



UNIVERSIDAD CES

Un compromiso con la excelencia

**IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES PARA LA ENFERMEDAD DE
CHAGAS EN FASE CRÓNICA UTILIZANDO LA ESTRATEGIA BIO-SELEX.**

Mateo Morales Velásquez. Bact.

Universidad CES

Facultad de Medicina

División de Salud Pública

Medellín

2023



UNIVERSIDAD CES

Un compromiso con la excelencia

IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES PARA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN FASE CRÓNICA UTILIZANDO LA ESTRATEGIA BIO-SELEX.

Mateo Morales Velásquez. Bact.

Estudiante cohorte 9

Juan David Ospina Villa. Bact., MsC., PhD.

María Isabel Osorio Pulgarín. Bact., MsC.

Asesores

Grupo de investigación en Medicina Tropical,
Instituto Colombiano de Medicina Tropical-CES
Trabajo de investigación para optar por el título de

Magíster en Medicina Tropical

Universidad CES

Facultad de Medicina

División de Salud Pública

Medellín, 19 de octubre de 2023

Agradecimientos

Es todo un reto condensar en unas pocas líneas el agradecimiento que siento hacia todas las personas que han desempeñado un papel crucial en este proceso. Reconozco que es posible que no todos queden reflejados en estas palabras, y pido disculpas de antemano por ello.

En primer lugar, deseo expresar mi profundo agradecimiento al Dr. Juan David Ospina Villa, quien abrió las puertas de Baltymas para mí y me brindó la confianza y la oportunidad de formar parte de este proyecto. Su pasión y experiencia, tanto en el tema de investigación como en el ámbito académico, fueron fundamentales para llevar adelante este proyecto. Su capacidad para motivarme y presionarme cuando fue necesario fue crucial, y sin su apoyo, este logro no habría sido posible.

Quiero extender mi agradecimiento a mi tutora, María Isabel Osorio Pulgarín, así como a la Dra. Miryan Margot Sánchez y a mis evaluadores, el Dr. Daniel Guzmán Zapata y el Dr. Didier Enrique Tirado Duarte. También agradezco a la coordinadora de la maestría, Katerine Marín Velázquez, y a todos los demás investigadores, estudiantes y docentes del ICMT. Su ayuda, dedicación, aportes y, en general, todo lo que he aprendido gracias a ustedes, ha sido invaluable.

Quiero expresar mi gratitud hacia mis amigos, quienes han sido un pilar emocional y anímico durante estos años. A Charlie, Samuel, Andrés, JuanFer, Mari, Camilo, Danny, Luisa, Ana, Linda y Sara, gracias por estar siempre presentes, por su confianza, sus consejos y, sobre todo, por invertir su tiempo en apoyarme.

Por último, pero no menos importante, deseo agradecer a mi familia. Ellos han sido un apoyo fundamental en este camino, brindándome su amor incondicional, apoyo y haciendo sacrificios para que pudiera avanzar en mi formación. A mis padres y hermanos, les agradezco profundamente, ya que soy quien soy gracias a ellos y a su respaldo constante en cada una de mis decisiones. Sin ustedes, no habría llegado hasta este punto. Los admiro, los quiero y les agradezco de todo corazón.

Tabla de contenido

RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	14
1.1. Planteamiento problema	14
1.2. Justificación	21
1.3. Pregunta de investigación	22
2. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL	23
2.1. Referentes conceptuales	23
2.2. Generalidades y ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	26
2.3. Formas de transmisión (figura 6)	32
2.3.1. Transmisión vectorial	32
2.3.2. Transmisión oral	32
2.3.3. Transmisión transfusional	33
2.3.4. Transmisión vertical	33
2.4. Fases de la enfermedad	33
2.4.1. Fase aguda	33
2.4.2. Fase indeterminada	34
2.5. Métodos de diagnóstico	34
2.5.1. Métodos parasitológicos directos	34
2.5.2. Métodos parasitológicos indirectos	35
2.5.3. Métodos moleculares	36
2.5.4. Métodos serológicos	36
2.5.5. Pruebas rápidas	36
2.6. Diagnóstico	37
2.6.1. Diagnóstico fase aguda	37
2.6.2. Diagnóstico fase crónica	38
2.6.3. Diagnóstico diferencial	39
2.7. Tratamiento	40
2.8. Biomarcadores	41
2.9. Aptámeros	42

2.10. Técnica SELEX	45
2.10.1. SELEX Clásico	45
2.10.2. Bio-SELEX	46
2.10.3. CE-SELEX (SELEX por electroforesis capilar)	46
2.10.4. Capture-SELEX	46
2.10.5. Magnetic-Bead SELEX	47
2.10.6. Cell-SELEX	47
2.10.7. Modificaciones Post-SELEX	47
2.11. Estado del arte	48
2.12. Marco normativo	52
3. HIPÓTESIS	55
3.1. Hipótesis	55
3.2. Hipótesis nula	55
4. OBJETIVOS	56
4.1. Objetivo general	56
4.2. Objetivos específicos	56
5. METODOLOGÍA	57
5.1. Enfoque metodológico de la investigación	57
5.2. Tipo de estudio	57
5.3. Población	57
5.3.1. Población de estudio	57
5.3.2. Criterios de exclusión	57
5.4. Variables	58
5.4.1. Variables dependientes	58
5.4.2. Variables independientes o covariables	58
5.5. Recolección de la información	58
5.5.1. Fuentes de información	58
5.5.2. Técnicas e instrumentos de recolección de información	58
5.5.3. Procedimiento de recolección de información	58
5.5.3.1. Extracción de proteínas de los sueros	58
5.5.3.2. Bio-SELEX (Figura 10)	59
5.5.3.2.1. SELEX tradicional	59
5.5.3.2.2. Secuenciación y análisis (Figura 11)	60
5.5.3.2.3. Síntesis del aptámero	61

5.5.3.2.4.	Aislamiento de biomarcadores usando los aptámeros seleccionados	61
5.5.3.2.5.	Espectrometría de masas	62
5.5.3.2.6.	Análisis bioinformáticos del biomarcador identificado	62
5.5.3.2.6.1.	Análisis de datos LC-MS/MS	62
5.5.3.2.6.2.	Alineación múltiple	63
5.5.3.2.6.3.	Búsqueda y predicción de estructuras 3D	64
5.5.3.2.7.	Docking molecular proteína-aptámero	64
5.5.3.2.8.	Análisis de interacciones proteína-aptámero	64
6.	ASPECTOS ÉTICOS	65
7.	RESULTADOS	66
7.1.	Extracción de proteínas de muestras de suero	66
7.2.	Análisis de secuenciación	66
7.3.	Aislamiento de las proteínas	67
7.4.	Identificación de proteínas reconocidas por CH1	68
7.5.	Análisis bioinformático de proteínas aisladas	71
7.6.	Docking molecular (MD) de la subunidad alfa de ATPasa-CH1	72
7.7.	Análisis de interacciones entre Tc ATPase alpha subunit y CH1	72
8.	DISCUSIÓN	75
9.	CONCLUSIONES	82
	LIMITACIONES DEL ESTUDIO	82
	PERSPECTIVAS	83
	PARTICIPACIÓN EN EVENTOS DE DIVULGACIÓN	84
	ARTÍCULOS CIENTÍFICOS	84
	FINANCIACIÓN	84
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

ANEXOS	98
1. Consentimiento informado de muestras de suero de proyecto INMUNOTRPOIC.	98
2. Consentimiento informado para muestras adicionales INMUNOTROPIC.	99
3. Consentimiento informado para muestras de controles sanos.	100
4. Consentimiento informado para muestras adicionales para muestras de controles sanos.	102

Índice de figuras

FIGURA 1. MAPA DE LAS REGIONES ENDÉMICAS DE CHAGAS EN AMÉRICA CENTRAL Y DEL SUR.	15
FIGURA 2. REPRESENTACIÓN VISUAL DE LOS BIOMARCADORES DETECTADOS EN: PARÁSITO, HOSPEDERO, CARDIOMIOPATÍA CHAGÁSICA Y SEGUIMIENTO DE LA EFICACIA AL TRATAMIENTO.	19
FIGURA 3. REPRESENTACIÓN VISUAL DE LA ESTRUCTURA DE LAS SECUENCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS CANDIDATAS PARA SU IMPLEMENTACIÓN EN LA ESTRATEGIA SELEX.	20
FIGURA 4. DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.	25
FIGURA 5. LOCALIZACIÓN Y MORFOLOGÍA DE <i>T. CRUZI</i> EN SUS DIFERENTES ESTADIOS.	26
FIGURA 6. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS ORGANELOS DE: A) AMASTIGOTE DE <i>T. CRUZI</i> . B) EPIMASTIGOTE DE <i>T. CRUZI</i> . C) TRIPOMASTIGOTE DE <i>T. CRUZI</i> .	28
FIGURA 7. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS VÍAS DE TRANSMISIÓN Y LAS FASES DE LA EC.	29
FIGURA 8. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS DTUS DE <i>T. CRUZI</i> EN EL CONTINENTE AMERICANO.	30
FIGURA 9. EXPRESIÓN GÉNICA EN TRIPANOSOMÁTIDOS.	32
FIGURA 10. ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO PARA LA EC.	39
FIGURA 11. ESQUEMATIZACIÓN DE LA ESTRATEGIA BIO-SELEX	60
FIGURA 12. DIAGRAMA DE FLUJO DE LOS ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS REALIZADOS DESPUÉS DE LA IDENTIFICACIÓN DEL BIOMARCADOR.	63
FIGURA 13. TOP 5 APTÁMEROS SELECCIONADOS.	67
FIGURA 14. AISLAMIENTO DE BIOMARCADORES MEDIANTE PULL-DOWN UTILIZANDO APTÁMERO CH1.	68
FIGURA 15. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE BIOMARCADORES AISLADOS.	73

Índice de tablas

TABLA 1. Cuantificación de las proteínas extraídas de muestras de suero.....	66
TABLA 2. Proteínas humanas (28) identificadas tanto en el grupo de proteínas extraídas como en el grupo de muestras de suero de pacientes positivos.	69
TABLA 3. Proteínas de <i>t. cruzi</i> (9) identificadas a partir de proteínas extraídas y muestras de suero de pacientes con ec.....	71
TABLA 4. Aminoácidos y nucleótidos involucrados en la interacción entre la subunidad alfa de la atpasa de <i>t. cruzi</i> y el aptámero ch1.....	73

Listado de abreviaturas

EC	Enfermedad de Chagas
<i>T.cruzi</i>	<i>Typanosoma cruzi</i>
OMS	Organización mundial de la salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
CCC	Cardiopatía chagásica crónica
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
TESA	Antígenos excretados/secretados de tripomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .
EVs	Vesículas extracelulares
MMP	Metaloproteinasa de matriz
NTproBN	Péptido natriurético cerebral N-terminal
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
ATP	Adenosín trifosfato
DTU	Unidades discretas de tipificación
HAI	Hemoaglutinación indirecta
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos
NIH	Institutos Nacionales de Salud
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>
LIGS	Selección Guiada por Ligando
TcTS	Proteínas transialidasa de <i>T. cruzi</i>

TrTS	Proteínas transialidasa de <i>T. rangeli</i>
SIVIGILA	Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública
SGSSS	Sistema General de Seguridad Social en Salud
LC-MS/MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas
APOE	Apolipoproteína E
SRA	Sistema renina-angiotensina
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
BRA	Bloqueadores de los receptores de angiotensina II

Resumen

Introducción: La enfermedad de Chagas, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, es endémica en América Latina y se presenta en dos fases: aguda y crónica. La fase crónica es de complejo diagnóstico, por lo que se busca encontrar nuevos biomarcadores que mejoren su detección. Los aptámeros, son moléculas de ADN o ARN con alta afinidad y especificidad hacia moléculas objetivo. Gracias a su versatilidad y capacidad de reconocimiento, se perfilan como una prometedora opción para la búsqueda de nuevos biomarcadores y potencial uso en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Objetivo: Identificar biomarcadores potencialmente útiles para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en fase crónica utilizando la estrategia Bio-SELEX.

Metodología: Este estudio fue observacional que involucró 4 grupos, cada uno con 18 muestras de suero. Se extrajeron proteínas de estas muestras para llevar a cabo una estrategia modificada de SELEX, denominada Bio-SELEX. Luego, se aislaron e identificaron las proteínas reconocidas por medio de Pull-Down y LC-MS/MS. Finalmente se hicieron experimentos de Docking molecular para conocer la interacción aptámero-proteína.

Resultados: Tras realizar el proceso de Bio-SELEX, se obtuvieron por NGS 204,132 secuencias de potenciales aptámeros, de las cuales se seleccionaron las cinco más representativas, denominando a la primera como CH1. Se aislaron bandas en dos grupos de muestras (extractos de proteínas y en sueros totales de pacientes con EC) por Pull-Down y entre las proteínas identificadas por LC-MS/MS, se destacó la subunidad alfa de ATPasa de *T. cruzi* como potencial biomarcador. Se realizó Docking molecular entre el aptámero CH1 y la proteína, identificando aminoácidos y nucleótidos críticos involucrados en la interacción.

Discusión: La subunidad alfa de ATPasa fue la única detectada en ambos grupos (extractos de proteínas y sueros individuales). Las ATPasas son esenciales para la supervivencia y virulencia del parásito, lo que las convierte en posibles objetivos diagnósticos y terapéuticos. El enfoque Bio-SELEX permitió la identificación directa de la subunidad alfa de ATPasa de *T. cruzi* pero se necesita más investigación para su completa caracterización y comprender su función en el metabolismo celular del parásito.

Conclusión: La identificación directa de la subunidad alfa de la ATPasa mediante el aptámero CH1 por Bio-SELEX abre potenciales usos diagnósticos, pero se necesita más investigación para su completa caracterización y el diseño de posibles herramientas diagnósticas.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas; aptámeros; biomarcadores, Bio-SELEX, *Trypanosoma cruzi*, subunidad alfa de ATPasa.

Abstract

Introduction: Chagas disease, caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, is endemic in Latin America and occurs in two phases: acute and chronic. The chronic phase is diagnostically challenging, prompting the search for new biomarkers to enhance its detection. Aptamers, DNA or RNA molecules with high affinity and specificity for target molecules, are considered a promising option for the discovery of new biomarkers and potential use in Chagas disease diagnosis due to their versatility and recognition capabilities.

Objective: To identify a potentially useful biomarker for the diagnosis of chronic Chagas disease using Bio-SELEX.

Methodology: This study is an observational approach involving four groups, each with 18 serum samples. Proteins were extracted from these samples to carry out a modified SELEX strategy known as Bio-SELEX. Subsequently, proteins recognized by pull-down were isolated and identified using LC-MS/MS. Finally, molecular docking was performed to understand the aptamer-protein interaction.

Results: After conducting the Bio-SELEX process, 204,132 sequences of potential aptamers were obtained by NGS, of which the top five most representative were selected, with the first one named CH1. Bands were isolated in two groups of samples (protein extracts and total sera from chronic Chagas disease patients) by pull-down, and among the proteins identified by LC-MS/MS, the alpha subunit of *T. cruzi* ATPase stood out as a potential biomarker. Molecular docking was performed between aptamer CH1 and the protein, identifying critical amino acids and nucleotides involved in the interaction.

Discussion: The alpha subunit of ATPase was the only one detected in both groups. ATPases are essential for the parasite's survival and virulence, making them potential diagnostic and therapeutic targets. The Bio-SELEX approach allowed for the direct identification of the alpha subunit of *T. cruzi* ATPase, but further research is needed for its complete characterization and understanding of its function in the parasite's cellular metabolism.

Conclusion: The direct identification of the alpha subunit of ATPase using CH1 through Bio-SELEX opens up potential diagnostic applications, but further research is required for its complete characterization and comprehension of its role in energy acquisition within the parasite's cells.

Keywords: Chagas disease; aptamers; biomarkers; Bio-SELEX; *Trypanosoma cruzi*; alpha subunit of ATPase.

1. Formulación del problema

1.1. Planteamiento problema

El parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*) es reconocido como el agente causante de la enfermedad de Chagas (EC), una infección sistémica crónica. La EC se caracteriza por su amplia diversidad de modos de transmisión. Entre ellos, el principal mecanismo de transmisión es a través de un insecto vector, siendo más de 150 especies de triatomíneos las implicadas en la propagación de la enfermedad. Además, la transmisión puede ocurrir de madres a hijos (vertical o congénita), mediante la transfusión de hemoderivados y el trasplante de tejidos no controlados, así como por la ingesta de alimentos contaminados, especialmente zumos de frutas o por ingesta directa de sangre de animales infectados (1).

La transmisión vectorial se lleva a cabo a través de vectores hematófagos pertenecientes a la subfamilia *Triatominae*, de la familia *Reduviidae*. La subfamilia de *Triatominae* incluye alrededor de 140 especies, clasificadas en 5 tribus (*Triatomini*, *Rhodniini*, *Alberproseniini*, *Bolboderini* y *Cavernicolini*) y 15-17 géneros. Dentro de estas tribus, las especies más relevantes en términos epidemiológicos se encuentran principalmente en las tribus de *Rhodniini* y *Triatomini*. *Triatoma infestans*, ampliamente distribuido en el sur de Sudamérica, *Rhodnius prolixus* en el norte de Sudamérica y América Central (excepto Panamá), y *T. dimidiata* en Ecuador, Perú, así como en varios países de América Central y el sur de México, son considerados como las especies más importantes en la transmisión de la enfermedad (1, 2) (figura 1).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que aproximadamente 75 millones de personas en el mundo están en riesgo de contraer la EC, y se estiman alrededor de 6 millones de infecciones actualmente (3). La enfermedad es endémica en el continente americano, siendo Argentina, Brasil, México y Bolivia los de mayor prevalencia (3).

En el contexto específico de Colombia, se reportó en el año 2019 que alrededor de 8 millones de personas estaban en riesgo de adquirir la infección, y se estimaba que entre 700.000 y 1.200.000 personas ya estaban infectadas (4, 5). La distribución de la infección por *T. cruzi* en Colombia se observa principalmente en los departamentos de Cundinamarca, Santander, Norte de Santander, Boyacá, Casanare, Arauca, así como en algunas comunidades ubicadas en la Sierra Nevada de Santa Marta (4).

En Colombia, la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas ha sido identificada como una de las principales vías de adquisición de la enfermedad. Según datos de la OMS, se reporta un promedio de 1.000 casos adquiridos por transmisión congénita cada año en el país (6). Además, se estima que alrededor de

100.000 mujeres en edad fértil, entre los 15 y los 49 años, padecen la EC en Colombia (6).

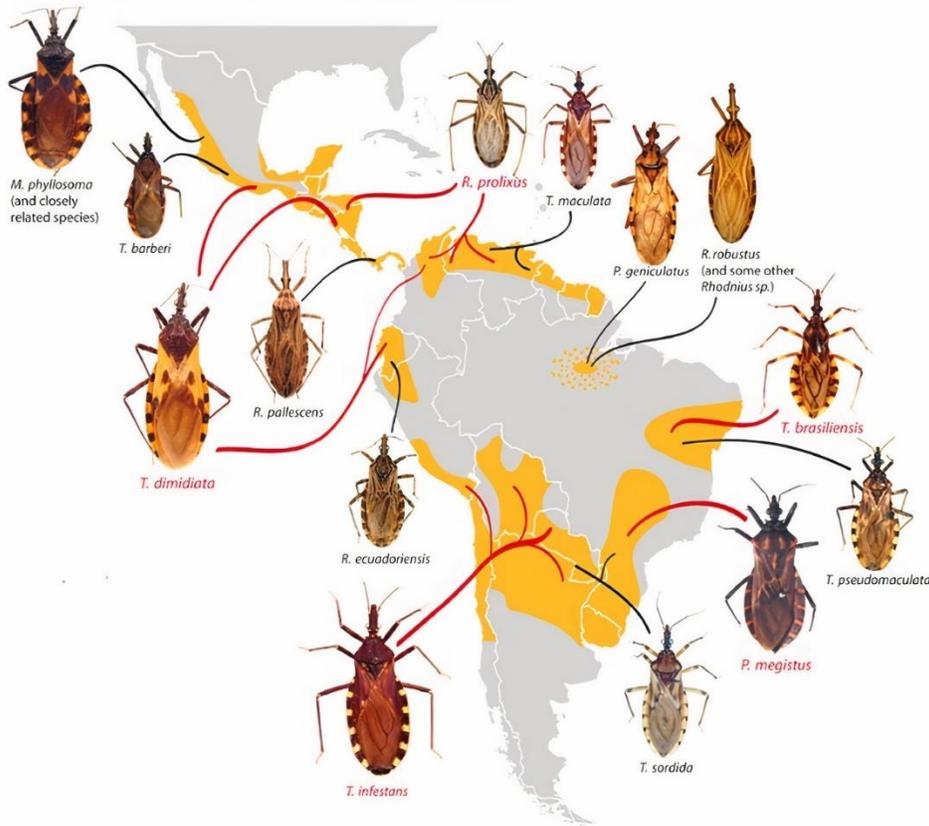


Figura 1. Mapa de las regiones endémicas de Chagas en América Central y del Sur que muestra las respectivas asociaciones con las 14 especies de vectores más importantes.

Fuente: tomada sin modificaciones de Patterson & Guhl. *Geographical Distribution of Chagas Disease*. 2010. (7)

Es importante resaltar que el tamizaje durante los controles prenatales para la EC en Colombia se limita a las mujeres embarazadas que residen en municipios endémicos o que provienen de zonas donde han estado expuestas a los vectores (8). Esta estrategia de tamizaje enfocada en un grupo específico de la población podría subestimar el número real de casos por transmisión vertical, ya que no se realiza a la población en general. Esto plantea un desafío tanto en los países endémicos como en aquellos no endémicos, donde migran y residen mujeres en edad fértil que pueden ser portadoras de la infección (6, 8).

En Colombia entre el 2012 y el 2019, aproximadamente el 40% de los nuevos casos de EC agudo ocurrieron en brotes de transmisión oral de la infección. Desde el 2008 al 2019 se han presentado 21 brotes por transmisión oral en los departamentos de Santander, Casanare, Cesar, Meta, Bolívar, Antioquia, Chocó y Atlántico; los recientes brotes por transmisión oral aumentaron la tasa de letalidad para 2019

hasta casi un 8%, posicionándolo por encima de otras enfermedades de transmisión vectorial como dengue y malaria (9).

La pandemia por SARS-CoV-2 ha tenido un impacto negativo en los programas de salud pública a nivel territorial y se ha reflejado en diversos aspectos, como el reajuste de los equipos de salud y la reasignación del personal para hacer frente a la emergencia sanitaria. Esto ha resultado en un acceso limitado o reducido a los servicios de salud por parte de la población, en la imposibilidad de implementar estrategias de salud pública que son fundamentales para abordar los problemas de salud prioritarios y en garantizar el derecho fundamental a la salud. El programa de EC no ha escapado de esta realidad y se ha visto directamente afectado, debilitando la capacidad de brindar una atención integral a los pacientes. Es importante destacar que, desafortunadamente, no se cuentan con datos concretos sobre los brotes de transmisión durante el periodo de la pandemia y postpandemia, que abarca los años comprendidos entre 2020 y 2022. Esta falta de información dificulta el análisis preciso de la situación epidemiológica y la toma de decisiones fundamentadas en base a datos concretos (10).

La EC, puede ser asintomática o presentar síntomas inespecíficos como malestar general y fiebre prolongada, principalmente en la fase aguda de la enfermedad. Sin embargo, las manifestaciones clínicas pueden variar según la etapa de la enfermedad y la forma de presentación. En la fase crónica, la cardiopatía chagásica crónica (CCC) representa la manifestación más grave de la enfermedad y afecta aproximadamente al 30% de los pacientes infectados por el parásito *T. cruzi*. La CCC se caracteriza por la presencia de anomalías en el ritmo cardíaco, alteraciones en la conducción eléctrica del corazón y la aparición de episodios tromboembólicos. Estas complicaciones se asocian con una alta mortalidad, siendo responsable de aproximadamente 50.000 muertes anuales a nivel mundial (11).

El diagnóstico de la EC en su fase aguda se lleva a cabo mediante la identificación de las formas parasitarias tripomastigotes en sangre, utilizando técnicas de microscopia como fresco, métodos de concentración o gota gruesa. Sin embargo, a medida que la enfermedad evoluciona hacia la fase crónica, tanto sintomática como asintomática, los niveles de parásitos circulantes disminuyen rápidamente, volviéndose prácticamente indetectables por la mayoría de los métodos utilizados en la actualidad. Por lo tanto, la observación directa de las formas parasitarias por microscopia no es suficiente para el diagnóstico de la EC en fase crónica. En esta etapa de la enfermedad, el diagnóstico se basa en pruebas inmunoserológicas que permiten la detección de anticuerpos contra el parásito en la sangre de los pacientes. Sin embargo, una sola prueba no es suficientemente sensible ni específica para confirmar el diagnóstico de manera definitiva, en consecuencia, para confirmar el diagnóstico, el Instituto Nacional de Salud en la “guía para la

vigilancia por laboratorio del *Trypanosoma cruzi*” en el año 2017 (12) recomendó realizar al menos dos pruebas serológicas de principio antigénico diferente, para aumentar la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico. Dos técnicas frecuentemente utilizadas son el enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) y la prueba de anticuerpos inmunofluorescentes. El ensayo de ELISA se recomienda como el método inicial, y si el resultado es positivo, se debe llevar a cabo una segunda prueba, generalmente la inmunofluorescencia indirecta (IFI), para confirmar el diagnóstico. Si ambas pruebas concuerdan en sus resultados, ya sea positivas o negativas, la probabilidad de un diagnóstico preciso supera el 95%. En caso de discrepancia entre las pruebas, especialmente si la segunda prueba es negativa, se debe realizar una tercera prueba utilizando un principio o antígeno diferente (13).

Se estima que menos del 10% de las personas afectadas por la EC en el continente americano han sido diagnosticadas, y apenas aproximadamente el 1% de los individuos afectados ha tenido acceso al tratamiento antiparasitario, el cual es efectivo principalmente durante la fase aguda y en inicios de la fase crónica de la enfermedad (3).

Tras el tratamiento, es común observar una disminución en la detección de anticuerpos específicos contra el parásito *T. cruzi* en las pruebas serológicas. Esta disminución indica una respuesta inmunológica reducida hacia el patógeno, lo que lleva a establecer el estado seronegativo del paciente. En otras palabras, la detección de anticuerpos disminuye o puede ser escasa, lo que sugiere que el sistema inmunológico del paciente no está respondiendo de manera tan activa como antes al parásito *T. cruzi*. Esta condición se ha convertido en el principal indicador terapéutico empleado para evaluar la eficacia del tratamiento en los casos de EC. No obstante, es importante destacar que se requiere un periodo de tiempo prolongado hasta que los anticuerpos anti *T. cruzi* sean completamente indetectables (14). Aunque la detección del material genético del parásito mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede indicar la falta de éxito del tratamiento, su uso es limitado y no siempre permite evaluar el daño en el tejido cardíaco. Por tanto, resulta fundamental buscar nuevos biomarcadores que reflejen la presencia del parásito en las células del huésped, la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento en los pacientes. Asimismo, se requiere el desarrollo de nuevas técnicas que mejoren la sensibilidad y especificidad del diagnóstico en la fase crónica de la enfermedad, especialmente en poblaciones con recursos económicos limitados y acceso restringido a servicios de salud especializados, donde la infección por *T. cruzi* es más prevalente y afecta principalmente a comunidades marginadas y desatendidas (15).

Dentro de las nuevas técnicas para lograr un diagnóstico y pronóstico más preciso en el ámbito médico, se destacan los biomarcadores. Los biomarcadores son moléculas que indican cambios biológicos y/o bioquímicos medibles, y se utilizan para observar la presencia, progresión o pronóstico de una enfermedad, su evolución, o la respuesta a un tratamiento. El término 'biomarcador', que proviene de la combinación de 'biológico' y 'marcador', abarca una amplia categoría de signos médicos que pueden medirse con precisión y reproducibilidad. Estos proporcionan indicaciones objetivas sobre el estado médico de un paciente (16). A diferencia de los síntomas médicos, que son las percepciones del paciente sobre su propia salud o enfermedad, los biomarcadores son indicadores cuantificables. Existen diversas definiciones de biomarcadores en la literatura, pero todas coinciden en que son características objetivas que reflejan procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Estas moléculas pueden variar y estar presentes tanto en el patógeno como en el huésped, especialmente en el caso de enfermedades infecciosas. Entre los biomarcadores más populares y utilizados se encuentran las proteínas y las secuencias de ADN, debido a su capacidad para proporcionar información relevante sobre el diagnóstico y la evolución de la enfermedad. Los biomarcadores brindan información del estado de un individuo o una población, y permite conocer a profundidad diferentes aspectos de las enfermedades a nivel preventivo, diagnóstico, y terapéutico, no solo en el desarrollo experimental de medicamentos sino también en conocer la progresión de las enfermedades y la efectividad de los tratamientos (17).

Los biomarcadores se clasifican en tres tipos distintos, que incluyen los biomarcadores de exposición, los cuales evalúan la presencia de una sustancia exógena o la interacción entre un agente externo y una molécula o célula específica en un organismo. Por otro lado, se encuentran los biomarcadores de efecto, que evalúan las alteraciones a nivel bioquímico o fisiológico que ocurren en el organismo como consecuencia de una enfermedad. Por último, están los biomarcadores de susceptibilidad, los cuales indican la capacidad heredada o adquirida de un organismo para responder a la exposición a una sustancia extraña (18).

La identificación y validación de nuevos biomarcadores constituyen un campo de investigación activo en la búsqueda de herramientas más precisas y eficientes para el diagnóstico y manejo de enfermedades, incluyendo las infecciosas (19).

En la EC se han propuesto varios biomarcadores con el objetivo de mejorar el diagnóstico y seguimiento de los pacientes. Entre ellos, se destacan biomarcadores provenientes del parásito *T. cruzi*, como los antígenos de excreción/secreción de tripomastigotes (TESA). Estos antígenos incluyen proteínas transalidasas que desempeñan un papel crucial en la penetración del parásito en las células del

huésped, estimulando así la respuesta inmunológica durante las fases aguda y crónica de la enfermedad. Por otro lado, se han identificado biomarcadores derivados del huésped, como el anti Tc-CA2, las vesículas extracelulares (EVs), el anti NGP32b y la IL-10. Estos biomarcadores permiten evaluar la interacción entre el parásito y el sistema inmunológico del huésped. Asimismo, se han descrito biomarcadores específicos de la CCC, como el MicroRNA-208a, miR-223-5p, miR-19a-3p, miR-21-5p, miR-29b-3p, miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-208a, miR-208b, miR-21, miR-146a, IP-10, PDGF-BB, metaloproteínasa de matriz 2 (MMP-2), MMP-9, CAP5.5, y el péptido natriurético cerebral N-terminal (NTproBNP), entre otros. Estos biomarcadores están asociados con la presencia y progresión de la enfermedad cardíaca en pacientes con EC. Además, se han identificado biomarcadores que pueden ser utilizados para evaluar la eficacia del tratamiento, como los linfocitos CD8+ T, el F2/3-ELISA, el ELISA-F29, IgG1, la apolipoproteína A-I y la fibronectina. Estos biomarcadores ofrecen información valiosa sobre la respuesta del paciente al tratamiento y pueden ser útiles para ajustar las estrategias terapéuticas en casos de EC (figura 2) (20-22).

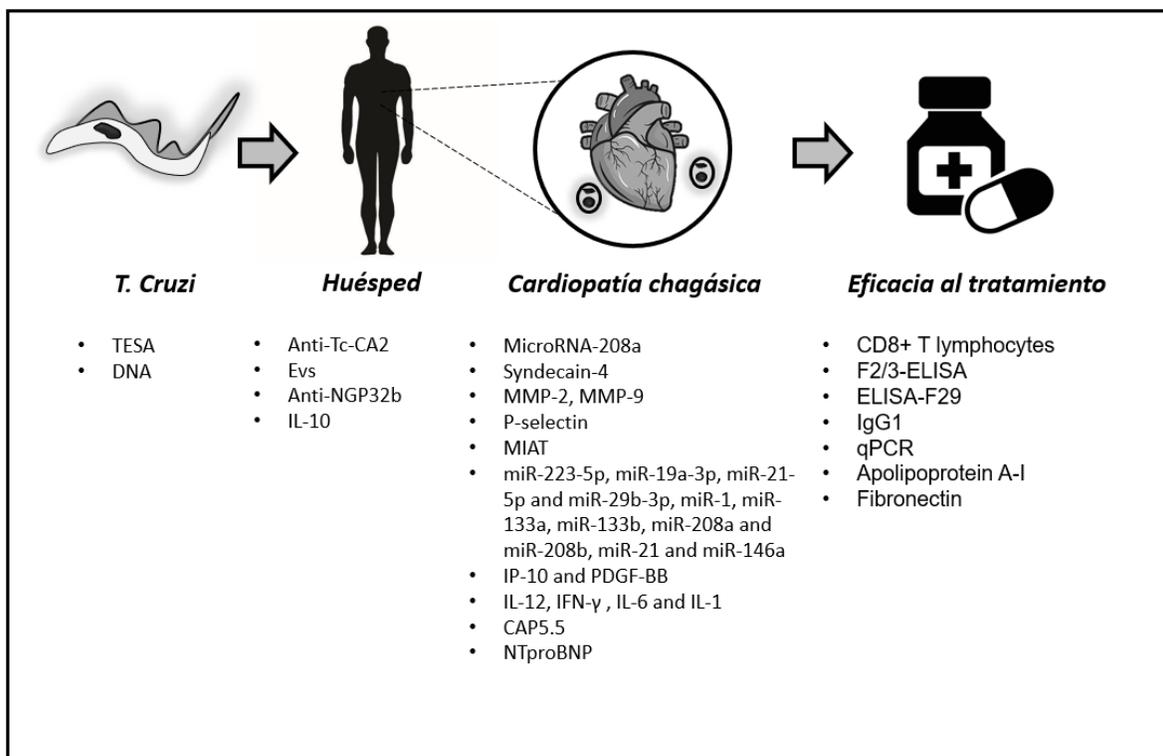


Figura 2. Representación visual de los biomarcadores detectados en: parásito, hospedero, cardiomiopatía chagásica y seguimiento de la eficacia al tratamiento.

Fuente: tomado sin modificaciones de Morales M, *et al. Biomarkers for the Diagnosis, Treatment Follow-Up, and Prediction of Cardiac Complications in Chagas Disease. Recent advances.* 2023 (22)

La EC en su fase crónica plantea una problemática importante en el diagnóstico, lo cual ha llevado a buscar alternativas para mejorar los métodos existentes y lograr un diagnóstico rápido, económico y que no requiera manipulación especializada de las muestras. Estas mejoras van desde la optimización de la sensibilidad y especificidad de los procedimientos actuales hasta la búsqueda de nuevas biomoléculas capaces de detectar la infección a través de cambios fisiológicos. En este contexto, los aptámeros han demostrado un gran potencial para el diagnóstico de enfermedades tanto infecciosas como no infecciosas. Los aptámeros son estructuras tridimensionales formadas por oligonucleótidos basados en ADN o ARN monocatenarios, que exhiben una capacidad de unirse selectivamente a pequeños ligandos moleculares o proteínas diana con una afinidad y especificidad en rango pM a nM. Los aptámeros son moléculas que pueden actuar como ligandos ~~en~~ reconociendo una amplia variedad de blancos. Su capacidad de interacción específica les permite actuar como inhibidores enzimáticos para el tratamiento de enfermedades, como guías en sistemas de liberación de medicamentos dirigidos a células específicas, y como herramientas de diagnóstico para la detección de biomarcadores en enfermedades y procesos biológicos. También pueden ser utilizados como detectores de sustancias dañinas en el medio ambiente y como reguladores alostéricos en procesos enzimáticos. Además, los aptámeros pueden formar parte de nanoestructuras de ADN que facilitan la unión de moléculas y actúan como mediadores en la comunicación intercelular (23). Su versatilidad y propiedades de reconocimiento molecular han despertado un gran interés en el campo de la investigación bio-analítica. En este sentido, se plantea la posibilidad de emplear los aptámeros como herramientas para la identificación de biomarcadores en la EC, lo cual representa una perspectiva prometedora para mejorar el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad.

Para obtener los aptámeros, se utiliza un método *in vitro* denominado SELEX (Evolución Sistemática de Ligandos mediante Enriquecimiento Exponencial). Este proceso involucra rondas sucesivas de incubación de la molécula objetivo con una población de oligonucleótidos que cuentan con regiones constantes a las cuales se unen oligonucleótidos específicos previamente diseñados para su amplificación por PCR y una región aleatoria central (10-80 nucleótidos) que le brinda la capacidad de adoptar estructuras 3D únicas (figura 3).



Figura 3. Representación visual de la estructura de las secuencias de oligonucleótidos candidatas para su implementación en la estrategia SELEX.

Durante la primera ronda de selección, se emplea una biblioteca de oligonucleótidos altamente diversa ($4^{10} - 4^{80}$ millones de secuencias), compuesta por secuencias aleatorias de longitud constante y secuencias conservadas en sus extremos. Las moléculas de esta biblioteca adoptan diversas conformaciones tridimensionales dependiendo de su secuencia y de las condiciones experimentales, como el pH, la temperatura y la fuerza iónica, lo que produce una población de aptámeros con estructuras distintas. A medida que avanza el proceso de selección, se eliminan los oligonucleótidos que no se unen a la molécula objetivo, mientras que aquellos que sí lo hacen son recuperados y amplificados mediante PCR. La población resultante, enriquecida en aptámeros con alta afinidad y especificidad hacia la molécula objetivo, se somete a rondas adicionales de selección, donde es posible ajustar las condiciones experimentales para aumentar la proporción de aptámeros con mejores propiedades de reconocimiento. Finalmente, los aptámeros individuales son identificados mediante secuenciación (24, 25).

1.2. Justificación

La EC representa un desafío significativo en salud pública, especialmente en América Latina, incluyendo a Colombia, donde se han identificado zonas altamente endémicas y cepas naturalmente resistentes (26-30). Abordar esta problemática y contribuir a su diagnóstico y seguimiento efectivo ha sido el motor impulsor de este proyecto de investigación.

En este contexto, surge la pregunta de cómo se podrían mejorar los métodos de diagnóstico y seguimiento de la EC en Colombia. A lo largo de los últimos años, se ha observado un creciente interés en los biomarcadores como herramientas que pueden revolucionar la medicina al proporcionar diagnósticos y pronósticos más precisos. En particular, este trabajo de investigación se enfoca en el uso de aptámeros como una alternativa prometedora en comparación con las técnicas convencionales (31).

La innovación detrás de este trabajo radica en la versatilidad y eficacia de los aptámeros como moléculas de reconocimiento. Estas herramientas bio-analíticas se producen en el laboratorio, lo que permite un control preciso y la posibilidad de realizar modificaciones químicas para mejorar su estabilidad. Además, los aptámeros son capaces de reconocer una amplia gama de blancos, tanto inmunógenos como no inmunógenos, ampliando su potencial aplicación en la investigación y el diagnóstico (24).

Su estabilidad a altas temperaturas garantiza la viabilidad durante el almacenamiento y transporte, y la capacidad de renaturalización es una ventaja adicional. A diferencia de los receptores basados en anticuerpos, los aptámeros de ácidos nucleicos son fácilmente amplificables mediante PCR y pueden ser producidos por síntesis química. Además, pueden ser modificados para resistir la

degradación enzimática y se pueden inmovilizar en sustratos sólidos para diversas aplicaciones. Lo más importante es que la obtención de aptámeros no requiere modelos biológicos ni inmunización in vivo, lo que minimiza las variaciones entre lotes y reduce significativamente los costos de producción (24).

Finalmente, conociendo la ventaja de los aptámeros sobre las actuales técnicas de detección, se hace de gran importancia seguir aumentando el trabajo investigativo de estas nuevas moléculas y determinar su posible implementación como potencial técnico de tamizaje, diagnóstico y seguimiento terapéutico en diferentes enfermedades, en este caso, en la EC.

El objetivo fundamental de nuestro trabajo es avanzar en la investigación de estas nuevas moléculas y explorar su posible implementación como herramienta de tamizaje, diagnóstico y seguimiento terapéutico en la EC, especialmente en el contexto colombiano. Nuestro proyecto se desarrolla en el marco de la continuidad del proyecto de mínima cuantía INV22021.024, financiado por la Universidad CES y programado para finalizar en noviembre de 2022. En dicho proyecto se diseñó una biblioteca de oligonucleótidos para la detección de biomarcadores en muestras biológicas de pacientes con EC, excluyendo aquellos presentes en sueros de pacientes de leishmaniasis y controles sanos. En este estudio, se llevó a cabo la identificación de los biomarcadores presentes en estas muestras, así como el desarrollo de un prototipo de prueba diagnóstica para la EC. Además, se contó con el apoyo del Banco de la República, proyecto #5.083, el cual permitió dar continuidad a los experimentos previos realizados en el proyecto de mínima cuantía.

Para llevar a cabo esta investigación, se trabajó en el laboratorio del Instituto Colombiano de Medicina Tropical, un centro con amplia experiencia en la selección y obtención de aptámeros específicos. El laboratorio cuenta con la capacidad técnica y científica necesaria para llevar adelante esta investigación propuesta.

1.3. Pregunta de investigación

¿ Pueden los aptámeros obtenidos a través de la técnica de Bio-SELEX identificar un biomarcador directamente en sueros de pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica?

2. Marco teórico y conceptual

2.1. Referentes conceptuales

La EC, también conocida como tripanosomiasis americana o mal de Chagas, fue nombrada en honor a Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, médico e investigador brasileño que la describió por primera vez en 1909. Se trata de una enfermedad parasitaria antropono-zoonótica causada por el protozoo parásito *T. cruzi*. La EC tiene una mayor prevalencia en las regiones rurales de Norte, Centro y Suramérica, y se transmite a los seres humanos a través de diversas vías. La vía vectorial, en la que los triatominos hematófagos son los principales vectores, ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, también se conocen otras formas de transmisión, como la transfusión de sangre infectada, la transmisión congénita y la ingestión de alimentos o bebidas contaminados con heces del vector que contienen la forma infectiva del parásito (figura 2) (5). Los reservorios mamíferos más comunes incluyen zorros, perros, gatos, murciélagos, armadillos, marsupiales, roedores, primates, toros, entre otros.(32).

EC es endémica en 21 países del continente americano, desde el sur de Estados Unidos, hasta Argentina y Chile, en los cuales aproximadamente 75 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad, afectando alrededor de 6 millones de personas, y registrando finalmente en promedio, 30.000 casos nuevos al año, 12.000 muertes y casi 9.000 recién nacidos infectados por vía congénita (13).

El avance del conocimiento sobre la enfermedad de Chagas en Colombia ha estado marcado por varios logros. En 1929, César Uribe Piedrahíta descubrió la presencia de *T. cruzi* y *Trypanosoma rangeli* en ejemplares de *Rhodnius prolixus* en el departamento del Tolima (33), lo que fue un importante hallazgo en la comprensión de la enfermedad. Posteriormente, en 1990, el trabajo de Augusto Corredor Arjona *et al.* del Instituto Nacional de Salud sobre la distribución de los triatominos domiciliarios en Colombia permitió obtener un conocimiento más claro sobre la distribución de los principales vectores de *T. cruzi* en el país (34). Esto fue fundamental para el diseño de estrategias de control y prevención.

En 1995, se emitió el Decreto 1738, que estableció la obligatoriedad del tamizaje de la infección por *T. cruzi* en todos los bancos de sangre del país. Esta medida ha sido crucial para prevenir la transmisión de la enfermedad a través de transfusiones sanguíneas. Sin embargo, es importante mencionar que aún existen desafíos en cuanto a la detección temprana y el acceso universal a pruebas diagnósticas precisas (35). En la actualidad, el tamizaje de la enfermedad de Chagas en los bancos de sangre ha alcanzado una cobertura del 100%, logrando identificar una prevalencia de aproximadamente el 0,3% en las unidades de sangre analizadas.

Este logro representa un avance significativo en la detección temprana de la enfermedad y marca un importante logro en la lucha contra la transmisión de Chagas mediante transfusiones sanguíneas (36).

En 1996, se formuló el “Programa Nacional de Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas” en Colombia por iniciativa del Ministerio de Salud y participación de centros de investigación nacionales con experiencia en la patología, el cual permitió evaluar la infestación domiciliar por triatomíneos y la seroprevalencia en menores de edad en varios departamentos del país. Esto proporcionó información valiosa para dimensionar el problema y focalizar las intervenciones. No obstante, es necesario fortalecer la continuidad y sostenibilidad de las acciones en el tiempo, así como mejorar la cobertura y calidad de los servicios de atención y tratamiento para los afectados por la enfermedad (37).

El ingreso de Colombia al Convenio Hipólito Unanue en 1997 permitió fijar compromisos para el control de la transmisión vectorial y transfusional de la tripanosomiasis americana en la región andina. Esto ha impulsado acciones coordinadas entre los países participantes, pero es necesario seguir fortaleciendo los esfuerzos regionales para lograr una interrupción sostenible de la transmisión (38).

En el 2013, en la resolución 1841 del Plan Decenal de Salud Pública reconoció la EC como un problema de salud pública priorizado en Colombia. Esto ha permitido establecer metas concretas para lograr la certificación de la interrupción de la transmisión y la reducción de la letalidad por casos agudos. Además, se asignaron recursos para la implementación de acciones de prevención, control y atención. Sin embargo, aún existen desafíos en la implementación efectiva de estas metas y en la integración de la enfermedad de Chagas en las políticas de salud a nivel nacional y territorial (36).

A pesar de los avances significativos en la prevención y control de la enfermedad de Chagas, la atención médica a las personas infectadas se ha quedado rezagada debido a las dificultades diagnósticas y terapéuticas que conlleva esta parasitosis sistémica. A nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud reconoció la enfermedad de Chagas como una enfermedad tropical desatendida en 2005 y estableció cinco objetivos específicos para el período de 2021 a 2030. En Colombia, se ha logrado avanzar en los objetivos relacionados con la interrupción de la transmisión vectorial domiciliar y transfusional, sin embargo, aún existen desafíos pendientes en los objetivos de interrupción de la transmisión por trasplante de órganos, eliminación de la enfermedad de Chagas congénita y suministro del tratamiento antiparasitario a la población elegible. Es alentador el progreso en la eliminación de la transmisión congénita a través de iniciativas como el proyecto CUIDA Chagas, respaldado por los ministerios de salud de varios países y con la

colaboración activa de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la OMS. Estos logros han impulsado el conocimiento y control de la enfermedad en Colombia, pero se debe seguir consolidando el control de la enfermedad congénita, ampliando el acceso al diagnóstico y tratamiento, implementando estrategias de control en otras regiones del país y abordando la transmisión por vectores y transmisión oral con una aproximación integral (36).

En los últimos años, la globalización y los viajes intercontinentales han contribuido a la propagación de la EC más allá de Latinoamérica. Casos de la enfermedad se han registrado en Europa, Estados Unidos, Canadá, Australia, Japón, Francia, Suiza, Inglaterra y España, principalmente entre personas de origen latinoamericano que contrajeron la infección en áreas endémicas (figura 4). Es importante destacar que la presencia del vector se limita al continente americano. Aunque la EC no se ha notificado en África, el continente enfrenta la tripanosomiasis africana, también conocida como enfermedad del sueño, transmitida por moscas *tsé-tsé* infectadas con el parásito *Trypanosoma brucei gambiense* o *Trypanosoma brucei rhodesiense*, afectando principalmente a la población rural con manifestaciones clínicas distintas a la EC (8).

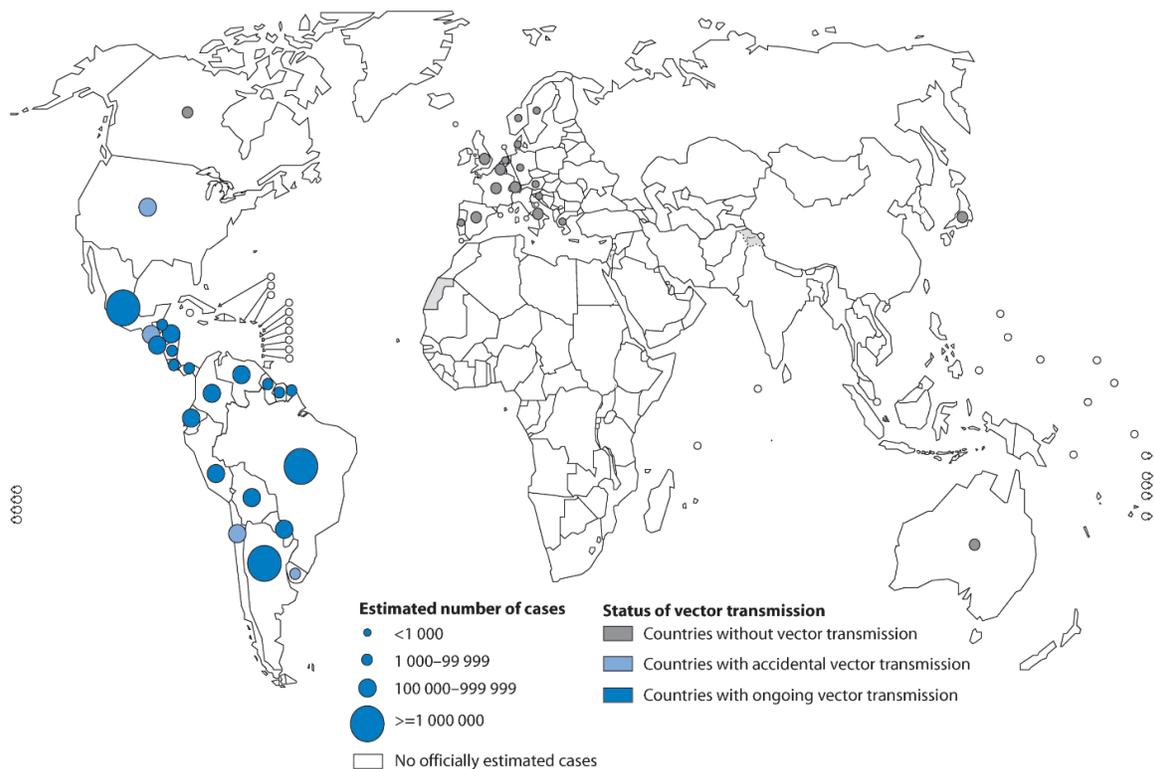


Figura 4. Distribución mundial de la enfermedad de Chagas.

Nota: Basado en estimaciones oficiales de 2006 a 2010.

Fuente: imagen obtenida de: <http://gamapservr.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>

2.2. Generalidades y ciclo de vida de *T. cruzi*

T. cruzi es un protozoo flagelado que pertenece a la clase *Zoomastigophora*, al orden *Kinetoplastida*, a la familia *Trypanosomatidae* y al género *Trypanosoma*, específicamente al subgénero *Schizotrypanum*. Este parásito intracelular presenta un ciclo biológico que se desarrolla en dos fases distintas, una en los hospedadores y otra en los insectos transmisores, también conocidos como vectores. En el hospedero, *T. cruzi* adopta la forma de tripomastigote en el sistema reticuloendotelial, mientras que en los tejidos se transforma en la forma amastigote. En el insecto transmisor, se encuentra en las formas de epimastigote y tripomastigote metacíclico (39) (figura 5).

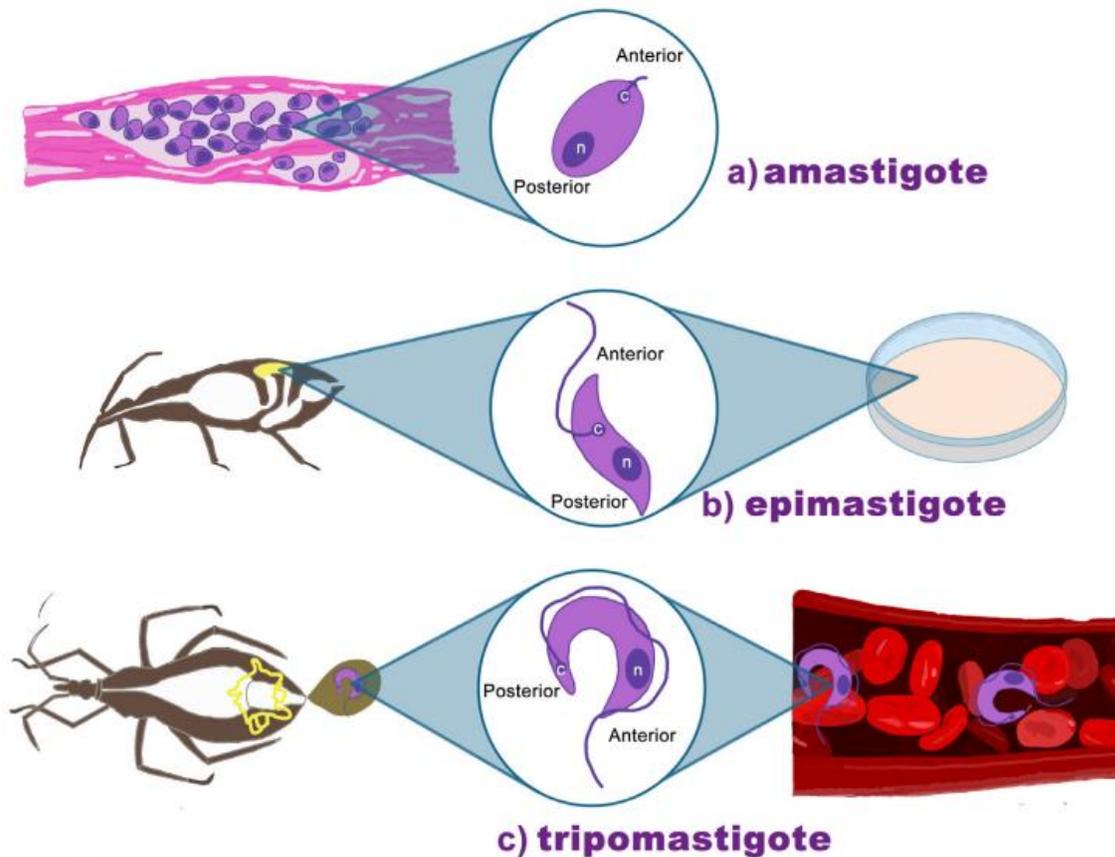


Figura 5. Localización y morfología de *T. cruzi* en sus diferentes estadios. a) amastigotes en los tejidos del huésped vertebrado. b) epimastigotes en el intestino medio del vector y en cultivo axénico. c) tripomastigotes metacíclicos en intestino y las heces del vector. n: núcleo, c: kinetoplasto.

Fuente: tomada sin modificaciones de Peña-Callejas, G. *et al.* *Chagas Disease: Biology and Transmission of Trypanosoma cruzi*. 2022 (40)

T. cruzi posee una mitocondria única que se extiende a lo largo de su estructura celular. La matriz mitocondrial alberga un segmento compuesto por ADN circular extranuclear, conocido como kinetoplasto, el cual contiene múltiples copias del genoma mitocondrial. El kinetoplasto se compone de dos tipos de ADN circular: los

maxicírculos, aproximadamente 25 en número y con un tamaño de alrededor de 23 kilobases (kb), que contienen genes responsables de la producción de adenosina trifosfato (ATP); y los minicírculos, alrededor de 5000 en cantidad y con un peso aproximado de 1 kb, que contienen secuencias que codifican para los ARN guía necesarios en el proceso de edición o "*editing*" de los transcritos mitocondriales (41).

T. cruzi presenta diversas estructuras fundamentales para su supervivencia y proliferación tanto en el vector como en el huésped. En primer lugar, destaca su flagelo, que se extiende desde el bolsillo flagelar y otorga al parásito movilidad, especialmente en las formas de epimastigotes y tripomastigotes (42). Además, el parásito cuenta con organelos clave en su adaptación metabólica a diferentes entornos durante su ciclo de vida. Los glicosomas desempeñan un papel crucial al funcionar como compartimentos donde se lleva a cabo la glicólisis (43). Por otro lado, los acidocalcinomas son organelos capaces de almacenar calcio, magnesio, sodio, potasio, zinc, hierro y pirofosfato inorgánico, desempeñando un papel vital en la homeostasis del pH y la osmorregulación. La vacuola contráctil, compuesta por varios túbulos, también contribuye a la regulación del volumen celular bajo condiciones de estrés hiposmótico (44, 45). Por último, los reservosomas son igualmente relevantes en el metabolismo parasitario, ya que actúan como organelos de reserva energética y almacenan macromoléculas utilizadas posteriormente en los procesos de transformación del parásito (46) (figura 6).

En los seres humanos, el parásito *T. cruzi* se localiza con mayor frecuencia en las células reticuloendoteliales del bazo, hígado, ganglios linfáticos y miocardio. Los insectos triatominos son los principales transmisores o vectores de la enfermedad, destacándose especies como *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus megistus*. El ciclo de vida del parásito en el vector se desarrolla en el intestino, donde atraviesa una transformación desde la forma tripomastigote hasta el tripomastigote metacíclico, que es la forma eliminada a través de las heces y que resulta infecciosa para los seres humanos y otros animales hospederos. En cuanto a los animales mamíferos domésticos, los hospederos más relevantes son los perros, los gatos y las cobayas, mientras que entre los mamíferos silvestres, se encuentra con mayor prevalencia en comadrejas, armadillos y roedores (47).

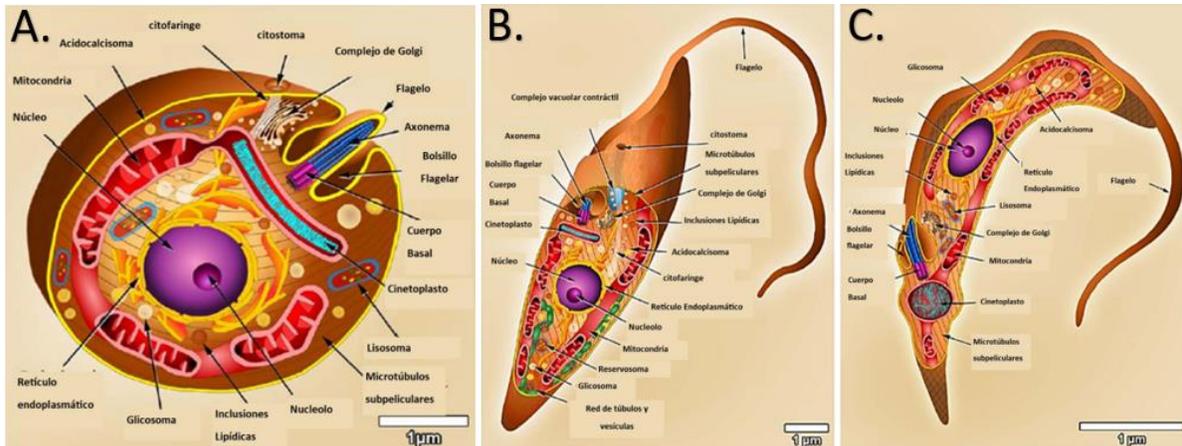


Figura 6. Representación esquemática de los organelos de: A) amastigote de *T. cruzi*. B) epimastigote de *t. cruzi*. C) tripomastigote de *t. cruzi*.

Fuente: tomada sin modificación de Chi, Buenfil, and Tomás Jafed. *Foto-inactivación del parásito Trypanosoma cruzi mediante el uso de luz visible*. 2021 (48)

En el intestino del vector, las heces y la sangre periférica de humanos y ratones se han identificado los tripomastigotes, que presentan una forma fusiforme, en C o en S, con una longitud de aproximadamente 20 μm y un ancho de 2 μm (49). Estos parásitos poseen un núcleo ovalado ubicado en la parte media del cuerpo, seguido por el kinetoplasto, una estructura que se extiende hacia un flagelo que se proyecta en la parte anterior del parásito. En el citoplasma, se encuentran numerosos ribosomas y una única mitocondria crestada cerca del kinetoplasto, donde el genoma del parásito se encuentra compactado (50).

Inicialmente, el parásito infecta a los fagocitos y luego se dirige a las células musculares, cardíacas, intestinales y esqueléticas. En esta etapa, acorta su flagelo y adopta una forma intracelular conocida como amastigote. Los amastigotes son esféricos, con un diámetro de 2-5 μm , poseen un núcleo redondo y un kinetoplasto en forma de barra. Estos amastigotes se encuentran exclusivamente dentro de las células, donde inician su proceso de multiplicación y proliferación a través de la fusión binaria, formando racimos hasta que la célula se llena de parásitos. Luego, la célula se rompe y libera las formas parasitarias al espacio extracelular, donde se transforman en tripomastigotes para invadir otras células y repetir el ciclo (50) (figura 6).

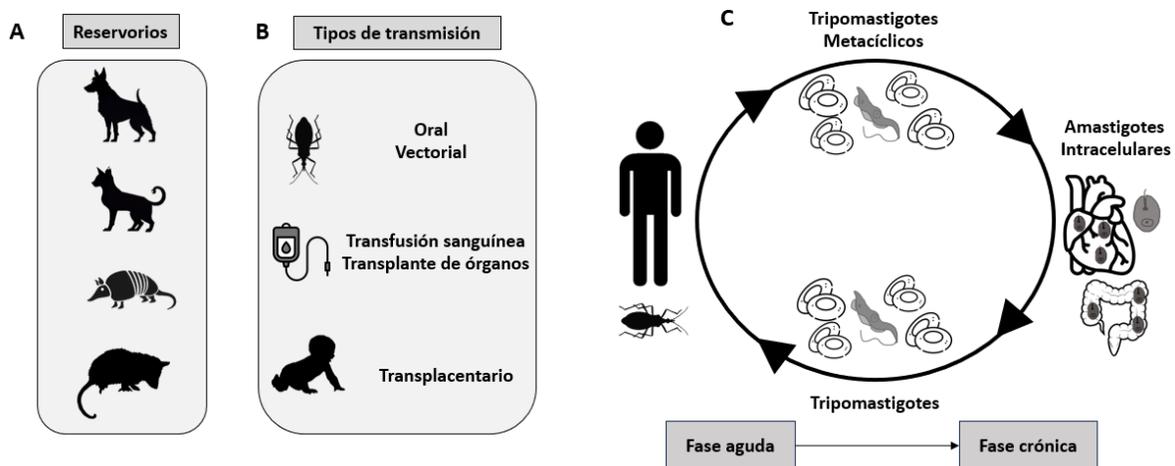


Figura 7. Representación esquemática de las vías de transmisión y las fases de la EC.

Fuente: Tomado sin modificaciones de: Morales M, et al. *Biomarkers for the Diagnosis, Treatment Follow-Up, and Prediction of Cardiac Complications in Chagas Disease. Recent advances.* 2023 (22).

Finalmente, el vector adquiere el parásito al ingerir sangre infectada proveniente de seres humanos u otros mamíferos que albergan al parásito. Una vez que el triatomo ingiere la sangre contaminada, en su intestino se forman los epimastigotes, que son formas alargadas con un tamaño aproximado de 12 μm de largo y 2 μm de ancho. Estos epimastigotes tienen un núcleo ovalado y un kinetoplasto del cual se desprende un flagelo que se proyecta en el extremo anterior del parásito (51). En las glándulas anales de las zarigüeyas (*Didelphis sp.*), que son un reservorio del parásito, el *T. cruzi* evade la respuesta inmune y tiene la capacidad de multiplicarse a nivel extracelular, de manera similar a lo que ocurre en el intestino de los vectores. Esto convierte a las zarigüeyas en un reservorio de gran relevancia epidemiológica en la erradicación del parásito, ya que sus heces pueden potencialmente infectar a los seres humanos (52).

Para avanzar en la lucha contra el *T. cruzi*, ha sido de vital importancia investigar y comprender su genoma. Esto nos ha permitido detectar que el parásito tiene una conformación diploide y que la mitad de su secuencia consiste principalmente en repeticiones de transposones y genes codificantes para proteínas y moléculas de superficie. Esta naturaleza ha facilitado la implementación de biomarcadores que nos ayudan a comprender la diversidad biológica, bioquímica y molecular del parásito, así como su interacción con los hospederos. Aunque la diversidad del genoma de *T. cruzi* es ampliamente reconocida, aún no se comprende completamente. La infección por este parásito está influenciada por diversos factores, como los genéticos del parásito, los factores genéticos e inmunológicos de los hospederos e incluso la presencia de infecciones mixtas con diferentes cepas de *T. cruzi* (53). Actualmente se han identificado seis Unidades Discretas de Tipificación (DTUs, por sus siglas en inglés) denominadas de TcI a TcVI (27). TcI se

considera la DTU más antigua y homogénea (mayor similitud genética entre sus miembros), con un origen principalmente silvestre y asociada a la familia de los marsupiales. Esta DTU es la más común en la región amazónica y Centroamérica, y también se ha observado su presencia en ciclos domésticos en Colombia, Venezuela y otros países de Centroamérica, así como en ciclos selváticos en la Amazonía. TcII, por otro lado, es una población más heterogénea y abundante en la zona sur de América, y se asocia principalmente con roedores caviomorfos y primates. TcIII es una población asociada principalmente con transmisión enzoótica, presente en mamíferos terrestres y excavadores, y al igual que TcIV, es menos común y se asocia principalmente con transmisión selvática, habiéndose registrado muy pocos casos de infección en humanos. La TcV, también conocida como cepa boliviana, y TcVI, conocida como cepa paraguaya, están asociadas principalmente con la transmisión doméstica y se encuentran en humanos y vectores en el Cono Sur de América (32) (figura 8).

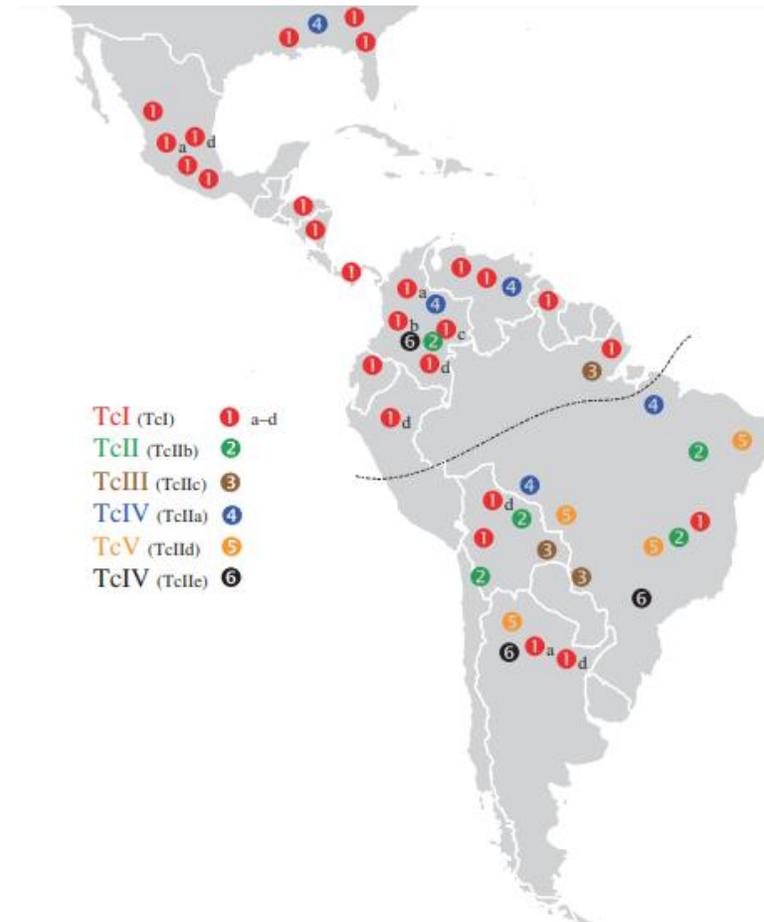


Figura 8. Distribución geográfica de los DTUs de *T. cruzi* en el continente americano.

Fuente: tomada sin modificaciones de Patterson & Guhl. *Geographical Distribution of Chagas Disease*. 2010. (7)

Marcili, A. *et al.* en 2009 (54) identificaron en murciélagos brasileños una cepa de *T. cruzi* con patrones genómicos que no se agrupaban en ninguna de las seis clasificaciones antes mencionadas, por lo cual esta cepa fue nombrada Tcbat. El origen y la implicación de este *Trypanosoma* en la evolución del *Trypanosoma* del nuevo mundo (tripanosomiasis americana) y el *Trypanosoma* del viejo mundo (tripanosomiasis africana) es controversial y requiere de mayor investigación (55).

En *T. cruzi* los genes que codifican para proteínas se disponen en *tándem* en grupos direccionales con polaridad de hebra llamados "*Directional Gene Clusters* o DGC" y se transcriben como largos policistrones de 10-100 genes, los cuales no están relacionados entre sí y se encuentran separados por secuencias cortas llamadas regiones de cambio de hebra (*Strand switch regions* o SSR), donde el sentido de la transcripción diverge (inicio de transcripción) o converge (terminación de transcripción) (56).

Los ARN policistrónicos son procesados por mecanismos de *trans-splicing* y poliadenilación para dar lugar a los ARN mensajeros. El *trans-splicing* es una reacción de empalme entre dos moléculas de ARN, donde los exones de dos transcritos de ARN primarios diferentes se unen de extremo a extremo y se ligan. Este proceso ocurre co-transcripcionalmente y es fundamental para la traducción correcta de los mensajeros (57, 58). Por otro lado, el proceso de poliadenilación que es la adición de una cola poliA a los RNA mensajeros participa una endonucleasa de restricción que corta el pre-mensajero en su extremo 3' y la enzima poliA polimerasa incorpora adenosinas haciendo uso del ATP (59) (figura 9).

Los transcritos mitocondriales deben pasar por un proceso de maduración que involucra la adición o delección de residuos ribonucleótidos, especialmente de uridinas, en un proceso denominado "editing" que va a generar cambios en las secuencias codificantes del ARN mensajero dirigido por los ARN guías los cuales son codificados en los minicírculos (60).

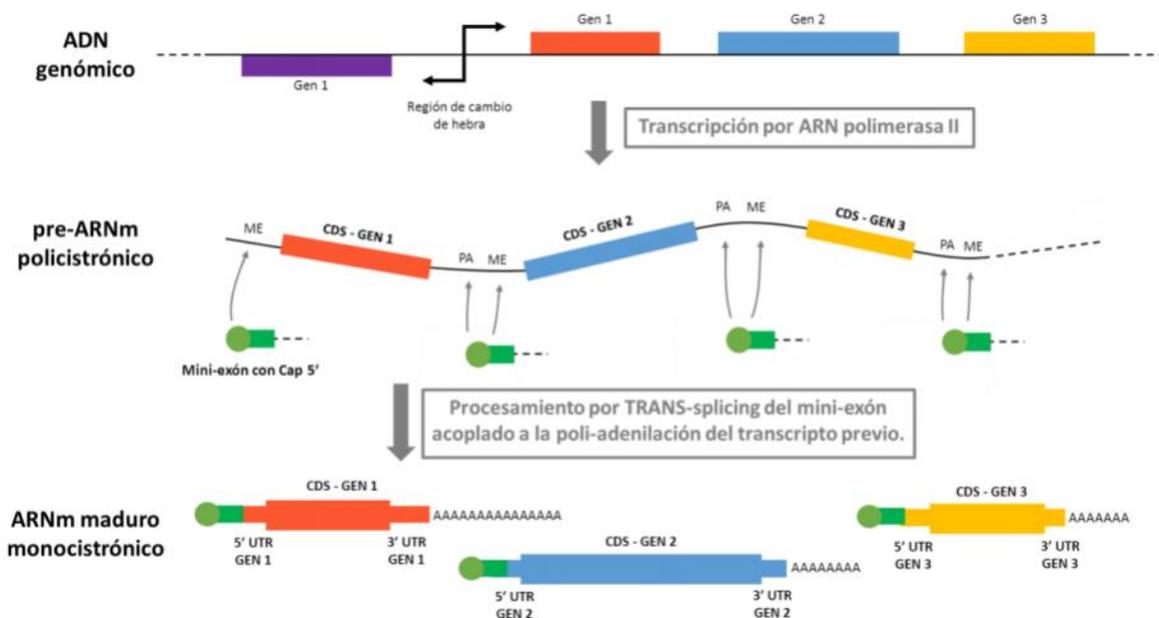


Figura 9. Expresión génica en tripanosomátidos. Esquematización de la etapa de transcripción y procesamiento de los transcritos primarios.

Fuente: tomado sin modificaciones de Radío-Lalanne, S. Mecanismos regulatorios de familias moduladas a nivel traduccional en *Trypanosoma cruzi*. 2019.

2.3. Formas de transmisión

2.3.1. Transmisión vectorial

La transmisión vectorial es ampliamente estudiada como la principal vía de propagación de la enfermedad de Chagas. Los insectos triatominos, también conocidos como "pitos" en las comunidades, desempeñan un papel crucial como vectores en la transmisión de la enfermedad a los seres humanos. Entre las especies más relevantes se encuentran el *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*. Estos insectos, que se alimentan de sangre, contaminan la piel y las mucosas del huésped con heces que contienen tripomastigotes metacíclicos. Estos parásitos ingresan al organismo humano a través de la herida causada por la picadura del triatomino, generalmente debido al rascado o al contacto con la conjuntiva ocular. Después de la exposición, se presenta un período de incubación que oscila entre 5 y 15 días aproximadamente (61).

2.3.2. Transmisión oral

La enfermedad de Chagas puede transmitirse mediante el consumo de bebidas o alimentos contaminados con heces de triatominos infectados o incluso con heces de zarigüeyas, que también eliminan las formas infectantes en sus heces. Otras formas de transmisión incluyen la contaminación de utensilios de cocina o la manipulación de cadáveres de mamíferos infectados. El período de incubación varía dependiendo de la forma de contagio. En el caso de la ingestión directa de sangre

de animales infectados, el período de incubación es de 3 a 22 días, mientras que la contaminación por parásitos en las heces, generalmente a través de agua o alimentos contaminados, tiene un período de incubación de 10 a 20 días aproximadamente (62).

2.3.3. Transmisión transfusional

Ocurre por la presencia de tripomastigotes vivos e infectantes en la sangre de los donantes, normalmente provenientes de zonas endémicas y con un periodo de incubación de 30 a 40 días después de la transfusión o trasplante (63).

2.3.4. Transmisión vertical

Ocurre por el paso del parásito presente en la sangre de la madre infectada a través de la placenta hacia el feto, con un periodo de incubación que oscila entre los 4 y los 9 meses de edad (64).

2.4. Fases de la enfermedad

La infección por *T. cruzi* se divide en dos fases: la fase aguda y la fase crónica. Ambas fases pueden presentarse de forma asintomática o potencialmente mortales, siendo la fase crónica, en particular, más desafiante para lograr un diagnóstico preciso (figura 6).

2.4.1. Fase aguda

La fase aguda de la enfermedad de Chagas se presenta en las primeras semanas o meses tras la infección por *T. cruzi*. En la mayoría de los casos, esta fase es asintomática, aunque aproximadamente el 1 al 10% de los pacientes desarrollan síntomas. Los síntomas característicos incluyen fiebre, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia, fatiga, cefalea y miocarditis. Si la infección ocurre a través de la conjuntiva ocular o por contacto accidental de las heces contaminadas con los ojos, puede aparecer el signo de Romaña, que se caracteriza por la aparición de edema bpalpebral unilateral indoloro. Además, en el lugar de entrada del parásito a través de la picadura del vector, puede desarrollarse una inflamación llamada chagoma, que se presenta como un nódulo subcutáneo indoloro. Aunque los síntomas de la fase aguda tienden a resolverse por sí solos en semanas o meses, en algunos casos raros puede haber complicaciones graves como miocarditis o meningoencefalitis, especialmente en pacientes inmunodeprimidos o en etapas tempranas de la vida. La muerte durante la fase aguda es extremadamente rara. En casos de transmisión vertical o transmisión oral en forma de brote, también se han descrito mayores tasas de complicaciones agudas graves. La fase aguda se considera hasta que la parasitemia detectada microscópicamente se vuelve negativa (35).

2.4.2. Fase indeterminada

La forma indeterminada es una fase crónica de la EC en la que no se presentan manifestaciones clínicas. Esta etapa puede comenzar después de finalizar la fase aguda y se caracteriza por la ausencia de síntomas o molestias. Puede durar de 10 a 20 años e incluso prolongarse durante toda la vida, afectando al 70% de los pacientes. El diagnóstico en esta fase se confirma mediante pruebas serológicas positivas de anticuerpos IgG en dos pruebas diferentes, sin la presencia de manifestaciones clínicas, hallazgos electrocardiográficos compatibles con cardiopatía chagásica crónica, y con estudios radiográficos normales del tórax y del sistema digestivo. En áreas endémicas donde persiste la transmisión vectorial, estas personas actúan como reservorios naturales de la infección por *T. cruzi* y contribuyen al ciclo vital del parásito. Para su identificación, se pueden realizar encuestas epidemiológicas y tamizajes serológicos, como los llevados a cabo en los bancos de sangre (65).

2.4.3. Fase crónica

Durante la fase crónica de la EC, pueden presentarse diversas manifestaciones clínicas que pueden surgir décadas después de la infección inicial. Una de las consecuencias más significativas es la cardiomiopatía chagásica, que afecta aproximadamente al 30% de los pacientes y puede causar arritmias, insuficiencia cardíaca y aneurismas ventriculares. Además, se han observado alteraciones en el tracto digestivo, como megaesófago y megacolon, que se manifiestan con dificultad para tragar, dolor abdominal y estreñimiento. Otros órganos como los nervios craneales y periféricos, el hígado, la médula ósea y el sistema nervioso pueden resultar afectados. También se ha reportado una mayor incidencia de cáncer esofagogástrico y manifestaciones neurológicas como cambios cognitivos, convulsiones y debilidad en un lado del cuerpo. Durante esta fase, los pacientes pueden estar asintomáticos, pero un porcentaje variable experimentará complicaciones tardías que pueden comprometer su salud y calidad de vida (35).

2.5. Métodos de diagnóstico

2.5.1. Métodos parasitológicos directos

El diagnóstico de la fase aguda de la EC se basa en métodos parasitológicos directos que permiten la detección del parásito en la sangre del paciente. Estos métodos incluyen el examen directo de sangre fresca, en el cual se observan tripanosomas en movimiento mediante el uso de un microscopio de luz. Además, se emplea el frotis o extendido de sangre periférica, donde se extiende una muestra de sangre sobre una lámina y se busca la presencia de tripomastigotes metacíclicos con su forma característica. La gota gruesa es otra técnica utilizada, la cual permite concentrar varias capas de sangre mediante coloraciones específicas, facilitando la

identificación del parásito. Asimismo, se recurre al microhematocrito o microstrout, que consiste en centrifugar una muestra de sangre para buscar tripomastigotes en movimiento en la interfase entre el plasma y los glóbulos rojos. Finalmente, se emplea la técnica de concentración de Strout, donde se centrifuga una muestra de sangre sin anticoagulante para concentrar los parásitos en el sedimento y luego realizar un montaje directo en fresco o un extendido para tinción. Estos métodos de concentración son altamente sensibles y se recomiendan cuando el examen en fresco arroja resultados negativos. Es importante considerar el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas, ya que después de los 60 días se dificulta la detección de parásitos mediante estas técnicas (35).

2.5.2. Métodos parasitológicos indirectos

El diagnóstico de la fase aguda de la enfermedad de Chagas también puede realizarse mediante métodos parasitológicos indirectos, los cuales buscan mejorar la sensibilidad al multiplicar los parásitos en un vector o en un medio de cultivo adecuado. Estos métodos incluyen el xenodiagnóstico, el hemocultivo y la inoculación en animales de laboratorio con *T. cruzi*.

El xenodiagnóstico implica alimentar a triatominos, vectores libres de infección criados en el laboratorio, con sangre del paciente. Se recomienda tanto el método natural, donde los triatominos se alimentan directamente del paciente, como el método artificial, que utiliza sangre extraída por venopunción y colocada en recipientes con membranas finas de látex. Después de 30 a 60 días de haber sido alimentados, se examinan las heces e intestinos de los triatominos para detectar tripomastigotes o epimastigotes de *T. cruzi*. Es importante tener precaución para no confundir con otras especies o tripanosomas similares. Además, se debe examinar la hemolinfa y las glándulas salivales del insecto para detectar *T. rangeli*, otro tripanosoma no patógeno pero que puede generar errores en la lectura (66).

En el hemocultivo, se recolectan 3 mL de sangre con anticoagulante citrato de sodio de pacientes sospechosos de estar infectados con *T. cruzi*. Esta muestra se transporta a temperatura ambiente hasta el laboratorio, donde se siembra en tubos de medio de Tobie y se realiza un seguimiento y observación semanal durante seis meses bajo microscopio invertido. Este método permite el aislamiento del parásito y su posterior mantenimiento en medios de cultivo. Se utilizan medios líquidos como LIT (triptosa de infusión de hígado) o BHI (infusión cerebro-corazón). El hemocultivo es útil en el diagnóstico de Chagas congénito y en formas agudas de la enfermedad, así como para incrementar la concentración de los parásitos y obtener antígenos para el diagnóstico serológico y molecular (66).

Estos métodos parasitológicos indirectos presentan una sensibilidad similar a los métodos directos en la fase aguda, alcanzando el 100%, mientras que en la fase crónica oscilan entre el 20% y el 50%.

2.5.3. Métodos moleculares

El diagnóstico molecular de la EC se realiza mediante la técnica de amplificación de ácidos nucleicos del parásito, conocida como PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Esta técnica permite amplificar fragmentos de ADN del parásito, como los minicírculos del kinetoplasto u otros ácidos nucleicos, y se puede aplicar en diferentes muestras biológicas, como sangre o heces de triatomíneos. Se utilizan distintos marcadores moleculares, como el kinetoplasto, la subunidad II del gen mitocondrial del citocromo oxidasa y secuencias repetidas de ADN satélite. Sin embargo, se ha observado que la sensibilidad de esta técnica puede variar debido a los diferentes kits disponibles en el mercado. Durante la fase aguda, la PCR se utiliza para confirmar la infección mediante la detección del parásito, mientras que en la fase crónica, la PCR puede ser positiva en aproximadamente el 70% de los casos, siendo el método más sensible en comparación con las técnicas parasitológicas de concentración como el microhematocrito y el Strout, que pierden sensibilidad en esta etapa debido a la disminución de la parasitemia (67).

2.5.4. Métodos serológicos

Los métodos serológicos consisten en la detección de anticuerpos (IgM, IgG) en el suero de los pacientes infectados con *T. cruzi*. El ensayo inmunoenzimático (ELISA) utiliza anticuerpos antiinmunoglobulinas ligados a una enzima, que al reaccionar con su sustrato genera un producto colorido. La inmunofluorescencia indirecta (IFI) se basa en la unión de anticuerpos presentes en el suero del paciente con antígenos de *T. cruzi* en una lámina, y se revela mediante anticuerpos anti-inmunoglobulina humana unidos a fluoresceína. La hemoaglutinación indirecta (HAI) detecta anticuerpos específicos que aglutinan los hematíes sensibilizados con antígenos de *T. cruzi*. El Western Blot consiste en separar los antígenos de *T. cruzi*, transferirlos a una membrana y luego incubarla con suero del paciente. Se detectan los complejos antígeno-anticuerpo y se utiliza para confirmar el diagnóstico en casos de discordancia entre pruebas serológicas previas o para descartar reacciones cruzadas con otros protozoos. Estas pruebas ofrecen diferentes niveles de sensibilidad y especificidad, y los resultados pueden requerir confirmación en laboratorios de referencia (67).

2.5.5. Pruebas rápidas

Las pruebas rápidas son inmunoensayos cromatográficos cualitativos que utilizan antígenos recombinantes o péptidos sintéticos para detectar anticuerpos IgG anti *T. cruzi* en plasma o suero humano. Estas pruebas tienen una sensibilidad y especificidad reportadas entre el 92% y 100% y se recomiendan para la vigilancia y el cribado de la enfermedad, aunque deben ser confirmadas con pruebas convencionales (67).

2.6. Diagnóstico

2.6.1. Diagnóstico fase aguda

El diagnóstico de la fase aguda de la EC se basa en una combinación de métodos de detección directa y serológicos. Para la detección directa, se busca la presencia de formas parasitarias en la sangre periférica del paciente. En caso de no visualizar el parásito en los exámenes en fresco, se recurre a métodos de concentración, como el microhematocrito o el método de Strout, que mejoran la sensibilidad de detección. Estas técnicas permiten aumentar la probabilidad de detección de los parásitos en la muestra sanguínea (68).

Por otro lado, los métodos serológicos desempeñan un papel importante en el diagnóstico de la fase aguda. La prueba IFI es altamente sensible y se utiliza para detectar la presencia de anticuerpos IgM, los cuales son indicativos de una infección reciente. Si el resultado de la IFI es positivo, se debe corroborar con el cuadro clínico del paciente y considerar el contexto epidemiológico para confirmar el caso. Además, se pueden emplear dos métodos serológicos diferentes para determinar la presencia de anticuerpos IgG. Primero se realiza ELISA y luego se confirma el resultado mediante IFI, lo cual mejora la especificidad en la detección de anticuerpos (69).

En Colombia, para el diagnóstico de la EC en fase aguda, se recomienda realizar tanto métodos parasitológicos directos como serológicos de forma simultánea. En caso de no detectar la presencia del parásito mediante los métodos directos, se deben repetir las pruebas diariamente durante al menos 3 días o hasta descartar el caso. Si no se obtienen resultados con los métodos en fresco, se deben utilizar técnicas de concentración. Se puede realizar la prueba IFI para detectar la presencia de anticuerpos IgM, y la interpretación de los resultados debe considerarse junto con el cuadro clínico y el contexto epidemiológico para confirmar el caso agudo. Es relevante tener en cuenta que la cinética de IgM en la fase aguda permite su detección en títulos bajos a partir de los 15 o 20 días del inicio de los síntomas, incrementándose entre los días 30 y 60 para luego disminuir. Además, se puede determinar la presencia de anticuerpos IgG para diagnosticar el caso como agudo. Si se confirma la infección por *T. cruzi* mediante anticuerpos IgG utilizando dos métodos diferentes (ELISA e IFI), y se observa un aumento en los títulos en 3 o más diluciones a los 21 días de realizar la prueba IFI, o si se evidencia seroconversión en otra prueba de IFI de control, se considera un caso confirmado de Chagas agudo. También se puede confirmar el caso agudo si se obtienen resultados positivos en pruebas parasitológicas indirectas o moleculares, siguiendo la sospecha clínica (35)

2.6.2. Diagnóstico fase crónica

En la fase crónica de la EC, la carga parasitaria es baja y variable, por lo que el diagnóstico se basa principalmente en la detección de anticuerpos IgG anti *T. cruzi* mediante pruebas serológicas. Aunque los métodos parasitológicos directos tienden a ser negativos en un porcentaje considerable de pacientes (entre el 30% y el 60%), las pruebas serológicas han demostrado ser más efectivas en esta etapa de la enfermedad. Estas pruebas utilizan antígenos que pueden ser el parásito completo, extractos purificados, antígenos recombinantes o péptidos sintéticos, y se incluyen tanto en las pruebas convencionales como en las no convencionales.

Entre las técnicas serológicas más utilizadas se encuentran la IFI, la HAI y la ELISA, siendo este último el que muestra valores más óptimos de sensibilidad y especificidad. Sin embargo, ninguna de estas pruebas alcanza una sensibilidad y especificidad del 100%. Por esta razón, la OMS establece que el diagnóstico de la EC en fase crónica se basa en la positividad de al menos dos pruebas serológicas realizadas mediante métodos diferentes. En caso de que exista discordancia entre las pruebas, se recomienda realizar una tercera prueba para confirmar o descartar la infección, como el Western blot. Estas discordancias pueden deberse a reacciones cruzadas con otros protozoos hemoflagelados, como *Leishmania spp.* o *Trypanosoma rangeli* (70).

El diagnóstico de la EC en fase crónica en Colombia se basa en la detección de anticuerpos IgG mediante métodos serológicos debido a la baja y variable carga parasitaria en esta etapa. Para confirmar el diagnóstico, se recomienda realizar al menos dos pruebas serológicas con principios diferentes, lo que aumenta la precisión del diagnóstico en caso de concordancia. En situaciones de discordancia, se debe realizar una tercera prueba con antígeno diferente. La prueba inicial recomendada es ELISA, y si es positiva, se debe realizar una segunda prueba, generalmente IFI (Figura 10) (35). En el tamizaje de donantes de sangre, se recomienda el uso de pruebas tipo ELISA, la cual ha demostrado alta sensibilidad y especificidad. Los sueros que resulten reactivos en estas pruebas deben ser confirmados en laboratorios de referencia o laboratorios de servicios de salud. Se debe proporcionar información del donante para su identificación y seguimiento en caso de requerir tratamiento (71).

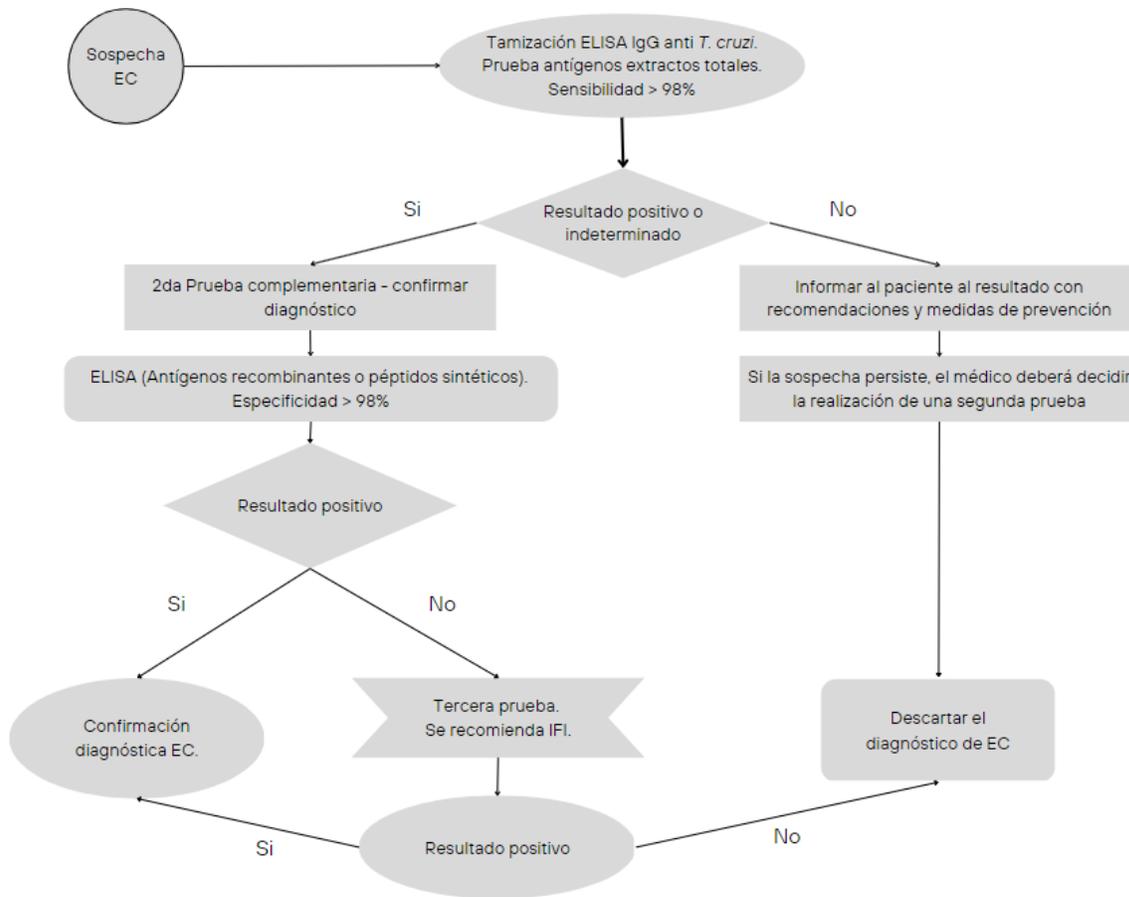


Figura 10. Algoritmo de diagnóstico serológico para la EC.

Fuente: adaptada a partir del algoritmo diagnóstico de INS. Ministerio de Salud y Protección. DNDI. 2016.

2.6.3. Diagnóstico diferencial

En el diagnóstico diferencial de la EC, tanto en la fase aguda como en la crónica, es importante considerar otras enfermedades con presentaciones clínicas similares. En la fase aguda, se deben diferenciar enfermedades febriles como la malaria, fiebre tifoidea, mononucleosis infecciosa, toxoplasmosis, sífilis, rickettsiosis, brucelosis, linfomas y leishmaniasis visceral. Se deben evaluar también los signos de puerta de entrada de la infección, como celulitis, conjuntivitis, trombosis de seno cavernoso, picaduras de insectos y lesiones traumáticas. Por otro lado, en la fase crónica, se debe realizar el diagnóstico diferencial con las causas de miocarditis crónica, arritmias y falla cardíaca. Entre las enfermedades a considerar se encuentran cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca y cardiomegalia. Es importante realizar una evaluación exhaustiva para descartar estas enfermedades y establecer un diagnóstico preciso de la EC (69).

Es importante mencionar que, en casos excepcionales, el parásito también puede ser detectado en otros fluidos corporales, como el líquido cefalorraquídeo. Sin

embargo, esta práctica se reserva principalmente para situaciones particulares, como la forma congénita de la enfermedad o la reactivación durante la fase crónica en pacientes inmunosuprimidos. Otros métodos, como el hemocultivo y el xenodiagnóstico, están en desuso y se emplean principalmente en laboratorios especializados con fines de investigación (72).

2.7. Tratamiento

El tratamiento de la enfermedad de Chagas es un aspecto crucial para abordar esta enfermedad y prevenir su evolución hacia la fase crónica. En la fase aguda, el objetivo principal del tratamiento es curar la infección, eliminar el parásito y controlar la enfermedad. En la fase crónica, se busca mejorar la calidad de vida de los pacientes y prevenir complicaciones (73).

A nivel mundial, el nifurtimox y el benzonidazol son los únicos fármacos aprobados para el tratamiento de esta enfermedad, si bien en Colombia solo se encuentra registrado, disponible y avalado por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Invima) el benzonidazol en la actualidad (73).

La dosis recomendada de benzonidazol para adultos oscila entre 5 y 7 mg/kg/día, administrados en dos o tres tomas diarias, durante aproximadamente 60 días. En el caso de los niños, la dosis es de 10 mg/kg, divididos en dos dosis diarias, también durante 60 días. Por su parte, el nifurtimox se administra en dosis de 8 a 10 mg/kg para adolescentes, de 12.5 a 15 mg/kg para niños y de 15 a 20 mg/kg para los más pequeños, siempre en cuatro tomas diarias, durante 90 días, o hasta 120 días si fuera necesario. Es importante tener en cuenta que ambos fármacos presentan efectos adversos significativos, lo que lleva a la suspensión del tratamiento en un porcentaje considerable de pacientes, aproximadamente el 40% en el caso del benzonidazol y alrededor del 60% en el caso del nifurtimox. Los efectos adversos más comunes asociados al benzonidazol son neuropatía periférica, reacciones cutáneas y granulocitopenia, mientras que en el caso del nifurtimox se destacan el dolor abdominal, la anorexia, las náuseas, los vómitos, la pérdida de peso y algunas manifestaciones neurológicas. Los efectos secundarios habituales del nifurtimox son: dolor abdominal, anorexia, náusea, vómito y pérdida de peso. Las posibles reacciones neurológicas son: inquietud, desorientación, pérdida de memoria, insomnio, espasmos, parestesias, polineuritis y convulsiones, que desaparecen al reducir la dosis o suspender el tratamiento (69).

Respecto al tratamiento en pacientes embarazadas, se recomienda iniciar el tratamiento una vez finalice el periodo de lactancia exclusiva al bebé. En caso de que el bebé sea diagnosticado con la enfermedad, se debe iniciar el tratamiento lo más pronto posible una vez se obtenga el. Ambos fármacos son activos en la fase aguda y ayudan a controlar la enfermedad (69).

El tratamiento temprano de la enfermedad de Chagas en la fase aguda presenta una excelente respuesta terapéutica. Sin embargo, su eficacia en la fase crónica es motivo de controversia debido a la incertidumbre sobre el efecto parasitológico del tratamiento y los potenciales eventos adversos que puede generar. Por lo tanto, aún no se ha determinado claramente si los posibles beneficios del tratamiento en la fase crónica justifican los riesgos asociados. Es fundamental considerar el tiempo de infección y la presencia de daño cardíaco en la evaluación de la indicación del tratamiento etiológico en esta etapa de la enfermedad (74).

Respecto al tratamiento en pacientes embarazadas, se recomienda iniciar el tratamiento una vez finalice el periodo de lactancia exclusiva al bebé. En caso de que el bebé sea diagnosticado con la enfermedad, se debe iniciar el tratamiento lo más pronto posible una vez se obtenga el resultado. El tratamiento temprano de la enfermedad de Chagas congénita presenta una buena respuesta terapéutica, con índices de curación cercanos al 100% (69).

2.8. Biomarcadores

Los biomarcadores son indicadores biológicos que desempeñan un papel fundamental en el proceso de desarrollo de medicamentos y la investigación biomédica. Estos biomarcadores se definen como características objetivas y cuantificables que nos permiten detectar y comprender la presencia y evolución de enfermedades mediante la respuesta orgánica a la interacción con agentes externos. A lo largo del tiempo, su uso en el ámbito clínico ha evolucionado significativamente (19).

El análisis de una muestra biológica implementando biomarcadores es un proceso complejo en el que es fundamental determinar la relación entre la exposición y la enfermedad ya que nos permite identificar los individuos más expuestos, realizarles un diagnóstico adecuado y de esta manera garantizar una intervención preventiva efectiva, o un tratamiento oportuno (75).

Los biomarcadores abarcan desde mediciones básicas como el pulso y la presión arterial, hasta pruebas de laboratorio más complejas en sangre y tejidos. Tienen una larga historia en la práctica clínica y son la manifestación más objetiva y cuantificable de los signos médicos. Su uso en la investigación clínica es más reciente y todavía se están desarrollando enfoques efectivos para su aplicación (76).

El término "biomarcador" se utilizó por primera vez en la década de 1970 para indicar la presencia de material de origen biológico. En 1973, se utilizó por primera vez en un título de artículo (77). Desde entonces, ha sido utilizado en la literatura geológica y ecológica para indicar material biológico. En el ámbito clínico, el uso de biomarcadores se remonta a 1977, cuando se mencionaron "biomarcadores tumorales de valor en el manejo de malignidades ginecológicas" (78). Sin embargo,

el concepto de biomarcadores es mucho más antiguo, con referencias a "marcadores bioquímicos" en 1949 (79) y a "marcadores biológicos" en 1957 (80).

El término "sustituto" se originó en la estrategia competitiva y luego se utilizó en el contexto de ensayos clínicos a principios de la década de 1980. En 1983, se mencionó por primera vez el "punto final sustituto" en relación con una estrategia competitiva (81). En 1989, se utilizó el término para referirse a ensayos clínicos y se definió como aquel que se elige medir como sustituto de otra variable (82). Además, en 1985, se utilizó la expresión "marcador sustituto" en un sentido biomédico, en un informe que afirmaba que los diagnósticos de laboratorio del SIDA se basaban en "marcadores sustitutos" debido a la falta de pruebas específicas (83).

A lo largo de los años, el campo de los biomarcadores ha estado poblado de una confusión de términos, como marcadores biológicos, marcadores sustitutos, puntos finales sustitutos, variables de respuesta sustitutas, puntos finales intermedios, marcadores intermedios, puntos finales de biomarcadores e incluso puntos finales de marcadores intermedios. Sin embargo, se sugiere que el término preferido y unificador para todos estos marcadores sea "biomarcador" (84).

En 1998, un Grupo de Trabajo de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) definió los biomarcadores como características objetivas y cuantificables que indican procesos biológicos normales, patogénicos o respuestas farmacológicas. Esta definición ha sido respaldada por la OMS en colaboración con otras organizaciones, que ha definido los biomarcadores como cualquier sustancia, estructura o proceso medible en el cuerpo que puede influir o predecir el desarrollo de una enfermedad u otro resultado de interés (84).

2.9. Aptámeros

Los aptámeros son nucleótidos de cadena sencilla que establecen interacción con moléculas específicas, similar a la interacción natural entre antígenos y anticuerpos. La historia de los aptámeros comienza con el descubrimiento de los nucleótidos en el siglo XIX, pero no fue hasta la década de 1990 que la comunidad científica comenzó a considerar su potencial selectivo de unión y las ventajas de estos oligonucleótidos como agentes de afinidad (85).

En 1990, Craig Tuerk y Larry Gold (86) realizaron un experimento pionero en el que se centró en una región de ocho nucleótidos dentro del mRNA del fago T4 que se unía a la proteína codificada por el gen 43 del mismo fago. Los resultados mostraron que, aunque dos hairpins (bucle o asa debido a la complementariedad de secuencias en la misma cadena) distintos se unían con la misma afinidad a la proteína, uno de ellos tenía cuatro cambios que reducían el tamaño del bucle de ocho a cuatro nucleótidos. Los ligandos obtenidos en este experimento pionero fueron denominados "aptámeros", término derivado de la palabra griega "aptus",

que significa "encajar". Tanto Craig Tuerk y Larry Gold (86) como Andy Ellington y Jack Szostak (87) realizaron investigaciones independientes pero idearon la misma estrategia, lo que condujo al nacimiento del proceso SELEX. Este innovador método permitió la identificación de oligonucleótidos que se ajustaban específicamente a las proteínas diana de interés.

El desarrollo de los aptámeros como agentes terapéuticos encontró obstáculos, ya que, en un principio, la tecnología SELEX estuvo limitada por patentes, lo que restringió la inversión comercial en su desarrollo hasta aproximadamente el año 2012 (88). Sin embargo, empresas creadas por los poseedores de la patente como NeXagen (luego NeXstar) se dedicaron al desarrollo de aptámeros como agentes terapéuticos, con el objetivo de competir con los anticuerpos. Entre los aptámeros identificados, se destacó NX1838 (ahora llamado Macugen), un aptámero de ARN modificado con alta afinidad por el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) que se mostró prometedor para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad. A pesar de sus ventajas, Macugen enfrentó desafíos en el mercado y fue superado por anticuerpos dirigidos específicamente a otra isoforma de VEGF (88). No obstante, Macugen demostró el potencial de los aptámeros como agentes terapéuticos, fue aprobado por la FDA y actualmente sigue comercializándose.

Desde el descubrimiento de los aptámeros en la década de 1990, la tecnología SELEX ha sido empleada para seleccionar más de 2000 secuencias, ganando una valiosa atención desde un punto de vista económico (89). Se estima que el mercado global de aptámeros superará los 400 mil millones de dólares para el año 2023. Los aptámeros prometen aplicaciones terapéuticas, diagnósticas e imagenológicas en procedimientos biomédicos. Sin embargo, se enfrentan a desafíos como la baja eficiencia en el cribado y selección, lo que requiere el desarrollo de herramientas mejoradas y efectivas para garantizar su éxito comercial (90).

Los aptámeros han demostrado ser una herramienta valiosa en el diagnóstico de diversas enfermedades, especialmente en el campo de enfermedades crónicas no infecciosas (como el cáncer) y las enfermedades infecciosas. En el caso del cáncer, los aptámeros han sido utilizados para identificar células cancerosas específicas y detectar biomarcadores tumorales en suero y plasma, lo que permite un diagnóstico temprano y preciso. Por ejemplo, los aptámeros se han conjugado con nanopartículas de oro, magnéticas y puntos cuánticos para formar sistemas de detección altamente sensibles y selectivos. En un estudio, se desarrolló un método colorimétrico simple y altamente sensible para detectar células de cáncer de mama MCF-7 utilizando aptámeros AS1411 conjugados con nanopartículas de oro. La presencia de las células cancerosas capturó los aptámeros, lo que resultó en un cambio de color distintivo que permitió la detección de las células cancerosas a una

concentración tan baja como 10 células MCF-7 (91). De igual forma, se han reportado estrategias de selección que han identificado aptámeros para el diagnóstico del cáncer de próstata resistente a hormonas en modelos de ratones (92).

En el campo de las enfermedades infecciosas, los aptámeros también han sido utilizados para detectar y capturar patógenos específicos, lo que permite un diagnóstico rápido y sensible. Por ejemplo, se ha desarrollado un ensayo basado en aptámeros de ADN para capturar y detectar *Listeria monocytogenes*, utilizando perlas magnéticas para la captura del patógeno, seguido de una detección altamente específica mediante el aptámero (93). Además, el fenómeno de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia la cual es una técnica que aprovecha la interacción entre moléculas fluorescentes, ha sido utilizada para desarrollar un aptasensor basado en nanopartículas de conversión ascendente y nanopartículas de oro para el diagnóstico rápido y ultrasensible de *Escherichia coli* (94). Además, se han utilizado aptámeros específicos para (1-3)- β -D-glucanos presentes en la pared celular del hongo *Candida albicans* para diagnosticar infecciones invasivas causadas por este hongo, mostrando una alta especificidad y sensibilidad en la detección en muestras de sangre de pacientes con *Candida albicans* (91).

Los aptámeros se destacan como una clase de terapéuticos altamente prometedora y versátil, con una variedad de aplicaciones en el campo médico. Además del ya mencionado y destacado Macugen, aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) en 2004, se pueden encontrar otros ejemplos notables como REG1, un sistema de anticoagulación que incluye el aptámero RB006, dirigido específicamente al factor de coagulación IXa. Este aptámero se emplea como un anticoagulante reversible durante intervenciones coronarias percutáneas (95). Por otro lado, el aptámero ARC1779 se dirige al dominio A1 del factor de Von Willebrand, el cual está involucrado en la formación de coágulos sanguíneos. La interacción de ARC1779 con los receptores de glucoproteína Ib en las plaquetas resulta en un efecto antitrombótico sin causar una anticoagulación significativa (96). Igualmente, el aptámero NOX-A12 se enfoca en el ligando de quimiocinas 12 (CXCL12), conocido como SDF-1 α , el cual juega un papel crucial en el movimiento celular, angiogénesis y metástasis tumoral. Al unirse a CXCL12, NOX-A12 tiene el potencial terapéutico de inhibir sus funciones biológicas, lo que lo hace prometedor para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el movimiento celular y la metástasis tumoral (97). Estos ejemplos son solo una muestra de la multitud de aptámeros con aplicaciones en la medicina. Con la continuación de la investigación y las pruebas clínicas, es probable que veamos un aumento en el número de aptámeros aprobados para uso diagnóstico y terapéutico en el futuro.

2.10. Técnica SELEX

La técnica SELEX ha demostrado ser un enfoque poderoso para seleccionar aptámeros altamente específicos contra una amplia gama de objetivos, desde moléculas pequeñas hasta proteínas y células enteras. El proceso SELEX es una simulación de la evolución natural, donde una biblioteca de secuencias de ADN o ARN con regiones aleatorias se somete a múltiples ciclos de incubación con el objetivo de interés, seguido de la separación entre secuencias unidas y no unidas. Las secuencias que muestran alta afinidad hacia el objetivo se amplifican mediante PCR y se someten a nuevos ciclos de selección para obtener aptámeros de alta afinidad y especificidad (90).

SELEX es una herramienta poderosa para seleccionar aptámeros altamente específicos, y las variantes de esta técnica, como el Bio-SELEX, CE-SELEX, Capture-SELEX, Magnetic-Bead SELEX y Cell-SELEX, permiten adaptarse a diferentes tipos de objetivos. Las modificaciones post-SELEX agregan versatilidad y mejoran las propiedades farmacológicas de los aptámeros, lo que los convierte en prometedores candidatos para diversas aplicaciones biomédicas (90).

2.10.1. SELEX Clásico

El método clásico SELEX es una técnica ampliamente utilizada para generar aptámeros, que son secuencias cortas de ADN o ARN de una sola hebra. El proceso comienza con una biblioteca de estas secuencias de ácidos nucleicos, cada una conteniendo secuencias específicas en sus extremos 5' y 3'. Estas secuencias se aleatorizan en la región central con una longitud entre 20-80 nucleótidos, creando una diversa colección de aptámeros potenciales. El proceso de SELEX implica varias rondas de selección. En cada ronda, la biblioteca se incuba con la molécula objetivo de interés. Los aptámeros con alta afinidad por el objetivo se unirán a él, mientras que las secuencias que no se unen permanecen libres. Los aptámeros unidos luego se separan de los no unidos, a menudo utilizando técnicas como la filtración o perlas magnéticas. Los aptámeros unidos se eluyen y amplifican mediante PCR. Esta amplificación genera más copias de los aptámeros seleccionados, aumentando su representación en la biblioteca para la siguiente ronda de selección. Todo el proceso se repite durante varias rondas, típicamente de 4 a 10, para enriquecer la biblioteca con aptámeros que exhiben una mayor afinidad por el objetivo. Después de las rondas de selección, se analiza el conjunto de aptámeros enriquecido para identificar las secuencias específicas que se unen al objetivo. Esto implica clonar los aptámeros y secuenciarlos para determinar su estructura primaria. Una vez identificados, los aptámeros pueden ser caracterizados y optimizados para aplicaciones específicas (25).

Una consideración importante en SELEX es la elección entre aptámeros de ADN y ARN. Los aptámeros de ADN son más económicos y químicamente estables, lo que

los hace adecuados para ciertas aplicaciones. Por otro lado, los aptámeros de ARN generalmente ofrecen una mayor especificidad y afinidad de unión con sus moléculas objetivo, lo que los hace valiosos para otros propósitos (90).

2.10.2. Bio-SELEX

La técnica Bio-SELEX es una modificación de la estrategia SELEX que busca identificar nuevos biomarcadores a partir de muestras biológicas. Esta innovadora técnica utiliza avances tecnológicos como secuenciación de última generación (NGS), pull-down y espectrometría de masas (MS) para identificar biomarcadores asociados con enfermedades infecciosas y no infecciosas. Es una herramienta adaptable y costo-efectiva que ha demostrado éxito en la identificación de biomarcadores para leishmaniasis (98).

2.10.3. CE-SELEX (SELEX por electroforesis capilar)

La CE-SELEX es una variante que se centra en la separación de las secuencias unidas al objetivo de las no unidas mediante electroforesis capilar la cual es técnica de separación y análisis de moléculas basada en sus cargas eléctricas y tamaños mediante el uso de un dispositivo de microelectroforesis de flujo libre. Esta técnica permite una separación de alta resolución y reduce el número de rondas de selección requeridas. Sin embargo, puede ser menos efectiva para objetivos pequeños o con cargas similares a las secuencias (99).

2.10.4. Capture-SELEX

En el proceso de Capture-SELEX, se utiliza una biblioteca de oligonucleótidos de ADN de cadena sencilla diseñada con una parte central adicional llamada secuencia de acoplamiento, que se fija y es complementaria a una secuencia utilizada para capturar la biblioteca en un soporte sólido. Una muestra de perlas magnéticas modificadas con oligonucleótidos de captura se incuba con la biblioteca, de manera que la inmovilización ocurre mediante hibridación entre la secuencia de acoplamiento de la biblioteca inicial y los oligonucleótidos de captura en las perlas magnéticas. Posteriormente, la biblioteca de ADN inmovilizada en las perlas se incuba con la molécula objetivo. Los oligonucleótidos con afinidad por la molécula objetivo se liberan de los complejos ADN-perlas y adoptan una estructura tridimensional que se une a la molécula objetivo en solución. El sobrenadante se recoge mediante separación magnética y se amplifica mediante PCR, para someterlo a la siguiente ronda de selección (100). Esta estrategia permite la identificación de aptámeros específicos para una amplia variedad de moléculas y presenta ventajas al evitar la inmovilización del objetivo durante el proceso de selección (100).

2.10.5. Magnetic-Bead SELEX

El método Magnetic-bead-SELEX es un paso crucial en la selección exitosa de aptámeros, ya que mejora la eficiencia y el tiempo del proceso. En esta técnica, se incuban la biblioteca inicial de ADN con perlas magnéticas modificadas con la molécula objetivo, luego se separan magnéticamente los oligonucleótidos no unidos y se extraen las secuencias que se unieron al objetivo. Estas secuencias seleccionadas se amplifican utilizando cebadores específicos y se utilizan en la siguiente ronda de selección. La metodología Magnetic-bead-SELEX ha sido empleada en diversas aplicaciones biomédicas, como la identificación de biomarcadores para tumores pulmonares y el enriquecimiento de aptámeros específicos utilizando ADN de fluoresceína. Esta técnica ha demostrado ser eficiente y versátil en la búsqueda de aptámeros con afinidad para diferentes moléculas de interés en el campo de la medicina y la investigación biológica (101).

2.10.6. Cell-SELEX

Cell-SELEX es una variante de SELEX que utiliza células vivas como objetivos para la selección de aptámeros. Permite seleccionar aptámeros que distinguen proteínas específicas presentes en la superficie de células particulares. El método involucra selección positiva para células objetivo y selección negativa para células no objetivo. Aunque ha demostrado utilidad en diagnóstico y aplicaciones terapéuticas, existen desafíos debido a efectos no específicos y selección hacia blancos no deseados. Para obtener resultados óptimos, se requiere tener células sanas para la selección exitosa. Diversas técnicas se han desarrollado para minimizar la unión no específica o eliminar células muertas, como la separación mediante perlas magnéticas o clasificación celular por fluorescencia (102). El método LIGS (Selección Guiada por Ligando), introducido en 2016, guía la selección hacia objetivos específicos en la superficie celular utilizando una elución competitiva con un ligando secundario, como un anticuerpo monoclonal. Esta estrategia ha demostrado ser adaptable y prometedora para la identificación de aptámeros altamente específicos contra complejos objetivos, como los receptores de superficie celular conocidos (103). Su uso abre nuevas posibilidades en biomedicina para el desarrollo de agentes terapéuticos de bajo costo y dispositivos de diagnóstico altamente estables.

2.10.7. Modificaciones Post-SELEX

Una vez identificadas las secuencias de aptámeros mediante el proceso de SELEX, es posible llevar a cabo modificaciones químicas para mejorar sus propiedades y adaptarlas a aplicaciones específicas en medicina y biotecnología. Estas modificaciones, conocidas como post-SELEX, permiten optimizar los aptámeros para su uso *in vivo*, mejorando su estabilidad y aumentando su afinidad de unión a sus objetivos (104).

Existen varias estrategias de modificación post-SELEX que se pueden aplicar a las secuencias de aptámeros. Una de las modificaciones más comunes es la sustitución de ribosas con grupos metilo o 2'-fluoro, lo que confiere mayor resistencia a las nucleasas y protege a los aptámeros de su degradación. Del mismo modo, las modificaciones en los enlaces fosfodiéster y en las bases mismas también han demostrado ser efectivas para aumentar la estabilidad de los aptámeros en entornos biológicos complejos (104).

Es importante tener en cuenta que, si bien las modificaciones post-SELEX pueden mejorar la estabilidad de los aptámeros, en algunos casos pueden afectar su afinidad de unión a los objetivos. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo un minucioso proceso de optimización para garantizar que las modificaciones seleccionadas no comprometan la capacidad del aptámero para reconocer y unirse específicamente a su objetivo (104).

2.11. Estado del arte

En un estudio realizado por Ulrich H. *et al.* (2002), mediante la técnica SELEX, se obtuvieron aptámeros que reconocen los receptores del parásito *T. cruzi* en el hospedero. Se utilizaron células de riñón de mono LLC-MK2 en un modelo *in vitro* para demostrar la capacidad de estos aptámeros para inhibir la invasión del *T. cruzi* en las células hospederas. La técnica SELEX permitió obtener aptámeros de ARN resistentes a nucleasas que se unen con afinidades de 40-400 nM a los receptores del parásito, específicamente a las moléculas de la matriz de la célula huésped, como la laminina, fibronectina, trombospondina y sulfato de heparina. Tras ocho rondas consecutivas de selección *in vitro*, se aislaron y secuenciaron cuatro clases de aptámeros de ARN con similitudes estructurales. Cada clase de aptámeros compartía un motivo de secuencia común y mostró actividad al inhibir la invasión de células renales de mono LLC-MK2 por *T. cruzi in vitro* (26).

En otro estudio dirigido por Nagarkatti R. *et al.* (2012), se identificó un aptámero (Apt68) que muestra alta afinidad por *T. cruzi* y que facilita el aislamiento de las formas parasitarias en sangre, lo que permite su diagnóstico mediante la técnica de PCR. Empleando una estrategia de SELEX de célula completa, se desarrollaron aptámeros de ARN estables en suero que se unen a los tripomastigotes vivos de *T. cruzi*. Estos aptámeros demostraron altas afinidades de unión en el rango de 8-25 nM. Además, el Apt68 mostró alta especificidad, ya que no interactuó con los epimastigotes de la etapa de insecto de *T. cruzi* ni con otros parásitos tripanosomátidos relacionados, como *L. donovani* y *T. brucei*. El Apt68 biotinilado, inmovilizado en una fase sólida, fue capaz de capturar los parásitos vivos, formando grandes agregados móviles cuando las perlas magnéticas recubiertas de aptámeros se unieron a la superficie de los tripomastigotes. También se pudo capturar y agrupar tripomastigotes de varios aislados de los dos principales genotipos del

parásito. Utilizando un imán, estos agregados parásito-perlas se purificaron a partir de muestras de sangre completa contaminadas con parásitos, incluso a concentraciones tan bajas como 5 parásitos en 15 ml de sangre total, según lo detectado por un ensayo de PCR en tiempo real. Los resultados de este estudio demuestran que los aptámeros pueden ser utilizados como ligandos específicos del patógeno para capturar y facilitar la detección de *T. cruzi* en la sangre mediante PCR (27).

En otro estudio liderado por Nagarkatti R. *et al.* (2014), se identificó un aptámero (Apt-L44) que muestra gran afinidad por antígenos excretados y secretados por *T. cruzi* (TESA) en el torrente sanguíneo durante la infección del hospedero. Los autores concluyeron, tras realizar la técnica ELASA (una técnica similar a la Elisa pero usando aptámeros en lugar de anticuerpos), que Apt-L44 tiene utilidad como biomarcador tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la enfermedad. Además, teniendo en cuenta que en ratones infectados con *T. cruzi*, Apt-L44 demostró un nivel significativamente más alto de unión en comparación con ratones no infectados, lo que sugiere su potencial diagnóstico en la infección por *T. cruzi* (28).

En un estudio dirigido por Verástegui P. *et al.* (2018), se identificaron diez proteínas altamente expresadas como posibles biomarcadores para la EC, y la proteína codificada por el gen TcCLB.510323.60 fue seleccionada como la mejor candidata. A partir de esta proteína, se generaron cinco péptidos (Tc1-Tc5) para desarrollar aptámeros mediante la técnica de SELEX. Se identificaron secuencias de ADN con un motivo rico en guaninas, de las cuales cinco mostraron una unión específica con el péptido Tc1. Un ensayo tipo ELISA demostró cualitativamente la capacidad de unión de estos aptámeros tanto al péptido biomarcador como a los lisados de cultivos de *T. cruzi*, confirmando su condición de aptámeros. Los aptámeros mostraron una unión diferencial al péptido Tc1 y presentaron reactividades 2 a 3 veces mayores que el cut-off establecido en los lisados. Los ensayos con lisados crudos de *T. cruzi* sugirieron la presencia de la proteína codificada por el gen TcCLB.510323.60 en la membrana del parásito. Estos aptámeros tienen el potencial de ser utilizados en el desarrollo de un ensayo de detección directa de *T. cruzi* en muestras biológicas, así como para enriquecer muestras con una baja carga parasitaria. Su aplicación podría mejorar significativamente la detección y diagnóstico de esta enfermedad, lo que sería de gran importancia para el control y tratamiento de la infección por *T. cruzi* (29).

Murgencia C & Gabriela M, (2021) implementaron una metodología basada en el diseño *in silico* de aptámeros de ARN para la detección de la proteína transalidasa de *T. cruzi*. Se empleó una biblioteca de 5 mil oligonucleótidos de ARN previamente optimizada, de la cual se seleccionaron treinta oligonucleótidos con mayor

probabilidad de interacción con las proteínas transialidasa de *T. cruzi* (TcTS), mediante el predictor de interacciones RPISeq. Posteriormente, se llevó a cabo el modelado de las estructuras secundarias y terciarias de los oligonucleótidos seleccionados, y se evaluó su energía de acoplamiento con las TcTS y las proteínas transialidasa de *T. rangeli* (TrTS), utilizando las plataformas HDOCK y HADDOCK. A partir de este análisis, se identificaron cinco aptámeros con energías de acoplamiento hacia TcTS significativamente inferiores a -140.3 unidades, lo que evidenció una mayor afinidad hacia esta proteína en comparación con TrTS. Además, se llevó a cabo un estudio de polimorfismos en el gen que codifica para la TcTS evaluada, y se identificaron regiones inmunogénicas putativas en la proteína, asegurando la especificidad del sitio de unión de los aptámeros. En consecuencia, se recomienda la validación de los aptámeros identificados (Apta3384M5, Apta3989 y Apta3989M3) mediante ensayos de afinidad *in vitro*, con el objetivo de determinar su funcionalidad y utilidad en el desarrollo de pruebas de flujo lateral. Estas pruebas podrían brindar una detección rápida y precisa de la EC en su fase aguda, superando algunas de las limitaciones actuales en el diagnóstico masivo de esta enfermedad. Estas investigaciones abren una prometedora perspectiva para el uso de aptámeros como herramientas efectivas en la lucha contra la EC (30).

También se han llevado a cabo diferentes investigaciones experimentales utilizando aptámeros contra otros tripanosomátidos, como el *Trypanosoma brucei*. Loriger M. *et al.* (2003) reportaron *in vitro* el uso de aptámeros dirigidos contra las glicoproteínas de superficie del *Trypanosoma brucei*, los cuales son capaces de dirigir anticuerpos a la superficie del parásito. Estas glicoproteínas son altamente variables pero reconocibles por los aptámeros debido a su estructura conservada C-terminal, lo que proporciona una nueva estrategia terapéutica para combatir la enfermedad del sueño (105). Homann M. y Göringer U. (2001) analizaron la posibilidad de dirigir un aptámero (aptámero 2-16) hacia el bolsillo flagelar de *Trypanosoma brucei*, un polipéptido que se expresa únicamente en la etapa infectiva en sangre del parásito. Una vez que el aptámero se une a la superficie del parásito, este es degradado e ingresa por endocitosis, siendo transportado al lisosoma, sugiriendo así la posibilidad de acoplar a los aptámeros medicamentos con actividad anti tripanosomátida y dirigirlos al compartimento lisosomal u otros compartimentos intracelulares del parásito para provocar su destrucción (106). En otro estudio, Homann M. *et al.* (2006) modificaron un aptámero con afinidad por la zona de unión flagelar de *Trypanosoma brucei*, ubicada entre el cuerpo celular y el flagelo del parásito, para que tuviera una estabilidad en el suero humano mayor a 30 horas. Este aptámero puede ser utilizado para redirigir principalmente inmunoglobulinas a la superficie del parásito, siendo una novedosa herramienta terapéutica para la enfermedad del sueño (107).

Por otro lado, también se han obtenido aptámeros contra el parásito protozoario *Leishmania spp.*, que tiene una relación filogenética cercana a *T. cruzi*. La leishmaniasis es una enfermedad tropical que afecta a diferentes países en cuatro continentes, causando diversas manifestaciones en la piel, mucosas y órganos. Para el diagnóstico de la leishmaniasis, la proteína histona H2A ha sido considerada una excelente candidata. Las histonas presentan conservación en su región globular y divergencia en los dominios N y C terminales (108).

En el caso de *Leishmania spp.*, los genes de las histonas son interesantes ya que estos parásitos no condensan la cromatina durante la mitosis. Por lo tanto, varias investigaciones se han centrado en generar aptámeros (SELH2A, AptLiH2A#1 y AptLiH2A#2) dirigidos específicamente contra la proteína H2A de *Leishmania infantum*, sugiriendo su implementación para el desarrollo de novedosas herramientas diagnósticas y terapéuticas (108, 109). De igual manera se han diseñado aptámeros contra la proteína H3 de *Leishmania infantum* con el mismo objetivo (110, 111). Además, se han identificado aptámeros de ADN contra la proteína PABP de *L. infantum*, la cual desempeña un papel fundamental en el proceso de corte y poliadenilación de los ARN mensajeros en su región 3'UTR. Entre estos aptámeros, destacan ApPABP#3, ApPABP#7 y ApPABP#11, que han sido purificados y muestran una alta afinidad de unión al LiPABP con un valor de 50 nM. Estos aptámeros pueden ser de gran utilidad en investigaciones, diagnósticos y terapias, ya que, además de reconocer a LiPABP, también tienen la capacidad de interrumpir su unión a la cola de poliA, lo que los convierte en valiosos candidatos para diversas aplicaciones biotecnológicas (112).

Los aptámeros también se han implementado para el diagnóstico de otras enfermedades parasitarias, como la malaria causada por *Plasmodium spp.* El parásito responsable de la malaria infecta los glóbulos rojos del huésped durante su ciclo de vida eritrocítico. Para evadir la respuesta inmunitaria, los eritrocitos infectados forman rosetas con eritrocitos no infectados, facilitado por la proteína PfEMP1, que presenta variación antigénica y está compuesta por un dominio ligando de unión a Duffy (DBL) y regiones interdominio ricas en cisteína (113).

En un estudio dirigido por Barfod. *et al.* (2009) se emplearon aptámeros de ARN con modificaciones específicas en 2'-fluoro desoxiadenosina, lo que prolongó su vida media a 15 horas en suero. Estos aptámeros se dirigieron al dominio N-terminal de DBL1 α , logrando el reconocimiento específico de la proteína recombinante DBL1 α y, en consecuencia, de los eritrocitos infectados con *P. falciparum* (114).

Por otro lado, la lactato deshidrogenasa (pfLDH) es un marcador diagnóstico clave para *Plasmodium spp.* En este contexto, Cheung. *et al.* (2018) desarrollaron aptámeros de ADN acoplados a nanopartículas de oro que mostraron una diferenciación selectiva entre la pLDH de *P. falciparum* y la LDH humana. Estos

aptámeros tienen el potencial de detectar el parásito en muestras de pacientes con malaria, brindando una alternativa prometedora para un diagnóstico específico de la especie (115). Un estudio dirigido por Niles. *et al.* (2009) logró obtener aptámeros de ADN altamente efectivos que inhiben de manera eficiente la vía de desintoxicación del grupo heme en *Plasmodium spp.* Esta vía es esencial para el parásito, y al ser inhibida, provoca su toxicidad y la inhibición de su crecimiento *in vitro*. La desintoxicación del grupo heme es un proceso vital para el parásito, ya que está relacionado con la neutralización de compuestos tóxicos, incluyendo aquellos utilizados en tratamientos antipalúdicos como la cloroquina (116).

Entamoeba histolytica, el agente causal de la amebiasis humana es un parásito que representa una grave amenaza para la salud pública a nivel mundial, causando aproximadamente 100,000 muertes al año y afectando a alrededor del 10% de la población, según datos de la OMS. La regulación de la expresión génica en este parásito es esencial para su supervivencia y, en particular, la poliadenilación del extremo 3' UTR de los ARN mensajeros juega un papel crucial en este proceso (117).

Para que la poliadenilación ocurra de manera eficiente, diferentes complejos proteicos deben reconocer secuencias específicas en los ARN mensajeros. Entre estos complejos, destaca el factor de corte EhCFIm25 de 25 kilodalton (kDa), el cual ha sido identificado como esencial para la selección de sitios de poliA y el proceso de poliadenilación en *Entamoeba histolytica*. La inhibición de EhCFIm25 ha demostrado acelerar la proliferación celular y, en última instancia, conducir a la muerte del parásito (117).

En el año 2018, se llevó a cabo una investigación en la que se seleccionaron dos aptámeros de ARN específicos para la proteína EhCFIm25 después de siete rondas de SELEX. Estos aptámeros fueron capaces de unirse de manera específica tanto a la forma recombinante como a la endógena de EhCFIm25. Al interferir con la función reguladora de EhCFIm25 en el ARN, los aptámeros lograron inducir la muerte del parásito *in vitro*, abriendo así la posibilidad de utilizarlos como herramientas terapéuticas para el control de la amebiasis humana (117).

2.12. Marco normativo

La EC en Colombia se considera una enfermedad de notificación obligatoria inmediata al Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) para todos los casos nuevos y brotes identificados. Además, de manera rutinaria, se realiza una notificación semanal. En la actualidad, existe la obligación de realizar tamizajes en menores de 18 años en áreas endémicas o en casos de nexos epidemiológico. Asimismo, los bancos de sangre y los estudios previos de trasplantes de órganos también deben someterse a tamizaje. Se ha establecido como requisito realizar tamizaje a las mujeres durante el último control prenatal o en el momento del parto,

especialmente si residen en municipios endémicos o han estado expuestas a triatomíneos. Además, se debe realizar un seguimiento adecuado a los hijos de mujeres seropositivas para establecer un diagnóstico de Chagas congénito. En caso de confirmar la infección en el niño, se debe administrar el tratamiento etiológico correspondiente para la enfermedad (35).

En Colombia, los casos confirmados de EC en fase aguda deben ser reportados de manera inmediata al Instituto Nacional de Salud. Además, todos los casos confirmados de EC en cualquier fase deben ser reportados semanalmente en la ficha de notificación nacional. Esto incluye casos confirmados a través de bancos de sangre, encuestas de seroprevalencia y Registros Individuales de Prestación de Servicios de Salud (RIPS), los cuales proporcionan los datos mínimos y básicos necesarios para dar seguimiento al Sistema General de Seguridad Social en Salud (SGSSS) (35).

En 1995, se reglamentó en Colombia la resolución 1738, la cual exige el tamizaje obligatorio para la EC en todas las unidades transfusionales de los bancos de sangre a nivel nacional. En 2013, se informó que alrededor del 0,4% de las muestras de sangre captadas y analizadas resultaron positivas, siendo Casanare la región con mayor reactividad. Aunque actualmente se realiza el tamizaje en el 100% de las unidades de sangre en Colombia, las pruebas disponibles en el mercado para la detección del *T. cruzi* no son 100% sensibles ni específicas, lo que sugiere que la transfusión sanguínea aún conlleva un riesgo de transmitir la enfermedad (118). En un estudio llevado a cabo por Caicedo Díaz, R. (2017) en Colombia, se evaluó el rendimiento diagnóstico de la técnica de ELISA tanto de forma individual como en combinación para la EC. Esta técnica se utiliza como tamizaje para la detección de la enfermedad. Los resultados mostraron que las pruebas individuales tenían una sensibilidad que variaba entre 92,5% y 99,6%, y una especificidad entre 94,6% y 97,9%. En cuanto a las combinaciones, se observó que la sensibilidad aumentaba cuando se realizaban pruebas en paralelo, mientras que la especificidad aumentaba en pruebas en serie, llegando incluso al 99,9% en algunas combinaciones (119).

La Asamblea Mundial de la Salud en 2012, a través de la resolución WHA63.20, y la OPS en 2010, mediante la resolución CD50.R17, establecieron y pusieron en marcha la actual estrategia y Plan de Acción para la prevención, control y atención de la EC. Este plan incluye medidas para la erradicación de los vectores, interrupción de las transmisiones domésticas y el fortalecimiento de nuevos planes para la prevención y control de la enfermedad. Además, se busca mejorar el acceso a la atención médica para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la EC, especialmente entre las poblaciones de bajos recursos y marginadas, ya que la proporción de personas afectadas sigue siendo alta en estos grupos (120). En este contexto, es importante destacar que actualmente las pruebas de detección para la

EC son realizadas en pocos laboratorios especializados y certificados, lo que limita su alcance. Por tanto, sería esencial contar con pruebas rápidas y efectivas que puedan ser implementadas en todos los niveles de atención, para así agilizar el diagnóstico y garantizar una atención oportuna a los pacientes afectados.

En Colombia, se han establecido responsabilidades por niveles en el manejo de la EC. Las entidades administradoras de salud son responsables de realizar pruebas, analizar el comportamiento epidemiológico de su población y llevar a cabo actividades de control y prevención de la enfermedad. Estas entidades informan sobre la situación a los niveles municipales y departamentales, quienes deben fortalecer y participar en las actividades con las comunidades, así como notificar a nivel nacional y solicitar los insumos y medicamentos necesarios para continuar con la meta de erradicación de la enfermedad. Es esencial consolidar los datos de los casos confirmados por EC, definir la incidencia de los casos y analizar la asociación geográfica teniendo en cuenta los datos históricos y los riesgos estudiados. En caso de brotes en zonas no endémicas, es importante considerar todas las vías de transmisión, además de la vectorial (35).

3. Hipótesis

3.1. Hipótesis

Los aptámeros obtenidos mediante Bio-SELEX son útiles para la identificación de un biomarcador potencialmente aplicable como herramienta diagnóstica para la enfermedad de Chagas en fase crónica.

3.2. Hipótesis nula

Los aptámeros obtenidos mediante Bio-SELEX no son útiles para la identificación de un biomarcador potencialmente aplicable como herramienta diagnóstica para la enfermedad de Chagas en fase crónica

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Identificar biomarcadores potencialmente útiles para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en fase crónica utilizando la estrategia Bio-SELEX.

4.2. Objetivos específicos

1. Identificar las secuencias de nucleótidos de los aptámeros con capacidad de unirse a biomarcadores específicos relacionados con la EC.
2. Aislar los potenciales biomarcadores identificados por medio del aptámero seleccionado.
3. Identificar los biomarcadores aislados por el aptámero seleccionado.
4. Caracterizar la interacción entre el aptámero seleccionado y el biomarcador identificado.

5. Metodología

5.1. Enfoque metodológico de la investigación

Este estudio tiene un enfoque cuantitativo en el cual a partir de la recolección y análisis de datos numéricos y estadísticos obtenidos a través de un proceso inferencial se busca probar la hipótesis previamente formulada.

5.2. Tipo de estudio

Descriptivo exploratorio observacional ambispectivo. Es un estudio de carácter estadístico en el que no se realizará intervención, sino que se analizarán diferentes variables que nos aproximen a una respuesta a la pregunta de investigación y a la hipótesis generada y nos ayuden a conocer el tema a mayor profundidad.

5.3. Población

5.3.1. Población de estudio

La población de estudio está compuesta por 18 muestras de suero seleccionadas a conveniencia y las cuales se dividieron en 4 grupos diferentes. Estas muestras fueron obtenidas previamente del banco de sueros disponible en el Instituto Colombiano de Medicina Tropical. La distribución de los grupos de sueros fue la siguiente:

Grupo 1: mezcla de 5 sueros de controles sanos que nunca fueron diagnosticados para la EC, ni para Leishmaniasis.

Grupo 2: mezcla de 5 sueros de pacientes con diagnóstico confirmado de leishmaniasis cutánea mediante la visualización del parásito por microscopía a partir de muestras de piel. (control negativo para diagnóstico diferencial por la relación filogenética entre *Leishmania spp.* y *T. cruzi.*)

Grupo 3: mezcla de 3 pacientes con diagnóstico de EC confirmados por inmunofluorescencia indirecta (IFI) con títulos bajos (<1:64).

Grupo 4: mezcla de 5 sueros de pacientes con diagnóstico de EC confirmados por inmunofluorescencia indirecta (IFI) con títulos altos (>1:64).

5.3.2. Criterios de exclusión

Para el estudio se excluyeron las muestras de suero que no contaban con el volumen suficiente para su procesamiento (menos de 100µL), y también aquellas que para la EC no tenían registro de los títulos de anticuerpos por IFI.

5.4. Variables

5.4.1. Variables dependientes

La variable dependiente del estudio es la o las proteínas presentes en el suero de los pacientes con EC, expresadas de forma diferencial. Estas proteínas se consideran potenciales biomarcadores, y su identificación por parte de los aptámeros que los reconocen de forma específica permitirá un primer paso en la elaboración de un prototipo de una nueva prueba diagnóstica para la EC en su fase crónica.

5.4.2. Variables independientes o covariables

Las variables independientes del estudio son los aptámeros, la afinidad de unión de los aptámeros a la proteína y la capacidad que tienen los aptámeros para detectar la proteína en los sueros de los pacientes con EC.

5.5. Recolección de la información

5.5.1. Fuentes de información

La recolección de la información fue de fuente primaria, ya que los datos se obtuvieron a partir de los resultados de los diferentes ensayos que se realizaron por parte de los investigadores principales. La información de fase secundaria corresponde únicamente al diagnóstico previo de los sueros utilizados para los grupos de leishmaniasis y de la EC con sus respectivos títulos en la prueba IFI.

5.5.2. Técnicas e instrumentos de recolección de información

Se realizó un formato en el cual se diligenció el paso a paso de cada proceso experimental realizado por los investigadores principales, incluyendo resultados y modificaciones pertinentes a cada uno de los protocolos. La primera etapa incluyó el análisis bioinformático de los aptámeros y de las proteínas y la segunda parte, la estandarización de todas las técnicas de laboratorio que nos van a permitir obtener la proteína diana para la elaboración del prototipo de prueba diagnóstica para la EC en fase crónica.

5.5.3. Procedimiento de recolección de información

Objetivo 1

5.5.3.1. Extracción de proteínas de los sueros

Se formaron grupos de sueros (pacientes sanos, pacientes con diagnóstico de leishmaniasis, pacientes con diagnóstico de EC con títulos bajos y pacientes con diagnóstico de EC con títulos altos). Las proteínas totales se extrajeron mediante el método de Trizol utilizando los reactivos TRI reagent® BD (Molecular Research Center, Inc.) según las especificaciones del proveedor. La cuantificación de las

proteínas se realizó con el kit comercial BCA Protein Assay Kit (ab102536, Abcam) y su integridad se evaluó mediante electroforesis en SDS-PAGE.

5.5.3.2. Bio-SELEX

5.5.3.2.1. SELEX tradicional

Se obtuvieron los extractos de proteínas de los sueros de los pacientes positivos para EC, y se agruparon en una única muestra, a partir de la cual se llevó a cabo la técnica SELEX. Para esto, se utilizó el protocolo publicado por Wang *et al* en 2019 con algunas modificaciones (121). La biblioteca de oligonucleótidos utilizada constó de una región variable de 40 nucleótidos y 2 regiones conservadas (5'-GTCTATATGATCTGTAAGTC-N40-CCAGCAGTGAGTCATCAGAT-3') en los extremos, para facilitar su detección y amplificación mediante PCR. Para la amplificación de las bibliotecas, se empleó un oligonucleótido sentido complementario a la región conservada en el extremo 3' (5'-GTCTATATGATCTGTAAGTC-3') y un oligonucleótido antisentido complementario al extremo 5' (5'-ATCTGATGACTCACTGCTGG-3') (figura 11).

La biblioteca fue amplificada mediante PCR utilizando el kit comercial 2X PCR HotStart Master Mix con colorante (ABM). El perfil térmico utilizado consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos, seguida de ciclos de 95°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos, y 72°C durante 30 segundos. Finalmente, se llevó a cabo una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Se realizaron 18 ciclos de amplificación.

Tras la amplificación de la biblioteca, se sometieron 0.2 nmol de la muestra a 95°C durante 10 minutos y luego se dejó enfriar a 18°C-20°C para promover el plegamiento de los aptámeros, paso fundamental para reconocer su blanco. A continuación, se incubó la muestra con 0.1 nmol de proteínas sensibilizadas en 200 µl de Buffer SELEX (pH 7.4 PBS que contiene 2.5 mM de MgCl₂, Tween20 al 0.02% y 1 mM de heparina en 1L de agua miliQ) durante 1 hora a 37°C para facilitar la interacción entre los ADNss y las proteínas. Los complejos de ADNss y proteínas unidas se eluyeron con 50 µl de agua a 95°C durante 5 minutos, y los ADNss resultantes se amplificaron mediante PCR, siguiendo el protocolo previamente mencionado, durante 18 ciclos.

Inicialmente se llavaron a cabo 3 rondas de selección negativa, utilizando las proteínas totales extraídas de los grupos control 1 y 2, así como pocillos vacíos, con el objetivo de descartar las secuencias que tengan afinidad por blancos no específicos o no deseados.

Posteriormente, se llevaron a cabo 10 rondas de selección positiva para seleccionar las secuencias con mayor afinidad por las proteínas presentes en los grupos de muestras de pacientes con EC en fase crónica (grupos 3 y 4). Una vez finalizadas

las rondas de selección, las secuencias unidas fueron recuperadas y posteriormente enviadas para su secuenciación.

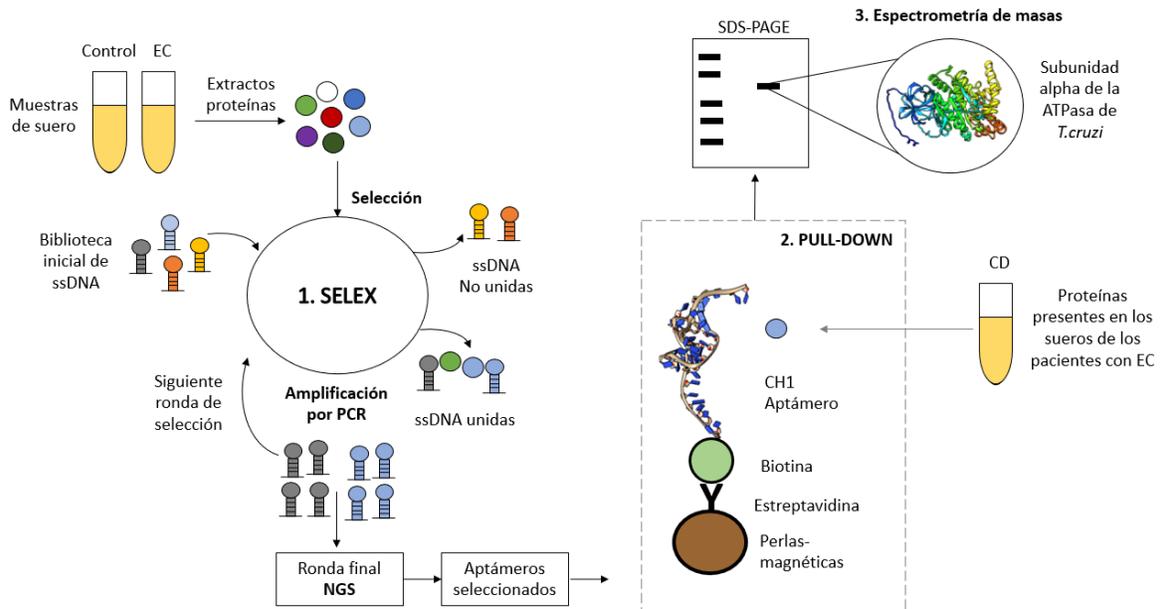


Figura 11. Esquemización de la estrategia Bio-SELEX para obtener aptámeros que reconocen biomarcadores específicos para la fase crónica de la enfermedad de Chagas a partir de muestras de suero. EC: enfermedad de Chagas (muestras de suero) ssDNA: ADN de cadena simple. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. NGS: secuenciación de nueva generación. SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida.

Fuente: Tomado sin modificaciones de: Morales M, *et al.* Identification of the ATPase alpha subunit of *Trypanosoma cruzi* as a potential biomarker for the diagnosis of Chagas disease. 2023.

5.5.3.2.2. Secuenciación y análisis

Después de completar 3 rondas de SELEX negativas y 10 rondas de SELEX positivas, las secuencias de ADNss seleccionadas fueron enviadas a Admera Health Biopharma Services para su secuenciación utilizando el equipo Illumina, con un tamaño de lectura de 2x250 por muestra. Una vez obtenidas las secuencias, se realizó el análisis de datos.

Inicialmente, se procesaron las secuencias mediante el software Cutadapt (122) para eliminar las regiones no deseadas y quedarse únicamente con las secuencias de la región variable de 40 nucleótidos, eliminando los adaptadores de secuenciación y de las bibliotecas de los extremos 5' y 3'. Aquellas secuencias que no cumplían con el número de nucleótidos requeridos fueron descartadas. A continuación, se evaluó la calidad de las secuencias seleccionadas utilizando el software FASTQC (123).

Para determinar la abundancia de cada secuencia y seleccionar los 5 grupos de aptámeros con mayor representatividad, se evaluó la cantidad de lecturas y lecturas por millón (reads y rpm) utilizando el software Fastaptamer (124). Luego, se utilizó

el programa GLAM2 (125) para identificar los motivos comunes presentes en cada uno de los 5 grupos de aptámeros seleccionados.

A continuación, se procedió a la predicción e identificación de la estructura 2D de cada grupo de aptámeros utilizando el software MFold (126). Posteriormente, se utilizó el software RNAComposer (127) para predecir las estructuras 3D de ARN de los aptámeros. Seguidamente, se convirtieron las estructuras 3D de ARN a estructuras 3D de ADN utilizando el software Discovery Studio Visualizer (128), reemplazando todos los uracilos por timinas y modificando el azúcar de ribosa a desoxirribosa.

El análisis se realizó de esta manera siguiendo el protocolo recomendado actualmente por diferentes investigadores (129-131) debido a que no se cuenta actualmente con un software para obtener estructuras 3D de ADN de cadena sencilla directamente desde su secuencia lineal.

Finalmente, para añadir hidrógenos a las estructuras 3D de ADN de los aptámeros se utilizó el software Swiss PDB Viewer (132) Este paso es crucial para los análisis de "Docking" y para obtener estructuras 3D completas y precisas.

Objetivo 2

5.5.3.2.3. Síntesis del aptámero

La secuencia del aptámero con mayor representatividad identificado después de la estrategia SELEX, la secuenciación y análisis de datos se nombró como CH1, el cual, fue marcado con biotina en el extremo 3' durante 30 minutos a 37 °C usando Biotin 3' End DNA Labelling Kit (PIERCE) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5.5.3.2.4. Aislamiento de biomarcadores usando los aptámeros seleccionados

Se utilizaron cuatro tubos eppendorf de 1,5 mL para llevar a cabo el procedimiento. En cada tubo se colocaron 50 µL de perlas magnéticas acopladas a estreptavidina conjugada con HRP (Thermo Fisher Scientific Inc.). Estas perlas fueron lavadas tres veces con 100 µL de Buffer SELEX 1X y las nanopartículas fueron recuperadas utilizando una gradilla magnética (The MagneSphere Technology, MyBio™) durante 2 minutos después de cada lavado.

A continuación, se añadieron 100 ng del aptámero CH1 biotinilado en un volumen de 50 µL a cada tubo. La mezcla se incubó a 18°C durante una hora para favorecer el acoplamiento del aptámero con las perlas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina. Luego, se realizaron tres lavados con Buffer TBST 1X en 50 µL para eliminar las moléculas no unidas.

Posteriormente, se agregaron 500 µg de proteínas de cada uno de los cuatro grupos mencionados anteriormente a cada tubo, en un volumen de 50 µL. Los tubos se incubaron nuevamente a 18°C durante una hora para facilitar la interacción entre los aptámeros acoplados a las perlas magnéticas y las proteínas específicas que pueden reconocer.

Después de esta etapa, se realizaron tres lavados adicionales con Buffer TBST 1X y los complejos formados se suspendieron en 50 µl de Buffer SELEX 1X. Seguidamente, se agregaron 25 µL de Buffer Laemmli 2X a cada tubo y se incubaron durante 10 minutos a 95°C. Esta etapa permitió desnaturalizar las proteínas y los aptámeros, preparándolos para su resolución en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%. Los geles se corrieron durante 2 horas a 80V y, finalmente, se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue R-250 (BIORAD 1610436) para visualizar los complejos obtenidos.

Objetivo 3

5.5.3.2.5. Espectrometría de masas

Las bandas observadas, que corresponden a las proteínas identificadas por el aptámero CH1, se separaron mediante un corte realizado con una lanceta estéril. Posteriormente, estas bandas fueron enviadas a la empresa Creative Proteomics (EE.UU.) para su identificación mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS).

En el análisis de espectrometría, las señales obtenidas fueron comparadas con las bases de datos disponibles, con el objetivo específico de buscar proteínas de *Homo sapiens* y *T. cruzi*. Para ello, se utilizó el equipo Q Exactive HF MS/MS y el software Maxquant (1.6.2.6).

5.5.3.2.6. Análisis bioinformáticos del biomarcador identificado

5.5.3.2.6.1. Análisis de datos LC-MS/MS

Los datos obtenidos se analizaron para identificar las proteínas aisladas por el aptámero previamente seleccionado, utilizado como molécula de captura, tanto de las proteínas extraídas de los sueros de los pacientes como directamente de las muestras de suero de los pacientes confirmados con EC (figura 12).

El enfoque de los análisis se centró en aquellas proteínas que eran comunes en ambos grupos (proteínas extraídas de la mezcla de sueros de los pacientes y proteínas identificadas directamente de las muestras de suero individuales). Para llevar a cabo esta identificación, se realizó una búsqueda exhaustiva en la literatura para encontrar bibliografía especializada que mencionara las proteínas identificadas

y su relación con el desarrollo de la EC, tanto proteínas de origen humano como aquellas provenientes del parásito *T. cruzi*.

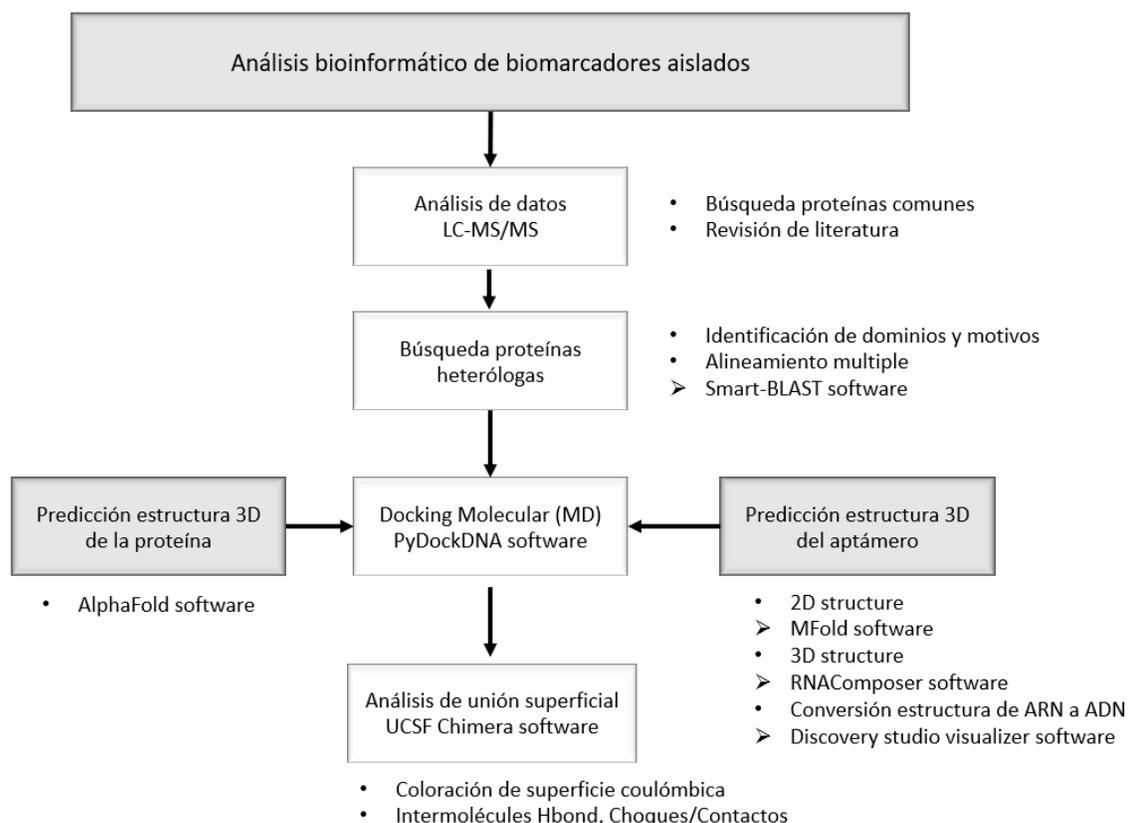


Figura 12. Diagrama de flujo de los análisis bioinformáticos realizados después de la identificación del biomarcador.

Fuente: Tomado sin modificaciones de: Morales M, *et al.* *Identification of the ATPase alpha subunit of Trypanosoma cruzi as a potential biomarker for the diagnosis of Chagas disease.* 2023.

5.5.3.2.6.2. Alineación múltiple

Las secuencias de proteínas identificadas del parásito *T. cruzi* se sometieron a comparación con proteínas de otros organismos relacionados, tales como *Homo sapiens*, *Trypanosoma sp*, *Leishmania spp*, y otros, mediante el uso de herramientas bioinformáticas como Smart BLAST (133). El propósito de esta comparación es evaluar la potencial utilidad diagnóstica de la proteína y verificar si puede existir alguna interferencia en la búsqueda de un diagnóstico específico. Es fundamental determinar si pueden ocurrir reacciones cruzadas con proteínas del huésped o de otros agentes infecciosos, ya que esto podría conducir a falsos positivos. Por lo tanto, se busca analizar su capacidad de diagnóstico y su susceptibilidad a interferencias que puedan provenir de co-infecciones o de otros elementos que puedan afectar la precisión del diagnóstico.

Objetivo 4

5.5.3.2.6.3. Búsqueda y predicción de estructuras 3D

Las secuencias de las proteínas identificadas mediante LC-MS/MS se analizaron en la base de datos Uniprot para buscar estructuras de cristal previamente reportadas. En aquellos casos donde no se encontraron estructuras resueltas, se procedió a predecir la estructura 3D utilizando el software online gratuito AlphaFold DB(134). Por otro lado, la predicción de la estructura 3D del aptámero CH1 se obtuvo como se explicó anteriormente.

5.5.3.2.7. Docking molecular proteína-aptámero

Una vez obtenidos los archivos PDB de la proteína y el aptámero seleccionado, se realizó el acoplamiento proteína-ADNss utilizando el software en línea PyDockDNA con los parámetros recomendados por defecto (135). Se seleccionó el modelo con la calificación más alta y la energía de interacción más baja.

5.5.3.2.8. Análisis de interacciones proteína-aptámero

Posteriormente, se procedió a la aplicación del software Chimera 1.15 (136) para la visualización y análisis del complejo aptámero-proteína. Utilizamos esta herramienta para calcular el potencial electrostático tanto de la proteína como del aptámero, lo que nos proporcionó información valiosa sobre las interacciones electrostáticas presentes en el complejo. Además, empleamos las herramientas FindHBond y Find Clashes/Contacts para identificar posibles interacciones intermoleculares y determinar los aminoácidos de la proteína y los nucleótidos del ADNss involucrados en el reconocimiento molecular.

6. Aspectos éticos

El estudio se desarrolló en concordancia con los aspectos éticos estipulados en la resolución 008430 de 1993, en el título 2, capítulo 1, donde se delimitan los aspectos éticos de la investigación en humanos en Colombia. Se respetará la dignidad y protección de los derechos y bienestar de los participantes, además de proteger su privacidad (137).

De acuerdo con la norma se determinó la investigación por una parte sin riesgo ya que serán utilizadas muestras de sueros de pacientes que ya habían sido previamente obtenidas para un estudio denominado "INMUNOTROPIC" en el ICMT. Por otra parte, se determina también un componente de riesgo mínimo, ya que para obtener los sueros de los controles sanos se realizará la toma de muestra con su debido consentimiento informado. No se manipulará la conducta de los participantes con medicamentos.

Se empleará consentimiento informado y consentimiento ampliado de las muestras del estudio "INMUNOTROPIC" para las muestras biológicas de los pacientes con diagnóstico de leishmaniasis y la EC y se empleará un consentimiento informado para las muestras obtenidas de controles sanos. El consentimiento incluye la justificación y objetivos de la investigación, los procedimientos que se realizaron y su propósito, la libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento de la investigación con la seguridad que se mantuvo la confidencialidad del participante (Anexo 1 - 4).

El estudio y el consentimiento fueron presentados ante el comité de Bioética del ICMT que evaluó el proyecto.

7. Resultados

Objetivo 1

7.1. Extracción de proteínas de muestras de suero

Se obtuvo la siguiente concentración de proteínas de los diferentes grupos de estudio (Tabla 1 y Figura 13A).

Tabla 1. Cuantificación de las proteínas extraídas de muestras de suero

Grupo	Concentración (mg/ml)
Grupo 1	26,24
Grupo 2	26,25
Grupo 3	24,57
Grupo 4	26,19

7.2. Análisis de secuenciación

Después de diez rondas de selección positiva y tres rondas de selección negativa de la estrategia SELEX, se envió la biblioteca final para ser identificada mediante NGS. Obtuvimos 872.575 secuencias. Después de procesar los datos, se obtuvo 204.132 secuencias agrupadas en 38 grupos. Las cinco secuencias más representadas se pueden observar en la figura 13.

Top 5	Secuencia (5'-3')	Estructura 2D	Estructura 3D	Motivos
CH1	TCCGCGCCTTCTCCCCTCTGTCCCTCGCTCCCTTCCGCCCC			
2	CCACCTATCTCCCGCCTACCAGACACGCATGATGGACCC			
3	AGAGGTGGCTAGCTCTCGACCCCCACGCAAGTGCCTACGC			
4	CTCACTGCTGGAGTTACAGATCATATAGACAGTATCTGAT			
5	ATCAGATACTGTCTATATGATCTGTAACTCCAGCAGTGAG			

Figura 13. Top 5 aptámeros seleccionados a partir del análisis de los resultados de NGS. Secuencia lineal, estructuras 2D y 3D, y predicción de motivos de los aptámeros más representativos aislados del ensayo SELEX contra proteínas desconocidas obtenidas de muestras de suero de pacientes con enfermedad de Chagas.

Fuente: Tomado sin modificaciones de: Morales M, *et al.* Identification of the ATPase alpha subunit of *Trypanosoma cruzi* as a potential biomarker for the diagnosis of Chagas disease. 2023.

Objetivo 2

7.3. Aislamiento de las proteínas

Se sintetizó el aptámero más representativo, al cual nombramos CH1, y se le acopló una biotina en el extremo 5' (CH1b). Luego, el CH1b se unió a perlas magnéticas mediante estreptavidina, formando así el complejo perlas magnéticas → Estreptavidina → Biotina → Aptámero CH1. A continuación, se mezclaron las proteínas totales de las muestras de suero con el complejo para aislar el biomarcador reconocido por CH1b.

Tras la incubación y tres lavados, se realizaron geles de poliacrilamida SDS-PAGE y se tiñeron para visualizar los biomarcadores aislados (Figura 14). Se observó un patrón de banda alrededor de 70 kDa en el grupo 3, mientras que en el grupo 4 se detectaron varias bandas, marcadas dentro de un rectángulo negro llamado B1, las cuales fueron enviadas para su identificación mediante LC-MS/MS (Figura 14B). En el grupo 1, no se observaron bandas, y en el grupo 2 se detectó una banda débil.

Al analizar las muestras de suero individuales, se observó un patrón de banda similar alrededor de 70 kDa en los pacientes con EC (1 a 5) (Figura 14C). La muestra

de suero de un individuo denominado NG1 reveló una banda débil alrededor de 70 kDa, mientras que las demás muestras de suero de individuos negativos (NG2-NG4) no mostraron ninguna banda. La banda observada en la muestra de suero del paciente confirmado con EC, denominada EC1 y resaltada dentro de un rectángulo negro llamado B2, fue enviada para su identificación mediante LC-MS/MS (Figura 14C).

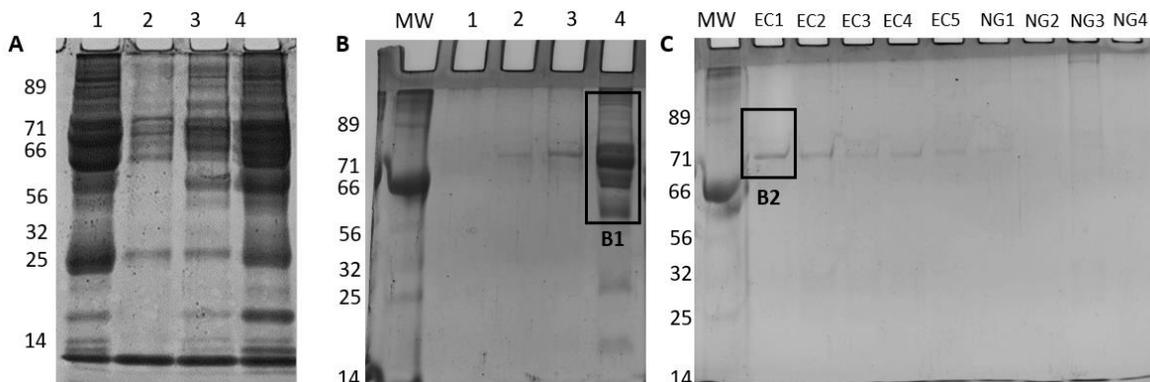


Figura 14. Aislamiento de biomarcadores mediante pull-down utilizando aptámero CH1. A) Extractos de proteínas totales de muestras de suero de los Grupos 1, 2, 3, 4. B) Aptámero CH1 acoplado a perlas magnéticas con estreptavidina en contacto con proteínas aisladas del grupo 1, 2, 3, 4. C) Proteínas aisladas con aptámero CH1 de muestras de suero individuales. Muestras de suero individuales EC1, EC2, EC3, EC4 y EC5 con confirmación de EC, muestras de suero individuales NG1, NG2, NG3, NG4 sin confirmación de EC. Los recuadros negros B1 y B2 muestran muestras extraídas y enviadas para su identificación empleando LC-MS/MS.

Fuente: Tomado sin modificaciones de: Morales M, *et al.* *Identification of the ATPase alpha subunit of Trypanosoma cruzi as a potential biomarker for the diagnosis of Chagas disease.* 2023.

Objetivo 3

7.4. Identificación de proteínas reconocidas por CH1

Los resultados de la espectrometría de masas mostraron un total de 161 proteínas humanas y dos proteínas de *T. cruzi* en B1 (proteínas extraídas del suero de pacientes con EC), así como 77 proteínas humanas y ocho proteínas de *T. cruzi* en B2 (suero de pacientes con EC). De estas, 28 proteínas humanas fueron identificadas tanto en B1 como en B2 (Tabla 2). Por otro lado, la subunidad alfa de la ATPasa (K2MV19) de *T. cruzi* fue la única proteína identificada en ambos grupos (B1 y B2) (Tabla 3).

Tabla 2. Proteínas humanas (28) identificadas tanto en el grupo de proteínas extraídas como en el grupo de muestras de suero de pacientes positivos.

ID proteína	Peso molecular [kDa]	Función biológica/molecular	Localización celular
P01009	46,736	Inhibidor serin proteasa	Extracelular
P01011	47,65	Inhibidor serin proteasa	Extracelular
P01019	53,11	Vasoconstrictor	Extracelular
P01024	187,15	Vía alterna del complemento	Extracelular
P01040	11,006	Inhibidor serin proteasa	Citoplasma
P01834	11,765	Respuesta inmune adaptativa	Membrana celular
P0DOX5	49,328	Respuesta inmune adaptativa	Membrana celular
P01871	49,439	Respuesta inmune adaptativa	Membrana celular
P01876	37,654	Respuesta inmune adaptativa	Membrana celular
P02649	36,102	Transporte y metabolismo de lípidos	Extracelular
P02746	26,721	Vía del complemento	Extracelular
P02790	51,676	Transporte grupo hemo	Extracelular
P06702	13,242	Regulación de procesos inflamatorios y respuesta inmune.	Citoplasma
P07358	67,046	Vía alterna del complemento	Extracelular

P10909	52,494	Chaperona	Extracelular
P13804	35,079	Transporte de electrones	Matriz mitocondrial
P14923	81,744	Adhesión celular	Unión celular, Unión adherente.
P15924	331,77	Adhesión celular	Unión celular, Desmosoma.
P29508	44,564	Inhibidor serin proteasa	Citoplasma
Q86SG5	11,305	Unión iones de calcio	Citoplasma
P31944	27,679	Proteasa e hidrolasa	Citoplasma
P61626	16,537	Enzima bacteriolítica	Extracelular
P81605	11,284	Actividad bacteriolítica	Extracelular
Q02413	113,75	Adhesión celular	Membrana celular
P38646	67,859	Chaperona	Mitocondria
Q13085	265,55	Metabolismo y biosíntesis de lípidos	Citoplasma
Q8N6T7	39,118	Reparación daño ADN	Núcleo
Q9NZT1	15,892	Unión iones de calcio	Extracelular

Fuente: Tomado sin modificaciones de: Morales M, *et al. Identification of the ATPase alpha subunit of Trypanosoma cruzi as a potential biomarker for the diagnosis of Chagas disease.* 2023.

Tabla 3. Proteínas de *T. cruzi* (9) identificadas a partir de proteínas extraídas y muestras de suero de pacientes con EC.

ID	ID proteína	Peso molecular [kDa]	Función biológica/molecular	Localización celular
B1	K2MV19	58,542	Actividad de la ATP sintasa transportadora de protones, mecanismo de rotación	Complejo ATP sintasa transportador de protones, núcleo catalítico F(1)
	K2MN00	52,291	No caracterizada	No caracterizada
B2	V5BEU9	57,121	No caracterizada	No caracterizada
	K2MV19	58,542	Actividad de la ATP sintasa transportadora de protones, mecanismo de rotación	Complejo ATP sintasa transportador de protones, núcleo catalítico F(1)
	V5BL31	52,242	Unión de ATP y actividad de hidrólisis de ATP.	No caracterizada
	Q4D7V0	26,161	Unión de ATP y actividad de hidrólisis de ATP.	Membrana
	K2MSY3	71,981	Unión de GTP y actividad GTPasa	No caracterizada
	A0A2V2XB66	48,754	No caracterizada	No caracterizada
	A0A7J6Y9P5	31,276	interacciones proteína-proteína	No caracterizada
	K2NAQ7	35,235	No caracterizada	No caracterizada
B1 and B2	K2MV19	58,542	Actividad de la ATP sintasa transportadora de protones, mecanismo de rotación	Complejo ATP sintasa transportador de protones, núcleo catalítico F(1)

Fuente: Tomado sin modificaciones de: Morales M, *et al.* Identification of the ATPase alpha subunit of *Trypanosoma cruzi* as a potential biomarker for the diagnosis of Chagas disease. 2023.

7.5. Análisis bioinformático de proteínas aisladas

Se realizó una búsqueda exhaustiva en la literatura para identificar una relación entre las proteínas humanas encontradas en los resultados de LC-MS/MS y su posible participación en la fisiopatología de la EC. Por otro lado, se caracterizaron las proteínas pertenecientes al parásito *T. cruzi* en busca de dominios y motivos, y se alinearon con múltiples secuencias de diferentes organismos para evaluar su

grado de conservación en comparación con proteínas heterólogas (Figura 15A, 15B).

En la Figura 15A se presenta el esquema de la estructura primaria de la subunidad alfa de ATPasa, mostrando claramente su dominio de unión a nucleótidos y el dominio perteneciente a la familia de las ATP sintasas, así como la ubicación de una región crítica para su función. Es relevante destacar que, aparentemente, el aptámero no se une a ninguno de estos sitios activos de la proteína.

Se ha identificado similitud en la secuencia de la proteína de la subunidad alfa de ATPasa de *T. cruzi* con otros organismos, como *Leishmania donovani* (89,6%), *Thermotoga* (49,05%), *Homo sapiens* (52,26%), *Mus musculus* (52,26%) y *Glycine max* (49,38%). Específicamente, el alto porcentaje de similitud (89,6%) en la secuencia proteica con *Leishmania donovani* podría estar relacionado con la pequeña banda observada en el extracto de proteínas de sueros de pacientes con leishmaniasis, unidas al aptámero CH1, como se muestra en el carril 2 de la Figura 15B.

Objetivo 4

7.6. Docking molecular (MD) de la subunidad alfa de ATPasa-CH1

Se seleccionó el mejor modelo (Rank 1) obtenido de PyDockDNA, el cual presentaba los porcentajes más bajos de restricciones, energía de unión electrostática y desolvación, así como las orientaciones de acoplamiento más precisas (Figura 15C). En este experimento de MD, se identificaron cinco aminoácidos críticos (Phe5, Arg249, Lys459, Ala245 y Arg576) que interactúan con el aptámero CH1 de la proteína subunidad alfa de la ATPasa, así como cuatro nucleótidos esenciales (C2, C8, T10 y C29) necesarios para la interacción con la proteína (Figura 15D).

7.7. Análisis de interacciones entre Tc ATPasa subunidad alfa y el aptámero CH1

El coloreado de superficie coulombica muestra el potencial electrostático de la proteína, revelando una distribución de cargas altamente positivas en la región más cercana al contacto con el aptámero. Esto sugiere la importancia de las interacciones entre las cargas de los aminoácidos y nucleótidos para la unión proteína-aptámero (Figura 15C). Además, en la Figura 15D se presentan los posibles contactos nucleótido-aminoácido encontrados mediante el uso del software Chimera, los cuales se detallan en la Tabla 4.

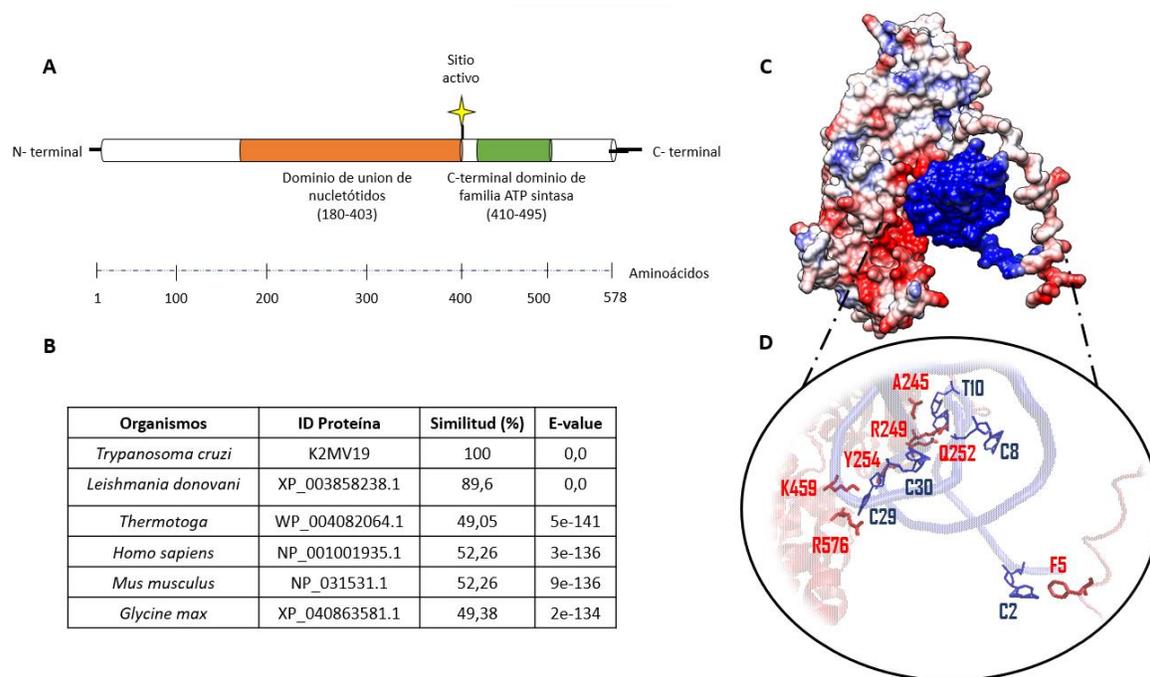


Figura 15. Análisis bioinformático de biomarcadores aislados. A) Estructura primaria de la subunidad alfa de la ATPasa de *T. cruzi*. B) Top 5 de proteínas heterólogas identificadas por alineación múltiple C) Representación gráfica de la mejor interacción entre la subunidad alfa de la ATPasa y el aptámero CH1 usando el software PyDockDNA D) Representación de las interacciones identificadas entre los nucleótidos del aptámero CH1 y los aminoácidos de la ATPasa Proteína de la subunidad alfa.

Fuente: Tomado sin modificaciones de: Morales M, *et al.* Identification of the ATPase alpha subunit of *Trypanosoma cruzi* as a potential biomarker for the diagnosis of Chagas disease. 2023.

Tabla 4. Aminoácidos y nucleótidos involucrados en la interacción entre la subunidad alfa de la ATPasa de *T. cruzi* y el aptámero CH1.

Subunidad alfa de la ATPasa	Aptámero CH1	Superposición	Distancia
Arg249	T10	1.465	2.175
Lys459	C29	1.445	1.835
Ala245	T10	1.445	2.315
Arg249	C8	1.210	2.530
Lys459	C29	1.157	2.093
Arg576	C29	1.141	2.379
Arg576	C29	1.134	2.386

Arg576	C29	1.090	2.430
Lys459	C29	1.053	2.347
Arg249	T10	1.026	2.734
Lys459	C29	1.026	2.494
Phe5	C2	0.931	2.469
Arg249	C8	0.916	2.794
Gln252	T10	0.886	2.414
Ala245	T10	0.833	2.927
Arg249	T10	0.812	2.678
Ala245	T10	0.803	2.957
Phe5	C2	0.777	2.623
Tyr254	C29	0.719	2.841
Ala245	T10	0.718	3.042
Arg249	C8	0.709	3.031
Ala245	T10	0.690	2.650
Arg249	C8	0.682	1.978
Arg249	T10	0.660	2.980
Arg576	C29	0.642	2.878
Arg249	T10	0.626	2.774
Arg249	C30	0.624	2.896

Fuente: Tomado sin modificaciones de: Morales M, *et al. Identification of the ATPase alpha subunit of Trypanosoma cruzi as a potential biomarker for the diagnosis of Chagas disease.* 2023.

8. Discusión

En este estudio, se llevó a cabo la estrategia de Bio-SELEX para obtener aptámeros con la capacidad de identificar posibles biomarcadores en muestras de suero de pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas en fase crónica. El diagnóstico de la enfermedad en esta etapa representa un desafío significativo que requiere enfoques diferentes para controlar adecuadamente su transmisión.

Después de realizar la estrategia de SELEX, se identificó el aptámero CH1 como una molécula de captura potencial de nuevos biomarcadores para la enfermedad de Chagas en fase crónica.

El aptámero CH1 interesantemente cuenta con un alto contenido de pares G-C, que representa el 72,5% de su secuencia, sin la presencia de bases de adenina. Además, su estructura tridimensional contiene un nudo poco común en la secuencia. Si bien estructuras más complejas como horquillas, pseudonudos y G-cuádruplex ofrecen una mayor estabilidad a los aptámeros, lo que los hace más prometedores para futuras aplicaciones. El motivo predicho del aptámero CH1, CCCTCT, se ha asociado previamente con la formación de ADN de triple hélice (H-DNA) (138), lo que representa un área prometedora para investigaciones futuras.

Utilizando el aptámero CH1 y la técnica de Pull-Down, llevamos a cabo el aislamiento de los potenciales biomarcadores presentes en los sueros de los pacientes con EC. Mediante el uso de LC-MS/MS, se logró identificar completamente los biomarcadores candidatos, detectando un total de 166 proteínas humanas en la banda B2 (muestras de suero de pacientes con EC) y 77 proteínas humanas en la banda B1 (extractos de proteínas de las muestras de suero). Entre estas proteínas identificadas, se encontraban la albúmina, factores de coagulación y anticuerpos, que son componentes comúnmente presentes en el suero de pacientes sanos.

De todas las proteínas identificadas, solo 28 se encontraron en ambos grupos (B1 y B2). Estas proteínas son conocidas por tener un impacto significativo en la fisiopatología de la EC. Algunas proteínas como la alfa-1-antitripsina (AAT), la alfa-1-antiquimotripsina y SERPIN B3 son cruciales en la regulación de la actividad de enzimas durante la inflamación y la remodelación de tejidos. En el contexto de las interacciones huésped-patógeno, estas proteínas pueden inhibir las proteasas de cisteína liberadas por el parásito durante los procesos infecciosos. Sin embargo, el aumento de los niveles de estas proteínas puede llevar a una mayor inflamación, daño tisular y, en última instancia, aumentar el riesgo de problemas cardiovasculares asociados con la enfermedad (139-141).

Por otro lado, los componentes del complemento, como se encontró en este estudio C3, C8, C1q y la subunidad B del componente C1 (C1QB), son partes esenciales de la respuesta inmunitaria innata humana en el reconocimiento y eliminación de

patógenos. En la EC, el sistema del complemento es un mecanismo de defensa importante y puede eliminar directamente a los parásitos y favorecer su eliminación mediante la acción de las células fagocíticas. Los tripomastigotes sanguíneos son resistentes al complemento debido a la producción regulada en su desarrollo de glicoproteínas de superficie, que restringen la activación del complemento en el nivel de la formación de la convertasa de C3. Como resultado, los parásitos pueden escapar de la lisis por parte del sistema del complemento del huésped (142). Este mecanismo de evasión es crucial en la cronicidad de la EC. Se ha informado que en ratones con deficiencia inducida de factores del complemento e infectados con *T. cruzi*, se observó una exacerbación de la infección debido a un incremento significativo en la carga parasitaria, lo que resultó en una mayor mortalidad en comparación con los ratones en los que no se indujo deficiencia del complemento (143). Sin embargo, otro estudio encontró que en los tejidos miocárdicos, los parásitos de *T. cruzi* se asociaron con una mayor activación del complemento (144). Se necesita comprender mejor en qué medida la activación del complemento durante la EC afecta la evolución de la infección.

En este estudio se identificaron varios tipos de inmunoglobulinas. Los anticuerpos IgG pueden encontrarse en diferentes etapas de la infección y durante toda la presentación clínica de la enfermedad. Mientras tanto, los anticuerpos IgA se detectan típicamente en la forma digestiva de las fases crónica y aguda de la EC, junto con los anticuerpos IgM (145).

Además, la apolipoproteína E (ApoE) es una proteína que desempeña un papel crucial en el transporte y metabolismo de lípidos (grasas) en el organismo. Se sintetiza principalmente en el hígado y se encuentra en diferentes tejidos, incluido el cerebro. Estudios han demostrado que los ratones deficientes en ApoE son propensos a desarrollar aterosclerosis, fenómeno que también se observa en animales infectados con *T. cruzi*. Para investigar aún más el papel de ApoE en esta enfermedad, se infectaron ratones *knockout* con dos cepas de *T. cruzi*. Después de cuatro semanas, se observó la producción y migración de células proinflamatorias hacia las células cardíacas, lo que indica que ApoE puede desempeñar un papel antiaterosclerótico significativo en ratones, especialmente durante la fase aguda de la enfermedad (146).

La hemopexina es una proteína que se une y transporta hemo, una molécula liberada durante la degradación de la hemoglobina. La hemopexina desempeña un papel vital en la prevención de los efectos tóxicos del hemo libre al transportarlo al hígado para su degradación. Normalmente, el complejo hemo-hemopexina es captado y eliminado por los macrófagos. Sin embargo, también puede representar una fuente crucial de hierro para ciertos agentes infecciosos, como *T. cruzi*. El hierro es fundamental para el crecimiento, diferenciación e invasión del parásito (Dick *et*

al., 2022). Por lo tanto, *T. cruzi* puede aprovechar el complejo hemopexina-hemo como fuente de hierro, promoviendo su diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes, potenciando su virulencia y contribuyendo al mantenimiento y progresión de la EC, favoreciendo un aumento del estrés oxidativo y la inflamación (147).

S100-A9, también conocida como calgranulina B, la proteína S100-A7A, también conocida como psoriasina, y la calmodulina son proteínas que se unen al calcio y desempeñan roles esenciales en la regulación de diversos procesos celulares. Estas proteínas están implicadas en varias enfermedades inflamatorias e infecciosas debido a su papel en la regulación del sistema inmunológico y su capacidad para promover el reclutamiento de células inmunes hacia los sitios de infección y la captación de metales como el hierro o el zinc (148). Se ha detectado la presencia de la proteína S100A9 en tejido cardíaco durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi* en ratones, lo que indica su importancia en la migración y reclutamiento de células inmunes para combatir la enfermedad (149). La calmodulina es crucial en la activación del factor de transcripción NFATc1 (factor nuclear de células T activadas 1), un factor esencial en la respuesta inmune contra el parásito (150).

El sistema renina-angiotensina (SRA) es un sistema hormonal que regula la presión arterial, el equilibrio de líquidos y la homeostasis de electrolitos en el cuerpo. El SRA comprende diversos componentes, incluyendo la renina, el angiotensinógeno (una proteína producida por el hígado), la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y la angiotensina II (un potente vasoconstrictor) (151). Cuando la presión arterial o el volumen disminuyen, se activa el SRA y se libera renina desde los riñones. La renina convierte el angiotensinógeno en angiotensina I, que luego se convierte en angiotensina II por medio de la ECA (151). El SRA tiene un impacto significativo en procesos fisiológicos como la inflamación, el estrés oxidativo y la fibrosis (151). La desregulación del SRA ha sido implicada en la patogénesis de varias enfermedades cardiovasculares, incluyendo la EC (152). Además, la angiotensina II regula la respuesta inmune a través de mecanismos dependientes del calcio estimulados por la calmodulina y juega un papel en el proceso inflamatorio (152). Los fármacos que inhiben el SRA, como los inhibidores de la ECA, los bloqueadores de los receptores de angiotensina II (BRA) y los inhibidores de la renina, se utilizan comúnmente para tratar la hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares (153). Recientemente, se ha estudiado el uso de inhibidores del SRA y beta-bloqueantes para el tratamiento de la CCC, con resultados prometedores (154, 155). Se ha informado sobre la posible aplicación de la detección de ACE2 para el diagnóstico de la EC y se ha explicado cómo la combinación de la actividad de ACE2 y los niveles de NTproBNP pueden representar alternativas importantes para predecir la insuficiencia cardíaca en pacientes con la enfermedad (156).

La lisozima C y la dermcidina son dos proteínas que presentan actividad bacteriolítica y antimicrobiana. La lisozima C se expresa en el intestino de dos de los principales vectores de la EC, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans*, lo que sugiere su posible papel en la respuesta inmune del vector (157). Sin embargo, no se ha informado sobre la actividad de la lisozima C en humanos durante la EC. Pierce y Kurata reportan la actividad de varios péptidos y proteínas antimicrobianas, incluyendo la dermcidina, la lisozima C, S100A7 (psoriasina) y S100A8/A9 (calprotectina), contra diferentes tipos de infecciones (158). También se encontró que la cistatina se encuentra aumentada tras la infección por *T. cruzi* en el intestino medio de *T. infestans*, lo que sugiere su participación en la respuesta inmune contra la infección en los vectores, principalmente mediante la inhibición de la cruzipaina (159). Estos hallazgos proporcionan evidencia potencial de que estas proteínas identificadas en nuestro estudio podrían desempeñar un papel esencial en la respuesta inmune contra la infección por *T. cruzi*.

La familia de proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70) es un conjunto de chaperonas moleculares conservadas que desempeñan un papel crucial en la regulación de la proteostasis celular (160). En el contexto de la EC, se llevó a cabo un estudio con el objetivo de investigar si la HSP70 podría ser un objetivo de la respuesta inmune humoral durante la infección por *T. cruzi* y si la autoinmunidad hacia la HSP70 podría contribuir al desarrollo de la EC. Los resultados obtenidos revelaron que, aunque la HSP70 es un antígeno polipeptídico importante en la enfermedad, los anticuerpos dirigidos contra la HSP70 de *T. cruzi* no reaccionan de manera cruzada contra la HSP70 humana, a pesar de que estas proteínas comparten un alto grado de similitud en su secuencia de aminoácidos. Estos hallazgos sugieren que el sistema inmunológico es capaz de mantener la autotolerancia hacia la HSP70 durante la infección crónica por *T. cruzi*, y que es poco probable que la autoinmunidad humoral dirigida contra la HSP70 esté involucrada en la patogénesis de la EC (161).

Se ha demostrado que HSP70 es fundamental para la supervivencia y proliferación del parásito *T. cruzi*, ya que la sobreexpresión de esta proteína en la forma infectiva del parásito resulta en un aumento repentino de la parasitemia. Estos hallazgos resaltan el papel crucial que desempeñan las HSP en la biología de los kinetoplastos y sugieren que pueden ser objetivos valiosos para el desarrollo de nuevas terapias contra estos parásitos (162). Sin embargo, no se ha informado sobre la expresión de HSP70 humana durante la infección, lo que indica que la HSP70 identificada en estos estudios puede ser la HSP70 del parásito *T. cruzi*.

La familia de proteínas de sirtuinas en humanos, que consta de SIRT1-SIRT7, es conocida por su alto grado de conservación estructural y funcional. Estas proteínas se expresan de forma ubicua en varios órganos, incluyendo la sangre, el cerebro, el

corazón, el riñón, el pulmón, el hígado, el ovario, el músculo esquelético, el bazo y los testículos, con niveles de expresión variables dependiendo del órgano específico. Es importante destacar que SIRT1, SIRT6 y SIRT7 se localizan principalmente en el compartimento nuclear y se ha descubierto que modulan la expresión génica a través de interacciones con factores de transcripción, co-factores o histonas (163).

SIRT6 es una proteína altamente conservada que participa en la homeostasis de los telómeros, la reparación del ADN, el metabolismo de los lípidos y el mantenimiento de la glucosa en sangre, lo que la convierte en un regulador clave de las enfermedades relacionadas con la edad. Además, SIRT6 desempeña un papel crucial en la regulación de la hipertrofia cardíaca, la inflamación y el estrés oxidativo, contribuyendo a diversas enfermedades cardiovasculares, incluyendo la enfermedad coronaria y la insuficiencia cardíaca. Estudios han demostrado que SIRT6 protege contra la cardiomiopatía isquémica, la hipertrofia miocárdica patológica, la remodelación cardíaca y la insuficiencia cardíaca. Dadas sus diversas funciones, SIRT6 podría ofrecer un enfoque novedoso para el tratamiento de la EC. Aún queda por determinar si SIRT6 desempeña un papel en la infección por *T. cruzi* (164).

En este estudio, identificamos dos proteínas de *T. cruzi* en el extracto de proteínas de pacientes con EC en la fase crónica y ocho proteínas de *T. cruzi* en el suero de pacientes con EC. Curiosamente, solo una de estas proteínas fue identificada en ambos grupos, la subunidad alfa de la ATPasa. Aunque su función aún no está completamente caracterizada experimentalmente, podemos especular sobre su posible papel en la síntesis de ATP u otros procesos celulares. Interesantemente, la ATPasa más caracterizada en *T. cruzi* es la Na⁺, K⁺-ATPasa, crucial para mantener la homeostasis iónica y regular el volumen celular (165). Esta proteína se encuentra en la membrana plasmática y bombea activamente iones a través de la membrana en contra de sus gradientes de concentración. Es esencial para la supervivencia y virulencia de *T. cruzi*, lo que la convierte en un objetivo atractivo para el desarrollo de fármacos (165).

Caruso-Neves *et al.* en 1999 fueron los primeros en proporcionar evidencia de una Na⁺-ATPasa en un parásito tripanosomátido. Descubrieron que el compuesto Ouabaína, un inhibidor específico de la (Na⁺ + K⁺)-ATPasa, no inhibía por completo la actividad de la ATPasa estimulada por Na⁺ en epimastigotes de *T. cruzi*, lo que indica que este parásito tiene una Na⁺-ATPasa insensible a la Ouabaína (166, 167). El gen responsable de la Na⁺-ATPasa en *T. cruzi*, TcENA, recibió su nombre debido a su similitud con el gen ENA en plantas y hongos, que es responsable de la Na⁺-ATPasa (ENA del término latino "exitus natru": que significa la salida de sodio) (166).

Las ATPasas desempeñan un papel crucial en el mantenimiento del potencial de la membrana plasmática, el cual está determinado por la distribución asimétrica de cargas cuando se establecen gradientes de concentración de H⁺, Na⁺, K⁺ y Cl⁻ en condiciones estables. En las formas de tripomastigotes, el potencial de la membrana plasmática está influenciado significativamente por las concentraciones extracelulares de Na⁺ y K⁺ (167). Los tripomastigotes tienen una alta actividad de Na⁺-ATPasa que contribuye significativamente a la generación del potencial de la membrana plasmática, lo cual contrasta con lo evidenciado en las formas de amastigotes. El gradiente de Na⁺ en las formas de amastigotes no afecta el potencial de la membrana plasmática (166). Los niveles de transcripción de TcENA varían en las diferentes formas evolutivas del parásito, con formas de tripomastigotes y epimastigotes que tienen una mayor expresión de TcENA que las formas de amastigotes (166). La adición de diferentes concentraciones de NaCl a una suspensión de epimastigotes inicialmente en medio NMG libre de Na⁺ resultó en una despolarización inmediata y pronunciada, lo cual es consistente con la observación de que el Na⁺ estimula significativamente la actividad de la ATPasa en células que expresan TcENA de manera dependiente de la dosis (167).

Las ATPasas tipo P ENA y ATP4 de los parásitos protozoarios, originalmente descritas como Ca²⁺-ATPasas debido a su similitud con las Ca²⁺-ATPasas del retículo endoplásmico (SERCA), desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de niveles bajos de Na⁺ en el citosol. Estas bombas de transporte están ausentes en los mamíferos, lo que las convierte en objetivos terapéuticos prometedores (165, 168). En consecuencia, en distintas etapas del ciclo de vida de los protozoarios, incluyendo no solo *T. cruzi*, la sensibilidad a fármacos dirigidos a la Na⁺-ATPasa puede variar, ofreciendo oportunidades para el desarrollo de estrategias terapéuticas específicas.

Se ha identificado otro tipo de ATPasas en los tripanosomátidos. la ATP sintasa, también conocida como F1/Fo ATPasa. Esta enzima transmembranal desempeña un papel fundamental al conectar el transporte de electrones y la síntesis de ATP, es decir, la fosforilación oxidativa en la respiración celular (169).

Al comparar los genomas de *Trypanosoma* (*T. brucei*, *T. cruzi*, *L. major*), se ha observado una notable conservación tanto en la disposición de los genes como en su conjunto dentro de los centros cromosomales (170). A pesar de haber divergido tempranamente, estos tripanosomátidos presentan una marcada colinealidad en sus genomas, lo que sugiere restricciones selectivas y una fuerte estructura genómica compartida (171). Esta conservación en la secuencia de los genes indica que los pares de genes altamente conservados desempeñan un papel crítico en la regulación funcional y transcripcional (171). Esto, a su vez, insinúa una estrecha

relación filogenética y posibles similitudes en la composición de componentes clave, como la ATP sintasa, entre estos microorganismos.

En un estudio realizado por Zíková A, et al. en el 2009 que se centró en comprender la composición de la ATP sintasa en *T. brucei* mediante análisis bioquímicos, se identificó como un complejo enzimático compuesto por 22 subunidades. Entre estas subunidades, las α , β , γ , δ , ϵ , c, b y OSCP se mantienen conservadas. Al silenciar genéticamente la subunidad α mediante la técnica del RNAi, se observó la disociación del complejo, lo que resultó en la liberación del dominio F1. Por lo tanto, concluyeron que esta proteína desempeña un papel esencial en la organización estructural del complejo y, en última instancia, en la generación de energía celular (169).

Dada esta conservación en las unidades que conforman el complejo de la ATP sintasa en los tripanosomátidos, cabe considerar que esta proteína podría ser el blanco de reconocimiento por el aptámero CH1 en suero de pacientes con leishmaniasis.

Investigadores han identificado los TESA como una posible herramienta de diagnóstico tanto para la fase aguda como crónica de la enfermedad. En dos estudios separados, Bautista-lópez *et al.* (172) y Brossas *et al.* (173), utilizaron espectrometría de masas para identificar proteínas pertenecientes a la familia de las ATPasas como posibles biomarcadores.

El enfoque de Bio-SELEX ha permitido la identificación directa de la subunidad alfa de la ATPasa mediante el uso de sueros de pacientes con EC en fase crónica, evitando así los métodos convencionales de cultivo celular que implican una extensa extracción y secuenciación de proteínas. Este descubrimiento amplía nuestra comprensión de la compleja maquinaria involucrada en la síntesis de ATP y el metabolismo celular en *T. cruzi*. Sin embargo, aún se requiere investigación adicional para una caracterización completa de la función de la familia de ATPasas y su contribución a la energética celular y la supervivencia del parásito. Estos estudios futuros ayudarán a revelar los mecanismos subyacentes y proporcionarán una visión más completa de la biología de *T. cruzi* y su interacción con el huésped.

9. Conclusiones

Mediante la estrategia de Bio-SELEX, identificamos con éxito proteínas de *T. cruzi* en muestras biológicas de pacientes con Enfermedad de Chagas en fase crónica. Por lo que, la estrategia Bio-SELEX se ha revelado como una prometedora herramienta para identificar biomarcadores en diversas enfermedades infecciosas.

El aptámero CH1 ha sido especialmente diseñado para detectar de manera precisa este biomarcador en muestras de suero. Este hallazgo ha demostrado la existencia de un nuevo biomarcador potencialmente útil para el diagnóstico de la enfermedad en esta etapa, lo que permitirá mejorar la precisión del diagnóstico de la EC.

La combinación del aptámero CH1 con la subunidad alfa de la ATPasa de *T. cruzi* abre la posibilidad de fabricar pruebas de diagnóstico efectivas que puedan ser implementadas en el campo. Esto permitirá determinar con mayor exactitud la prevalencia de la fase crónica de la EC y facilitará un control más rápido y efectivo de esta enfermedad.

Limitaciones del estudio

Se debe destacar el tamaño relativamente pequeño de la muestra utilizada en este estudio. A pesar de nuestros esfuerzos por seleccionar muestras representativas de pacientes con Enfermedad de Chagas, así como de individuos sanos y con leishmaniasis como grupos de control, la cantidad de muestras podría considerarse limitada en relación con la variabilidad inherente a una enfermedad de baja prevalencia como la enfermedad de Chagas.

Adicionalmente, aunque se buscó que las muestras de control, correspondientes a individuos sanos, no tuvieran enfermedades subyacentes detectables, debemos reconocer la posibilidad de que algunos participantes de este grupo presentaran condiciones médicas no diagnosticadas que pudieran influir en los resultados.

Finalmente, es crucial recordar que este estudio puede considerarse una fase inicial de investigación, y la validación adicional en una población más amplia y diversa sería necesaria antes de que el biomarcador propuesto pueda considerarse como una herramienta de diagnóstico clínico sólido.

Perspectivas

1. Caracterizar la función de la proteína de forma experimental para lograr entender a mayor profundidad su papel en la supervivencia y virulencia del parásito.
2. Optimizar la afinidad y especificidad del aptámero mediante la caracterización detallada de las modificaciones en la región CH1 que puedan mejorar la unión con la subunidad alfa de la ATPasa de *T. cruzi*, con el objetivo de desarrollar un aptámero con alto potencial diagnóstico para la enfermedad de Chagas en fase crónica.
3. Ampliar y fortalecer la validez clínica del aptámero y el biomarcador desarrollados en este estudio mediante la evaluación en un conjunto más extenso de muestras de pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica, con el objetivo de validar su utilidad como herramienta diagnóstica.
4. Explorar y comparar diferentes formatos de pruebas diagnósticas, como ELISA, Western Blot, pruebas de flujo lateral, apta-fluorescencia y apto-precipitación, entre otros, con el propósito de identificar el enfoque más efectivo y sensible para la detección precisa del biomarcador en pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica.

Participación en eventos de divulgación

- Presentación oral del proyecto en el simposio “Ómicas y biomarcadores asociados a la enfermedad de Chagas y leishmaniasis” llevado a cabo en la “VIII Reunión Colombiana Leishmaniasis y enfermedad de Chagas” llevada a cabo en la ciudad Bucaramanga, Colombia el 17 y 18 de agosto del 2023.
- Presentación de póster en el 21° Congreso Internacional CNB. Colegio Nacional de Bacteriólogos. Llevada a cabo en la ciudad de Medellín, Colombia el 13 y 14 de octubre del 2023.

Artículos científicos

- Artículo de revisión publicado el 5 de octubre del 2023 en la revista “Parasite Immunology”, titulado “Biomarkers for the diagnosis, treatment follow-up, and prediction of cardiac complications in Chagas disease in chronic”. (DOI: 10.1111/pim.13013)
- Artículo publicado el 10 de septiembre del 2023 en la revista “Biomarkers” por “Taylor & Francis Group” titulado “Identification of the ATPase alpha subunit of *Trypanosoma cruzi* as a potential biomarker for the diagnosis of Chagas disease.” (DOI: 10.1080/1354750X.2023.2255756)

Financiación

- El proyecto contó con la financiación de la Universidad CES con el convenio N° INV.022021.024 y del Banco de la República con el convenio N° 5.083.

Referencias bibliográficas

1. Porrás AI, Yadon ZE, Altcheh J, Britto C, Chaves GC, Flevaud L, et al. Target product profile (TPP) for Chagas disease point-of-care diagnosis and assessment of response to treatment. *PLoS neglected tropical diseases*. 2015;9(6):e0003697.
2. Mougabure-Cueto G, Picollo MI. Insecticide resistance in vector Chagas disease: evolution, mechanisms and management. *J Acta Tropica*. 2015;149:70-85.
3. Rovid A. Enfermedad de Chagas. The Center for Food Security Public Health Iowa State University of Science Technology, USA. 2009.
4. Enfermedad de Chagas: Memorias ILADIBA: Educación en salud.: Ministerio de Salud y Protección Social - Federación Médica Colombiana; 2013 [cited 2022 22 de marzo]. Available from: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/TH/Memorias_chagas.pdf.
5. Informe técnico entomológico de la enfermedad de chagas, Colombia, 2019: Instituto Nacional de Salud; 2019 [cited 2022 12 de abril].
6. Cucunubá ZM, Valencia-Hernández CA, Puerta CJ, Sosa-Estani S, Torrico F, Cortés JA, et al. Primer consenso colombiano sobre Chagas congénito y orientación clínica a mujeres en edad fértil con diagnóstico de Chagas. *J Infectio*. 2014;18(2):50-65.
7. Patterson JS, Guhl F. Geographical distribution of Chagas disease. *American Trypanosomiasis*: Elsevier; 2010. p. 83-114.
8. Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A. Actualización en enfermedad de Chagas. *J Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2016;34(2):132-8.
9. Enfermedad de Chagas: Brotes de transmisión oral en Colombia 2019. Instituto Nacional de Salud; 2019. p. 29.
10. LINEAMIENTOS PARA LA CONMEMORACION DEL DIA MUNDIAL DE ENFERMEDAD DE CHAGAS 2022: Ministerio de Salud y Protección Social; 2022 [Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ET/lineamiento-conmemoracion-dia-enfermedad-chagas-2022.pdf>].
11. Pérez Yanez LM, Gutiérrez López A, Rodríguez Blanco S, Gil Sarduy A. Enfermedad de Chagas. Amenaza en sombras para los corazones de la América Latina. *J Revista Cubana de Medicina*. 2017;56(1):50-68.
12. GUÍA PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DEL Trypanosoma cruzi. In: Salud INd, editor. www.ins.gov.co2017. p. 36.
13. Enfermedad de Chagas: Diagnóstico: Centro para el Contro y la Prevención de Enfermedades (CDC); 2022 [updated 6 de enero del 2022; cited 2022 23 de marzo]. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/hcp/diagnostico.html#:~:text=Durante%2>

[0la%20fase%20cr%C3%B3nica%2C%20los,de%20los%20anticuerpos%20del%20par%C3%A1sito.](#)

14. Sguassero Y, Roberts KN, Harvey GB, Comandé D, Ciapponi A, Cuesta CB, et al. Course of serological tests in treated subjects with chronic *Trypanosoma cruzi* infection: A systematic review and meta-analysis of individual participant data. *International Journal of Infectious Diseases*. 2018;73:93-101.
15. Sulleiro E, Muñoz-Calderon A, Schijman AG. Role of nucleic acid amplification assays in monitoring treatment response in chagas disease: Usefulness in clinical trials. *J Acta tropica*. 2019;199:105120.
16. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? Current opinion in HIV and AIDS. 2010;5(6):463-6.
17. Lock EA, Bonventre JV. Biomarkers in translation; past, present and future. *J Toxicology*. 2008;245(3):163-6.
18. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles-Environmental Health Criteria 155: World Health Organization; 1993 [
19. Arango V SS. Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana *J Revista Facultad Nacional de Salud Pública*. 2012;30:75-82.
20. Ndao M, Spithill TW, Caffrey R, Li H, Podust VN, Perichon R, et al. Identification of novel diagnostic serum biomarkers for Chagas' disease in asymptomatic subjects by mass spectrometric profiling. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(4):1139-49.
21. Hernández-Cuevas NA, Marín-Cervera A, Garcia-Polanco S, Martínez-Vega P, Rosado-Vallado M, Dumonteil E. Fibronectin degradation as biomarker for *Trypanosoma cruzi* infection and treatment monitoring in mice. *J Parasitology*. 2021;148(9):1067-73.
22. Juan Ospina MM-V, J.P. Barón-Vera, M.I. Osorio-Pulgarín, Miryan Sánchez. Biomarkers for the Diagnosis, Treatment Follow-Up, and Prediction of Cardiac Complications in Chagas Disease. *Recent. Authorea*. 2023.
23. Rodríguez Ramírez AM. Aplicaciones de la tecnología de aptámeros en los últimos 15 años. 2022.
24. Hernández FJ, Botero Hincapié JA. Aptámeros: agentes diagnósticos y terapéuticos. *J Iatreia*. 2012;25(2):159-68.
25. Ospina JD. Los aptámeros como novedosa herramienta diagnóstica y terapéutica y su potencial uso en parasitología. *J Biomédica*. 2020;40:148-66.
26. Ulrich H, Magdesian MH, Alves MJM, Colli W. In vitro selection of RNA aptamers that bind to cell adhesion receptors of *Trypanosoma cruzi* and inhibit cell invasion. *J Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(23):20756-62.
27. Nagarkatti R, Bist V, Sun S, Fortes de Araujo F, Nakhasi HL, Debrabant A. Development of an aptamer-based concentration method for the detection of *Trypanosoma cruzi* in blood. *Journal plos*. 2012.

28. Nagarkatti R, de Araujo FF, Gupta C, Debrabant AJPNTD. Aptamer based, non-PCR, non-serological detection of Chagas disease biomarkers in *Trypanosoma cruzi* infected mice. 2014;8(1):e2650.
29. Verástegui Pimentel MR, Mayer M, Luis P. Identificación de aptámeros que reconocen péptidos de *Trypanosoma cruzi*. 2018.
30. Muguercia C, Gabriela M. Diseño in silico de un aptámero de ARN con afinidad de unión a la proteína transialidasa de *Trypanosoma cruzi*. 2021.
31. Torres Courchoud I, Pérez Calvo J, editors. Biomarcadores y práctica clínica. Anales del Sistema Sanitario de Navarra; 2016: SciELO Espana.
32. Herrera L. Una revisión sobre reservorios de *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. J Boletín de Malariología y Salud Ambiental. 2010;50(1):3-15.
33. C U. Infeccion de *Rhodnius prolixus* (Stahl) por *Trypanosoma cruzi* y *Tripanosoma rangeli*. Bogotá. Editorial Minerva. 1929.
34. Corredor A, Santacruz M, Páez S, Guatame L. Distribución de los triatominos domiciliarios en Colombia. Bogotá: Instituto Nacional de Salud. 1990:1-144.
35. Protocolo para la vigilancia en salud pública de chagas: Instituto Nacional de Salud; 2020 [cited 2022 12 de abril]. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/Documents/Salud%20P%C3%BAblica/Ola%20invernal/Protocolo%20Chagas.pdf>.
36. Parra-Henao G, Vera MJ. Enfermedad de Chagas, logros y perspectivas en Colombia. Biomédica. 2022;42(2):213-7.
37. Zambrano P. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública - CHAGAS. Instituto Nacional de Salud; 2014. p. 1-28.
38. Guhi F. LA INICIATIVA ANDINA PARA EL CONTROL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS: SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA Y ACCIONES DE CONTROL EN LA REGIÓN COLOMBO-VENEZOLANA. 2006.
39. Bern C. Chagas' disease. J New England Journal of Medicine. 2015;373(5):456-66.
40. Peña-Callejas G, González J, Jiménez-Cortés JG, Fuentes-Vicente JAd, Salazar-Schettino PM, Bucio-Torres MI, et al. Chagas Disease: Biology and Transmission of *Trypanosoma cruzi*. TIP Revista especializada en ciencias químico-biológicas. 2022;25.
41. Aphasizhev R, Aphasizheva I. Mitochondrial RNA editing in trypanosomes: small RNAs in control. J Biochimie. 2014;100:125-31.
42. Souza WD. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. J Current pharmaceutical design. 2002;8(4):269-85.
43. Hannaert V, Bringaud F, Opperdoes FR, Michels PA. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. J Kinetoplastid biology disease. 2003;2(1):1-30.

44. Docampo R, Scott DA, Vercesi AE, Moreno SN. Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *J Biochemical Journal*. 1995;310(3):1005-12.
45. Rohloff P, Docampo R. A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *J Experimental parasitology*. 2008;118(1):17-24.
46. Batista CM, Kessler RL, Eger I, Soares MJ. *Trypanosoma cruzi* intracellular amastigotes isolated by nitrogen decompression are capable of endocytosis and cargo storage in reservosomes. *J PLoS One*. 2015;10(6):e0130165.
47. Pereira Á, Ríos MP. Tripanosomosis. Enfermedad de Chagas y enfermedad del sueño. *J Offarm: farmacia y sociedad*. 2003;22(2):104-11.
48. Chi B, Jafed T. Foto-inactivación del parásito *Trypanosoma cruzi* mediante el uso de luz visible: Tesis (MC)--Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad ...; 2021.
49. Hoare CA, Wallace FG. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *J Nature*. 1966;212(5068):1385-6.
50. Carrada-Bravo T. *Trypanosoma cruzi*. Natural history diagnosis of Chagas disease. . *J Rev Mex Patol Clin*. 2004;51(4):205-19.
51. Guhl F. Epidemiología molecular de *Trypanosoma cruzi*. *J Revista Española de Salud Publica*. 2013:1-8.
52. Prata A. Tripanosomiasis Americana (enfermedad de Chagas) En: Goldsmith R, Hayneman D. *J Parasitología y medicina tropical México DF: Manual Moderno*. 1995:346-59.
53. Muñoz C, Solari A, Apt W, Zulantay I. Caracterización de las Unidades Discretas de Tipificación de *Trypanosoma cruzi* según sus marcadores moleculares. *J Rev Ibero Latinoam Parasitol*. 2013;72:5-21.
54. Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira A, Veludo H, Da Silva FM, et al. 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*. 2009;136(6):641-55.
55. Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, Pinto CM, et al. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *J Acta tropica*. 2015;151:166-77.
56. Kramer S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. *J Molecular biochemical parasitology*. 2012;181(2):61-72.
57. Matthews KR, Tschudi C, Ullu E. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *J Genes development*. 1994;8(4):491-501.

58. Ullu E, Matthews K, Tschudi C. Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. *J Molecular cellular biology*. 1993;13(1):720-5.
59. Wahle E, Keller W. The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. *J Annual review of biochemistry*. 1992;61(1):419-38.
60. Simpson L, Shaw J. RNA editing and the mitochondrial cryptogenes of kinetoplastid protozoa. *J Cell*. 1989;57(3):355-66.
61. Vallejo GA, Suárez J, Olaya JL, Gutierrez SA, Carranza JC. *Trypanosoma rangeli*: un protozoo infectivo y no patógeno para el humano que contribuye al entendimiento de la transmisión vectorial y la infección por *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. *Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 2015.
62. Filigheddu MT, Górgolas M, Ramos JM. Enfermedad de Chagas de transmisión oral. *J Medicina clínica*. 2017;148(3):125-31.
63. Angheben A, Boix L, Buonfrate D, Gobbi F, Bisoffi Z, Pupella S, et al. Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *J Blood transfusion*. 2015;13(4):540.
64. González-Tomé MI, Rivera M, Camano I, Norman F, Flores-Chávez M, Rodríguez-Gómez L, et al. Recomendaciones para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de la embarazada y del niño con enfermedad de Chagas. *J Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2013;31(8):535-42.
65. Murillo-Godínez G. Enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). *Medicina interna de México*. 2018;34(6):959-70.
66. Bazurto NLP, Sánchez GPV. Métodos directos e indirectos empleados para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en fase aguda y crónica. *Salud, Ciencia y Tecnología*. 2022;2:152-.
67. Gonzalez L, Scollo K, Bardach A, Sáez-Alquezar A, Ferlín C, Albajar-Viñas P, et al. Inmunoserología y métodos moleculares para el diagnóstico de Chagas: revisión sistemática rápida. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. 2017;51(1):63-74.
68. Álvarez-Hernández D-A, Franyuti-Kelly G-A, Díaz-López-Silva R, González-Chávez A-M, González-Hermosillo-Cornejo D, Vázquez-López R. Chagas disease: Current perspectives on a forgotten disease. *Revista Médica del Hospital General de Mexico*. 2018;81(3):154-64.
69. Murcia L, Carrilero B, Saura D, Iborra MA, Segovia M. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *J Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2013;31:26-34.
70. Ferrer E, Lares M, Viettri M, Medina M. Comparación entre técnicas inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *J Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2013;31(5):277-82.

71. Behrend M, Beltrán M, Restrepo M, Kroeger AJB. Control de la enfermedad de Chagas en bancos de sangre de Colombia. 2002;22(1):39-45.
72. Bern C, Martin DL, Gilman RH. Acute and congenital Chagas disease. *Advances in parasitology*. 2011;75:19-47.
73. Apt W. Tratamiento de la enfermedad de Chagas. *J Parasitología al día*. 1999;23(3-4):100-12.
74. Kreimer P, Romero LA, Bilder P. ¿ Tratar o no tratar? La controversia científica sobre el tratamiento para los enfermos de Chagas crónico. *J Asclepio*. 2010;62(2):405-28.
75. Albertini RJ. Biomarker responses in human populations: towards a worldwide map. *J Mutation Research/Fundamental Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1999;428(1-2):217-26.
76. Organization WH. WHO international programme on chemical safety biomarkers in risk assessment: validity and validations. 2001.
77. Rho JH, Bauman A, Boettger HG, Yen TF. A search for porphyrin biomarkers in Nonesuch Shale and extraterrestrial samples. *Space life sciences*. 1973;4:69-77.
78. Order SE. Beneficial and detrimental effects of therapy on immunity in breast cancer. *Int J Radiat Oncol, Biol Phys*. 1977;2(3/4).
79. Mundkur BD. Evidence excluding mutations, polysomy, and polyploidy as possible causes of non-Mendelian segregations in *Saccharomyces*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 1949;36(3):259-80.
80. Porter K. Effect of homologous bone marrow injections in x-irradiated rabbits. *British journal of experimental pathology*. 1957;38(4):401.
81. Shubik M. The strategic audit: a game theoretic approach to corporate competitive strategy. *Managerial Decision Economics*. 1983;4(3):160-71.
82. Wittes J, Lakatos E, Probstfield J. Surrogate endpoints in clinical trials: cardiovascular diseases. *J Statistics in medicine*. 1989;8(4):415-25.
83. Joller-Jemelka H, Vogt M, Joller P. Immunologische Laboruntersuchungen bei Patienten mit erworbenem Immundefizienzsyndrom (AIDS) und bei AIDS-Verdacht. *J Schweiz Med Wochenschr*. 1985;115:125-32.
84. Group BDW, Atkinson Jr AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology therapeutics*. 2001;69(3):89-95.
85. Kumar Kulabhusan P, Hussain B, Yüce M. Current perspectives on aptamers as diagnostic tools and therapeutic agents. *J Pharmaceutics*. 2020;12(7):646.
86. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 1990;249(4968):505-10.
87. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 1990;346(6287):818-22.

88. Gold L, Janjic N, Jarvis T, Schneider D, Walker JJ, Wilcox SK, et al. Aptamers and the RNA world, past and present. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012;4(3):a003582.
89. Zhuo Z, Yu Y, Wang M, Li J, Zhang Z, Liu J, et al. Recent advances in SELEX technology and aptamer applications in biomedicine. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(10):2142.
90. Ştefan G, Hosu O, De Wael K, Lobo-Castañón MJ, Cristea C. Aptamers in biomedicine: Selection strategies and recent advances. *Electrochimica Acta*. 2021;376:137994.
91. Borghei Y-S, Hosseini M, Dadmehr M, Hosseinkhani S, Ganjali MR, Sheikhnejad R. Visual detection of cancer cells by colorimetric aptasensor based on aggregation of gold nanoparticles induced by DNA hybridization. *Analytica chimica acta*. 2016;904:92-7.
92. Civit L, Theodorou I, Frey F, Weber H, Lingnau A, Gröber C, et al. Targeting hormone refractory prostate cancer by in vivo selected DNA libraries in an orthotopic xenograft mouse model. *Scientific reports*. 2019;9(1):4976.
93. Suh SH, Choi SJ, Dwivedi HP, Moore MD, Escudero-Abarca BI, Jaykus L-A. Use of DNA aptamer for sandwich type detection of *Listeria monocytogenes*. *Analytical biochemistry*. 2018;557:27-33.
94. Jin B, Wang S, Lin M, Jin Y, Zhang S, Cui X, et al. Upconversion nanoparticles based FRET aptasensor for rapid and ultrasensitive bacteria detection. *Biosensors Bioelectronics*. 2017;90:525-33.
95. Chan M, Rusconi C, Alexander J, Tonkens R, Harrington R, Becker R. A randomized, repeat-dose, pharmacodynamic and safety study of an antidote-controlled factor IXa inhibitor. *Journal of Thrombosis Haemostasis*. 2008;6(5):789-96.
96. Huang R-H, Fremont D, Tuley EA, Diener JL, Schaub RG, Sadler JE. Crystal structure of von Willebrand factor (VWF) A1 domain in complex with aptamer ARC1172, an inhibitor of VWF-platelet binding. *Blood*. 2008;112(11):257.
97. Sayyed S, Hägele H, Kulkarni O, Endlich K, Segerer S, Eulberg D, et al. Podocytes produce homeostatic chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12, which contributes to glomerulosclerosis, podocyte loss and albuminuria in a mouse model of type 2 diabetes. 2009;52:2445-54.
98. Ospina J, Restrepo-Cano V, Sánchez-Jiménez M, Restrepo-Cano V. Bio-SELEX: A new strategy to identify new biomarkers from biological samples.
99. Mosing RK, Bowser MT. Isolating aptamers using capillary electrophoresis–SELEX (CE–SELEX). *Nucleic acid peptide aptamers: methods protocols*. 2009:33-43.
100. Reinemann C, Von Fritsch UF, Rudolph S, Strehlitz B. Generation and characterization of quinolone-specific DNA aptamers suitable for water monitoring. *Biosensors Bioelectronics*. 2016;77:1039-47.

101. Wilson R. Preparation of single-stranded DNA from PCR products with streptavidin magnetic beads. *Nucleic acid therapeutics*. 2011;21(6):437-40.
102. Ohuchi S. Cell-SELEX technology. *BioResearch open access*. 2012;1(6):265-72.
103. Zumurut HE, Mallikaratchy PR. Ligand guided selection (LIGS) of artificial nucleic acid ligands against cell surface targets. *ACS applied bio materials*. 2019;3(5):2545-52.
104. Gao S, Zheng X, Jiao B, Wang L. Post-SELEX optimization of aptamers. *Analytical bioanalytical chemistry*. 2016;408:4567-73.
105. Lorger M, Engstler M, Homann M, Göringer HU. Targeting the variable surface of African trypanosomes with variant surface glycoprotein-specific, serum-stable RNA aptamers. *J Eukaryotic Cell*. 2003;2(1):84-94.
106. Homann M, Göringer HU. Uptake and intracellular transport of RNA aptamers in African trypanosomes suggest therapeutic “piggy-back” approach. *J Bioorganic medicinal chemistry*. 2001;9(10):2571-80.
107. Homann M, Lorger M, Engstler M, Zacharias M, Ulrich Goring H. Serum-stable RNA aptamers to an invariant surface domain of live African trypanosomes. *J Combinatorial chemistry high throughput screening*. 2006;9(7):491-9.
108. Ramos E, Pineiro D, Soto M, Abanades DR, Martín ME, Salinas M, et al. A DNA aptamer population specifically detects *Leishmania infantum* H2A antigen. *J Laboratory investigation*. 2007;87(5):409-16.
109. Martín ME, García-Hernández M, García-Recio EM, Gómez-Chacón GF, Sánchez-López M, González VM. DNA aptamers selectively target *Leishmania infantum* H2A protein. *J PLoS One*. 2013;8(10):e78886.
110. Ramos E, Moreno M, Martín ME, Soto M, Gonzalez VM. In vitro selection of *Leishmania infantum* H3-binding ssDNA aptamers. *J Oligonucleotides*. 2010;20(4):207-13.
111. Frezza V, Pinto-Díez C, Fernández G, Soto M, Martín ME, García-Sacristán A, et al. DNA aptamers targeting *Leishmania infantum* H3 protein as potential diagnostic tools. *J Analytica Chimica Acta*. 2020;1107:155-63.
112. Guerra-Pérez N, Ramos E, García-Hernández M, Pinto C, Soto M, Martín ME, et al. Molecular and functional characterization of ssDNA aptamers that specifically bind *Leishmania infantum* PABP. *PLoS One*. 2015;10(10):e0140048.
113. Chen Q. The naturally acquired immunity in severe malaria and its implication for a PfEMP-1 based vaccine. *Microbes infection*. 2007;9(6):777-83.
114. Barfod A, Persson T, Lindh J. In vitro selection of RNA aptamers against a conserved region of the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Parasitology research*. 2009;105:1557-66.
115. Cheung Y-W, Dirkzwager RM, Wong W-C, Cardoso J, Costa JDAN, Tanner JA. Aptamer-mediated *Plasmodium*-specific diagnosis of malaria. *Biochimie*. 2018;145:131-6.

116. Niles JC, DeRisi JL, Marletta MA. Inhibiting Plasmodium falciparum growth and heme detoxification pathway using heme-binding DNA aptamers. *Proceedings of the National Academy of Science* 2009;106(32):13266-71.
117. Ospina-Villa JD, Dufour A, Weber C, Ramirez-Moreno E, Zamorano-Carrillo A, Guillen N, et al. Targeting the polyadenylation factor EhCFIm25 with RNA aptamers controls survival in *Entamoeba histolytica*. *Scientific Reports*. 2018;8(1):5720.
118. Beltrán M, Bermúdez MI, Forero MC, Ayala M, Rodríguez MJ. Control de la infección por *Trypanosoma cruzi* en donantes de sangre de Colombia, 2003. *J Biomédica*. 2005;25(4):527-32.
119. Caicedo Dlaz R. Evaluación del rendimiento diagnóstico de técnicas ELISA para la Enfermedad de Chagas en Colombia. 2017.
120. Zambrano P. Estrategia y plan de acción para la prevención, el control y la atención de la Enfermedad de Chagas. *J Protocolo de Vigilancia En Salud Pública*. 2010;28.
121. Wang T, Yin W, AlShamaileh H, Zhang Y, Tran PH-L, Nguyen TN-G, et al. A detailed protein-SELEX protocol allowing visual assessments of individual steps for a high success rate. *J Human gene therapy methods*. 2019;30(1):1-16.
122. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *J EMBnet journal*. 2011;17(1):10-2.
123. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom; 2010.
124. Alam KK, Chang JL, Burke DH. FASTAptamer: a bioinformatic toolkit for high-throughput sequence analysis of combinatorial selections. *J Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 2015;4:e230.
125. Frith MC, Saunders NF, Kobe B, Bailey TL. Discovering sequence motifs with arbitrary insertions and deletions. *J PLoS computational biology*. 2008;4(5):e1000071.
126. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *J Nucleic acids research*. 2003;31(13):3406-15.
127. Popenda M, Szachniuk M, Antczak M, Purzycka KJ, Lukasiak P, Bartol N, et al. Automated 3D structure composition for large RNAs. *J Nucleic acids research*. 2012;40(14):e112-e.
128. Biovia DS. Discovery Studio Visualizer. San Diego: Dassault Systèmes. 2021.
129. Oliveira R, Pinho E, Sousa AL, Dias Ó, Azevedo NF, Almeida C. Modelling aptamers with nucleic acid mimics (NAM): From sequence to three-dimensional docking. *Plos one*. 2022;17(3):e0264701.
130. Sabri MZ, Hamid AAA, Hitam SMS, Rahim MZA. The assessment of three dimensional modelling design for single strand DNA aptamers for computational chemistry application. *Biophysical chemistry*. 2020;267:106492.

131. Ahmad NA, Zulkifli RM, Hussin H, Nadri MH. In silico approach for Post-SELEX DNA aptamers: A mini-review. *Journal of Molecular Graphics*. 2021;105:107872.
132. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *J electrophoresis*. 1997;18(15):2714-23.
133. Coordinators NR. Database resources of the national center for biotechnology information. *J Nucleic acids research*. 2016;44(D1):D7-D19.
134. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *J Nature*. 2021;596(7873):583-9.
135. Jiménez-García B, Pons C, Fernández-Recio J. pyDockWEB: a web server for rigid-body protein–protein docking using electrostatics and desolvation scoring. *J Bioinformatics*. 2013;29(13):1698-9.
136. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Journal of computational chemistry*. 2004;25(13):1605-12.
137. RESOLUCION NUMERO 8430 DE 1993: Ministerio de Salud; 1993 [19]. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/RESOLUCION-8430-DE-1993.PDF>.
138. Khristich AN, Mirkin SM. On the wrong DNA track: Molecular mechanisms of repeat-mediated genome instability. *J Journal of Biological Chemistry*. 2020;295(13):4134-70.
139. Dhiman M, Nakayasu ES, Madaiah YH, Reynolds BK, Wen J-j, Almeida IC, et al. Enhanced nitrosative stress during *Trypanosoma cruzi* infection causes nitrotyrosine modification of host proteins: implications in Chagas' disease. *J The American journal of pathology*. 2008;173(3):728-40.
140. Gomes S, Marques PI, Matthiesen R, Seixas S. Adaptive evolution and divergence of SERPINB3: a young duplicate in great Apes. *J PLoS One*. 2014;9(8):e104935.
141. Pereira NdS, Queiroga TBD, Nunes DF, Andrade CdM, Nascimento MSL, Do-Valle-Matta MA, et al. Innate immune receptors over expression correlate with chronic chagasic cardiomyopathy and digestive damage in patients. *J PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2018;12(7):e0006589.
142. Messias-Reason I, Urbanetz L, Pereira da Cunha C. Complement C3 F and BF S allotypes are risk factors for Chagas disease cardiomyopathy. *J Tissue antigens*. 2003;62(4):308-12.
143. Budzko DB, Pizzimenti MC, Kierszenbaum F. Effects of complement depletion in experimental chagas disease: immune lysis of virulent blood forms of *Trypanosoma cruzi*. *J Infection Immunity*. 1975;11(1):86-91.

144. Demarchi Aiello V, Martins Reis M, Alberto Benvenuti L, de Lourdes Higuchi M, Antonio Franchini Ramires J, Halperin JA. A possible role for complement in the pathogenesis of chronic chagasic cardiomyopathy. *J The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain Ireland*. 2002;197(2):224-9.
145. Primavera KS, Umezawa ES, Peres BA, Camargo ME, Hoshino-Shimuzu S. Chagas' disease: IgA, IgM and IgG antibodies to *T. cruzi* amastigote, trypomastigote and epimastigote antigens in acute and in different chronic forms of the disease. *J Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1990;32:172-80.
146. Figueiredo VP, Silva MC, de Souza DMS, Junior DC, Lopes LR, de Araújo Azevedo M, et al. Trypanosoma cruzi infection increases atherosclerotic lesion in ApoE-deficient mice. *J Microbial Pathogenesis*. 2022;171:105730.
147. Johnson EE, Wessling-Resnick M. Iron metabolism and the innate immune response to infection. *J Microbes infection*. 2012;14(3):207-16.
148. Monteith AJ, Skaar EP. The impact of metal availability on immune function during infection. *J Trends in Endocrinology Metabolism*. 2021;32(11):916-28.
149. Cuervo H, Guerrero NA, Carbajosa S, Beschin A, De Baetselier P, Gironès N, et al. Myeloid-derived suppressor cells infiltrate the heart in acute Trypanosoma cruzi infection. *J The Journal of immunology*. 2011;187(5):2656-65.
150. Kayama H, Koga R, Atarashi K, Okuyama M, Kimura T, Mak TW, et al. NFATc1 mediates Toll-like receptor-independent innate immune responses during Trypanosoma cruzi infection. *J PLoS Pathogens*. 2009;5(7):e1000514.
151. Fountain JH, Lappin SL. Physiology, renin angiotensin system. 2017.
152. Scharfstein J, Monteiro AC, Schmitz V, Svensjö E. Angiotensin-converting enzyme limits inflammation elicited by Trypanosoma cruzi cysteine proteases: a peripheral mechanism regulating adaptive immunity via the innate kinin pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;389:1015–24.
153. Bestetti RB, Theodoropoulos TA, Cardinalli-Neto A, Cury PM. Treatment of chronic systolic heart failure secondary to Chagas heart disease in the current era of heart failure therapy. *J American heart journal*. 2008;156(3):422-30.
154. Botoni FA, Poole-Wilson PA, Ribeiro AL, Okonko DO, Oliveira BM, Pinto AS, et al. A randomized trial of carvedilol after renin-angiotensin system inhibition in chronic Chagas cardiomyopathy. *J American heart journal*. 2007;153(4):544. e1-. e8.
155. Souza-Silva TG, Diniz LF, Mazzeti AL, Mendonca AA, Gonçalves RV, Novaes RD. Could angiotensin-modulating drugs be relevant for the treatment of Trypanosoma cruzi infection? A systematic review of preclinical and clinical evidence. *J Parasitology*. 2019;146(7):914-27.
156. Wang Y, Maria da Consolação VM, Heringer-Walther S, Ebermann L, Schultheiss H-P, Wessel N, et al. Plasma ACE2 activity is an independent prognostic marker in Chagas' disease and equally potent as BNP. *J Journal of cardiac failure*. 2010;16(2):157-63.

157. Ursic-Bedoya RJ, Nazzari H, Cooper D, Triana O, Wolff M, Lowenberger C. Identification and characterization of two novel lysozymes from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. *J Journal of Insect Physiology*. 2008;54(3):593-603.
158. Pierce LM, Kurata WE. Priming with toll-like receptor 3 agonist poly (I: C) enhances content of innate immune defense proteins but not MicroRNAs in human mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *J Frontiers in Cell Developmental Biology*. 2021;9:676356.
159. Scharfstein J, Lima APC. Roles of naturally occurring protease inhibitors in the modulation of host cell signaling and cellular invasion by *Trypanosoma cruzi*. *J Molecular Mechanisms of Parasite Invasion: Subcellular Biochemistry*. 2008:140-54.
160. Radons J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *J Cell Stress Chaperones*. 2016;21(3):379-404.
161. Engman DM, Dragon E, Donelson J. Human humoral immunity to hsp70 during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Journal of immunology*. 1990;144(10):3987-91.
162. Maranon C, Planelles L, Alonso C, Lopez MC. HSP70 from *Trypanosoma cruzi* is endowed with specific cell proliferation potential leading to apoptosis. *J International immunology*. 2000;12(12):1685-93.
163. Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *J Molecular biology of the cell*. 2005;16(10):4623-35.
164. Saiyang X, Deng W, Qizhu T. Sirtuin 6: a potential therapeutic target for cardiovascular diseases. *J Pharmacological Research*. 2021;163:105214.
165. Dick CF, Meyer-Fernandes JR, Vieyra A. The Functioning of Na⁺-ATPases from Protozoan Parasites: Are These Pumps Targets for Antiparasitic Drugs? *J Cells*. 2020;9(10):2225.
166. Iizumi K, Mikami Y, Hashimoto M, Nara T, Hara Y, Aoki T. Molecular cloning and characterization of ouabain-insensitive Na⁺-ATPase in the parasitic protist, *Trypanosoma cruzi*. *J Biochimica et Biophysica Acta -Biomembranes*. 2006;1758(6):738-46.
167. Van Der Heyden N, Docampo R. Proton and sodium pumps regulate the plasma membrane potential of different stages of *Trypanosoma cruzi*. *J Molecular biochemical parasitology*. 2002;120(1):127-39.
168. Lu H-G, Zhong L, de Souza W, Benchimol M, Moreno S, Docampo R. Ca²⁺ content and expression of an acidocalcisomal calcium pump are elevated in intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *J Molecular Cellular Biology*. 1998;18(4):2309-23.
169. Zíková A, Schnauffer A, Dalley RA, Panigrahi AK, Stuart KD. The F₀F₁-ATP synthase complex contains novel subunits and is essential for procyclic *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathogens*. 2009;5(5):e1000436.

170. El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science*. 2005;309(5733):404-9.
171. Ghedin E, Bringaud F, Peterson J, Myler P, Berriman M, Ivens A, et al. Gene synteny and evolution of genome architecture in trypanosomatids. 2004;134(2):183-91.
172. Bautista-lópez N, Ndao M, Camargo V. Antigens shed in extracellular vesicles released from infected mammalian cells. *J Clin Microbiol*. 2017;55:744-58.
173. Brossas J-Y, Gulin JEN, Bisio MMC, Chapelle M, Marinach-Patrice C, Bordessoules M, et al. Secretome analysis of *Trypanosoma cruzi* by proteomics studies. *J PLoS One*. 2017;12(10):e0185504.

Anexos

1. Consentimiento informado de muestras de suero de proyecto INMUNOTRPOIC.

Desarrollo de inmunoblots para el diagnóstico de enfermedades tropicales. Inmunotropic

Investigador principal del proyecto: Miryan Margot Sánchez Jiménez. Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Universidad CES, Sabaneta, Antioquia.

Co-Investigadores: Marcos Restrepo Isaza, Bertha Nelly Restrepo Jaramillo, Nora María Cardona Castro, Margarita Arboleda Naranjo, Luz Astrid Velasquez, Irma Marcela Romero Montoya, Leidy Diana Piedrahita, Paula Andrea Morales.

Este documento describe el propósito del estudio, sus posibles riesgos y beneficios y los derechos que usted tiene como participante en él. Por favor, tómese el tiempo necesario para tomar su decisión. La decisión de participar o no en este estudio es solamente suya. Por favor no firme, a menos, que se sienta satisfecho con las respuestas a sus preguntas. Si usted decide participar, por favor asegúrese de firmar y poner la fecha al final de la última página de este formulario.

¿POR QUE HACEMOS ESTE ESTUDIO?

Por esta razón se plantea realizar este estudio cuyo objetivo es Desarrollar pruebas de inmunoblot para la detección de la infección por agentes infecciosos tropicales, causantes de síndrome febril, en sueros de pacientes atendidos en el Instituto Colombiano de Medicina Tropical sedes Sabaneta y Apartadó, 2015-2018. Estos resultados permitirán determinar cómo se comportan un grupo de nuevas pruebas diagnósticas denominadas Inmunotropic, que permiten detectar leptospirosis, dengue, salmonelosis, brucelosis, malaria y chagas.

¿QUE PASARÁ DURANTE EL ESTUDIO?

A los participantes se le tomarán dos muestras de 7 ml de sangre cada una, en los adultos y de 5 ml cada una en los niños menores de 5 años. Adicionalmente nos autorizará a tomar datos clínicos, de laboratorio y a realizar análisis especializados a partir de la muestra que fue recolectada.

¿CUALES SON LOS RIESGOS EN EL ESTUDIO?

La toma de la muestra de sangre puede causar:

- Pequeña molestia al momento de introducir la aguja.
- Hematoma en el sitio de la punción que desaparece en pocos días.
- En raras ocasiones mareo o infección en el lugar de la punción.
- La cantidad extraída de sangre no causa anemia.

¿CUÁLES SON LOS BENEFICIOS AL FORMAR PARTE DEL ESTUDIO?

Los beneficios para los participantes en el estudio son: Obtener diagnóstico en menos de 24 horas de infecciones causantes de síndrome febril, obtener resultados rápidos y confiables para que el médico tome decisiones de tratamiento oportunas y obtener diagnóstico diferencial de la enfermedad causante del síndrome febril.

¿QUIÉN PUEDE PARTICIPAR EN EL ESTUDIO?

Puede participar cualquier persona, de cualquier edad, con excepción las personas que tengan alguna enfermedad muy grave.

La información suministrada a los integrantes del estudio será confidencial. A cada paciente se le asignará un código que permitirá su identificación durante el análisis de los datos. Las muestras tomadas serán almacenadas en el Instituto Colombiano de Medicina Tropical.

La participación en el estudio será voluntaria y no tendrá ningún costo. Usted tampoco recibirá compensación económica. Usted podrá retirarse del estudio en el momento en que lo considere necesario, sin que esto traiga consecuencias.

CONSENTIMIENTO DEL PARTICIPANTE, DEL PADRE/MADRE/TUTOR SI ES MENOR DE EDAD.

Se contestaron todas mis preguntas con satisfacción. Me han explicado que la participación en este estudio es voluntaria y que se puede dejar de participar en cualquier momento, si así se desea.

Autorizo la toma de la muestra de sangre y de materia fecal y para ser usada en la investigación y para que los investigadores puedan usar la información recolectada.

Firma del participante: _____

Firma del Padre o Acudiente: _____

Fecha: _____

Firma del investigador: _____

Nombre: _____ Fecha: _____

Firma del testigo: _____

Nombre: _____ Fecha: _____



2. Consentimiento informado para muestras adicionales INMUNOTROPIC.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MUESTRAS ADICIONALES

Fecha: Día ___ Mes ___ Año ___
Número de Identificación del Paciente: _____
Paciente: _____
 Primer Apellido Segundo Apellido Primer Nombre Segundo Nombre
T.I o C.C # _____
Padre o Acudiente _____
Nombres Apellidos _____
C.C #: _____

Desarrollo de inmunoblots para el diagnóstico de enfermedades tropicales. Inmunotropic

Muestras adicionales

Autorizó que las muestras de sangre tomadas a mí en este estudio puedan ser utilizadas en otros estudios realizados por el ICMT-CES. Las muestras serán guardadas en el Instituto Colombiano de Medicina Tropical-Universidad CES. Sin embargo otras enfermedades también importantes podrían ser estudiadas en esas muestras. Por lo tanto como parte de este estudio, los investigadores planean guardar muestras adicionales de sangre con el fin de estudiar otras enfermedades. Las muestras serán identificadas solo por códigos, de modo tal que su nombre no será identificado.

Si Usted desea que los investigadores guarden muestras adicionales, por favor firme abajo para indicar su deseo de dar permiso a los investigadores de guardar muestras adicionales para futuros estudios.

Cualquier estudio adicional usando sus muestras serán revisadas por los Comités de Ética Institucionales de los investigadores, un comité que chequea estudios médicos para proteger los derechos de los voluntarios.

Usted puede cambiar de parecer en cualquier momento acerca de permitir que muestras suyas sean usadas en estudios futuros. Si es así contacte a los investigadores y hágales saber de su decisión.

Firma del participante: _____

Firma del Padre o Acudiente: _____

Fecha: _____

Firma del investigador: _____

Nombre: _____ Fecha: _____

Firma del testigo: _____

Nombre: _____ Fecha: _____

Si usted tiene alguna pregunta acerca de la investigación, por favor contacte a Miryan Margot Sánchez Jiménez, teléfono: 3053500 ext: 2316. Instituto Colombiano de Medicina Tropical-Universidad CES



3. Consentimiento informado para muestras de controles sanos.

Desarrollo de una prueba diagnóstica para la enfermedad de Chagas en fase crónica.

Consentimiento Informado

Investigadora principal del proyecto: Juan David Ospina Villa- Instituto Colombiano de Medicina Tropical

Co-Investigadores: Maria Isabel Osorio Pulgarín- Instituto Colombiano de Medicina Tropical.
Mateo Morales Velásquez- Estudiante Maestría en Medicina Tropical- Universidad CES
Miriyán Margot Sánchez- Instituto Colombiano de Medicina Tropical

Este documento describe el propósito del estudio, sus posibles riesgos y beneficios y los derechos que usted tiene como participante en él. Por favor, tómese el tiempo necesario para tomar su decisión. La decisión de participar o no en este estudio es solamente suya. Por favor no firme, a menos, que se sienta satisfecho con las respuestas a sus preguntas. Si usted decide participar, por favor asegúrese de firmar y poner la fecha al final de la última página de este formulario.

¿POR QUE HACEMOS ESTE ESTUDIO?

Estamos interesados en desarrollar una prueba de bajo costo y más efectiva para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, es una enfermedad potencialmente mortal causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), puede ser moderada (y causar inflamación y fiebre) o duradera. Si no se trata, puede provocar insuficiencia cardíaca congestiva. El tratamiento consiste en controlar los síntomas y tomar medicamentos que maten al parásito.

¿QUE PASARÁ DURANTE EL ESTUDIO?

Si usted acepta participar en este estudio, se procederá a tomar una muestra de 5 a 7 ml de sangre en un tubo sin anticoagulante con gel. Adicionalmente nos autorizará a realizar análisis especializados a partir de la muestra que fue recolectada.

¿CUALES SON LOS RIESGOS EN EL ESTUDIO?

La toma de la muestra de sangre puede causar:

- Pequeña molestia al momento de introducir la aguja.
- Hematoma en el sitio de la punción que desaparece en pocos días.
- En raras ocasiones mareo o infección en el lugar de la punción.
- La cantidad extraída de sangre no causa anemia.

¿CUÁLES SON LOS BENEFICIOS AL FORMAR PARTE DEL ESTUDIO?

Su participación permitirá conocer si sus síntomas están siendo causados por la enfermedad de Chagas y su médico podrá decidir cuál es el mejor tratamiento para que usted se mejore. Además, estaría ayudando para que otras personas que en otra ocasión puedan presentar sus mismos síntomas, puedan saber que tienen en forma rápida y precisa.

¿QUIÉN PUEDE PARTICIPAR EN EL ESTUDIO?

Puede participar cualquier persona que lo desee desde los 3 años de edad y que no presente ninguna enfermedad grave, también vamos a necesitar tomar muestra de pacientes sanos "controles sanos" que nunca hayan tenido diagnóstico de enfermedad de Chagas.

La información suministrada a los integrantes del estudio será confidencial. A cada paciente se le asignará un código que permitirá su identificación durante el análisis de los datos.

Las muestras tomadas serán almacenadas en el Instituto Colombiano de Medicina Tropical de la Universidad CES en Sabaneta-Antioquia. La participación en el estudio será voluntaria y no tendrá ningún costo, Usted tampoco recibirá compensación económica. Usted podrá retirarse del estudio en el momento en que lo considere necesario, sin que esto traiga consecuencias.

Si usted tiene alguna pregunta acerca de la investigación, por favor contacte a Maria Isabel Osorio Pulgarin teléfono: 3053500 ext: 2316

Acepto participar

Firma del participante: _____

Firma del Padre o Acudiente: _____

Fecha: _____

Firma del investigador: _____

Nombre: _____ Fecha: _____

Firma del testigo: _____

Nombre: _____ Fecha: _____

4. Consentimiento informado para muestras adicionales para muestras de controles sanos.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MUESTRAS ADICIONALES

Fecha: Día ___ Mes ___ Año ____

Número de Identificación del Paciente: _____

Paciente: _____

Primer Apellido Segundo Apellido Primer Nombre Segundo Nombre

T.I o C.C # _____

Padre o Acudiente _____

Nombres Apellidos

C.C #: _____

Desarrollo de una prueba diagnóstica para la enfermedad de Chagas en fase crónica.

Muestras adicionales

Autorizó que las muestras de sangre tomadas a mí en este estudio puedan ser utilizadas en otros estudios realizados por el ICMT-CES.

Las muestras serán guardadas en el Instituto Colombiano de Medicina Tropical-Universidad CES. Sin embargo, otras enfermedades también importantes podrían ser estudiadas en esas muestras. Por lo tanto, como parte de este estudio, los investigadores planean guardar muestras adicionales de sangre y orina con el fin de estudiar otras enfermedades. Las muestras serán identificadas solo por códigos, de modo tal que su nombre no será identificado.

Si Usted desea que los investigadores guarden muestras adicionales, por favor firme abajo para indicar su deseo de dar permiso a los investigadores de guardar muestras adicionales para futuros estudios.

Cualquier estudio adicional usando sus muestras serán revisadas por los Comités de Ética institucionales de los investigadores, un comité que chequea estudios médicos para proteger los derechos de los voluntarios.

Usted puede cambiar de parecer en cualquier momento acerca de permitir que muestras suyas sean usadas en estudios futuros. Si es así contacte a los investigadores y hágales saber de su decisión.

Firma del participante: _____

Firma del Padre o Acudiente: _____

Fecha: _____

Firma del investigador: _____

Nombre: _____ Fecha: _____

Firma del testigo: _____

Nombre: _____ Fecha: _____

Si usted tiene alguna pregunta acerca de la investigación, por favor contacte a Miryan Margot Sánchez Jiménez, teléfono: 3053500 ext: 2316 o Náyade Córdoba Rentería cel:3134108545