en los que se determine la virulencia y la patogenicidad y se evalúen los otros estadios (amastigotes y tripomastigotes), previa normalización de los índices de infección en cultivos celulares y establecimiento de curvas de crecimiento y tasa de metaciclogenesis, con el fin de estudiar los mecanismos bioquímicos y moleculares de resistencia y sensibilidad a los fármacos y buscar biomarcadores de resistencia natural, aspectos que son relevantes para mejorar el tratamiento y el pronóstico de la enfermedad de Chagas.

## Referencias

1. Stanaway JD, Roth G. The burden of Chagas disease: Estimates and challenges. *Glob Heart*. 2015;10:139-44. <https://doi.org/10.1016/j.gheart.2015.06.001>
2. World Health Organization (WHO). Integrating neglected tropical diseases into global health and development. Fourth WHO report on neglected tropical diseases, 2017. Fecha de consulta: 20 de mayo del 2019. Disponible en: [https://www.who.int/neglected\\_diseases/resources/9789241565448/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/resources/9789241565448/en/)

3. Herricks JR, Hotez PJ, Wanga V, Coffeng LE, Haagsma JA, Basáñez MG, *et al.* The global burden of disease study 2013: What does it mean for the NTDs? *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11:e0005424. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005424>
4. Buccheri R, Kassab MJ, Freitas VL, Silva SC, Bezerra RC, Khoury Z, *et al.* Chagasic meningoencephalitis in an HIV infected patient with moderate immunosuppression: Prolonged survival and challenges in the HAART era. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015;57:531-5. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000600014>
5. Gray EB, La Hoz RM, Green JS, Vikram HR, Benedict T, Rivera H, *et al.* Reactivation of Chagas disease among heart transplant recipients in the United States, 2012-2016. *Transpl Infect Dis.* 2018;20:e12996. <https://doi.org/10.1111/tid.12996>
6. Kaushal M, Shabani S, Cochran EJ, Samra H, Zwagerman NT, Kaushal M. Cerebral trypanosomiasis in an immunocompromised patient: Case report and review of the literature. *World Neurosurg.* 2019;pii:S1878-875031537-2. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.05.260>
7. Pereiro AC. Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas disease. *Lancet.* 2019;393:1486-7. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30288-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30288-0)
8. Sangenito LS, da Silva Santos V, d'Avila-Levy CM, Branquinho MH, Souza Dos Santos AL, de Oliveira SSC. Leishmaniasis and Chagas disease - neglected tropical diseases: Treatment updates. *Curr Top Med Chem.* 2019;19:174-7. <https://doi.org/10.2174/156802661903190328155136>
9. Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81:755-9. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(87\)90020-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(87)90020-4)
10. Luna KP, Hernández IP, Rueda CM, Zorro MM, Croft SL, Escobar P. *In vitro* susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole. *Biomédica.* 2009;29:448-55. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v29i3.15>
11. Mejía-Jaramillo AM, Fernández GJ, Montilla M, Nicholls RS, Triana-Chávez O. *Trypanosoma cruzi* strains resistant to benznidazole occurring in Colombia. *Biomédica.* 2012;32:196-205. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-169>
12. Dos Santos FM, Caldas S, de Assis Cáu SB, Crepalde GP, de Lana M, Machado-Coelho GL, *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Induction of benznidazole resistance *in vivo* and its modulation by *in vitro* culturing and mice infection. *Exp Parasitol.* 2008;120:385-90. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.09.007>
13. Mejía AM, Hall BS, Taylor MC, Gómez-Palacio A, Wilkinson SR, Triana-Chávez O, *et al.* Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. *J Infect Dis.* 2012;206:220-8. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis331>
14. Urbina JA, Payares G, Contreras LM, Liendo A, Sanoja C, Molina J, *et al.* Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *In vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:1771-7. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.7.1771>
15. Urbina JA, Payares G, Sanoja C, Lira R, Romanha AJ. *In vitro* and *in vivo* activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Int J Antimicrob Agents.* 2003;21:27-38. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(02\)00273-x](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(02)00273-x)
16. Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, *et al.* Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med.* 2014;37020:1899-908. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1313122>
17. Morillo CA, Waskin H, Sosa-Estani S, Del Carmen Bangher M, Cuneo C, Milesi R, *et al.* STOP-CHAGAS Investigators. Benznidazole and posaconazole in eliminating parasites in asymptomatic *T. cruzi* carriers: The STOP-CHAGAS trial. *J Am Coll Cardiol.* 2017;69:939-47. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.12.023>
18. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 2012;12:240-53. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>
19. Burgos JM, Begher S, Silva HM, Bisio M, Duffy T, Levin MJ, *et al.* Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* I tropism for central nervous system in Chagas reactivation due to AIDS. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78:294-7.

20. Llewellyn MS, Rivett-Carnac JB, Fitzpatrick S, Lewis MD, Yeo M, Gaunt MW, *et al.* Extraordinary *Trypanosoma cruzi* diversity within single mammalian reservoir hosts implies a mechanism of diversifying selection. *Int J Parasitol.* 2011;41:609-14. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.12.004>
21. Bontempi IA, Bizai ML, Ortiz S, Manattini S, Fabbro D, Solari A, *et al.* Simple methodology to directly genotype *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in single and mixed infections from human blood samples. *Infect Genet Evol.* 2016;43:123-9. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.05.026>
22. Chapman MD, Baggaley RC, Godfrey-Fausset PF, Malpas TJ, White G, Canese J, *et al.* *Trypanosoma cruzi* from the Paraguayan Chaco: Isoenzyme profiles of strains isolated at Makthlawaiya. *J Protozool.* 1984;31:482-6. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1984.tb02999.x>
23. Cura CI, Mejía-Jaramillo AM, Duffy T, Burgos JM, Rodriguero M, Cardinal MV, *et al.* *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes. *Int J Parasitol.* 2010;40:1599-607. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.06.006>
24. del Puerto F, Sánchez Z, Nara E, Meza G, Paredes B, Ferreira E, *et al.* *Trypanosoma cruzi* lineages detected in congenitally infected infants and *Triatoma infestans* from the same disease-endemic region under entomologic surveillance in Paraguay. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;82:386-90. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0006>
25. Sánchez Z, Russomando G, Chena L, Nara E, Cardozo E, Paredes B, *et al.* *Triatoma sordida*, indicadores de adaptación y transmisión de *Trypanosoma cruzi* en intradomicilio del Chaco Paraguayo. *Mem Inst Investig Cienc Salud.* 2016;14:96-101. [https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014\(03\)96-101](https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014(03)96-101)
26. Acosta N, Miret J, López E, Schinini A. First report of *Sapajus cay* naturally infected by *Trypanosoma cruzi* in San Pedro Department, Paraguay. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2016;25:327-32. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016052>
27. Acosta N, López E, Lewis MD, Llewellyn MS, Gómez A, Román F, *et al.* Hosts and vectors of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in the Chagas disease endemic region of the Paraguayan Chaco. *Parasitol.* 2017;144:884-98. <https://doi.org/10.1017/S0031182016002663>
28. Camargo E. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi* I. Origen of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1964;6:93-100.
29. Yeo M, Lewis MD, Carrasco HJ, Acosta N, Llewellyn M, da Silva Valente SA, *et al.* Resolution of multiclonal infections of *Trypanosoma cruzi* from naturally infected triatomine bugs and from experimentally infected mice by direct plating on a sensitive solid medium. *Int J Parasitol.* 2007;37:111-20. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.08.002>
30. Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GA, *et al.* Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol.* 2005;35:225-33. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.10.024>
31. Lewis MD, Ma J, Yeo M, Carrasco HJ, Llewellyn MS, Miles MA. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: Systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81:1041-9. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.09-0305>
32. Andrade SG, Magalhães JB, Pontes AL. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull World Health Organ.* 1985;63:721-6.
33. Muñoz-Calderón A, Santaniello A, Pereira A, Yannuzzi J, Díaz-Bello Z, Alarcón de Noya B. 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.* 2012;71:14-22.
34. Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM, Cheeseman I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:5022-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711014105>
35. Mejía-Jaramillo AM, Fernández GJ, Palacio L, Triana-Chávez O. Gene expression study using real-time PCR identifies an NTR gene as a major marker of resistance to benznidazole in *Trypanosoma cruzi*. *Parasit Vectors.* 2011;4:169. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-169>
36. Campos MC, Leon LL, Taylor MC, Kelly JM. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: Evidence that distinct mechanisms can act in concert. *Mol Biochem Parasitol.* 2014;193:17-9. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.01.002>

37. González L, García-Huertas P, Triana-Chávez O, García GA, Murta SMF, Mejía-Jaramillo AM. Aldo-ketoreductase and alcohol dehydrogenase contribute to benznidazole natural resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol*. 2017;106:704-18. <https://doi.org/10.1111/mmi.13830>
38. García-Huertas P, Mejía-Jaramillo AM, Machado CR, Guimarães AC, Triana-Chávez O. Prostaglandin F2 $\alpha$  synthase in *Trypanosoma cruzi* plays critical roles in oxidative stress and susceptibility to benznidazole. *R Soc Open Sci*. 2017a;4:170773. <https://doi.org/10.1098/rsos.170773>
39. Quebrada-Palacio LP, González MN, Hernandez-Vasquez Y, Perrone AE, Parodi-Talice A, Bua J, *et al.* Phenotypic diversity and drug susceptibility of *Trypanosoma cruzi* TcV clinical isolates. *PLoS ONE*. 2018;13:e020346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203462>
40. Campos MC, Castro-Pinto DB, Ribeiro GA, Berredo-Pinho MM, Gomes LH, da Silva Bellieny MS, *et al.* P-glycoprotein efflux pump plays an important role in *Trypanosoma cruzi* drug resistance. *Parasitol Res*. 2013;112:2341-51. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3398-z>
41. García-Huertas P, Mejía-Jaramillo AM, González L, Triana-Chávez O. Transcriptome and functional genomics reveal the participation of adenine phosphoribosyltransferase in *Trypanosoma cruzi* resistance to benznidazole. *J Cell Biochem*. 2017;118:1936-45. <https://doi.org/10.1002/jcb.25978>
42. Nozaki T, Engel JC, Dvorak JA. Cellular and molecular biological analyses of nifurtimox resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;55:111-7. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1996.55.111>
43. Toledo MJ, Bahia MT, Carneiro CM, Martins-Filho OA, Tibayrenc M, Barnabé C, *et al.* Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:223-30. <https://doi.org/10.1128/aac.47.1.223-230.2003>
44. Villarreal D, Barnabé C, Sereno D, Tibayrenc M. Lack of correlation between *in vitro* susceptibility to benznidazole and phylogenetic diversity of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Exp Parasitol*. 2004;108:24-31. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.07.001>
45. Teston AP, Monteiro WM, Reis D, BossolaniGleison DP, Gomes ML, de Araújo SM, *et al.* *In vivo* susceptibility to benznidazole of *Trypanosoma cruzi* strains from the western Brazilian Amazon. *Trop Med Int Health*. 2013;18:85-95. <https://doi.org/10.1111/tmi.12014>
46. Gruending AP, Massago M, Teston AP, Monteiro WM, Kaneshima EN, Araújo SM, *et al.* Impact of benznidazole on infection course in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;92:1178-89. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0690>
47. Wilkinson SR, Bot C, Kelly JM, Hall BS. Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: Current treatments and future perspectives. *Curr Top Med Chem*. 2011;11:2072-84. <https://doi.org/10.2174/156802611796575894>
48. Hall BS, Wilkinson SR. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:115-23. <https://doi.org/10.1128/AAC.05135-11>
49. Moraes CB, Giardini MA, Kim H, Franco CH, Araujo-Junior AM, Schenkman S, *et al.* Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: Implications for Chagas disease drug discovery and development. *Sci Rep*. 2014;4:4703. <https://doi.org/10.1038/srep04703>
50. Cal M, Ioset JR, Fügen MA, Mäser P, Kaiser M. Assessing anti-*T. cruzi* candidates *in vitro* for sterile cidal activity. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2016;6:165-70. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2016.08.003>
51. MacLean LM, Thomas J, Lewis MD, Cotillo I, Gray DW, De Rycker M. Development of *Trypanosoma cruzi in vitro* assays to identify compounds suitable for progression in Chagas disease drug discovery. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12:e0006612. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006612>
52. Burgos LG, Ortiz BD, Canese A, Ojeda A, Melo M. Reactivation of Chagas disease y immunosuppressive therapy in a patient with systemic lupus erythematosus: Report of an exceptional case. *Am J Dermatopathol*. 2012;34:e84-9. <https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e318257f9e2>

53. Vera de Bilbao N, Samudio M, Schinini A, Acosta N, López E, González N, *et al.* Evaluación a 24 meses post-tratamiento con benznidazol en niños de 6 a 12 años infectados con *Trypanosoma cruzi*. *Rev Patol Trop.* 2004;33:301-12.
54. Bustamante JM, Craft JM, Crowe BD, Ketchie SA, Tarleton RL. New, combined, and reduced dosing treatment protocols cure *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Infect Dis* 2014;209:150-62. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit420>
55. Diniz L de F, Urbina JA, de Andrade IM, Mazzeti AL, Martins TA, Caldas IS, *et al.* Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: Positive interaction in concomitant and sequential treatments. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7:e2367. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002367>
56. Campos MC, Phelan J, Francisco AF, Taylor MC, Lewis MD, Pain A, *et al.* Genome-wide mutagenesis and multi-drug resistance in American trypanosomes induced by the front-line drug benznidazole. *Sci Rep.* 2017;7:14407. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14986-6>
57. Diniz LF, Caldas IS, Guedes PMM, Crepalde G, de Lana M, Carneiro CM, *et al.* Effects of ravuconazole treatment on parasite load and immune response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agent Chemother.* 2010;54:2979-86. <https://doi.org/10.1128/AAC.01742-09>
58. Caldas S, Caldas IS, Cecílio AB, Diniz LF, Talvani A, Ribeiro I, *et al.* Therapeutic responses to different anti-*Trypanosoma cruzi* drugs in experimental infection by benznidazole resistant stock. *Parasitol.* 2014;21:1-10. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000882>