




ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESI DOCTORAL

Estratègies d'optimització del tractament de la malaltia de Chagas

Autor: Pau Bosch Nicolau

Director: Israel Molina Romero

Tutor: Vicenç Falcó Ferrer

Programa de doctorat en Medicina

Departament de Medicina

2024

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

A ma mare i a sa padrina, sense elles no seria on soc

Al Lau, per tot

AGRAÏMENTS

Primer de tot, i com no podria ser d'una altra manera, voldria donar les gràcies al meu director de tesis, l'Israel Molina. Crec que a vegades no soc conscient de lo afortunat que he estat de tenir-te com a mentor i com amic. Ets una persona única amb una capacitat immensa per inspirar i fer créixer a la gent que t'envolta. T'agraeixo de tot cor que en aquell passadís de la sisena planta em fessis confiança i m'oferissis participar d'aquesta aventura que són les malalties tropicals. I no només això, m'has obert les portes de la secció més apassionant de la nostra unitat "*els hemoflagelats*" on puc compartir directament amb tu projectes, il·lusions i teleconferències infinites amb Brasil. Gràcies per tot el temps invertit, per la paciència i per l'amistat, crec que mai t'ho podré agrair prou.

També volia donar les gràcies al meu tutor, el Vicenç Falcó. Ha estat un honor que poguessis exercir de tutor de la meva tesi. A tu et dec probablement que avui en dia em dediqui a les infeccions. En un moment de replantejament personal em vas recolzar i em vas mostrar el món de les infeccioses. Amb tu em vaig iniciar en el món científic i gràcies a la teva infinita paciència i a unes quantes tardes al despatx de la sisena, vaig poder publicar el meu primer treball. I ves per on, amb tu vaig fer el meu primer viatge a Angola on em vaig reafirmar en les malalties tropicals. En definitiva, gràcies per tot.

Gràcies a la Unitat de Salut Internacional i Medicina Tropical Vall d'Hebron – Drassanes. Des que vaig arribar a la unitat he sentit que era on volia ser. Soc conscient del luxe i també la responsabilitat de treballar amb un grup de persones referents en aquest àmbit. He après moltíssim de tots vosaltres i com bé demostren els treballs d'aquesta tesi, sense un equip com el nostre, això no hauria estat possible. Volia fer una menció directa al Nano, l'Adrián i la Esperanza. Vosaltres vau ser el meu primer equip directe i m'heu acompanyat des de llavors. Segueixo admirant-vos com el primer dia. I crec que és també necessari agrair a la Elena i la Aroa el seu suport. És innegable que sense elles cap dels treballs que conformen aquesta tesi haurien arribat a bon port. També volia agrair el suport a la resta del servei de malalties infeccioses. M'he sentit com a casa des que vaig entrar com a resident. És un plaer estar envoltat de persones compromeses amb la seva feina, amb esperit crític i amb ganes de fer les coses ben fetes.

Com no podia ser d'altra manera, gràcies a tots els amics que m'heu acompanyat en un moment o altre de la meva vida. Des dels de la infància a Mallorca fins als més recents a Vilassar passant per Barcelona. Sense la vostra estima i el suport en diferents moments no hauria arribat aquí on soc.

Vull agrair a la meva família tot el seu suport. Tant a la pròpia com la política. A la meva mare per ser el meu pilar des que vaig néixer. Ella m'ha transmès tot lo bo que tinc i ha establert la base

del que soc ara. A la meva germana perquè tot i les nostres diferències amb ella he après a compartir i estimar. Al meu pare, per deixar-me al meu germà petit i perquè encara que avui no hi sigui estic segur que estaria molt orgullós. Als meus avis per l'amor incondicional que m'han transmès des que soc petit i amb qui he tingut la sort de poder compartir, parlar i aprendre fins ben entrada l'edat adulta. No puc ser més afortunat.

Finalment al Lau. Gràcies per acompanyar-me en aquesta aventura que és la vida. Gràcies per ser al meu costat en tot moment. Gràcies també per la paciència i comprensió que has tingut aquests últims anys i especialment aquests mesos quan la feina ens ha tret més temps del que hauríem volgut. Si tinc clara una cosa és que sense tu aquesta tesi no hauria estat possible.

ABREVIACIONS

ADN: àcid desoxiribonucleic

CCC: cardiopatia chagàsica crònica

CDC: centers for disease control

CT: *control treatment* (tractament control)

DBS: *dried blood spots*, o gota seca en paper

DE: desviació estàndard

DTU: *Discrete typing unit*

EA: efecte advers

ELISA: *enzyme linked immunosorbent assay*

HLA: antígens leucocitaris humans

HR: *hazard ratio*

Ig: immunoglobulina

ITT: intenció de tractar

LDT: *low-dose treatment* (tractament amb dosis baixes)

MC: malaltia de Chagas

NYHA: *New York Heart Association*

OMS: organització mundial de la salut

OR: oportunitat relativa o *odds ratio*

PCR: *Polymerase chain reaction*

PP: per-protocol

qPCR: PCR a temps real

RIQ: rang inter-quartílic

RM: ressonància magnètica

SNC: sistema nerviós central

ST: *short treatment* (tractament curt)

TNF: factor de necrosi tumoral

VIH: virus de la immunodeficiència humana

ÍNDIX

RESUM.....	10
SUMMARY.....	12
1. INTRODUCCIÓ.....	14
1.1. La malaltia de Chagas i la seva situació actual.....	16
1.1.1. Cicle vital i classificació de <i>T. cruzi</i>	16
1.1.2. Vies de transmissió.....	18
1.2. Formes clíniques: presentació i patogènia.....	19
1.2.1. La fase aguda.....	19
1.2.2. La fase crònica.....	20
1.2.3. Les reactivacions.....	21
1.3. Diagnòstic i seguiment de les persones amb Malaltia de Chagas.....	22
1.3.1. Tècniques diagnòstiques.....	22
1.3.2. Seguiment i possibles marcadors pronòstics.....	23
1.4. Tractament de la Malaltia de Chagas.....	23
1.4.1. Tractaments actuals: Benznidazol i Nifurtimox.....	23
1.4.2. Noves teràpies.....	26
1.4.3. Optimització de les teràpies actuals.....	27
2. JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI I HIPÒTESI DE TREBALL.....	30
3. OBJECTIUS.....	34
3.1. Objectiu principal.....	36
3.2. Objectius secundaris.....	36
4. COMPENDI DE PUBLICACIONS.....	38
4.1. Article 1.....	40
4.2. Article 2.....	46
5. RESUM GLOBAL DELS RESULTATS.....	56
6. RESUM GLOBAL DE LA DISCUSSIÓ.....	64
7. CONCLUSIONS.....	74
8. LÍNIES DE FUTUR.....	78
9. BIBLIOGRAFIA.....	82
10. ANNEXES.....	94
10.1. Annex 1: Fonts de finançament.....	96
10.2. Annex 2: Material suplementari de l'article 2.....	98
10.3. Annex 3: Revisió sistemàtica: associació entre qPCR i CCC.....	118

RESUM

Els tractaments actuals amb benznidazol (BNZ) per la fase crònica de la malaltia de Chagas (MC) presenten nombrosos inconvenients, ja que s'associen a taxes de curació baixes i a l'aparició de toxicitat en més del 50% dels individus, especialment en forma de reacció cutània. Aproximadament, un 15% acaben suspent el tractament per aquest motiu. Anteriorment, aquestes reaccions s'han relacionat amb la presència de l'al·lel HLA-B*35:05. L'objectiu d'aquesta tesi és optimitzar el tractament actual seguint dues estratègies: per una banda descriure els factors de risc per presentar reaccions cutànies d'hipersensibilitat i confirmar de forma prospectiva la seva associació amb l'al·lel HLA-B*35:05; i per altra banda comparar l'eficàcia parasitològica i la seguretat del BNZ en 3 esquemes terapèutics diferents.

El primer estudi és un estudi observacional prospectiu que inclou individus en la fase crònica de la MC que acceptaven rebre tractament amb BNZ seguint les guies actuals. Es va genotipar l'al·lel HLA-B a tots els participants. Es va fer seguiment clínic i analític els dies 0, 7, 14, 30 i 60 del tractament. Es van incloure 207 participants. Un 70% eren dones amb una edat mitja de 45.1 (SD \pm 9.86) anys, majoritàriament de Bolívia (92.8%). En 102 (49.3%) dels casos es va diagnosticar una reacció cutània. D'aquestes, 48 (46.6%) es van classificar com a lleus, 37 (35.9%) com a moderades i 18 (17.5%) com a severes. Fins a 31 (15.4%) dels individus van haver d'interrompre el tractament de manera definitiva. El sexe femení (OR 4.49 [IC95% 1.62-12.47]), la eosinofília de nova aparició (OR 2.55 [IC95% 1.2-5.43]) i ser portador del grup al·lèlic HLA-B*35 (OR 2.58 [IC95% 1.2-5.51]) eren predictors de reaccions cutànies moderades o severes.

El segon treball és l'assaig clínic MULTIBENZ, un assaig clínic fase 2b, aleatoritzat, doble-cec que es va dur a terme a l'Argentina, el Brasil, Colòmbia i Espanya. Vam incloure individus adults diagnosticats de MC amb DNA de *T. cruzi* detectable per qPCR en sang perifèrica. Els participants van ser aleatoritzats utilitzant un esquema de randomització balancejat per blocs i estratificat per país en una proporció de 1:1:1 a rebre 3 esquemes diferents: 300mg/60dies (*control treatment*; CT), 150mg/60dies (*low-dose treatment*; LDT), o 400mg/15dies (*short treatment*; ST). L'objectiu primari era la proporció de participants amb una negativització parasitològica sostinguda mesurada mitjançant qPCR durant el període de 12 mesos de seguiment. L'objectiu primari de seguretat era la proporció d'individus que havien de suspendre el tractament de forma definitiva. Ambdós anàlisis es van basar en la població per intenció-de-tractar. Des de l'Abril de 2017 al Setembre de 2020 es van incloure un total de 245 pacients i després de les exclusions, 234 participants van ser aleatoritzats i inclosos a l'anàlisi: 78, 77 i 79 participants al grup CT, LDT i ST respectivament. Es va observar una negativització parasitològica sostinguda en 42/78 (54%) individus al grup CT, 47/77 (61%) al grup LDT i 46/79 (58%) al grup ST amb una OR de 1.41 [IC95% 0.69-2.88] quan comparàvem el grup LDT amb el CT i una OR 1.23 [0.61-2.50]

quan comparàvem el grup ST vs. CT. Un total de 177 (76%) dels participants van reportar algun efecte advers: 62 (79%) del grup CT, 56 (73%) del LDT i 59 (77%) del grup ST. No obstant, les suspensions foren menys freqüents en el grup ST comparat amb el grup CT (2% vs. 14%, OR 0.20 [95% CI 0.04-0.95]).

D'aquests resultats concloem que els individus portadors del grup al·lèlic HLA-B*35 presenten un major risc de reaccions cutànies moderades o greus sota tractament amb BNZ. A més a més, es conclou també que els 3 règims terapèutics presenten una resposta parasitològica similar, tot i que els nous podrien disminuir la proporció d'efectes adversos i per tant millorar-ne l'adherència.

SUMMARY

Current treatment with benznidazole (BNZ) for chronic Chagas disease (CD) is far from ideal, as it is associated with low cure rates and substantial toxicity in more than 50% of individuals, especially cutaneous events, leading to discontinuation in approximately 15%. These reactions have been previously related to the specific allele HLA-B*35:05. The objective of the present thesis is to optimize the actual treatment following two strategies: to describe risk factors for cutaneous toxicity and prospectively confirm the association with the allele HLA-B*35:05; and to compare the parasitological efficacy and safety of 3 different benznidazole regimens.

The first study is a prospective observational study including adult chronic CD individuals who accepted to receive benznidazole treatment following current guidelines. Allele genotyping of HLA-B was determined in all participants. Clinical and analytical follow-up was performed at days 0, 7, 14, 30 and 60 of treatment. Two-hundred and seven individuals were included. Seventy percent were female with a mean age of 45.1 (SD \pm 9.86) years mainly from Bolivia (92.8%). In 102 (49.3%) cases a cutaneous reaction was diagnosed. Forty-eight (46.6%) were classified as mild, 37 (35.9%) as moderate and 18 (17.5%) as severe. Thirty-two (15.4%) subjects had to definitively interrupt the treatment due to a cutaneous reaction. Female sex (OR 4.49; 95%CI 1.62-12.47), new-onset eosinophilia prior to cutaneous symptoms (OR 2.55; 95%CI 1.2-5.43) and carrying the HLA-B*35 allelic group (OR 2.58; 95%CI 1.2-5.51) were all predictors of moderate to severe cutaneous reactions.

The second study is the MULTIBENZ trial. A 2b phase, randomized, double-blind, clinical trial performed in Argentina, Brazil, Colombia, and Spain. We included participants aged 18 years and above diagnosed with CD and a detectable *T. cruzi* DNA by qPCR in blood. Participants were randomized using a balanced block randomization scheme stratified by country, in a 1:1:1 proportion to receive BNZ at 3 different doses: 300mg/60days (control treatment; CT), 150mg/60days (low-dose treatment; LDT), or 400mg/15days (short treatment; ST). The primary objective was the proportion of patients with a sustained parasitological negativity by means of qPCR during a follow-up period of 12 months. The primary safety outcome was the proportion of people who permanently discontinued the treatment. Both primary efficacy analysis and primary safety analysis were based in the intention to-treat population. From April 2017 to Sept 2020 the trial enrolled 245 people and after exclusions, 234 randomized patients were included in the analysis: 78, 77 and 79 participants in the CT, LDT and ST groups respectively. Sustained parasitological negativity was observed in 42/78 (54%) individuals in the CT group, 47/77 (61%) in the LDT set and 46/79 (58%) in the ST group with an OR 1.41 [95% CI 0.69-2.88] when comparing the LDT with the CT, and an OR 1.23 [0.61-2.50]) comparing the ST vs. CT. One-

hundred seventy-seven (76%) participants reported an adverse event (AE): 62 (79%) among CT, 56 (73%) in LDT and 59 (77%) in the ST set. However, discontinuations were less frequent in the ST arm compared to the CT arm (2% vs. 14% OR 0.20 [95% CI 0.04-0.95]).

As a conclusion, individuals carrying the HLA-B*35 allelic group are at higher risk of moderate to severe reactions when taking benznidazole treatment. Furthermore, participants in the three therapeutic regimens had a similar parasitological response. However, new regimens may decrease AE and enhance treatment adherence.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. La malaltia de Chagas i la seva situació actual

La tripanosomiasis americana o malaltia de Chagas (MC) és una malaltia parasitària descrita per primera vegada per Carlos Chagas al 1909 (1). La malaltia està causada per un protozou de l'ordre dels quinetoplàstids, el *Trypanosoma cruzi*, una infecció de tipus zoonòtic que es troba fonamentalment a les àrees endèmiques de 21 països del continent americà (Figura 1). S'estima que entre 6 i 7 milions de persones es troben infectades a tot el món i 75 milions resideixen en àrees amb risc d'adquirir-la (2). Tot i així, és considerada per la Organització Mundial de la Salut (OMS) com una de les 20 malalties desateses, afectant generalment a comunitats empobrides i amb escassa visibilitat essent font de discriminació i estigma.

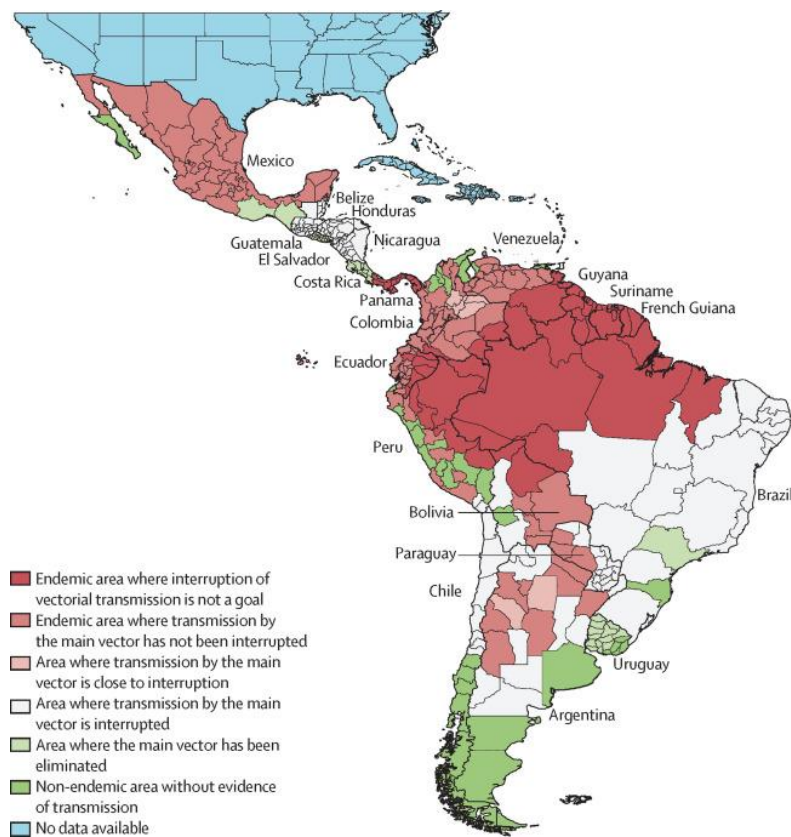


Figura 1. Àrees endèmiques i control vectorial. Imatge extreta de Pérez-Molina et al. 2018

1.1.1. Cicle vital i classificació de *T. cruzi*

El cicle vital de *T. cruzi* inclou artròpodes que fan de vectors i mamífers com a hostes definitius. Els tripomastigots metacíclics, que es desenvolupen a nivell del tub digestiu del vector, són les formes que s'excreten amb la femta durant o després de la ingesta. Quan s'alliberen els tripomastigots al costat de la ferida es produeix l'autoinoculació per part de l'hoste amb el rascat o a través de les mucoses. Dintre de l'hoste es diferencia en els amastigots, les formes replicatives (3). Els tripomastigots són els encarregats d'envair diferents teixits, presentant tropisme pel teixit

cardíac i els ganglis del sistema nerviós autònom digestiu on la infecció pot persistir durant dècades (4).

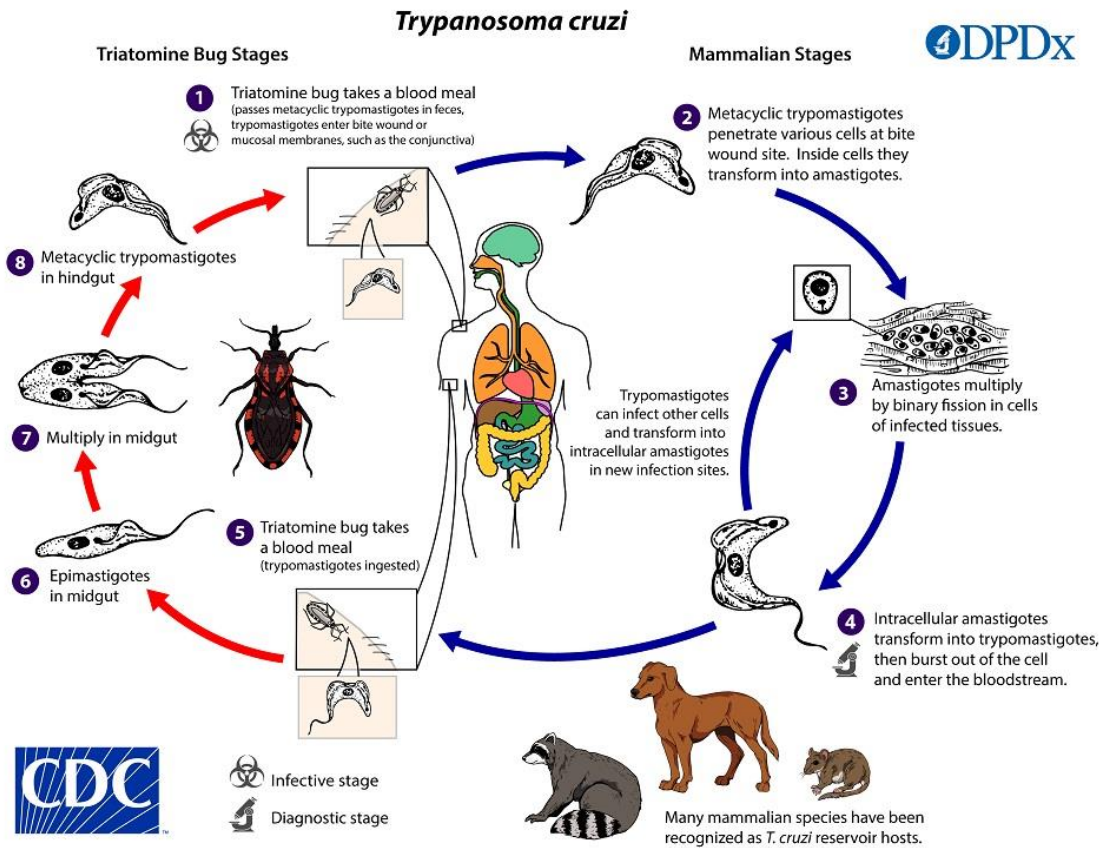


Figura 2. Cicle vital de *T. cruzi*. Imatge extreta dels CDC. www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican. Accés Julol 2023.

T. cruzi és un microorganisme amb gran diversitat genètica i fenotípica. Tot i que han existit diferents formes de classificació en funció de la rellevància ecològica i epidemiològica, actualment la classificació més acceptada divideix *T. cruzi* en 7 llinatges o *Discrete Typing Units* (DTUs): TcI-TcVI i Tcbat (5). A nivell geogràfic, TcI es concentra a Amèrica Central i al nord d'Amèrica del Sud. És la DTU més abundant i estesa, tant a nivell selvàtic com domèstic. En canvi, TcII es distribueix al con sud i a les regions centrals d'Amèrica del Sud en cicles principalment domèstics, essent la principal causa de MC a l'est i centre del Brasil. TcV i TcVI es consideren hibridacions de TcII i TcIII, i tenen el seu nínxol geogràfic principal a l'Argentina, el Paraguai i Bolívia (TcV) i la regió del Gran Chaco (TcVI). Tant TcIII com TcIV es troben principalment a la selva amazònica brasilera i als països adjacents, però mentre que TcIII és molt infreqüent com a causa d'infecció en humans, TcIV és una causa a tenir en compte en aquestes regions (6). Finalment Tcbat és una DTU descrita posteriorment en rat-penats de la selva amazònica que s'ha descrit de forma anecdòtica com a causa de MC (7).

Més enllà de la distribució geogràfica, la importància d'aquesta divisió rau en les diferents implicacions clíniques i terapèutiques que s'han descrit. A nivell clínic, mentre que TcII, TcV i TcVI s'han associat tant a cardiopatia com a afectació digestiva, aquesta última és extremadament infreqüent a les àrees on la causa principal de la MC és la TcI (8–10). Tot i així, cal tenir en compte com a possible factor de confusió el fet que en algunes sèries, fins a un 50% dels individus presentaven coinfeccions per diferents DTU (11). Quant a la resposta terapèutica, és coneguda la diferent susceptibilitat als nitroimidazols de les diferents soques de *T. cruzi* tant en model *in vitro* com en model *in vivo* (12,13). No obstant, la manca d'estandardització dels diferents models en pel que fa a tractament, inòcul i hoste no han permès identificar una correlació estricta entre els nivells de benznidazol i la seva tolerància en cap DTU concreta (14).

1.1.2. Vies de transmissió

La principal via de transmissió a les zones endèmiques segueix essent de tipus vectorial. Els triatòmits són insectes que s'alimenten principalment de la sang de mamífers a través de la picada. Existeixen fins a 157 espècies diferents, essent les del gènere *Triatoma*, *Panstrongylus* i *Rhodnius* les més freqüentment relacionades amb la transmissió de la MC en humans (15). La seva distribució és àmplia a tot el continent americà i estan adaptats tant a regions selvàtiques com a àrees més seques (16). Donada la seva adaptació a diferents nínxols ecològics, els triatòmits permeten la circulació de *T. cruzi* entre hostes selvàtics, peri-domèstics i domèstics podent afectar a l'ésser humà i dificultant la seva eliminació.

No obstant, existeixen altres vies de transmissió. La transmissió oral es produeix per la ingesta de productes contaminats amb femtes de triatòmits infectats, generalment per sucus o líquids casolans. Tot i que és una via minoritària, es considera re-emergent i característicament cursa en forma de brots amb una mortalitat que ronda el 3-6% (17). Altres formes de transmissió inclouen la transmissió vertical, que es produeix arrel de la infecció congènita transplacentària, així com les transfusions sanguínies (al voltant del 10% dels casos), transplantament d'òrgans, accidents biomèdics a laboratoris o consum de carn d'animals infectats (18).

Degut a la globalització i les migracions internacionals, durant les darreres dècades la MC ha esdevingut una malaltia emergent en regions no-endèmiques, principalment a Europa, Estats Units, Canadà i Àsia. Al 2009, una revisió va estimar entre 68.000 i 122.000 casos a Europa, amb un 95% d'individus no diagnosticats (19). Als Estats Units, un altre estudi va estimar un total de 288.000 infectats (20). Tot i que els processos migratoris són la principal font d'aquests casos, la transmissió vertical així com les infeccions produïdes per donacions són també una via de transmissió possible en zones no endèmiques (18). Per tal de mitigar aquests riscs, s'han implementat programes de cribratge universal en donacions sanguínies i d'òrgans així com

diversos protocols de cribratge de la dona i perinatals (21). No obstant, moltes regions no-endèmiques encara no han implementat aquestes iniciatives (22).

1.2. Formes clíniques: presentació i patogènia

La MC clàssicament s'ha dividit en 2 fases: la fase aguda i la fase crònica. No obstant, l'ús progressiu de diferents tractaments immunosupressors i la irrupció de la pandèmia del VIH han propiciat l'aparició de reactivacions (3)(Figura 3).

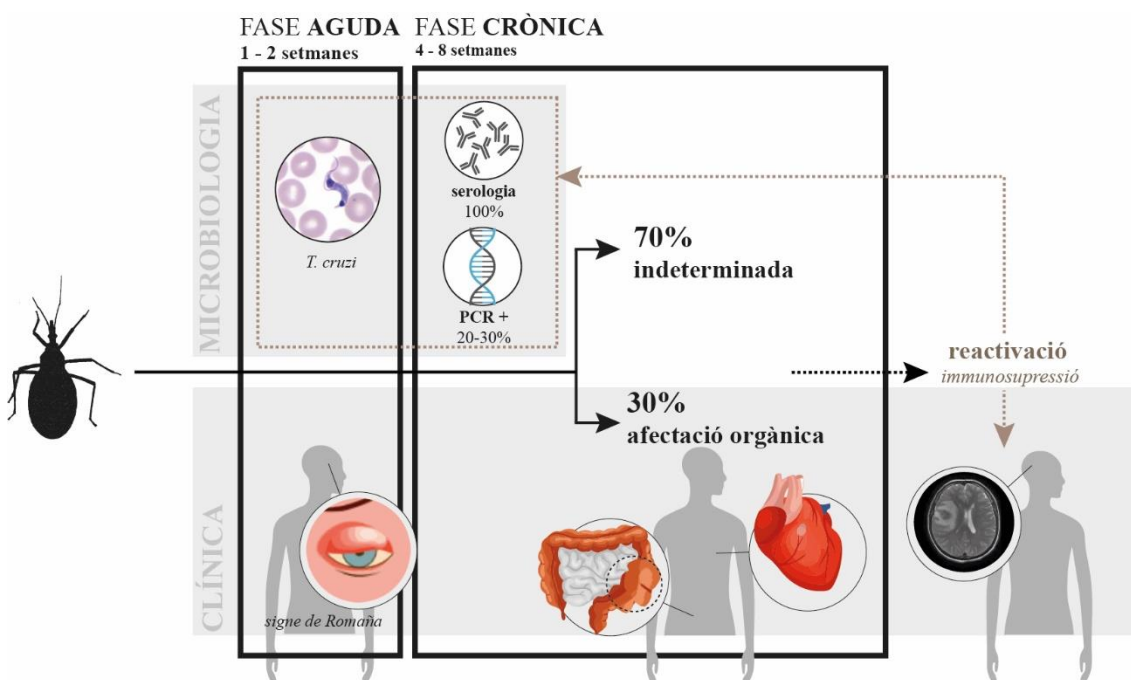


Figura 3. Formes clíniques de la MC

1.2.1. La fase aguda

La fase aguda es produeix com a resultat de l'entrada dels tripomastigots al cos de l'hoste. A nivell clínic, es caracteritza per ser generalment asimptomàtica. En alguns casos però, es poden produir símptomes com la febre, la cefalea, el mal estar, l'aparició d'un xancre d'inoculació per inflamació del lloc d'entrada, l'edema unilateral de la parpella o *signe de Romània*, l'aparició de limfadenopaties o inclús un quadre d'hepatomegàlia i esplenomegàlia. Tot i que generalment aquesta presentació és lleu, en menys d'un 5% dels casos, aquesta fase pot presentar-se de forma greu amb símptomes com la miocarditis aguda, l'embassament pericàrdic o una meningoencefalitis amb una mortalitat del 0.2 – 0.5% (23,24).

Quan la infecció s'adquireix per transfusions de sang o per transplants d'òrgans, la simptomatologia sol ser similar a la presentada en l'adquisició vectorial sense els signes relacionats amb la porta d'entrada. En el cas de la infecció congènita, la majoria d'infants es troben asimptomàtics. Tot i així, en alguns casos s'han reportat puntuacions baixes a l'escala d'Apgar, baix pes o destrés respiratori (25,26). Quan la infecció es produeix per via oral, la presència de símptomes és molt més freqüent arribant quasi a un 98% dels individus. Les artràlgies, dolor abdominal i edema periorbitari bilateral són símptomes relacionats amb aquesta via d'adquisició. A més, la presència de formes severes amb afectació pericàrdica, miocàrdica i neurològica són més habituals amb mortalitats de fins el 50% (27,28).

El període d'incubació pot anar des dels pocs dies en el cas de la transmissió oral fins a algunes setmanes en el cas de la infecció congènita. A nivell microbiològic, la fase aguda es caracteritza per la presència d'una elevada quantitat de tripomastigots en sang. La invasió dels teixits i la seva diferenciació i replicació originen tant un dany directe a nivell orgànic com una resposta inflamatòria aguda. Una vegada iniciats els símptomes, aquesta fase es manté entre 4 i 8 setmanes coincidint amb la disminució progressiva de la parasitemia generalment a partir dels 90 dies si el pacient no rep tractament (29).

1.2.2. La fase crònica

Una vegada resolta la fase aguda, si el pacient no ha sigut tractat, el paràsit evadeix la erradicació esdevenint una infecció crònica. Aquesta fase es caracteritza per la positivitat de les tècniques serològiques i una parasitemia baixa o indetectable. La majoria de les persones infectades no desenvoluparan mai símptomes ni presentaran alteracions a nivell visceral essent per tant el grup majoritari d'individus infectats per *T. cruzi*. Aquesta fase s'anomena fase crònica indeterminada. No obstant, aproximadament un 30-40% dels pacients infectats crònicament, desenvoluparan afectació visceral en forma de cardiopatia chagàsica crònica (CCC), afectació digestiva o mixta durant els 10-30 anys que segueixen a la infecció (3).

La CCC és la forma orgànica més prevalent i que associa major morbiditat i mortalitat essent la causa de 7000 morts cada any. Es calcula una progressió a la forma cardíaca del 1,85% per any (30). Aquesta forma es caracteritza per la presència d'alteracions de la conducció cardíaca i afectacions de la motilitat del miocardi. Clínicament el pacient pot presentar símptomes com dolor toràcic, palpitations, síncope o mort sobtada (31). Quant a les manifestacions de l'electrocardiograma, un dels signes més freqüents són el bloqueig de branca dreta o el bloqueig fascicular anterior esquerre. Altres alteracions associades són les extrasístoles ventriculars, disfunció sinusal, bradicàrdia, fibril·lació auricular, bloquejos aurícula-ventricle i taquicàrdies ventriculars no-sostingudes. En quan a l'afectació miocardiàca, l'aparició d'aneurismes apicals esquerres són freqüents en casos avançats, així com alteracions segmentàries de la motilitat (32).

En alguns casos, els pacients acaben progressant a una miocardiopatia dilatada i insuficiència cardíaca essent la primera causa de transplantament cardíac a l'Amèrica llatina (33). L'avaluació i classificació de la cardiopatia chagàsica s'ha basat clàssicament en l'ús de l'electrocardiograma i la radiografia de tòrax (34). No obstant, la introducció d'altres tècniques com l'ecocardiograma o la ressonància magnètica (RM) han permès la detecció d'alteracions més subtils com les alteracions de la relaxació o els focus de fibrosis endomiocàrdiques (35). La disfunció ventricular, els estadis III i IV de la *New York Heart Association* (NYHA), la cardiomegàlia i la taquicàrdia ventricular no sostinguda són els factors que més clarament s'han associat amb un mal pronòstic d'aquests pacients (36).

L'afectació digestiva és l'altra manifestació que afecta un 10-21% dels individus i ocorre més freqüentment als països del con sud (37). La MC afecta predominantment a esòfag, còlon o ambdós com a resultat del dany del sistema nerviós autònom a nivell intramural. Les manifestacions clíniques esofàgiques van des d'alteracions asimptomàtiques de la motilitat fins al megaesòfag. L'afectació del còlon es manifesta per un estrenyiment progressiu que pot arribar a ser molt greu amb aparició de megacòlon (38).

Tot i que existeixen diverses teories dels mecanismes patogènics, avui en dia s'accepta que la forma crònica i les seves manifestacions són resultat de interrelació entre la persistència del paràsit i la resposta immunològica de l'hoste (39). En relació al rol de la persistència de *T. cruzi*, diversos estudis han evidenciat que l'afectació visceral es troba relacionada amb la persistència del paràsit en aquests òrgans (40). A més, s'ha descrit l'associació entre alguns llinatges filogenètics i el tropisme per diferents teixits (41). En termes de resposta immunitària de l'hoste, destaca el paper de la immunitat innata amb l'alliberació de citocines, espècies reactives a l'oxigen i l'estrès oxidatiu (42-44). Quant a la immunitat adaptativa, s'ha observat la producció de diferents auto-anticossos i autoantígens que reaccionen de forma creuada amb els antígens de *T. cruzi* (45).

1.2.3. Les reactivacions

Les reactivacions de la MC responen a la proliferació i moltes vegades a la reparació al torrent sanguini de tripomastigots secundàriament a un estat d'immunosupressió. Des de finals de la dècada dels 80 s'han descrit casos de reactivació secundàries a VIH (46). Aquesta es dona sobretot en pacients amb estats d'immunosupressió severa amb recomptes de CD4 per sota de 100cèl/mm³. Clínicament es solen presentar amb afectació del sistema nerviós central (SNC) tant en forma de lesió ocupant d'espai (chagoma) com en forma de meningoencefalitis (75-80% dels casos). Altres afectacions menys freqüents son la miocarditis (10-55%), cervicitis, peritonitis o nòduls subcutanis. La mortalitat d'aquestes reactivacions és alta i pot arribar a superar el 75% dels casos (47).

Una altra presentació a tenir en compte és la reactivació en pacients trasplantats. El risc és diferent en funció de l'òrgan trasplantat. Mentre que el risc en pacients trasplantats de fetge és del 1,8%, el risc en trasplantament de cor pot arribar al 31%. En aquests casos tot i que s'ha demostrat una supervivència similar als trasplantats per altres causes, les reactivacions no són infreqüents i generalment es presenten en forma de miocarditis, panniculitis o nòduls subcutanis (48). Finalment, s'han descrit casos de reactivació en pacients amb neoplàsies hematològiques i amb malalties sistèmiques autoimmunes, essent aquestes molt menys freqüents (3).

1.3. Diagnòstic i seguiment de les persones amb Malaltia de Chagas

1.3.1. Tècniques diagnòstiques

A la fase aguda de la malaltia el diagnòstic es realitza principalment amb tècniques basades en la detecció del paràsit. La tècnica clàssicament més emprada és la visualització directa dels tripomastigots a nivell sanguini amb sensibilitats que van del 34 al 85%. Per tal d'augmentar aquesta sensibilitat es poden emprar mètodes de concentració com el microhematòcrit o la tècnica de *Strout* arribant a sensibilitats de fins el 95% (49).

Existeixen també tècniques parasitològiques indirectes per al diagnòstic de la MC. La reacció en cadena de la polimerasa o PCR és una tècnica que permet detectar àcid desoxiribonucleic (ADN) parasitari en sang. No obstant, encara existeixen moltes incògnites en relació a la dinàmica del paràsit (50). Mentre que a la fase aguda la presència de *T. cruzi* a la sang i per tant també la detecció per PCR és una constant, a la fase crònica aquesta presència és habitualment de baix nivell i només detectable en un subgrup de pacients (51). A dia d'avui, existeixen diferents tècniques de PCR per la detecció del ADN parasitari. Aquestes, han millorat la sensibilitat i especificitat de les tècniques clàssiques com el cultiu o el xenodiagnòstic (52). No obstant, la obtenció de la mostra, la conservació, el volum, el mètode d'extracció de l'ADN o la seqüència utilitzada poden fer variar els resultats. Aquest fet ha dificultat l'estandardització de les tècniques per tal d'obtenir resultats comparables i reproduïbles (53). Tot i així, en els darrers anys s'han produït avanços notables en la metodologia emprada, permetent la monitorització del paràsit en situacions d'immunosupressió i fer-ne ús de forma protocol·lària en el diagnòstic de la infecció congènita utilitzant-la com a marcador subrogat de fracàs terapèutic (54).

De totes maneres, a la fase crònica de la malaltia i a la infecció congènita una vegada han transcorreguts 9 mesos des del naixement, el diagnòstic de la MC es basa en les tècniques serològiques (immunofluorescència indirecta, hemaglutinació indirecta o *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) (55). Aquestes utilitzen antígens parasitaris complets o extractes

purificats (tests convencionals) i antígens recombinats o pèptids sintètics (test no-convencionals). Donat que no existeix un únic test de referència, per confirmar el diagnòstic de la MC cal la detecció de IgG utilitzant almenys 2 tècniques serològiques diferents que es dirigeixin contra antígens diferents (56).

1.3.2. Seguiment i possibles marcadors pronòstics

A dia d'avui l'únic criteri de curació validat és la negativització de les tècniques serològiques convencionals. En adults en la fase crònica, aquest fet es dona habitualment 10-20 anys després del tractament (57). Per aquest motiu, es recomana fer un seguiment a llarg termini de les persones infectades per *T. cruzi*.

No obstant, aquest seguiment prolongat i les exploracions derivades podrien ser innecessàries en aquells pacients que romandran en fase crònica indeterminada. Per aquest motiu, una de les principals necessitats en el maneig de la MC és disposar de marcadors precoços tant de progressió a formes orgàniques com de cura (58). Durant els darrers anys aquesta línia d'investigació ha estat notablement prolífica. S'han identificat diferents marcadors amb potencial tant a nivell individual com de forma combinada utilitzant tècniques serològiques, antígens parasitaris i de l'hoste, marcadors immunològics o genètics (59–62). Per desgràcia, a dia d'avui encara no n'existeix cap que estigui validat en l'ús clínic diari.

1.4. Tractament de la Malaltia de Chagas

1.4.1. Tractaments actuals: Benznidazol i Nifurtimox

A dia d'avui, l'arsenal terapèutic es limita als derivats nitroimidazòlics benznidazol i nifurtimox.

El benznidazol va ser descrit per primera vegada a finals dels anys 60s (63). Des del 1971 s'utilitza en humans per al tractament de la MC. Després d'estudis tant pre-clínic com clínic en què s'usava per al tractament de la fase aguda i la crònica de la malaltia, va esdevenir el tractament d'elecció en ambdues situacions (64). El benznidazol és una pro-droga activada per la nitro-reductasa del tripanosoma actuant en totes les fases del cicle. D'eliminació predominantment renal té una biodisponibilitat del 90% seguint un model d'un sol compartiment. Després d'una dosi, arriba a la concentració pic a les 3.5h i té una semi-vida de 12.1h (65).

El nifurtimox és un derivat del nitrofuran que es va utilitzar per primera vegada al 1969 (66). Metabolitzat per les nitro-reductases, produeix radicals lliures que provoquen el dany sobre *T. cruzi*. Amb un primer pas metabòlic hepàtic amb implicació del citocrom P-450, l'excreció renal és inferior a l'1%. El seu pic a plasma es produeix a les 2h i presenta una semi-vida de 2.95h (67).

1.4.1.1. *Indicacions*

El tractament parasiticida està sempre indicat en els pacients en fase aguda independentment de la via de transmissió. No hi ha assajos clínics que comparin benznidazol vs. nifurtimox però generalment es prefereix el primer per la seva millor tolerància i penetració a teixits. A més d'evitar la progressió a formes més greus, reduir els símptomes i aclarir la parasitèmia, el tractament ha demostrat assolir la curació serològica de fins al 100% dels casos congènits i fins al 76% dels casos aguts (68,69).

A la fase crònica en canvi, la seva utilitat i eficàcia són més controvertides. En general s'ofereix als individus en fase crònica indeterminada, especialment en menors de 18 anys i en aquells amb afectació orgànica lleu-moderada. En aquesta situació hi ha estudis observacionals que han demostrat un millor pronòstic dels pacients tractats en relació al desenvolupament de la cardiopatia associada a MC (70,71). En canvi, en aquells pacients amb afectació orgànica avançada, el tractament amb benznidazol sembla ser fútil. De fet, a l'assaig clínic BENEFIT el benznidazol no va mostrar benefici en quan a nous esdeveniments cardíacs ni en termes de supervivència (72). Pel que fa a la eficàcia, mentre que en el cas de menors de 13 anys la taxa de curació pot arribar a ser del 94%, en adults aquesta es queda entre un 2-40% (73,74). Un altre grup en el que el tractament es troba especialment indicat són les dones en edat de gestació. El tractament parasiticida ha demostrat una clara efectivitat en la interrupció de la transmissió vertical quan es tracten abans de la concepció (75).

Finalment, en els casos de reactivació el tractament està clarament indicat tant per reduir els símptomes aguts com per millorar el pronòstic vital. En els casos de pacients trasplantats, no s'ha demostrat que la profilaxis amb benznidazol sigui eficaç per prevenir la reactivació. En general es recomana un seguiment de la parasitèmia de forma estreta per tal de diagnosticar de forma precoç la reactivació i aleshores iniciar el tractament (76). En el cas dels pacients amb VIH a més d'un seguiment estret i el tractament precoç, es sol recomanar una profilaxis secundària fins que el recompte de CD4 supera les 200 cèl·lules/mm³ (47). En aquest perfil de pacients s'ha estès l'ús de la PCR per a la detecció del fracàs del tractament. Quan aquesta és positiva i la indicació de tractament no ha variat, es recomana habitualment repetir el tractament amb el mateix fàrmac o amb l'alternatiu així com valorar allargar la durada (77).

1.4.1.2. Perfil de seguretat del Benznidazol

Una de les característiques del tractament amb nitroimidazols és la mala tolerància que generalment mostren els individus tractats. S'ha observat que entre el 40 i el 98% de les persones que reben benznidazol presenten algun efecte advers (EA), essent aquests més freqüents en adults que en infants. Com a conseqüència, entre un 9 i un 30% dels pacients acaben interrompent el

tractament (78–81). Generalment, aquests efectes són de característiques lleus o moderades i reversibles però fins a un 3% dels individus presenten reaccions adverses severes (82).

Cronològicament els efectes secundaris més precoços són a nivell digestiu. Poden aparèixer durant els primers dies de tractament i es solen presentar en forma de nàusea, dispèpsia i en alguns casos vòmits tot i que habitualment són lleus i auto-limitats. Entre el dia 10 i 15 després de l'inici del tractament és quan més freqüentment apareixen les alteracions dermatològiques. Aquestes són els efectes secundaris més habituals i per la seva intensitat o persistència, els que més implicacions tenen en el maneig d'aquests pacients. Tot i que generalment són moderats i es presenten en forma de prurit i/o erupció exantèmica, en <1% dels casos la reacció pot ser molt greu i presentar-se en forma de síndrome de DRESS (reacció farmacològica amb eosinofília i símptomes sistèmics) (81). També al voltant de la segona setmana de tractament és quan poden aparèixer les afectacions hematològiques. Les alteracions més freqüent són la neutropènia i la limfopènia. Tot i que generalment són lleus i auto-limitades, en alguns casos ja sigui per la persistència o per la intensitat, obliguen a la suspensió del tractament. A nivell analític també destaca l'elevació dels enzims hepàtics, més freqüent al voltant del mes de tractament. Generalment són elevacions lleus o moderades que s'acaben auto-limitant però obliguen a fer un seguiment analític per detectar aquells casos en que aquesta progressa. Un altre EA que es presenta al voltant del mes de tractament és l'afectació articular, ja sigui en forma d'artritis o artràlgies. Tot i que a vegades precisen de tractament simptomàtic, poques vegades són causa de suspensió. Finalment, tot i ser infreqüents i aparèixer de forma tardana al voltant dels 40 dies, alguns pacients presenten símptomes neurològics com les parestèsies o la disgèusia, requerint moltes vegades la suspensió del tractament. Més enllà d'aquestes manifestacions, s'han descrit de forma més aïllada trastorns de la son, ansietat, depressió, trastorns menstruals, disfunció erèctil o inclús broncospasme (83).

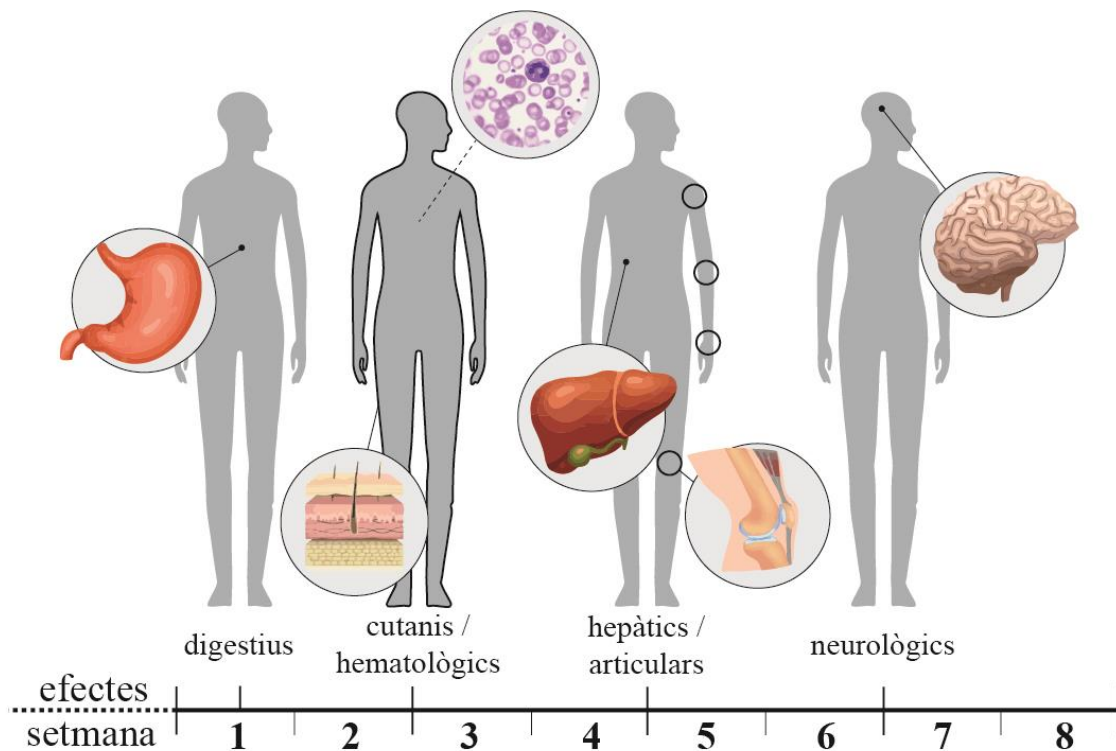


Figura 4. Cronologia efectes secundaris Benznidazol. Imatge pròpia.

1.4.2. Noves teràpies

Els avenços en malaltia de Chagas, igual que en altres malalties desateses han estat històricament lents per la manca d'inversió. A més, les incògnites que segueixen existint sobre el metabolisme del paràsit, la interacció amb l'hoste així com l'enorme variabilitat del mateix han dificultat el descobriment de noves molècules. Tanmateix, els avenços en el coneixement del paràsit com les millores tecnològiques en el procés de descobriment de nous fàrmacs han permès la identificació de noves dianes i de nous compostos (84). Durant els darrers anys s'han provat diferents famílies farmacològiques: inhibidors del metabolisme de la tripanotona, inhibidors de les proteases de la cisteïna, anàlegs de lisofosfolípids i derivats dels bis-triazols entre d'altres. No obstant, els resultats en model animal han parat el seu desenvolupament clínic ja fos per una manca d'eficàcia o pel perfil de toxicitat.

En els últims anys, s'ha aprovat un nou nitroimidazol per la tripanosomiasis africana, el fexinidazol. Tot i les esperances dipositades, els resultats publicats en malaltia de Chagas no han estat molt favorables, tant a nivell de seguretat com d'eficàcia (85). No obstant, existeixen altres compostos amb activitat tripanocida que ja es troben en fase clínic. Per una banda els derivats de l'oxaborol com l'AN15368, que ha demostrat bons resultats tant d'eficàcia com de seguretat en primats; i el DNDi-6148, una molècula en desenvolupament pel tractament de la Leishmaniosis

amb efecte sobre *T. cruzi* del que s'ha iniciat un assaig clínic fase I. I per altra banda, els inhibidors del proteasoma com LXE408 que han demostrat eficàcia per *T. cruzi*, *T. brucei*, *Leishmania donovani* i *Leishmania infantum* i del que també s'ha iniciat un assaig clínic fase I per al tractament de la Leishmània (84).

1.4.3. Optimització de les teràpies actuals

Donat que els terminis per tal d'aprovar i comercialitzar un nou compost són generalment molts llargs, una de les línies d'investigació més importants a la MC en els darrers anys ha estat la d'optimitzar els tractaments dels que disposem.

1.4.3.1. *Ús de biomarcadors per predir toxicitat*

En un estudi previ del nostre grup, es van analitzar 54 pacients tractats amb benznidazol, dels quals 20 (38.5%) van presentar una reacció cutània. D'aquests es va determinar el perfil de citocines i una mostra histopatològica de la regió afectada, establint-se que es tractava de reaccions retardades d'hipersensibilitat no mitjançada per IgE (86).

En els darrers anys, les reaccions retardades d'hipersensibilitat a diferents fàrmacs s'han relacionat amb antígens leucocitaris humans (HLA) de classe I específics. El locus que codifica per els HLA és un gen que presenta un alt polimorfisme amb més de 25.000 variants al·lèliques identificades (87). La identificació d'aquests polimorfismes ha permès establir estratègies de prevenció. Un exemple àmpliament estès a la pràctica clínica és la determinació de l'al·lel HLA-B*57:01 abans del tractament de persones infectades pel virus de la immunodeficiència humana. Aquesta estratègia que ha permès reduir dràsticament la incidència de reaccions d'hipersensibilitat a l'abacavir (88).

Tornant a l'estudi esmentat anteriorment, es va fer un anàlisi dels gens HLA, tant de classe I com de classe II, de tots els participants inclosos. Tot i que cap al·lel es va relacionar amb l'aparició o no de la reacció d'hipersensibilitat, la interrupció del tractament (incloent reaccions moderades i severes) va ser més freqüent en aquells pacients portadors de l'al·lel HLA-B*35:05 (45% vs. 15.4%; p 0.03) (86). Aquests resultats obrien la porta a una nova estratègia per detectar aquells pacients amb major risc, però el nombre de pacients inclosos era baix per obtenir conclusions robustes.

1.4.3.2. *Nous esquemes terapèutics*

Durant els darrers anys, un dels grups farmacològics més estudiats per al tractament de la MC han estat els derivats triazòlics. Desafortunadament, en els diferents assajos clínics publicats tant amb posaconazol com amb una pro-droga del ravuconazol, la monoteràpia amb aquests fàrmacs va demostrar taxes de negativització parasitària clarament inferiors a benznidazol. Tot i així es va

plantejar la possibilitat d'optimitzar l'actual tractament amb benznidazol combinant-lo amb aquests principis. Els assajos clínics STOP-CHAGAS i BENDITA van incloure branques de tractament en què es combinava benznidazol amb posaconazol i fosravuconazol respectivament (89,90). En els dos estudis, la teràpia combinada no aportava cap benefici en termes d'eficàcia.

Una altra de les qüestions actualment discutides és la durada i la dosi dels tractaments actuals amb benznidazol. Models matemàtics basats en estudis farmacocinètics tant pediàtrics com d'adults mostraven com dosis menors durant el mateix temps podrien mantenir eficàcies similars als tractaments actuals. A l'estudi pediàtric, els nens eren tractats amb la dosi estàndard, però arribaven a concentracions menors respecte als adults, sense que això suposés una pèrdua d'eficàcia (91). Per altra banda, l'estudi realitzat en adults insinuava que les dosis actuals de 5mg/Kg/dia podien suposar una sobreexposició al fàrmac, ja que dosis de 2.5mg/Kg/dia mantenien les concentracions de benznidazol en sang dins del rang recomanat (92).

Pel que fa a la reducció del temps, estudis realitzats amb model murí, mostraven com règims de tan sols un 25% de la durada estàndard, aconseguien taxes de resposta similar (93). Tot i que quan vam dissenyar el nostre treball mai s'havia avaluat aquesta estratègia en assajos clínics, estudis observacionals de la pràctica clínica diària ja observaven que aquells pacients que havien d'interrompre el tractament per EAs, presentaven taxes de seroconversió similars a les observades en individus tractats correctament. De fet, a l'estudi de *Viotti et al.* un 20% dels adults seguits durant 10 anys després d'haver rebut un tractament incomplet amb una mediana de només 10 dies, assolien criteris de curació (94). L'assaig clínic BENDITA, que va incloure individus bolivians amb malaltia de Chagas en fase crònica indeterminada, va establir 2 braços de tractament més curt: dosis de 150mg al dia durant 30 dies o 300mg al dia durant 15 dies. Aquests resultats, publicats recentment, han mostrat taxes no-inferiors en termes de negativització parasitària sostinguda a 12 mesos respecte al tractament estàndard de 60 dies, millorant la tolerància i conseqüentment l'adherència al tractament (90).

Tot i que contradictori amb alguns estudis previs, hi ha estudis in vitro que quantifiquen el temps requerit per eliminar els paràsits (anàlisi temps fins a mort) que mostren com els compostos nitroheterocíclics com el benznidazol són dosis dependents, al contrari dels triazols. Per aquest motiu, ja s'han utilitzat dosis més altes en assajos clínics sense que s'hagi observat un augment en els EAs (89,95). Això obre les portes a utilitzar dosis més elevades de les habituals per tal d'optimitzar-ne al màxim l'efectivitat.

2. JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI I HIPÒTESI DE TREBALL

2. Justificació de l'estudi i hipòtesi de treball

A dia d'avui, el tractament de la MC segueix restringit al benznidazol i nifurtimox. A banda de les consideracions en quan a l'eficàcia clínica i com es mesura aquesta, a nivell parasitari cap altre fàrmac ha demostrat ser superior. No obstant, el perfil de seguretat dista molt de ser òptim amb aparició d'efectes adversos de forma molt freqüent i taxes molt elevades d'abandonament.

Per tant, a l'espera de nous biomarcadors que permetin seleccionar aquells pacients amb major risc de progressió i de nous tractaments que ofereixin un millor perfil d'eficàcia i seguretat, una de les principals línies d'investigació és la d'optimitzar els tractaments actuals. En aquest sentit hem vist com en els últims anys s'han proposat diferents estratègies. Per una banda, i seguint amb la línia de la determinació dels al·lels de l'HLA, una opció és buscar biomarcadors que ens permetin seleccionar aquells pacients amb millor perfil risc/benefici. Per altra banda, i tenint en compte la informació obtinguda en estudis previs, sembla raonable explorar nous règims que ofereixin alguna millora en relació a l'efectivitat, la seguretat o el seguiment dels pacients tractats amb benznidazol.

En aquest sentit les hipòtesis del nostre treball són:

- Que l'HLA-B*35:05 es relaciona amb el desenvolupament de reaccions cutànies d'hipersensibilitat moderades o greus en relació a l'ús del benznidazol i que per tant es podria utilitzar per predir la seva aparició.
- Que la modificació de l'esquema terapèutic actual amb benznidazol per la MC en fase crònica, ja sigui reduint la dosi diària (150mg/dia durant 60 dies) o reduint la durada del tractament amb dosis més altes (400mg/dia durant 15 dies) milloraran l'adherència al tractament amb una menor toxicitat i taxes de resposta similars a les del règim estàndard.

2. Justificació de l'estudi i hipòtesi de treball

3. OBJECTIUS

3. Objectius

3.1. Objectiu principal

Optimitzar l'ús del tractament amb benznidazol per al tractament de les persones amb malaltia de Chagas en fase crònica utilitzant biomarcadors com a predictors de toxicitat i explorant nous esquemes terapèutics per millorar-ne la tolerància.

3.2. Objectius secundaris

- Confirmar de forma prospectiva l'associació de l'HLA-B*35:05 i l'aparició de reaccions d'hipersensibilitat cutània moderada o greu amb l'ús de benznidazol pel tractament dels adults en fase crònica de la MC.
- Descriure altres factors de risc de presentar reaccions d'hipersensibilitat cutània amb l'ús de benznidazol pel tractament dels adults en fase crònica de la MC.
- Explorar l'eficàcia i tolerància de 2 nous règims de benznidazol i comparar-lo amb el tractament estàndard per al tractament dels adults en fase crònica de la MC.
- Avaluar la resposta terapèutica en funció de l'origen geogràfic dels individus com aproximació a la resposta dels diferents llinatges de *T. cruzi*.

3. Objectius

4. COMPENDI DE PUBLICACIONS

4.1. Article 1

* Bosch-Nicolau P, Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Franco-Jarava C, Arrese-Muñoz I, Sulleiro E, Roure S, Valerio L, Oliveira-Souto I, Serre-Delcor N, Pou D, Treviño B, Aznar ML, Espinosa-Pereiro J, Molina I. Association of HLA-B*35 and moderate or severe cutaneous reactions secondary to benznidazole treatment in chronic chagas disease. *Clin Microbiol Infect.* 2022 Jun;28(6):881.e1-881.e5. doi: 10.1016/j.cmi.2021.11.021. Epub 2021 Dec 1. PMID: 34863919.

Clinical Microbiology and Infection 28 (2022) 881.e1–881.e5



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: www.clinicalmicrobiologyandinfection.com



Original Article

Association of HLA-B*35 and moderate or severe cutaneous reactions secondary to benznidazole treatment in chronic chagas disease

Pau Bosch-Nicolau^{1,2,**}, Fernando Salvador¹, Adrián Sánchez-Montalvá¹, Clara Franco-Jarava³, Iria Arrese-Muñoz³, Elena Sulleiro⁴, Silvia Roure^{5,6}, Lluís Valerio⁵, Inés Oliveira-Souto¹, Núria Serre-Delcor¹, Diana Pou¹, Begoña Treviño¹, María L. Aznar¹, Juan Espinosa-Pereiro^{1,2}, Israel Molina^{1,2,*}

¹ Tropical Medicine & International Health Unit Vall D'Hebron—Drassanes, Infectious Diseases Department, PROSICS Barcelona, University Hospital Vall D'Hebron, Barcelona, Spain

² Medicine Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

³ Immunology Department, University Hospital Vall D'Hebron, Barcelona, Spain

⁴ Microbiology Department, University Hospital Vall D'Hebron, Barcelona, Spain

⁵ North Metropolitan International Health Unit, PROSICS Metropolitana Nord, Badalona, Spain

⁶ Infectious Diseases Department, Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 August 2021

Received in revised form

9 November 2021

Accepted 18 November 2021

Available online 1 December 2021

Editor: E. Bottieau

Keywords:

Benznidazole
Chagas disease
Cutaneous hypersensitive reactions
Human leucocyte antigen
Pharmacogenetics

ABSTRACT

Objectives: Benznidazole is the first-line treatment for Chagas disease. Adverse events appear in more than 50% of patients, leading to discontinuation in approximately 15%. Cutaneous reactions are one of the most frequent adverse events. Human leucocyte antigen (HLA) genotyping studies identified an association between cutaneous reactions to benznidazole and carrying the specific allele HLA-B*35:05. We designed the present study to prospectively confirm this association.

Methods: This is a prospective observational study including Chagas disease patients aged 18 years or more who accepted to receive benznidazole treatment following current guidelines. Allele genotyping of HLA-B was determined in all patients. Clinical and analytical follow up was performed at days 0, 7, 14, 30 and 60 of treatment.

Results: Two-hundred and seven individuals were included. Seventy per cent were female with a mean age of 45.1 (SD ± 9.86) years mainly from Bolivia (92.8%). In 102 (49.3%) cases a cutaneous reaction was diagnosed. Forty-eight (46.6%) were classified as mild, 37 (35.9%) as moderate and 18 (17.5%) as severe. Thirty-two (15.4%) patients had to definitively interrupt the treatment because of a cutaneous reaction. Female sex (OR 4.49; 95% CI 1.62–12.47), new-onset eosinophilia before cutaneous symptoms (OR 2.55; 95% CI 1.2–5.43) and carrying the HLA-B*35 allelic group (OR 2.58; 95% CI 1.2–5.51) were all predictors of moderate to severe cutaneous reactions. No statistical significance was found when the specific allele HLA-B*35:05 was analysed.

Conclusions: Patients carrying the HLA-B*35 allelic group are at higher risk of moderate to severe reactions when taking benznidazole treatment. **Pau Bosch-Nicolau, Clin Microbiol Infect 2022;28:881.e1–881.e5**

© 2021 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author: Israel Molina, Infectious Diseases Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Passeig Vall d'Hebron 119–129, 08035, Barcelona, Spain.

** Corresponding author: Pau Bosch-Nicolau, Infectious Diseases Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Passeig Vall d'Hebron 119–129, 08035, Barcelona, Spain.

E-mail addresses: pbosch@vhebron.net (P. Bosch-Nicolau), imolina@vhebron.net (I. Molina).

<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.11.021>

1198-743X/© 2021 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Chagas disease (CD) is a parasitic disease caused by *Trypanosoma cruzi*, a zoonotic infection mainly found in endemic areas of 21 countries of the American continent [1]. It is estimated that about 8 million people are infected and about 75 million people are at risk of acquiring the infection [2].

Only two treatments are currently approved for CD: benznidazole and nifurtimox, of which benznidazole is the most commonly used [3,4]. Even though opinions about its usefulness in the chronic phase are controversial, some observational studies have found a better clinical prognosis in preventing progression of Chagas-associated cardiomyopathy [5,6]. Furthermore, the effectiveness of benznidazole in interrupting vertical transmission in child-bearing mothers has also been demonstrated [7]. As a consequence, parasitocidal treatment is usually offered to patients in the chronic phase, with special emphasis in childbearing women and patients without Chagas-associated cardiomyopathy [8]. Unfortunately, benznidazole is associated with adverse events (AEs) in more than 50% of adults treated, leading to a 9%–30% of discontinuations [9–11].

In recent years, delayed hypersensitivity reactions for many different drugs have been linked to a specific human leucocyte antigen (HLA) class I leading to prediction and prevention strategies. The locus codifying for HLA presents a high polymorphism with >25 000 allelic variants identified (HLA.alleles.org) [12]. For example, the determination of HLA-B*57:01 before treatment in individuals infected with human immunodeficiency virus drastically reduced the incidence of abacavir hypersensitivity reactions. Based on these considerations, our group published a prospective study where the cytokine profile and HLA alleles of 52 patients treated with benznidazole were analysed. Patients carrying the HLA-B*35:05 allele were at higher risk of moderate to severe cutaneous reactions compared with patients not carrying this specific allele (45% versus 15.4%; p 0.03) [13].

We designed this prospective study to confirm the association between the allele HLA-B*35:05 and the development of a moderate or severe cutaneous reaction.

Materials and methods

Study design and inclusion criteria

We conducted a prospective observational study from January 2016 to August 2017 at two international health centres: Vall d'Hebrón—Drassanes International Health Unit (Barcelona, Spain) and North Metropolitan International Health Unit (Badalona, Spain), both of which are included in the International Health Programme of the Catalan Health Institute (PROSICS).

We included individuals who were 18 years or older with a diagnosis of CD who had accepted benznidazole treatment following the current recommendations. Diagnosis was based on two positive serological tests according to World Health Organization recommendations [2]: an ELISA with recombinant antigen (Bioelisa Chagas, Biokit, Lliçà d'Amunt, Spain) and an ELISA with crude antigen (Ortho *T. cruzi* ELISA, Johnson & Johnson, High Wycombe, UK). Patients with eosinophilia at baseline evaluation were screened for other parasitic diseases and treated before inclusion. We excluded patients who received previous treatment for CD, patients under immunosuppressive treatment and those with renal or liver diseases.

Study population and definitions

Cardiac and gastrointestinal involvement was evaluated through physical examination, 12-lead electrocardiography, chest radiography and barium enema. Kuschnir classification was used to grade chagasic cardiomyopathy. A PCR to detect *T. cruzi* DNA in peripheral blood was performed before starting treatment in all patients according to the method described by Piron et al. [14].

Although there is no consensus on treating patients with organ involvement, we offered anti-parasitic therapy to all participants.

All included patients were treated with benznidazole at a dose of 5 mg/kg/day divided into two or three doses for 60 days. During benznidazole treatment, patients were scheduled for follow up at 7, 15, 30 and 60 days for blood test and clinical evaluation to monitor possible AEs. Furthermore, participants were informed to come to clinic or emergency department in case of unexpected AEs. Blood tests for cell count and general biochemistry were performed at each visit. New-onset eosinophilia before cutaneous symptoms was defined as an eosinophil count above 500 cells/mL or 5% not present at baseline evaluation that appeared any moment before cutaneous symptoms onset. HLA B allele genotyping was performed in all patients.

Cutaneous reactions were pooled according to a predefined classification. Mild cutaneous reactions were those with pruritus as the only symptom or those with skin rash involving less than 40% of the body surface area; treatment recommendation included antihistaminic drugs and moisturizing skin cream. Moderate cutaneous reactions were those with a skin rash involving more than 40% of the body surface area or any skin lesions treated with corticosteroids or those that required temporary treatment discontinuation. Severe cutaneous reactions were those with extensive skin involvement and systemic symptoms (fever, lymphadenopathy), DRESS (Drug Rash with Eosinophilia and Systemic symptoms) syndrome, Stevens–Johnson syndrome or Lyell syndrome or those cases where treatment was definitively interrupted after a physician assessment.

HLA typing

HLA typing was performed at the basal determination and blinded for the treating physicians. Genomic DNA was isolated from peripheral whole blood of the patients following the protocol instructions of manual extraction QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Quantity and purity of the obtained DNA was determined with the spectrophotometer Colibrí (Titertek-Berthold, Pforzheim, Germany). HLA typing was performed using sequence-specific oligonucleotides to identify all the HLA-B alleles present in a PCR-amplified sample. LIFECODES HLA-SSO for HLA-B Typing kits (Immucor Spain, Cerdanyola del Vallès, Spain) were performed following the manufacturer's instructions using Lumindex xMAP technology [15].

Sample size calculation and statistical analysis

Considering the results previously reported by our group, we expected a prevalence of 35% of HLA-B*35:05 in our population. We calculated that we would need to enrol 201 patients for the study to have a statistical power of 80% to detect a difference in cutaneous reactions of 20% in the HLA-B*35:05-positive group compared with the HLA-B*35:05-negative group with a two-sided significance level of 5%. Losses to follow up before starting the treatment and voluntary treatment interruptions during the first week unrelated to AEs were excluded from the analysis and replaced to reach the calculated sample size.

Categorical variables were expressed as absolute numbers and percentages, and numerical data were expressed as the mean \pm SD for variables with a normal distribution or the median and interquartile range for those with a skewed distribution. Categorical variables were compared with the χ^2 test or Fisher exact test and continuous variables with the Student's *t* test or the Mann–Whitney *U* test depending on the distribution. Univariate logistic regression models were used to calculate unadjusted ORs. Variables with a significance of $p < 0.1$ on univariate analysis were included in the multivariate logistic regression analysis. Models were performed in a sequential fashion beginning with the variable

most strongly associated. A two-sided $p < 0.05$ was considered statistically significant. SPSS software for Windows (Version 19.0; SPSS Inc, Chicago, IL, USA) was used for statistical analyses.

Ethics statement

The study was approved by the Ethics Committee of Vall d'Hebron Research Institute with the registration code: VHI-BEN-2016-01 and written informed consent was obtained from all patients.

Results

Baseline characteristics

A total of 223 patients with CD who fulfilled the inclusion criteria were asked to participate in the study. Sixteen patients were withdrawn from the analysis: 13 patients were lost to follow up before starting treatment, and three patients stopped the treatment after 5 days by their own decision without presenting any AE. Overall, 207 patients were included in the analysis, 145 (70%) were female and the mean age was 45.1 (SD \pm 9.86) years. Most of the patients (192; 92.8%) were originally from Bolivia, four (1.9%) were from Paraguay, four (1.9%) from El Salvador, four (1.9%) from Argentina, two (1%) from Honduras and one (0.5%) from Uruguay, with a median arrival time to Spain of 10 (9–12) years. When we assessed organ involvement, 32 (15.5%) had chagasic cardiomyopathy: 28 (13%) were classified as Kuschnir 1, 3 (1.4%) as Kuschnir 2 and 1 as (0.5%) Kuschnir 3. Twenty-seven (13.1%) patients presented gastrointestinal involvement, 19 (9.2%) had a dolichosigma, 6 (2.9%) a dolichocolon and 2 (1%) a megacolon. *Trypanosoma cruzi* quantitative PCR was performed in 191 patients, 64 (33.5%) of which had a positive result.

Benznidazole adverse events and treatment duration

During treatment with benznidazole, 148 (71.5%) patients had at least one AE. Benznidazole-related AEs are shown in Table 1. Cutaneous adverse effects affected 102 (49.3%) patients. Forty-seven (46.1%) were classified as mild, 37 (36.3%) as moderate and 18 (17.6%) as severe. All moderate to severe reactions presented erythematous maculopapular confluent rash with symmetric distribution. None of the patients had DRESS syndrome criteria, Stevens–Johnson syndrome or toxic epidermal necrolysis syndrome. The initial management of patients presenting a mild reaction compared with those having a moderate to severe reaction was: spontaneous resolution in 27 (57.5%) versus two (3.6%) patients; antihistaminic treatment in 17 (36.2%) versus 21 (38.2%) patients; combined treatment including antihistaminic and corticosteroids in one (2.1%) versus five (9.1%) participants, temporary withdrawal and reintroduction with progressive doses of benznidazole in two (4.2%) versus nine (16.4%) patients and definitive withdrawal in 0 versus 18 (32.7%).

Overall, 59 (28.5%) patients permanently discontinued benznidazole treatment. In 32 (54.2%) of them, treatment was interrupted by their treating physician because of a cutaneous reaction, including 18 patients who presented a cutaneous reaction that led to definitive withdrawal, nine patients previously treated with antihistaminic therapy, three patients treated with combined therapy of antihistaminic and corticosteroids and two patients who relapsed after a reintroduction with progressive doses of benznidazole. Other AEs were responsible for six (10.2%) discontinuations: two patients presented peripheral neuropathy, two developed neutropenia, one developed a transaminase elevation and one presented arthralgia. In the remaining 21 (35.6%) patients, treatment interruption was a patient decision after the appearance of mild AEs.

Table 1
Benznidazole-related adverse events

Adverse events	Patients, n (%) (n = 207)	Time of appearance (days), median (IQR)
Cutaneous reactions	102 (49.3)	13 (8–30)
Severity		
Mild	47 (46.1)	
Moderate	37 (36.3)	
Severe	18 (17.6)	
Characteristics		
Rash and pruritus	55 (26.6)	
Pruritus	31 (15)	
Extended rash	5 (2.4)	
Located rash	5 (2.4)	
Rash and fever	4 (1.9)	
Rash and adenopathy	2 (1)	
General symptoms	49 (23.6)	14 (8–30)
Headache	32 (15.4)	
Dry mouth	8 (3.9)	
Arthralgia	6 (2.8)	
Insomnia	2 (1)	
Asthenia	1 (0.5)	
Digestive	37 (17.9)	7 (5.5–19.5)
Epigastralgia	10 (4.9)	
Nausea and vomiting	25 (12)	
Diarrhoea	2 (1)	
Neuro-psychiatric	8 (3.8)	29 (11.5–47.25)
Disgeusia	6 (2.8)	
Paraesthesia	2 (1)	
Psychiatric alteration	2 (1)	
Analytical disorders	15 (7.3)	15 (8–30)
Elevated transaminase ^a	10 (4.9)	
Neutropenia	5 (2.4)	

Abbreviations: IQR, interquartile range.

^a Transaminase elevation: include any value out of upper normal limits.

Risk factors of cutaneous reactions

The proportion of women was higher among those presenting moderate to severe reactions than in those with good tolerance or mild reactions (90.9% versus 62.5%; p 0.001). When available, new-onset eosinophilia preceded moderate and severe reactions more frequently than in those with good tolerance or mild reactions (50% versus 29%; p 0.01) (Table 2).

HLA-B alleles were determined in all but two patients. When comparing its frequency between groups, we observed a higher proportion of the allelic group HLA-B*35 including the specific allele HLA-B*35:05 among patients with moderate to severe reactions compared with those with good tolerance or mild reactions (64.8 versus 43%; p 0.007 and 40.7 versus 24.5%; p 0.035, respectively). Other HLA-B alleles were screened but no statistically significant differences were observed.

A multivariate analysis was performed including statistically significant variables on the univariate analysis. In the multivariate analysis, HLA-B*35:05 did not reach statistical significance probably because of a lack of power (OR 2.15, 95% CI 0.99–4.65), but when considered, the HLA-B*35 allelic group a strong association was found (OR 2.58, 95% CI 1.2–5.51). Female sex (OR 4.49, 95% CI 1.62–12.47) and new-onset eosinophilia before cutaneous symptoms (OR 2.55, 95% CI 1.2–5.43) were predictors of moderate to severe cutaneous reactions secondary to benznidazole. Sensitivity, specificity and predictive values of all three factors are also shown in Table 3.

Discussion

In our study, after treating 207 adults with chronic CD with benznidazole, almost one-half of them (49.3%) reported cutaneous reactions. Although these were mostly mild, in 39 (18.8%) of the patients these cutaneous effects triggered cessation of treatment. These rates of toxicity and withdrawal are consistent with previous published data, where a range of a 12%–20% of treatment discontinuation have been reported [16,17]. Consistently with our previous observation, where a genetic predisposition to these phenomena was suggested, our work showed an increased risk of having a moderate to severe cutaneous reaction when carrying the allelic group HLA-B*35.

In a previous publication, our group showed that patients carrying the HLA-B*35:05 specific allele were more likely to interrupt

treatment, due to more severe reactions compared with those without the HLA-B*35:05 specific allele (45% versus 15.4%; p 0.03) [13]. A similar approach was used in a case–control study that identified HLA-A*68, HLA-A*11:01 and HLA-A*29:02 alleles as possible risk factors of a T-cell-mediated hypersensitivity reaction. However, associations with HLA-B alleles were not found, probably because of the exploratory design of the study with an unpowered sample size calculation [18]. When we performed a multivariate analysis to identify risk factors, were all predictors of moderate to severe cutaneous reactions. Nevertheless, sensitivity and specificity values of each factor were low. Hence a stratified strategy combining different factors should be considered in a future validation study. Significance could not be found when considering the specific allele HLA-B*35:05. However, an OR of 2.15 (95% CI 0.99–4.65) highlights that a possible association may exist and studies with a larger sample size may help to elucidate a significant correlation.

Female sex has been associated with hypersensitivity reactions. In previous reports, benznidazole AEs were more common in female patients and some authors have linked it to higher nitro-reductive activity in women or a higher immunoglobulin level [10,13,19]. In our cohort, sex differences could be clearly observed, especially among moderate to severe reactions, where women represented a 90% compared with 62.5% among mild reactions or good tolerance.

Cutaneous AEs usually appear between the first and the fourth weeks after initiation, characteristically after 2 weeks of drug exposure. The mechanism of this reaction has been explained by a non-IgE-mediated drug allergy with a T helper type 2 response with high levels of suppressing cytokines as interleukin-10 and production of interleukin-5, which leads to an eosinophilic infiltrate [13]. Patients who presented a moderate to severe reaction on the second week of treatment or later, showed new-onset eosinophilia before cutaneous symptom appearance more often than those with good tolerance or mild reactions (50 versus 29%). In this line, eosinophilia could be easily determined and endorsed as an early marker of a preventive strategy [20].

In the current context, treatment options are bounded to benznidazole and nifurtimox, the efficacy of treatment in late chronic infection is doubtful and toxicity remains one of the major constraints. To have tools that could predict the risk of moderate–severe reactions might help to optimize treatment algorithms and to better select which patients are going to present a better safety and tolerability profile.

Table 2
Characteristics of patients with good tolerance or mild reactions versus moderate to severe reactions

	Good tolerance or mild reaction (n = 152)	Moderate to severe reaction (n = 55)	p value
Sex, n (%)			
Female	95 (62.5)	50 (90.9)	0.001
Mean age (years), mean \pm SD	45.75 \pm 10.28	43.31 \pm 8.4	0.60
Positive PCR, n (%)	47 (33.6)	17 (33.3)	1
Previous cutaneous condition, n (%) ^a	3 (2)	3 (5.6)	0.18
Cardiac involvement, n (%)	27 (17.8)	5 (9.1)	0.19
Kuschnir 1	24 (15.4)	4 (7.7)	
Kuschnir 2	2 (1.3)	1 (1.9)	
Kuschnir 3	1 (0.7)	0	
Digestive involvement, n (%)	23 (15.1)	4 (7.3)	0.16
Dolicosigma	16 (10)	3 (5.5)	
Dolicocolon	5 (3)	1 (1.8)	
Megacolon	2 (1)	0	
New-onset eosinophilia, n (%)	40 (29)	21 (50)	0.01
Previous transaminase elevation, n (%)	24 (16.1)	10 (20%)	0.52
HLA-B*35, n (%)	65 (43)	35 (64.8)	0.007
HLA-B*3505, n (%)	37 (24.5)	22 (40.7)	0.035

Abbreviation: HLA, human leucocyte antigen.

^a Previous cutaneous condition: two psoriasis, two dyshidrotic eczema, one hyper-IgE syndrome, one rosacea.

Table 3
Multivariate analysis, sensitivity and specificity of risk factors of moderate to severe cutaneous reactions

	OR (95% CI)	Sens. (%)	Spec. (%)	PPV (%)	NPV (%)
Model 1:					
Female	4.49 (1.62–12.47)	90.9	37.5	34.5	91.9
New-onset eosinophilia	2.55 (1.2–5.43)	50	71	34.4	82.3
HLA-B*35	2.58 (1.2–5.51)	64.8	56.9	35	81.9
Model 2:					
Female	4.24 (1.54–11.7)	90.9	37.5	34.5	91.9
New-onset eosinophilia	2.44 (1.16–5.14)	50	71	34.4	82.3
HLA-B*3505	2.15 (0.99–4.65)	40.7	80.8	44.9	78.1

Abbreviations: HLA, human leucocyte antigen; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value; Sens., sensitivity; Spec., specificity.

This study has some limitations. First, although patients carrying HLA-B*35 are at greater risk of moderate to severe reactions, this marker alone showed a low specificity to guide treatment indication. Second, patients were predominantly from Bolivia, a country with a very homogeneous genetic ancestry compared with other surrounding countries, such as Brazil or Argentina [21]. Moreover, there are also some technical limitations when analysing HLA alleles. Using sequence-specific oligonucleotides for HLA typing allows identification of the allelic group. However, because of the scarce information about allelic frequency among Bolivians, the inference of the specific allele could not be accurate enough.

In summary, in this study, patients with HLA-B*35 were at higher risk of moderate to severe cutaneous reactions when taking benznidazole. Considering other risk factors, such as female sex and new-onset eosinophilia, we could stratify patient individual risk to minimize severe reactions. A screening strategy considering these risk factors should be validated in a wider prospective study including patients preferably from different genetic backgrounds.

Transparency declaration

The authors declare that they have no conflicts of interest. This article is part of the European project BERENICE, which is a Collaborative Project funded under the European Community's 7th Framework Programme. Grant agreement number: HEALTH-30593.

Author contributions

PBN was a major contributor to this paper through study design, data analysis and manuscript writing. FS, ASM, SR, LIV, IO, NSD, DP, BT, MLA and JEP contributed by including patients from the outpatient clinic and by article revision. CFJ, IAM and ES conducted laboratory procedures including *T. cruzi* analysis and HLA determination. FS, ASM and IM contributed through study design and article review.

Acknowledgements

ASM was supported by a postdoctoral grant 'Juan Rodés' (JE18/00022) from Instituto de Salud Carlos III through the Ministry of economy and competitiveness, Spain.

References

- [1] Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet* 2018;391:82–94.
- [2] World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). Available at: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-american-trypanosomiasis>. 2021. No Title n.d., [Accessed 21 April 2021].

- [3] Croft SL, Barrett MP, Urbina JA. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2005;21:508–12.
- [4] Javier Olivera M, Alexandra Forj J, José Olivera A, Parasitología G. Therapeutic drug monitoring of benznidazole and nifurtimox: a systematic review and quality assessment of published clinical practice guidelines. *Rev Soc Bras Med Trop* 2017;50:748–55.
- [5] Pérez-Molina JA, Pérez-Ayala A, Moreno S, Fernández-González MC, Zamora J, López-Velez R. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:1139–47.
- [6] Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F, et al. Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2015;373:1295–306.
- [7] Álvarez MG, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Viotti R. Prevention of congenital Chagas disease by Benznidazole treatment in reproductive-age women. An observational study. *Acta Trop* 2017;174:149–52.
- [8] Coura JR, Borges-Pereira J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011;106:641–5.
- [9] Pinazo MJ, Muñoz J, Posada E, López-Chejade P, Gállego M, Ayala E, et al. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4896–9.
- [10] Hasslocher-Moreno AM, do Brasil PEA, de Sousa AS, Xavier SS, Chambela MC, Sperandio da Silva GM. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1261–6.
- [11] Sosa-Estani S, Armenti A, Araujo G, Viotti R, Lococo B, Ruiz Vera B, et al. Tratamiento de la enfermedad de Chagas con benznidazol y ácido tioctico. *Medicina (B Aires)* 2004;64:1–6.
- [12] Mallal S, Phillips E, Carosi G, Molina JM, Workman C, Tomažič J, et al. HLA-B*5701 screening for hypersensitivity to abacavir. *N Engl J Med* 2008;358:568–79.
- [13] Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Martínez-Gallo M, Sala-Cunill A, Viñas L, García-Prat M, et al. Evaluation of cytokine profile and HLA association in benznidazole related cutaneous reactions in patients with Chagas disease. *Clin Infect Dis* 2015;61:1688–94.
- [14] Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop* 2007;103:195–200.
- [15] Trajanoski D, Fidler SJ. HLA typing using bead-based methods. *Methods Mol Biol* 2012;882:47–65.
- [16] Pinazo M-J, Guerrero L, Posada E, Rodríguez E, Soy D, Gascon J. Benznidazole-related adverse drug reactions and their relationship to serum drug concentrations in patients with chronic Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:390–5.
- [17] Yun O, Lima MA, Ellman T, Chambi W, Castillo S, Fleuvad L, et al. Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiologic treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-year experience of Médicins Sans Frontières. *PLoS Negl Trop Dis* 2009;3:e488.
- [18] Balas A, Ramírez E, Trigo E, Cabañas R, Fiandor A, Arsuaga M, et al. HLA-A*68, -A*11:01, and -A*29:02 alleles are strongly associated with benznidazole-induced maculopapular exanthema (MPE)/DRESS. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2020;8:3198–3200.e3.
- [19] Jones BG, Penkert RR, Surman SL, Sealy RE, Pelletier S, Xu B, et al. Matters of life and death: how estrogen and estrogen receptor binding to the immunoglobulin heavy chain locus may influence outcomes of infection, allergy, and autoimmune disease. *Cell Immunol* 2019;346:103996.
- [20] Shiohara T, Mizukawa Y, Aoyama Y. Monitoring the acute response in severe hypersensitivity reactions to drugs. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2015;15:294–9.
- [21] Martínez-Laso J, Siles N, Moscoso J, Zamora J, Serrano-Vela JI, R-A-Cachafeiro JI, et al. Origin of Bolivian Quechua Amerindians: their relationship with other American Indians and Asians according to HLA genes. *Eur J Med Genet* 2006;49:169–85.

4.2. Article 2

LANCET INFECTIOUS DISEASES

([https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00629-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00629-1))

LANCET INFECTIOUS DISEASES

([https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00629-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00629-1))

LANCET INFECTIOUS DISEASES

([https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00629-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00629-1))

LANCET INFECTIOUS DISEASES

([https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00629-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00629-1))

LANCET INFECTIOUS DISEASES

([https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00629-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00629-1))

LANCET INFECTIOUS DISEASES

([https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00629-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00629-1))

LANCET INFECTIOUS DISEASES

([https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00629-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00629-1))

LANCET INFECTIOUS DISEASES

([https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00629-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00629-1))

LANCET INFECTIOUS DISEASES

([https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00629-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00629-1))

5. RESUM GLOBAL DELS RESULTATS

Considerant els criteris d'inclusió i exclusió del primer treball, finalment es van incloure per a l'anàlisi 207 individus amb MC en fase crònica. D'aquests, 145 (70%) eren dones i l'edat mitjana fou de 45.1 (DE \pm 9.86) anys. La majoria dels pacients (192; 93%) eren originaris de Bolívia, seguits del Paraguai (4; 2%), el Salvador (4; 2%), l'Argentina (4; 2%), Hondures (2; 1%) i l'Uruguai (1; 0.5%). El temps d'estada mitja a Espanya des del seu procés migratori va ser de 10 (9-12) anys. Quant a les característiques clíniques dels participants, 32 (15%) presentaven afectació cardíaca en forma de CCC. Seguint la classificació de Kuschnir, la majoria es trobaven en estadis lleus: Kuschnir 1 (28), Kuschnir 2 (3) i Kuschnir 3 (1). A nivell digestiu, 27 (13%) individus presentaven alguna afectació, essent aquesta en forma de dolicosigma (19), dolicoçòlon (6) i megacòlon (2). A nivell parasitològic, la detecció de *T. cruzi* per PCR va ser positiva en 64 (33%) participants.

Durant el tractament amb BNZ, 148 (71.5%) individus van presentar algun efecte secundari. Els efectes més freqüents van ser els cutanis (102; 49%) seguit dels generals (49; 24%), digestius (37; 18%), alteracions a nivell analític (15; 7%) i neuro-psiquiàtrics (8, 4%). Quan vam analitzar les reaccions cutànies, aquestes les vam classificar com a lleus, moderades o greus en un 46%, 36% i 18% respectivament. Cap dels participants va presentar una síndrome de DRESS, una síndrome de *Stevens-Johnson* o una necròlisi epidèrmica tòxica. Quan vam comparar el maneig inicial entre les reaccions cutànies lleus i les moderades-greus vam veure que un 57.5% vs. 3.6% presentava una resolució espontània, un 36% vs. 38% precisaven de l'ús d'antihistamínics, en un 2% vs. 9% s'instaurava un tractament combinat amb antihistamínics i corticoides, en un 4% vs. 16% es decidia una suspensió transitòria del tractament amb posterior reintroducció progressiva i finalment un 0% vs. 33% suspèien el tractament de forma definitiva.

Considerant l'evolució posterior, un total de 59 (28%) individus van suspendre el tractament de forma definitiva. Si mirem les causes d'aquesta suspensió, en 32 (54%) dels casos, aquesta va ser una decisió del seu metge en resposta a una reacció cutània considerada moderada o greu. En 18 casos aquesta suspensió va ser immediata, mentre que en 9 individus es va produir després d'instaurar tractament antihistamínic, en 3 després del tractament amb teràpia combinada i en 2 després de presentar una recidiva dels símptomes posterior a la reintroducció progressiva del fàrmac. Altres causes d'aquesta suspensió fou l'aparició d'altres EA en 6 (10%) casos: 2 per neuropatia perifèrica, 2 per neutropènia, 1 per elevació de transaminases i 1 per artràlgies. La resta de les 21 (36%) suspensions definitives foren decisions preses pel pacient després d'EAs.

Quan vam comparar la distribució de les diferents variables entre aquells individus amb reaccions cutànies moderades o greus i aquells amb reaccions lleus o bona tolerància vam observar que la proporció de dones va ser major entre els primers que entre el segons (91% vs. 62%; p 0.001). A més, la eosinofília de nova aparició també va ser més freqüent entre el grup de reaccions

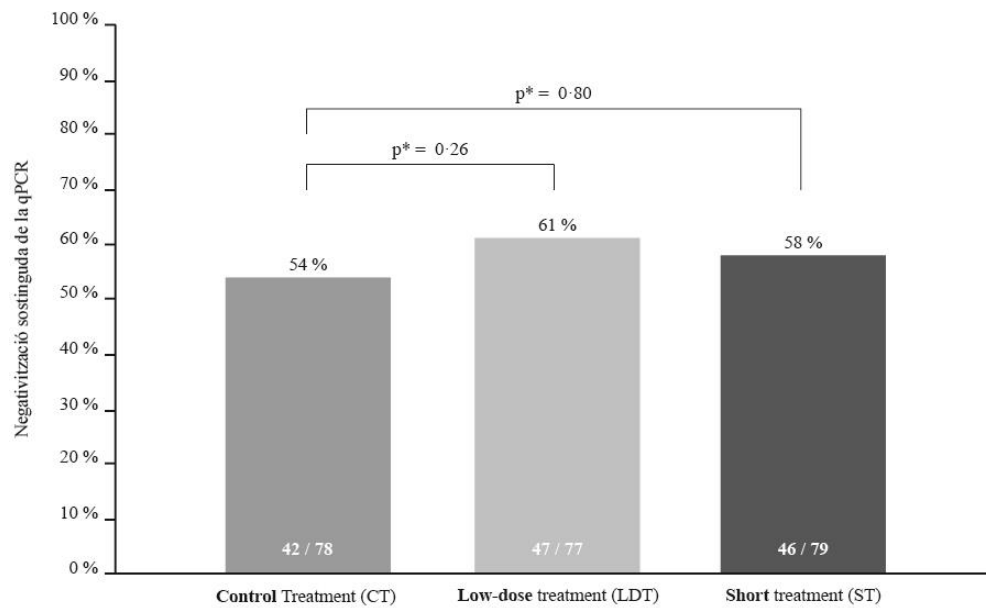
moderades-greus (50% vs. 3%; p 0.01). Quant a la determinació de l'HLA, aquesta es va poder dur a terme en 205/207 individus. Tant l'HLA-B*35 com l'al·lel específic HLA-B*35:05 van ser més freqüents entre aquells amb reaccions moderades-greus que en aquells amb bona tolerància o reaccions lleus (65% vs. 43%; p 0.007) en el primer cas i 41% vs. 24%; p 0.035) en el cas de l'al·lel específic. A l'anàlisi de la resta d'al·lells de l'HLA-B no vam trobar cap altre associació.

Una vegada feta l'anàlisi univariada, vam fer una anàlisi multivariada incloent aquelles variables significatives en la primera per tal d'identificar possibles factors de risc. Quan tenien en compte l'al·lel específic HLA-B*35:05 al model, no s'observava una associació que fos significativa. En canvi, quan vam fer l'anàlisi considerant tot el grup al·lèlic HLA-B*35, vam observar una associació entre l'aparició de reaccions cutànies moderades-greus i el grup al·lèlic HLA-B*35 (OR 2.58, IC95% 1.2-5.5), el sexe femení (OR 4.49, IC95% 1.62-12.47) i l'eosinofília de nova aparició (OR 2.55, IC95% 1.2-5.43), amb valors predictius negatius del 82%, 92% i 82% respectivament.

Per al segon treball, entre l'Abril de 2017 i Setembre de 2020 es van incloure un total de 245 participants dels quals 238 es van aleatoritzar i 234 es van incloure a l'anàlisi per intenció-de-tractar (ITT). Després de 4 abandonaments precoços, 2 desviacions majors del protocol i 46 pèrdues de seguiment, 182/245 (74%) dels participants es van incloure a l'anàlisi per-protocol (PP): 53/78 al tractament control (*control treatment*, CT; 300mg/dia 60 dies), 62/77 al tractament dosis baixes (*low-dose treatment*, LDT; 150mg/dia 60 dies) i 67/79 al de tractament curt (*short treatment*, ST; 400mg/dia 15 dies). Tenint en compte les característiques basals, 142 (60%) participants eren dones i l'edat mitjana era de 46.4 (DE 13.6) anys. Considerant la classificació clínica de la MC, 183 (78%) es trobaven a la forma indeterminada, 49 (21%) presentaven una CCC i 2 (1%) presentaven una forma digestiva.

Des del final de la fase de tractament a les 8 setmanes fins al final de la fase de seguiment als 12 mesos, 135/234 (58%) individus presentaven una negativització parasitològica sostinguda a l'anàlisi per ITT i 124/182 (68%) a l'anàlisi PP. La *figura 5* mostra les taxes de negativització parasitològica sostinguda per grup. Després d'ajustar per país d'inclusió, no es van observar diferències entre cada un dels braços experimentals i el braç control tant a l'anàlisi per ITT com PP. Quan vam analitzar els participants per ITT després de fer una imputació múltiple de les dades, la probabilitat de negativització parasitològica sostinguda va ser del 61% (IC95% 19-91), del 73% (IC95% 30-95) i del 64% (IC95% 21-92) per els braços CT, LDT i ST respectivament, sense observar diferències en ambdues comparacions: CT vs. LDT OR 1.77 (IC95% 0.66-4.78); i CT vs. ST OR 1.13 (0.43-2.95).

1. Anàlisi per intenció de tractament



2. Anàlisi per protocol

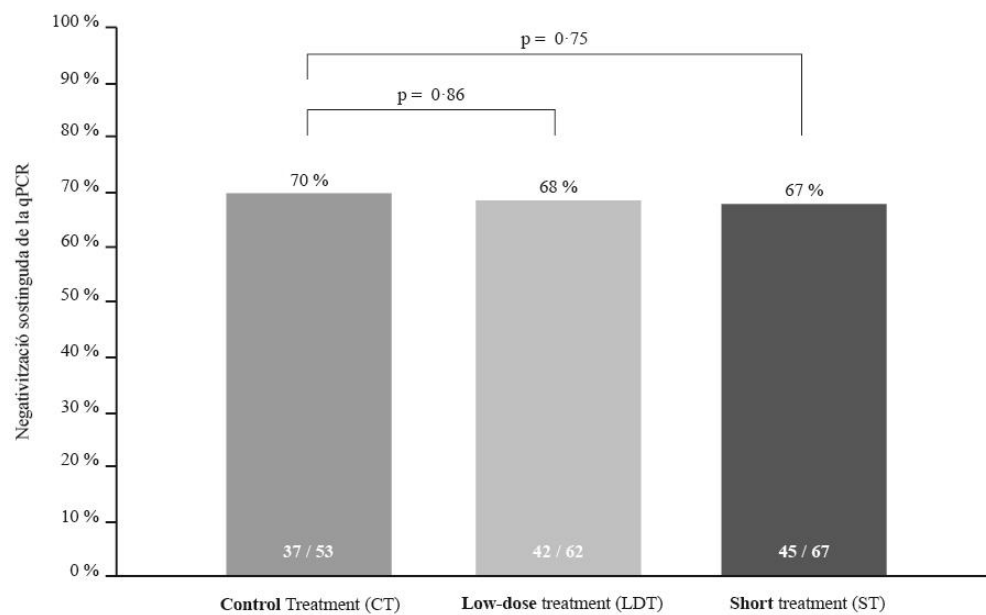
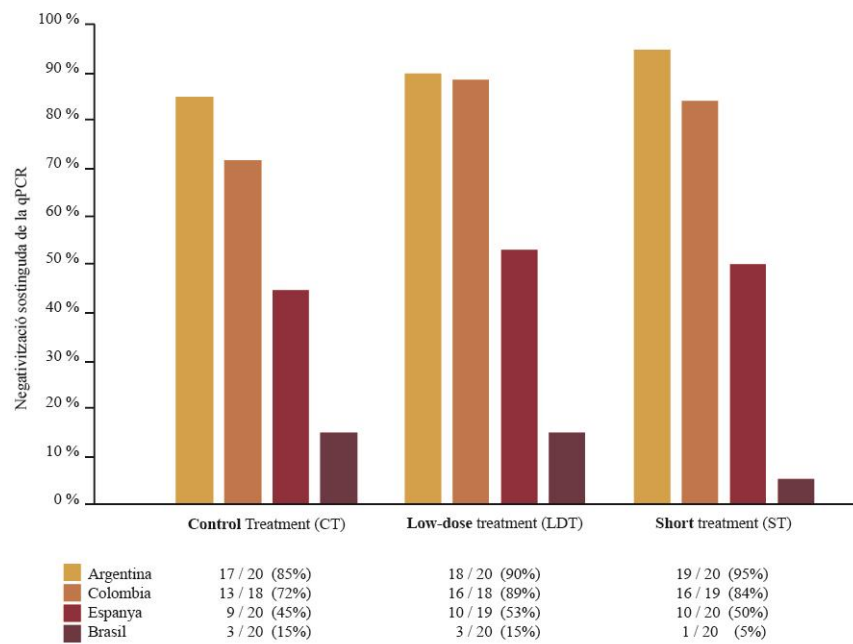


Figura 5. Resultats negativització parasitològica sostinguda per grup de tractament.

Tot i que l'estudi no estava potenciat per fer les comparacions entre els diferents braços de tractament dintre de cada país o entre països, vam observar una menor taxa de resposta global en els individus del Brasil en comparació a la resta de països (*Figura 6*).

1. Anàlisi per intenció de tractor



2. Anàlisi per protocol

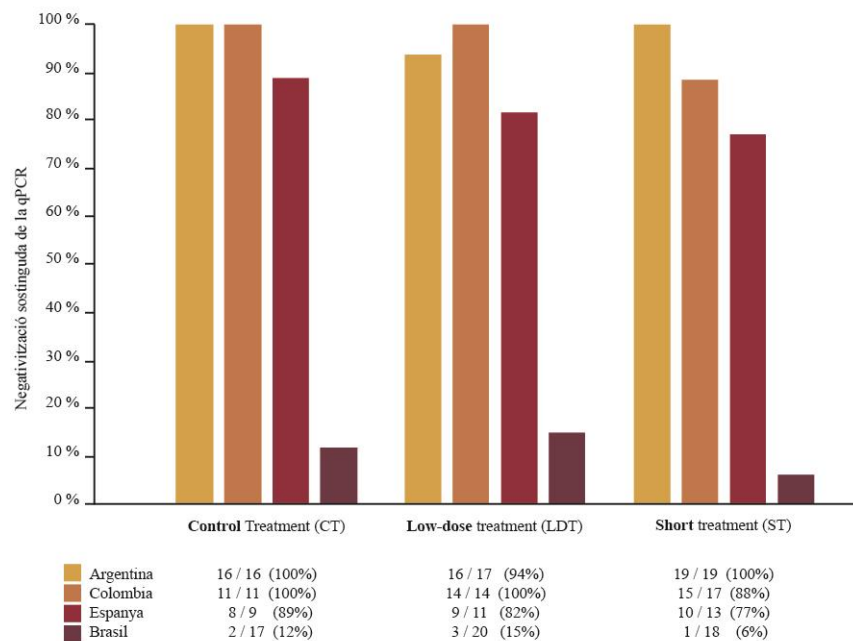


Figura 6. Resultats negativització parasitològica sostinguda per països.

Considerant el braç CT a l'anàlisi per ITT amb imputació múltiple, la probabilitat de negativització parasitològica sostinguda era del 15% (IC95% 5-38) al Brasil, 47% (IC95% 22-73) a Espanya, 90% (IC95% 58-98) a Colòmbia i 85% (IC95% 59-96) a l'Argentina. A més, tenint també en compte el set per ITT vam fer un anàlisi de sensibilitat considerant únicament els

individus amb CCC. La taxa global de resposta va ser menor en els pacients amb cardiopatia comparat amb els individus en fase indeterminada: 44% vs. 61% (OR 0.46 [IC95% 0.23-0.92]) una vegada ajustat per braç de tractament i per país. Cal destacar que els participants amb CCC no es trobaven distribuïts de forma equitativa entre els països. Mentre que Brasil i Colòmbia presentaven els percentatges més elevats (38% i 33%) respectivament, l'Argentina presentava un 8% i Espanya un 6%. No obstant, quan analitzàvem les taxes de negativització parasitològica sostinguda, Brasil i Colòmbia presentaven la taxa més baixa i més alta respectivament. Tenint en compte el moment de positivització de la qPCR, vam fer una anàlisi de supervivència en el set de participants per ITT. El temps mitjà de negativització parasitològica sostinguda va ser de 315 dies (294-335) al grup CT, 315 dies (295-334) al grup LDT i 318 dies (299-334) al grup CT, sense observar diferències significatives entre ells: LDT HR 0.99 (0.54-1.84) i ST HR 1.06 (0.58-1.94).

Globalment, 177/234 (76%) individus van presentar algun EA: 62/78 (79%) en el grup CT, 56/77 (73%) en el grup LDT i 59/79 (77%) en el grup ST. No obstant, quan vam comparar la taxa d'EA entre els grups, no vam observar diferències: LDT vs. CT (OR 0.63 [IC95% 0.29-1.37]); ST vs. CT (OR 0.78 [IC95% 0.35-1.72]). Tenint en compte la presència d'efectes adversos severos, tampoc vam observar diferències entre els diferents braços de tractament. En canvi, quan vam analitzar els EA segons el sistema afectat, els participants dels braços experimentals presentaven menys reaccions cutànies en comparació amb el braç control: LDT vs. CT (OR 0.40 [IC95% 0.20-0.76]); ST vs. CT (OR 0.42 [IC95% 0.22-0.80]). A més, una vegada ajustats els resultats per país d'origen i per presència o no de reaccions cutànies, vam observar una menor proporció d'interrupcions definitives del tractament en el grup ST comparat amb el grup CT: 2% vs. 14% (OR 0.20 [IC 95% 0.04-0.95]). La comparació entre els diferents països no va mostrar diferències significatives en termes de seguretat.

Entre les determinacions obtingudes, vam poder analitzar els valors de densitat òptica de les serologies en situació basal i al final del seguiment de 200/234 participants. L'anàlisi aparellat de les dades va mostrar uns valors mitjans de 8.33 ± 2.33 en situació basal i de 7.54 ± 2.54 en la determinació del final de seguiment als 12 mesos, essent aquesta diferència estadísticament significativa ($p < 0.001$). En canvi, quan vam comparar aquests valors entre els diferents grups de tractament i entre els diferents països no vam observar diferències.

A nivell farmacològic, vam analitzar les concentracions de BNZ a les 2 setmanes i al final de la fase de tractament. Aquesta anàlisi, va mostrar un augment lineal proporcional a la dosi administrada, amb escassa variabilitat inter-individual en cada grup terapèutic i àrea geogràfica. No obstant, no vam trobar una correlació entre els nivells de BNZ i els EA ni entre aquests nivells i la resposta parasitològica al tractament. Finalment, vam determinar l'al·lel l'HLA-B en tots els participants. L'al·lel específic HLA-B35:05 només va estar present en 8 individus d'Argentina i

23 d'Espanya, essent tots ells naturals de Bolívia o descendents de bolivians excepte el cas d'un individu reclutat a l'Argentina que era d'origen paraguaià. Aquesta anàlisi no ens va permetre trobar cap associació significativa entre els al·lels del grup HLA-B i l'aparició de toxicitat cutània o un altre EA.

6. RESUM GLOBAL DE LA DISCUSSIÓ

A l'espera de nous tractaments, a dia d'avui BNZ i Nifurtimox segueixen representant les úniques opcions aprovades per al tractament de la MC. Tot i que BNZ s'ha associat a un millor perfil de tolerància, els EA segueixen representant un important escull. En aquest sentit, l'objectiu de la present tesi ha estat el d'optimitzar les pautes actuals per millorar-ne la tolerància i generar eines per anticipar-nos a l'aparició de possibles efectes secundaris.

L'assaig clínic MULTIBENZ és un assaig multicèntric i multinacional dissenyat per explorar 3 règims de BNZ diferents. L'objectiu era comparar la pauta estàndard de BNZ a dosis de 300mg diaris durant 60 dies i 2 noves propostes amb una reducció de la dosi total administrada: un tractament amb dosis baixes (BNZ 150mg diaris durant 60 dies) i un tractament curt (BNZ 400mg diaris durant 15 dies). La principal troballa d'aquest treball fou que no vam observar diferències en termes de negativització parasitològica sostinguda quan comparàvem els braços experimentals amb el braç control ni en l'anàlisi per ITT ni en l'anàlisi PP. Aquests resultats obren la porta a un canvi de paradigma en el tractament de la MC. Si finalment es confirmen els resultats i es produeix una reducció del tractament a dues setmanes, aquest fet suposaria un abaratiment dels costos tant directa com indirectament pels programes de salut i especialment per a les persones amb la infecció. Més enllà de la reducció de fàrmac necessari que permetria arribar a més individus, en molts casos aquests es veuen obligats a fer trajectes a centres de referència amb despeses lligades al transport, al menjar, a l'atenció mèdica i a pèrdua d'hores de treball (96). Tot això sense tenir en compte les despeses derivades de les múltiples visites necessàries per monitoritzar els EA i les possibles conseqüències derivades que en alguns casos pot associar una important morbiditat.

Els nostres resultats reforcen la idea que les dosis actuals de BNZ podrien estar per sobre del necessari. En aquests sentit i com esmentàvem anteriorment les nostres dades recolzarien les troballes dels estudis de farmacodinàmica en població infantil i adults on s'observava un manteniment de l'eficàcia amb nivells plasmàtics inferiors i es suggeria que una dosi menor de fins a 2.5mg/Kg/dia seria suficient per mantenir uns nivells acceptables (91,92). Les nostres dades també recolzarien les dades d'estudis observacionals on tractaments incomplets de fins a 10 dies podien procurar resultats similars tant a nivell de detecció del paràsit com a nivell serològic (94). Finalment, aquests resultats també recolzen els resultats reportats per l'assaig clínic BENDITA on a més d'analitzar tractaments combinats amb fosravuconazol es va incloure un braç de BNZ en monoteràpia amb dosis de 300mg/dia durant 2 setmanes. Aquest però, és un estudi que va incloure només pacients bolivians i es va dissenyar com una prova de concepte amb només 30 participants per braç terapèutic fet que limitava la possibilitat d'extreure'n conclusions fermes tant d'eficàcia com de seguretat (90). Una qüestió que no queda resolta és el possible impacte d'escurçar el tractament en relació a les formes dorments dels amastigots. S'ha vist que aquestes formes poden sobreviure sota tractament continuat amb BNZ i tenen la capacitat de tornar a replicar i diferenciar-se en formes infectives. No obstant, es desconeix el seu paper en el fracàs al

tractament de la fase crònica així com el temps d'exposició necessari per la erradicació, ja que sembla que el tractament estàndard de 60 dies tampoc seria suficient (97).

Una de les coses que més destacà de les troballes extretes de l'estudi eren les baixes taxes globals de negativització parasitològica sostinguda, amb valors inferiors al 70% en tots els grups. Aquestes taxes estaven per sota del que s'havia observat en estudis previs com el BENDITA, el STOP-CHAGAS o el CHAGASAZOL on les taxes de negativització de la qPCR després del tractament amb BNZ estaven per sobre del 90% (89,90,98). Aquests valors però, estaven clarament condicionats per un fet: l'origen geogràfic dels pacients.

En aquest sentit, quan vam analitzar els resultats per països, una de les troballes més importants fou la baixa taxa de negativització parasitològica sostinguda que presentaven els participants del Brasil, que anava del 5 al 15% en tots els grups, essent menys de la meitat de les taxes de la resta de països. Per confirmar l'efecte país en els resultats globals, vam decidir fer una anàlisi de sensibilitat incloent només Argentina i Colòmbia. Aquests mostraven taxes de negativització parasitològica sostinguda del 87-94%, resultats més congruents amb els assajos clínics mencionats anteriorment.

Una explicació podria ser que s'hagués produït un error al laboratori o una mala adherència al tractament entre els participants brasilers. No obstant, es va dur a terme un control de qualitat extern de les mostres que descartaven aquesta possibilitat i les dades d'adherència reportades per els investigadors així com els nivells en sèrum del benznidazol descartaven també aquests factors com a possible explicació. Cal afegir que els nivells de BNZ en sèrum tampoc mostraven diferències entre els participants de diferents països. Aquest fet feia poc probable que hi hagués una possible influència ètnica o racial en la biodisponibilitat del fàrmac.

Per tant, creiem que l'explicació més plausible de les diferències observades devien ser degudes a diferències intrínseques al propi paràsit. Quan vam dissenyar l'estudi, vam considerar els diferents orígens geogràfics com una aproximació de la biodiversitat genètica del paràsit. Les espècies de *T. cruzi* es troben actualment dividides en 7 DTUs (TcI-TcVI i Tcbat). Aquesta diversitat genètica s'ha relacionat prèviament amb la distribució geogràfica, patogènia, manifestacions clíniques, sensibilitat de les proves serològiques i resposta terapèutica (14,99,100). Tenint en compte dades publicades prèviament, mentre que la DTU I seria la predominant a Colòmbia, les DTU TcV/TcIV ho serien a Bolívia, TcV/TcVI a l'Argentina i TcII seria la més freqüent al centre de Brasil (101–103). En aquest sentit i considerant la classificació en DTUs, una metanàlisi va mostrar que en alguns casos, les soques de TcI mostraven una major susceptibilitat al benznidazol que les de TcII, TcIII, TcV i TcVI en tots els estadis de *T. cruzi*. No obstant, existia una gran variabilitat genètica amb diferències remarcables dintre inclús de cada DTU (14). De fet, aquesta variabilitat explicaria les diferents taxes de resposta parasitològica que

s'observen inclús dintre dels mateixos països quan es comparen treballs, suggerint que no es pot parlar de les diferents variants de *T. cruzi* com una entitat homogènia amb uns límits geogràfics concrets.

A nivell d'estudis amb persones amb infecció crònica, i en el cas concret de Brasil, les nostres dades estarien recolzades per observacions prèvies. Alguns estudis realitzats a la mateixa regió on es van incloure els nostres participants ja mostraven una baixa eficàcia del tractament amb BNZ amb taxes de positivitat de la qPCR després de la teràpia entre el 48-85% (104,105). Sembla per tant, que calen estudis de susceptibilitat d'aquestes soques per aprofundir en el seu coneixement i plantejar esquemes diferents o l'ús d'alternatives, en aquest moment limitades a Nifurtimox.

Una altra dada que cal remarcar i que podria representar una potencial font de biaix en els nostres resultats és la inclusió de pacients amb cardiopatia lleu o moderada. A l'assaig clínic BENEFIT, un estudi que incloïa pacients amb CCC, ja es va observar una baixa taxa de resposta parasitològica mesurada per qPCR després del tractament amb BNZ. Aquesta anava del 66% al final del tractament fins un 47% després de 5 anys de seguiment (72). En el nostre cas, quan vam fer l'anàlisi de sensibilitat considerant únicament aquells pacients amb cardiopatia, les taxes de negativització parasitològica sostinguda anaven del 53-65%, sense que aquestes diferències fossin significatives. Tot i que ja s'ha suggerit prèviament que el tractament estàndard podria no ser suficient en pacients amb CCC, no es coneix la explicació exacta d'aquest fet ni si té una implicació clínica (72). A més, la distribució dels participants amb cardiopatia va ser similar entre els 3 grups de tractament. I tot i que la distribució dels individus amb cardiopatia no va ser homogènia entre països, aquesta no explicava les diferències observades entre aquests. De fet, la proporció de participants amb cardiopatia era similar entre Brasil i Colòmbia, tot i així, les taxes de negativització parasitològica sostinguda van ser la més baixa i la més alta respectivament.

En quan a la tolerància del tractament, en l'assaig clínic MULTIBENZ, fins un 77% dels participants van presentar almenys un EA, comparable al 67-87% observat en assajos previs (89,90). De fet, al primer treball d'aquesta tesi, després de tractar 207 individus amb MC crònica amb benznidazol, la proporció de participants que presentaven efectes adversos era molt similar, un 71%. D'aquests, quasi la meitat (49.3%) van presentar alguna reacció cutània. Tot i que en general van ser lleus, en 39 (19%) dels casos, aquestes reaccions van provocar la suspensió del tractament, similar a les dades publicades anteriorment, amb suspensions que anaven del 12 al 20% (100,106). Aquestes taxes de toxicitat cutània són també molt similars al 42% observat a l'assaig clínic MULTIBENZ, tot i que la taxa global de suspensió definitiva va ser menor, d'un 8%.

Una possible explicació del fet d'observar taxes globals de suspensió més baixes són les diferències observades entre els diferents braços de tractament. Mentre que els grups CT i LDT van presentar un 14% i un 9% de suspensions permanents respectivament, el grup ST només en va presentar un 2%. Seguint la estreta relació que existeix entre toxicitat cutània i suspensió del tractament, aquestes diferències concordaven amb el significatiu baix percentatge de reaccions cutànies observat en els grups ST i LDT en comparació amb el CT (36% i 35% vs. 58%). Aquest fet recolza algunes observacions prèvies on es relacionava la tolerància del fàrmac amb la dosi acumulada més que amb les concentracions sèriques de BNZ (81,93). Tenint en compte les dades d'eficàcia i el perfil de seguretat, fan que el tractament curt de 2 setmanes (ST) sigui la pauta més atractiva a validar.

Com a possible factor predisposant d'aquestes reaccions vam identificar el sexe femení. En estudis previs, els EA amb BNZ eren més freqüents en els individus de sexe femení i alguns autors ho han associat a un augment de l'activitat nitro-reductiva lligada al sexe degut a uns majors nivells d'immunoglobulines (79,86,107,108). A la nostra cohort, les diferències entre sexes eren clares, especialment entre les reaccions moderades-greus on el sexe femení representava el 91% del total en comparació al 62% entre les reaccions lleus o aquells individus amb bona tolerància. A l'assaig clínic MULTIBENZ tot i que la classificació dels EA no es corresponia exactament a l'emprada al treball 1, vam observar que el sexe femení era més freqüent entre els que interrompien el tractament per un EA que els que no (12% vs. 4%) amb una OR de 3.7 (IC95% [1.0-13.2]).

A més, les reaccions cutànies generalment apareixen entre la primera i la quarta setmana des de l'inici del tractament, característicament després de 2 setmanes d'exposició al fàrmac. El mecanisme d'aquestes reaccions s'ha explicat per una al·lèrgia no mitjançada per IgE amb una resposta de tipus Th2 amb nivells elevats de citocines supressives com IL-10 i la producció de IL-5, conduint a un infiltrat eosinofílic (86). En el primer treball aquells individus que presentaven reaccions moderades o greus a partir de la segona setmana de tractament, presentaven més freqüentment una eosinofília de nova aparició abans de l'aparició dels símptomes cutanis en comparació amb aquells que presentaven reaccions lleus o bona tolerància (50 vs. 29%). En aquest sentit, la eosinofília és fàcil de determinar i es podria utilitzar com un marcador precoç en una estratègia preventiva (109). Degut al disseny de l'assaig clínic i la classificació emprada no vam poder fer aquesta anàlisi per confirmar les troballes del primer treball.

L'altre factor predisposant que vam observar, i en línia amb una possible predisposició genètica a aquests fenòmens, el primer treball mostrà un risc augmentat de presentar reaccions cutànies moderades-greus en aquells individus portadors del grup al·lèlic HLA-B*35. Aquest grup al·lèlic era present en un 65% dels que presentaven reaccions moderades-greus mentre que només

s'observava en un 43% dels individus amb bona tolerància. Aquest fet, també es repetia quan analitzàvem l'al·lel específic HLA-B*35:05 (41% v. 24%). A la publicació prèvia del grup, s'observava com aquells individus portadors de l'al·lel específic HLA-B*35:05 interrompien més freqüentment el tractament, degut a reaccions cutànies més severes, que aquells individus sense l'al·lel amb xifres similars amb les observades aquest cop (45% vs. 15.4%; p 0.03) (86). Aquesta aproximació també es va dur a terme en un altre estudi de casos-control en individus amb MC en fase crònica tractats amb BNZ. En aquesta ocasió els investigadors van identificar els al·lells HLA-A*68, HLA-A*11:01 i l'HLA-A*29:02 com a possibles factors de risc de reaccions d'hipersensibilitat cutània essent aquesta mitjançada per limfòcits T. No obstant, en aquest estudi no es van trobar associacions amb els al·lells de l'HLA-B, probablement degut al disseny exploratori del treball i una mida mostral amb poder estadístic insuficient (110).

A l'assaig clínic MULTIBENZ també vam explorar la relació entre el grup al·lèlic HLA-B*35 o l'al·lel específic HLA-B*35:05 i les reaccions cutànies. Aquest només va estar present en 8 individus d'Argentina i 23 d'Espanya, essent tots ells naturals de Bolívia o descendents de bolivians excepte el cas d'un individu reclutat a l'Argentina que era d'origen paraguaià. Tal i com es reflectia en els nostres resultats, tot i que aquest al·lel s'ha descrit àmpliament en població Boliviana i Argentina, la seva presència a la població Colombiana i Brasileira és anecdòtica (111). Probablement aquest fet ha impedit trobar una associació en aquest estudi i donada l'escassa mida mostral si separàvem els individus per país, no hem trobat cap altre associació entre els al·lells de l'HLA-B i toxicitat.

Quan vam fer l'anàlisi multivariada per tal d'identificar factors de risc, el sexe femení (OR 4.49 [IC 95% 1.62-12.47]), l'eosinofília prèvia a l'aparició dels símptomes (OR 2.55 [IC 95% 1.2-5.43]) i el grup al·lèlic HLA-B*35 (OR 2.58 [1.2-5.51]) eren tots predictors de reaccions cutànies moderades o greus. No obstant, tant la sensibilitat com la especificitat de cada factor eren baixes fet que fa inviable el seu ús com a marcadors únics. En quan a l'al·lel específic HLA-B*35:05, aquest cop no vam trobar una associació significativa. De tota manera, cal destacar que la OR de 2.15 (CI95% 0.99-4.65) observada era propera a la significació i donat que no vam trobar cap altre al·lel del grup HLA-B*35 que mostrés una tendència similar, és probable que una major mida mostral podria ajudar a aclarir la possible correlació. Aquests resultats, obren la porta a la possibilitat de crear una eina que permetin predir el risc d'aquestes reaccions en base a l'estratificació del risc individual. Això permetria la optimització dels algorismes de tractament i especialment de seguiment per tal d'adequar la vigilància, els controls i les possibles mesures de tractament en cas de presentar toxicitat. De fet, aquest tipus d'estratègies ja s'utilitzen en camps com la cardio-oncologia on s'identifiquen els individus amb un risc de toxicitat cardíaca als quimioteràpics més elevat per tal d'oferir un seguiment personalitzat (112).

Ja per acabar, cal fer alguns comentaris sobre les limitacions més importants dels treballs inclosos. En quan el primer treball, com comentàvem abans cal interpretar amb precaució l'aplicabilitat dels resultats. Tot i que els pacients portadors de l'HLA-B*35 presentarien un major risc de reaccions cutànies moderades o greus, el marcador per si mateix presenta una baixa sensibilitat i especificitat per guiar per si mateix la indicació o no la indicació de tractament. En aquest sentit, hem de tenir en compte que els participants eren predominantment de Bolívia, un país amb una ascendència genètica molt homogènia en comparació amb els països del voltant com Brasil o Argentina (113). Com hem vist, aquests resultats no es reproduïen en la resta de països i per tant les conclusions en quan a aquest marcador es limiten a aquesta població. Cal anomenar també les limitacions tècniques en quan a l'anàlisi dels al·lels HLA. L'ús de la tècnica de seqüències específiques d'oligonucleòtids permet la identificació del grup al·lèlic, però basa en part la determinació dels al·lels específics en la prevalença d'aquests en la població objectiu. Mentre que existeixen moltes dades en població europea, la informació disponible en població de l'Amèrica del sud és escassa. Aquest fet introdueix un possible error d'inferència dels al·lels específics fet que podria explicar la manca de resultats a aquest nivell.

En quan a les limitacions del segon treball, sabem que l'ús de la qPCR com a marcador subrogat de l'eficàcia s'ha d'interpretar amb cautela. Més enllà del seu ús com a eina diagnòstica o de fracàs terapèutic, es desconeix el paper de la persistència de *T. cruzi* en sang perifèrica i la progressió a nivell orgànic. Tot i l'existència de resultats controvertits, existeix la hipòtesi de que la persistència de la parasitemia, entesa com un possible marcador subrogat de major càrrega parasitària o major activitat d'aquest, esdevindria un factor de risc de progressió orgànica (114,115). Per aquest motiu i de forma paral·lela a l'elaboració de la present tesis, vàrem realitzar una revisió sistemàtica i metanàlisi per tal de descriure l'associació entre la detecció de *T. cruzi* en sang mitjançant l'ús de la PCR i la progressió orgànica cardíaca (veure Annex 3). Després de revisar 731 treballs, només en 2 la proporció de qPCR positiva en sang perifèrica era significativament major entre els individus amb CCC respecte als individus en fase indeterminada (116,117). De forma conjunta però, no es demostrava aquesta associació. A més, s'ha de tenir en compte que el seguiment és només de 12 mesos i tot i que la distribució temporal dels fracassos entre els grups era similar, sabem que aquests es poden seguir donant a més llarg termini.

A més, tot i que s'havia planejat inicialment, no vam poder fer la seqüenciació i determinació de la DTU de *T. cruzi* amb el que les troballes en quan a susceptibilitat al BNZ són limitades. Cal destacar també que més del 60% dels participants eren de sexe femení i tant la clínica com les reaccions adverses poden variar en funció del sexe com s'ha vist anteriorment, pel que els resultats podrien no ser extrapolables a la població en conjunt.

Finalment i no menys important, mencionar que fins a 24 (10%) dels participants es van perdre durant el seguiment. S'ha de tenir en compte aquest possible biaix de selecció que podria afectar els resultats. De fet, aquesta pèrdua era especialment notòria en el cas d'Espanya on es van produir el 62% de les pèrdues. Aquest fet magnifica els fracassos en aquest grup i posa de manifest un problema freqüent quan s'aborden problemes de salut en població migrada ja que molts d'ells afronten dificultats socials i econòmiques que en dificulten el seguiment. És evident que quan parlem de malalties desateses, les mesures de protecció social juguen un paper fonamental tant en la promoció de la salut, en la prevenció, així com en el maneig de la malaltia. Per tant cal no oblidar aquest abordatge en del disseny i consecució d'aquesta mena d'estudis.

7. CONCLUSIONS

1. Les pautes de tractament amb dosis acumulades reduïdes amb BNZ de 150mg al dia durant 60 dies i 400mg al dia durant 15 dies presenten taxes de negativització parasitològica sostinguda similars a les presentades amb el tractament estàndard de 300mg al dia durant 60 dies.
2. En el cas de Brasil, la taxa de negativització parasitològica sostinguda és marcadament inferior a la que presenten els participants de la resta de països, independentment de la pauta de tractament utilitzada.
3. Si tenim en compte el perfil de seguretat, el tractament curt de 400mg al dia durant 15 dies seria la pauta més ben tolerada, ja que presenta taxes significativament més baixes tant d'efectes cutanis com d'interrupcions definitives del tractament en comparació a la pauta actual.
4. Ser portador del grup al·lèlic HLA-B*35, el sexe femení i l'aparició d'eosinofília durant el tractament s'associen a un major risc de presentar reaccions cutànies moderades o greus en relació a la pauta de tractament actual amb BNZ.

8. LÍNIES DE FUTUR

En relació amb els resultats obtinguts a aquesta tesi es desprenen tres possibles línies de recerca. A l'espera de nous tractaments o la confirmació dels nous esquemes terapèutics hem de seguir aprofundint en el coneixement de les reaccions adverses i en garantir la seguretat d'aquells pacients a qui se'ls indica el tractament. Del nostre estudi se'n desprèn que difícilment trobarem un marcador únic amb prou sensibilitat i especificitat per prendre la decisió de tractar o no tractar un pacient, pel que creiem que l'estratègia a seguir és la d'establir escales de risc que permetin adaptar-ne el seguiment. En quan a la determinació dels HLA, combinant els resultats dels 2 estudis n'extraïem 2 idees. Per una banda l'HLA-B*35 pot ser útil en població Boliviana, especialment l'al·lel específic HLA-B*35:05, però cal confirmar aquesta associació amb tècniques més específiques que garanteixin que l'al·lel observat es correspon al veritable al·lel presentat per l'individu. Si es confirmés, es podria plantejar una escala de risc que condicionés diferents protocols de seguiment per assegurar la detecció precoç dels possibles esdeveniments i optimitzar els recursos. Per altra banda, la seva baixa freqüència fa poc viable el seu ús en la resta de poblacions. En aquest sentit el següent pas serà el d'analitzar la resta d'al·lels obtinguts a l'estudi MULTIBENZ i ampliar la mostra d'estudi amb pacients d'aquestes regions per reproduir una aproximació similar i identificar marcadors específics en funció de l'ascendència genètica. Tot i que la compartimentalització de la població fa menys atractiva la idea, cal aquest subanàlisi amb les dades actuals abans de prendre una decisió ferma en la continuïtat d'aquesta línia.

L'altra gran línia de recerca i probablement la més transcendent a curt-mitjà termini és la confirmació de l'efectivitat del règim curt. Per una banda ja s'han iniciat els tràmits per dur a terme un assaig clínic fase 3 en col·laboració amb diferents institucions i organitzacions en que es compari el règim estàndard amb la nova pauta tant a l'Argentina com Bolívia i Colòmbia. Si es confirmen els resultats, podríem parlar d'establir el primer canvi en l'esquema terapèutic des que es va descriure el tractament de la malaltia. Això afavoriria notablement la disponibilitat de tractament i la seva arribada a una major població i també en reduiria els riscos i les consultes derivades pel que probablement representaria un canvi a nivell de sistemes de salut, especialment a àrea endèmica. No s'ha d'oblidar però que paral·lelament s'han de crear cohorts de seguiment que confirmen que més enllà de mantenir una mateixa resposta a nivell parasitològic, no hi hagi diferències tampoc a nivell clínic.

Finalment i de forma paral·lela a la línia anterior, s'han d'estudiar més a fons els resultats obtinguts a Brasil. D'entrada, ja hem reiniciat el reclutament dels individus que van participar a l'assaig clínic inicial per tal d'intentar aïllar el *Trypanosoma cruzi* i determinar-ne les característiques genètiques com la DTU. A més, ho complementarem amb un estudi de susceptibilitat tant *in vitro* com *in vivo* al benznidazol per de donar una explicació als resultats tan pobres que vam obtenir. En aquest sentit, s'ha dissenyat també un assaig clínic fase 3 específic per al Brasil. En aquest cas però, es pretén comparar la pauta estàndard de benznidazol amb la de

nifurtimox. Els resultats actuals fan inviable plantejar un tractament curt i donat que existeix un segon fàrmac aprovat i disponible creiem que és el més adient en aquesta població. Cal destacar que aquest assaig es portarà a terme a diferents regions del Brasil. Estem parlant d'un país amb una gran superfície i amb gran variabilitat tant vectorial com del propi paràsit que fan pensar que la distribució de la malaltia no és homogènia i per tant cal generar evidència a un nivell més local.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Chagas C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909 Aug;1(2):159–218.
2. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25671846/>.
3. Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. Vol. 391, The Lancet. Lancet Publishing Group; 2018. p. 82–94.
4. Pérez-Mazliah D, Ward AI, Lewis MD. Host-parasite dynamics in Chagas disease from systemic to hyper-local scales. Parasite Immunol. 2021 Feb 1;43(2).
5. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol. 2012 Mar;12(2):240–53.
6. Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, et al. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. Parasitology. 2009 Oct;136(12):1509–28.
7. Ramírez JD, Hernández C, Montilla M, Zambrano P, Flórez AC, Parra E, et al. First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to TcBat genotype. Zoonoses Public Health. 2014 Nov 1;61(7):477–9.
8. Monje-Rumi MM, Florida-Yapur N, Zago MP, Ragone PG, Pérez Brandán CM, Nuñez S, et al. Potential association of *Trypanosoma cruzi* DTUs TcV and TcVI with the digestive form of Chagas disease. Infect Genet Evol. 2020 Oct;84.
9. Bizai ML, Romina P, Antonela S, Olivera L V., Arias EE, Josefina DC, et al. Geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes detected in chronic infected people from Argentina. Association with climatic variables and clinical manifestations of Chagas disease. Infect Genet Evol. 2020 Mar 1;78.
10. Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Aug 29;10(8).
11. Monje-Rumi MM, Brandán CP, Ragone PG, Tomasini N, Lauthier JJ, Alberti D'Amato AM, et al. *Trypanosoma cruzi* diversity in the Gran Chaco: mixed infections and differential host distribution of TcV and TcVI. Infect Genet Evol. 2015 Jan 1;29:53–9.
12. Muñoz-Calderón A, Ramírez JL, Díaz-Bello Z, Alarcón de Noya B, Noya O, Schijman AG. Genetic Characterization of *Trypanosoma cruzi* I Populations from an Oral Chagas Disease Outbreak in Venezuela: Natural Resistance to Nitroheterocyclic Drugs. ACS Infect Dis. 2023 Mar 10;9(3):582–92.
13. Teston APM, Fernandes N de S, Abegg CP, de Abreu AP, Sarto MPM, Gomes ML, et al. Therapeutic effects of benznidazole in Swiss mice that are orally inoculated with *Trypanosoma cruzi* IV strains from the Western Brazilian Amazon. Exp Parasitol. 2021 Sep 1;228.
14. Vela A, Coral-Almeida M, Sereno D, Costales JA, Barnabé C, Brenière SF. In vitro susceptibility of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (DTUs) to benznidazole: A systematic review and meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2021 Mar 1;15(3).

15. Chaboli Alevi KC, de Oliveira J, da Silva Rocha D, Galvão C. Trends in Taxonomy of Chagas Disease Vectors (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): From Linnaean to Integrative Taxonomy. *Pathogens*. 2021 Dec 1;10(12).
16. Tineo-González E, Fermín R, Bonilla-Rivero A, Herrera L. Geographic Distribution of the Genus *Panstrongylus* Berg, 1879 in the Neotropic with Emphasis on *Trypanosoma cruzi* Vectors. *Trop Med Infect Dis*. 2023 May 1;8(5).
17. Lopez-García AL, Gilabert JA, Juan Gilabert CA. Oral transmission of Chagas disease from a One Health approach: A systematic review. *Tropical Medicine & International Health*. 2023 Jul 24;28(9):689-698.
18. Shikanai Yasuda MA. Emerging and reemerging forms of *Trypanosoma cruzi* transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2022;117(1).
19. Basile L, Jansá JM, Carlier Y, Salamanca DD, Angheben A, Bartoloni A, et al. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. *Eurosurveillance*. 2011 Sep 15;16(37):19968.
20. Irish A, Whitman JD, Clark EH, Marcus R, Bern C. Updated Estimates and Mapping for Prevalence of Chagas Disease among Adults, United States. *Emerg Infect Dis*. 2022 Jul 1;28(7):1313–20.
21. Requena-Méndez A, Albajar-Viñas P, Angheben A, Chiodini P, Gascón J, Muñoz J. Health policies to control Chagas disease transmission in European countries. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(10).
22. Soriano-Arandes A, Angheben A, Serre-Delcor N, Treviño-Maruri B, Gómez i Prat J, Jackson Y. Control and management of congenital Chagas disease in Europe and other non-endemic countries: current policies and practices. *Trop Med Int Health*. 2016 May 1;21(5):590–6.
23. Añez N, Crisante G, Rojas A, Segnini S, Espinoza-Álvarez O, Teixeira MMG. Update on Chagas disease in Venezuela during the period 2003-2018. A review. *Acta Trop*. 2020 Mar 1;203.
24. Pinto AYDN, Valente SA, Valente VDC, Ferreira AG, Coura JR. [Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008 Nov;41(6):602–14.
25. Chancey RJ, Edwards MS, Montgomery SP. Congenital Chagas Disease. *Pediatr Rev*. 2023 Apr 1;44(4):213–21.
26. Lynn MK, Rodriguez Aquino MS, Cornejo Rivas PM, Kanyangarara M, Self SCW, Campbell BA, et al. Chagas Disease Maternal Seroprevalence and Maternal–Fetal Health Outcomes in a Parturition Cohort in Western El Salvador. *Trop Med Infect Dis*. 2023 Apr 1;8(4).
27. Rincón-Acevedo CY, Parada-García AS, Olivera MJ, Torres-Torres F, Zuleta-Dueñas LP, Hernández C, et al. Clinical and Epidemiological Characterization of Acute Chagas Disease in Casanare, Eastern Colombia, 2012-2020. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Jul 23;8.
28. de Sousa DRT, de Oliveira Guerra JA, Ortiz JV, do Nascimento Couceiro K, da Silva e Silva MRH, Jorge Brandão AR, et al. Acute Chagas disease associated with ingestion of contaminated food in Brazilian western Amazon. *Trop Med Int Health*. 2023 Jul 1;28(7).

29. DIAS E, LARANJA FS, MIRANDA A, NOBREGA G. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation*. 1956;14(6):1035–60.
30. Sabino EC, Ribeiro AL, Salemi VMC, Di Lorenzo Oliveira C, Antunes AP, Menezes MM, et al. Ten-year incidence of Chagas cardiomyopathy among asymptomatic *Trypanosoma cruzi*-seropositive former blood donors. *Circulation*. 2013 Mar 12;127(10):1105–15.
31. Echavarría NG, Echeverría LE, Stewart M, Gallego C, Saldarriaga C. Chagas Disease: Chronic Chagas Cardiomyopathy. *Curr Probl Cardiol*. 2021 Mar 1;46(3).
32. Sánchez-Montalvá A, Salvador F, Rodríguez-Palomares J, Sulleiro E, Sao-Avilés A, Roure S, et al. Chagas Cardiomyopathy: Usefulness of EKG and Echocardiogram in a Non-Endemic Country. *PLoS One*. 2016 Jun 1;11(6).
33. Bocchi E, Arias A, Verdejo H, Diez M, Gómez E, Castro DP. The reality of heart failure in Latin America. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Sep 10;62(11):949–58.
34. Kuschnir E, Sgammini H, Castro R, Evequoz C, Ledesma R, Brunetto J. [Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography, in patients with chronic Chagas cardiopathy]. *Arq Bras Cardiol*. 1985 Oct;45(4):249–56.
35. Moll-Bernardes RJ, Rosado-De-Castro PH, Camargo GC, Sardinha Mendes FSN, Brito ASX, Sousa AS. New Imaging Parameters to Predict Sudden Cardiac Death in Chagas Disease. *Trop Med Infect Dis*. 2020 May 1;5(2).
36. Rassi A, Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi SG, Rassi AG, et al. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med*. 2006 Aug 24;355(8):799–808.
37. Pérez-Ayala A, Pérez-Molina JA, Norman F, Monge-Maillo B, Faro M V., López-Vélez R. Gastro-intestinal Chagas disease in migrants to Spain: prevalence and methods for early diagnosis. *Ann Trop Med Parasitol*. 2011 Jan;105(1):25–9.
38. de Oliveira RB, Troncon LEA, Dantas RO, Meneghelli UG. Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. *Am J Gastroenterol*. 1998 Jun;93(6):884–9.
39. Machado F, Dutra W, Esper L, Gollob K, Teixeira M, Factor S, et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol*. 2012 Nov;34(6):753–70.
40. Tarleton R. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol*. 2001 May 1;31(5–6):550–4.
41. Burgos J, Diez M, Vigliano C, Bisio M, Risso M, Duffy T, et al. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin Infect Dis*. 2010 Sep 1;51(5):485–95.
42. Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol*. 2012 Nov;34(6):753–70.
43. Koh CC, Neves EGA, de Souza-Silva TG, Carvalho AC, Pinto CHR, Sobreira Galdino A, et al. Cytokine Networks as Targets for Preventing and Controlling Chagas Heart Disease. *Pathogens*. 2023 Feb 1;12(2).
44. Dutra WO, Menezes CAS, Magalhães LMD, Gollob KJ. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol*. 2014 Aug 1;36(8):377–87.

45. Bonney KM, Engman DM. Chagas Heart Disease Pathogenesis: One Mechanism or Many? *Curr Mol Med*. 2008 Sep;8(6):510.
46. Bern C, Messenger LA, Whitman JD, Maguire JH. Chagas Disease in the United States: a Public Health Approach. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Jan;33(1).
47. Pérez-Molina JA. Management of *Trypanosoma cruzi* coinfection in HIV-positive individuals outside endemic areas. *Curr Opin Infect Dis*. 2014 Feb;27(1):9–15.
48. Benatti RD, Al-Kindi SG, Bacal F, Oliveira GH. Heart transplant outcomes in patients with Chagas cardiomyopathy in the United States. *Clin Transplant*. 2018 Jun 1;32(6).
49. de Noya BA, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Zavala-Jaspe R, Abate T, Contreras R, et al. The performance of laboratory tests in the management of a large outbreak of orally transmitted Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Nov;107(7):893–8.
50. Sulleiro E, Salvador F, Martínez de Salazar P, Silgado A, Serre-Delcor N, Oliveira I, et al. Contributions of molecular techniques in the chronic phase of Chagas disease in the absence of treatment. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed)*. 2020 Oct 1;38(8):356–60.
51. Sulleiro E, Salvador F, Martínez de Salazar P, Silgado A, Serre-Delcor N, Oliveira I, et al. Contributions of molecular techniques in the chronic phase of Chagas disease in the absence of treatment. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed)*. 2020 Oct 1;38(8):356–60.
52. Bua J, Volta BJ, Perrone AE, Scollo K, Velázquez EB, Ruiz AM, et al. How to improve the early diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection: relationship between validated conventional diagnosis and quantitative DNA amplification in congenitally infected children. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(10).
53. Schijman A, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo A, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(1).
54. Moreira O, Ramírez J, Velázquez E, Melo M, Lima-Ferreira C, Guhl F, et al. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. *Acta Trop*. 2013 Jan;125(1):23–31.
55. Brasil PEAA, De Castro L, Hasslocher-Moreno AM, Sangenis LHC, Braga JU. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2010 Nov 25;10.
56. Flores-Chávez M, Cruz I, Rodríguez M, Nieto J, Franco E, Gárate T, et al. [Comparison of conventional and non-conventional serological tests for the diagnosis of imported Chagas disease in Spain]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010 May;28(5):284–93.
57. Cançado JR. Criteria of Chagas disease cure. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94 Suppl 1(SUPPL. 1):331–5.
58. Pérez-Molina JA, Perez AM, Norman FF, Monge-Maillo B, López-Vélez R. Old and new challenges in Chagas disease. *Lancet Infect Dis*. 2015 Nov;15(11):1347–56.
59. Rivero R, Esteva MI, Huang E, Colmegna L, Altchek J, Grossmann U, et al. ELISA F29 -A therapeutic efficacy biomarker in Chagas disease: Evaluation in pediatric patients

- treated with nifurtimox and followed for 4 years post-treatment. *PLoS Negl Trop Dis*. 2023 Jun 23;17(6):e0011440.
60. Rego N, Libisch MG, Rovira C, Tosar JP, Robello C. Comparative microRNA profiling of *Trypanosoma cruzi* infected human cells. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023 Jun 21;13.
 61. Puerta CJ, Cuellar A, Lasso P, Mateus J, Gonzalez JM. *Trypanosoma cruzi*-specific CD8+ T cells and other immunological hallmarks in chronic Chagas cardiomyopathy: Two decades of research. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023 Jan 4;12.
 62. Cortes-Serra N, Gualdron-Lopez M, Pinazo MJ, Torrecilhas AC, Fernandez-Becerra C. Extracellular Vesicles in *Trypanosoma cruzi* Infection: Immunomodulatory Effects and Future Perspectives as Potential Control Tools against Chagas Disease. *J Immunol Res*. 2022;2022.
 63. Grunberg E, Beskid G, Cleeland R, DeLorenzo WF, Titsworth E, Scholer HJ, et al. Antiprotozoan and antibacterial activity of 2-nitroimidazole derivatives. *Antimicrob Agents Chemother*. 1967;7:513–9.
 64. De Oliveira Ferreira H. [Clinico-therapeutic trial with benznidazole in Chagas' disease]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1976;18(5):357–64.
 65. Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Artaza MA, Moreno R, Perin L, et al. Pharmacokinetics of Benznidazole in Healthy Volunteers and Implications in Future Clinical Trials. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Apr 1 ;61(4).
 66. Cançado JR, Marra UD, Lopes M, Mourão O, Faria CA, Alvares JM, et al. [Toxicity and therapeutic value of Bay 2502 in chronic Chagas' disease in 3 dosage schemes]. *Bol Chil Parasitol*. 1969 Jan;24(1):28–32.
 67. Paulos C, Paredes J, Vasquez I, Thambo S, Arancibia A, Gonzalez-Martin G. Pharmacokinetics of a nitrofurán compound, nifurtimox, in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol*. 1989;27(9):454–7.
 68. Schijman AG, Altcheh J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ, et al. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Sep;52(3):441–9.
 69. Cançado JR. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2002;44(1):29–37.
 70. Crespillo-Andújar C, Comeche B, Hamer DH, Arevalo-Rodriguez I, Alvarez-Díaz N, Zamora J, et al. Use of benznidazole to treat chronic Chagas disease: An updated systematic review with a meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022 May 1;16(5).
 71. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, et al. Long-Term Cardiac Outcomes of Treating Chronic Chagas Disease with Benznidazole versus No Treatment. *Ann Intern Med*. 2006;144(May):724–34.
 72. Morillo C, Marin-Neto J, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F, et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2015 Oct;373(14):1295–306.
 73. Estani SS, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yampotis C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59(4):526–9.

74. Fabbro DL, Streiger ML, Arias ED, Bizai ML, Del Barco M, Amicone NA. Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007;40(1):1–10.
75. Álvarez MG, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Viotti R. Prevention of congenital Chagas disease by Benznidazole treatment in reproductive-age women. An observational study. *Acta Trop.* 2017; Oct;174:149-152.
76. Bern C. Chagas disease in the immunosuppressed host. *Curr Opin Infect Dis.* 2012 Aug;25(4):450–7.
77. Dias JCP, Ramos AN, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR, et al. 2nd Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016 Dec 1;49Suppl 1(Suppl 1):3–60.
78. Pinazo MJ, Muñoz J, Posada E, López-Chejade P, Gállego M, Ayala E, et al. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(11):4896–9.
79. Hasslocher-Moreno AM, do Brasil PEAA, de Sousa AS, Xavier SS, Chambela MC, Sperandio da Silva GM. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2012; May;67(5):1261-6.
80. Sosa-Estani S, Armenti A, Araujo G, Viotti R, Lococo B, Ruiz Vera B, et al. Tratamiento de la enfermedad de Chagas con benznidazol y acido tioctico. *Medicina (B Aires).* 2004;64(1):1–6.
81. Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Treviño B, Serre N, Avilés AS, et al. Toxic profile of benznidazole in patients with chronic chagas disease: Risk factors and comparison of the product from two different manufacturers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; Oct;59(10):6125-31.
82. Crespillo-Andújar C, Venanzi-Rullo E, López-Vélez R, Monge-Maillo B, Norman F, López-Polín A, et al. Safety Profile of Benznidazole in the Treatment of Chronic Chagas Disease: Experience of a Referral Centre and Systematic Literature Review with Meta-Analysis. *Drug Saf.* 2018 Nov 1;41(11):1035–48.
83. Aldasoro E, Posada E, Requena-Méndez A, Calvo-Cano A, Serret N, Casellas A, et al. What to expect and when: benznidazole toxicity in chronic Chagas' disease treatment. *J Antimicrob Chemother.* 2018 Apr 1;73(4):1060–7.
84. Gabaldón-Figueira JC, Martínez-Peinado N, Escabia E, Ros-Lucas A, Chatelain E, Scandale I, et al. State-of-the-Art in the Drug Discovery Pathway for Chagas Disease: A Framework for Drug Development and Target Validation. *Res Rep Trop Med.* 2023 Jun;14:1–19.
85. Torrico F, Gascón J, Ortiz L, Pinto J, Rojas G, Palacios A, et al. A Phase 2, Randomized, Multicenter, Placebo-Controlled, Proof-of-Concept Trial of Oral Fexnidazole in Adults With Chronic Indeterminate Chagas Disease. *Clin Infect Dis.* 2023 Feb 1;76(3):E1186–94.
86. Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Martínez-Gallo M, Sala-Cunill A, Viñas L, García-Prat M, et al. Evaluation of cytokine profile and HLA association in benznidazole related cutaneous reactions in patients with chagas disease. *Clinical Infectious Diseases.* 2015; Dec 1;61(11):1688-94.

87. Robinson J, Barker DJ, Georgiou X, Cooper MA, Flicek P, Marsh SGE. IPD-IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Res.* 2020 Jan 8;48(D1):D948-D955.
88. Mallal S, Phillips E, Carosi G, Molina JM, Workman C, Tomažič J, et al. HLA-B*5701 screening for hypersensitivity to abacavir. *New England Journal of Medicine.* 2008 Feb 7;358(6):568–79.
89. Morillo CA, Waskin H, Sosa-Estani S, del Carmen Bangher M, Cuneo C, Milesi R, et al. Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic T. Cruzi Carriers: The STOP-CHAGAS Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2017 Feb 28;69(8):939–47.
90. Torrico F, Gascón J, Barreira F, Blum B, Almeida IC, Alonso-Vega C, et al. New regimens of benznidazole monotherapy and in combination with fosravuconazole for treatment of Chagas disease (BENDITA): a phase 2, double-blind, randomised trial. *Lancet Infect Dis.* 2021 Aug 1;21(8):1129–40.
91. Altcheh J, Moscatelli G, Mastrantonio G, Moroni S, Giglio N, Marson ME, et al. Population pharmacokinetic study of benznidazole in pediatric Chagas disease suggests efficacy despite lower plasma concentrations than in adults. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(5).
92. Soy D, Aldasoro E, Guerrero L, Posada E, Serret N, Mejía T, et al. Population pharmacokinetics of benznidazole in adult patients with Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Jun 1;59(6):3342–9.
93. Bustamante JM, Craft JM, Crowe BD, Ketchie SA, Tarleton RL. New, combined, and reduced dosing treatment protocols cure *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Infect Dis.* 2014 Jan 1;209(1):150–62.
94. Álvarez MG, Vigliano C, Lococo B, Petti M, Bertocchi G, Viotti R. Seronegative conversion after incomplete benznidazole treatment in chronic Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012 Oct;106(10):636–8.
95. Moraes CB, Giardini MA, Kim H, Franco CH, Araujo-Junior AM, Schenkman S, et al. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. *Sci Rep.* 2014 Apr 16;4:1–11.
96. Herazo R, Rey A, Galvão D, Camargo MM, Pinzón NJC, Sanchez ACR, et al. Analysis of the costs incurred by patients with Chagas disease: The experience in endemic municipalities in Colombia. *Acta Trop.* 2023 Sep 1;245.
97. Sánchez-Valdéz FJ, Padilla A, Wang W, Orr D, Tarleton RL. Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. *Elife.* 2018 Mar 26;7.
98. Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, et al. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med.* 2014 May 15;370(20):1899–908.
99. Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop.* 2018 Aug 1;184:38–52.
100. Yun O, Lima MA, Ellman T, Chambi W, Castillo S, Flevaud L, et al. Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in

- Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-Year experience of Médecins Sans Frontières. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; Jul 7;3(7):e488.
101. Ramírez JC, Cura CI, Da Cruz Moreira O, Lages-Silva E, Juiz N, Velázquez E, et al. Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *J Mol Diagn*. 2015;17(5):605–15.
 102. Perez-Molina JA, Poveda C, Martinez-Perez A, Guhl F, Monge-Maillo B, Fresno M, et al. Distribution of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Bolivian migrants in Spain. *Infection, Genetics and Evolution*. 2014;21:440–2.
 103. Dario MA, Rodrigues MS, Barros JHDS, Xavier SCDC, D’Andrea PS, Roque ALR, et al. Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). *Parasit Vectors*. 2016 Aug 31;9(1).
 104. Aguiar C, Batista AM, Pavan TBS, Almeida EA, Guariento ME, Wanderley JS, et al. Serological profiles and evaluation of parasitaemia by PCR and blood culture in individuals chronically infected by *Trypanosoma cruzi* treated with benznidazole. *Trop Med Int Health*. 2012 Mar;17(3):368–73.
 105. de Lana M, Lopes LA, Martins HR, Bahia MT, Machado-de-Assis GF, Wendling AP, et al. Clinical and laboratory status of patients with chronic Chagas disease living in a vector-controlled area in Minas Gerais, Brazil, before and nine years after aetiological treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(8):1139–47.
 106. Pinazo MJ, Guerrero L, Posada E, Rodriguez E, Soy D, Gascon J. Benznidazole-Related Adverse Drug Reactions and Their Relationship to Serum Drug Concentrations in Patients with Chronic Chagas Disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; Jan;57(1):390-5.
 107. Jones BG, Penkert RR, Surman SL, Sealy RE, Pelletier S, Xu B, et al. Matters of life and death: How estrogen and estrogen receptor binding to the immunoglobulin heavy chain locus may influence outcomes of infection, allergy, and autoimmune disease. Vol. 346, *Cellular Immunology*. Academic Press Inc.; 2019 Dec;346:103996.
 108. Crespillo-Andújar C, Venanzi-Rullo E, López-Vélez R, Monge-Maillo B, Norman F, López-Polín A, et al. Safety Profile of Benznidazole in the Treatment of Chronic Chagas Disease: Experience of a Referral Centre and Systematic Literature Review with Meta-Analysis. *Drug Saf*. 2018 Nov 1;41(11):1035–48.
 109. Shiohara T, Mizukawa Y, Aoyama Y. Monitoring the acute response in severe hypersensitivity reactions to drugs. Vol. 15, *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2015. p. 294–9.
 110. Balas A, Ramírez E, Trigo E, Cabañas R, Fiandor A, Arsuaga M, et al. HLA-A*68, -A*11:01, and -A*29:02 alleles are strongly associated with benznidazole-induced maculopapular exanthema (MPE)/DRESS. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2020 Oct 1;8(9):3198-3200.e3.
 111. Middleton D, Menchaca L, Rood H, Komerofsky R. New allele frequency database: <http://www.allelefreqencies.net>. *Tissue Antigens*. 2003 May 1;61(5):403–7.
 112. Lyon AR, Dent S, Stanway S, Earl H, Brezden-Masley C, Cohen-Solal A, et al. Baseline cardiovascular risk assessment in cancer patients scheduled to receive cardiotoxic cancer therapies: a position statement and new risk assessment tools from the Cardio-Oncology

- Study Group of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology in collaboration with the International Cardio-Oncology Society. *Eur J Heart Fail.* 2020 Nov 1;22(11):1945–60.
113. Martinez-Laso J, Siles N, Moscoso J, Zamora J, Serrano-Vela JI, R-A-Cachafeiro JI, et al. Origin of Bolivian Quechua Amerindians: Their relationship with other American Indians and Asians according to HLA genes. *Eur J Med Genet.* 2006 Mar;49(2):169–85.
 114. Norman FF, Pérez-Ayala A, Pérez-Molina JA, Flores-Chavez M, Cañavate C, López-Vélez R. Lack of association between blood-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA and cardiac involvement in a non-endemic area. *Ann Trop Med Parasitol.* 2011 Sep;105(6):425.
 115. Sabino E, Ribeiro A, Lee T, Oliveira C, Carneiro-Proietti A, Antunes A, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood by PCR is associated with Chagas cardiomyopathy and disease severity. *Eur J Heart Fail.* 2015 Apr 1;17(4):416–23.
 116. Salomone OA, Juri D, Omelianiuk MO, Sembaj A, Aguerri AM, Carriazo C, et al. Prevalence of circulating *Trypanosoma cruzi* detected by polymerase chain reaction in patients with Chagas' cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2000 May 15;85(10):1274–6.
 117. Sabino EC, Ribeiro AL, Lee TH, Oliveira CL, Carneiro-Proietti AB, Antunes AP, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood by PCR is associated with Chagas cardiomyopathy and disease severity. *Eur J Heart Fail.* 2015 Apr 1;17(4):416–23.

10. ANNEXES

10.1. Annex 1: Fonts de finançament

Ambdós articles formen part del projecte europeu BERENICE, un projecte col·laboratiu, finançat per el “*European Community’s 7th Framework Programme*” amb el número de beca: HEALTH-30593.

10.2. Annex 2: Material suplementari de l'article 2

TABLE OF CONTENTS

1. Participating centers and investigators.....	page 2
2. Chagasic organic involvement criteria.....	page 3
3. Timesheet of the study.....	page 4
4. Laboratory procedures.....	page 5
5. Sensitivity analysis of the primary outcome.....	page 7
6. Survival analysis of sustained qPCR negativization.....	page 8
7. Per-protocol survival analysis per country.....	page 10
8. Safety profile (overall and by country) and list of SAE.....	page 12
9. Serology absorption rates at inclusion and end of follow-up.....	page 16
10. Benznidazole levels	page 17
11. Most frequent HLA-B alleles in each country.....	page 19

1. Participating centers, laboratories, principal investigators and working group

ARGENTINA

- **Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatała Chaben**, Buenos Aires. Dra. Marisa Fernández,
Working group: Carolina Ines Cura PhD, Constanza Lopez-Albizu MSc, Carolina Maria Siufi MD, Agustin Pablo Seijo MD
- **Instituto de Cardiología Juana Francisca Cabral**, Corrientes. Dra. Maria del Carmen Bangher.
Working group: Mariano Romero-Vidomlanky MD
- **Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste (IMR-UNNE)**, Resistencia.
Working group: Laura Belén Formichelli MSc, Bettina Laura Brusés MSc, Raúl Horacio Lucero PhD.

BRAZIL

- **Hospital Universitário Clemente de Faria**, Montes Claros. Dr. Alfredo Mauricio Batista de Paula.
Working group: Ariela Mota Ph.D., André Antunes, Paulo Emilio Clementino Almeida M.D.
- **Centro de Pesquisas René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz**, Belo Horizonte. Dr. Rodrigo Correa Oliveia.
- **Laboratory of Molecular Virology and Parasitology**, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro. Dr. Otacilio Moreira
Working group: Daniela Ferreira Nunes Ph.D.

COLOMBIA

- **Fundación Cardioinfantil - Instituto de Cardiología**, Bogotá. Dr. Juan Carlos Villar
Working group: Eliana Váquiro, Luis David Sáenz, Diana Isabel Ortiz.

SPAIN

- **Hospital Universitari Vall d'Hebrón - Drassanes**, Barcelona. Dr. Israel Molina
Working group: Diana Pou MSc, Begoña Treviño MSc, Pau Bosch-Nicolau M.D., Juan Espinosa-Pereiro M.D., Adrián Sánchez-Montalvá Ph.D., Fernando Salvador Ph.D., Inés Oliveira Ph.D., Núria Serre Ph.D., Maria Luisa Aznar Ph.D.
- **Hospital Universitario Ramón y Cajal**, Madrid. Dr. José Antonio Pérez Molina
Working group: Begoña Monge-Maillo Ph.D., Francesca Normann M.D., Sandra Chamorro M.D., Oihane Martín Ph.D.

2. Chagasic organic involvement criteria

CD cardiomyopathy

CD patient with at least one of the following findings non-attributable to other cardiomyopathies:

1. Electrocardiogram alterations:
 - Right bundle-branch block
 - Left bundle-branch block
 - Left anterior fascicular block
 - Left posterior fascicular block
 - First degree AV block (PR segment >200 milliseconds)
 - Mobitz type I AV block
 - Mobitz type II AV block
 - Advanced or third-degree AV block.
 - Sinus bradycardia (<50 beat/min or sinus pauses)
 - Abnormal Q waves
2. Increased cardiothoracic ratio > 0.5
3. Echocardiogram alterations:
 - Evidence of regional wall motion abnormality
 - Reduced LV systolic function (<50%)
 - Increased LV end-diastolic diameter >55mm

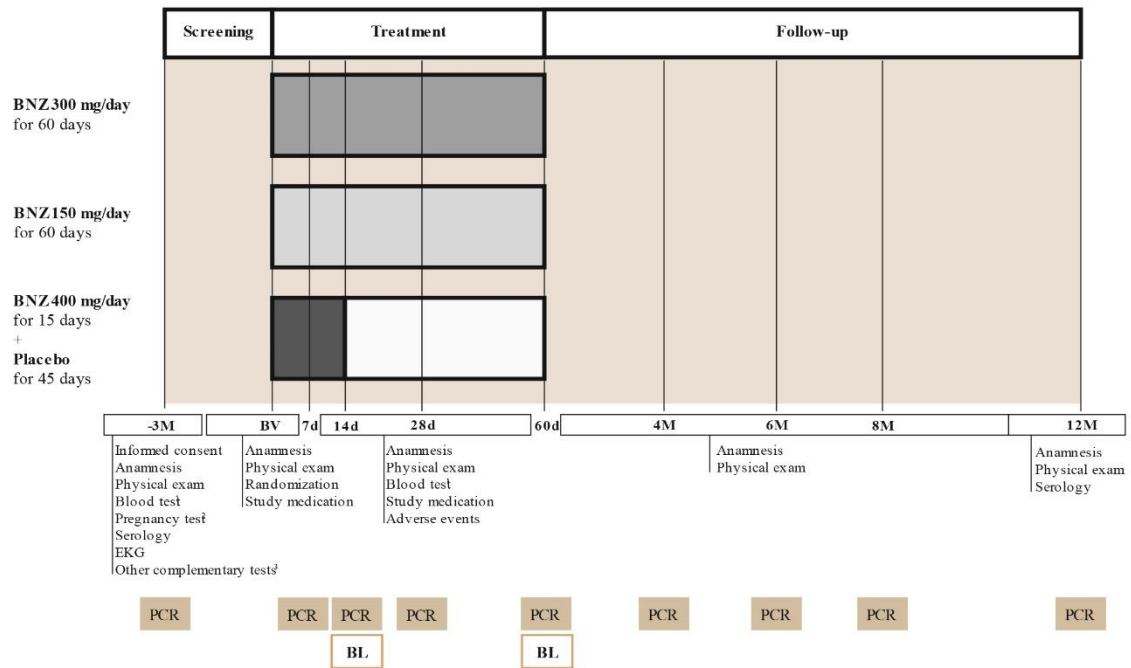
*Severe chagasic cardiomyopathy was defined as congestive heart failure or a New York Heart Association class IV.

CD digestive involvement:

- Dilated esophagus diagnosed by barium esophagogram.
- Dilated colon or sigma diagnosed by barium enema.
- Megacolon diagnosed by barium enema.

Abbreviations: AV, auricle-ventricular; CD, chagas disease; LV, left ventricle.

3. Timesheet of the study



Abbreviations: BNZ, benznidazole; BL, benznidazole levels; BV, basal visit; d, days; EKG, electrocardiogram; M, months; PCR, real-time polymerase chain reaction; PK, pharmacokinetics.

¹: blood test included hematology and biochemistry

²: Pregnancy test only to women of childbearing age

³: Other complementary tests included echocardiogram, Holter, barium enema or esophagogram at discretion of the treating physician.

4. Laboratory procedures

Serology

Two different anti-*T. cruzi* serologic tests based on different antigens were used for assessing patient eligibility. To avoid inter-laboratory variability, serum samples collected at the times indicated in the protocol were sent at the end of the study to a centralized laboratory that processed them using two techniques in parallel: Architect Chagas (Abbott Laboratories, Wiesbaden, Germany) and ORTHO *Trypanosoma cruzi* ELISA Test System (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, USA). In order to give greater robustness to the results, samples from external quality control sent by the National Program of Quality Control of Brazil were included.

PCR

Laboratories included in the project carried out the same real time (RT)-PCR protocol following the instructions included in the laboratory manual agreed among all of them. To carry out this technique, 5 ml of whole blood were collected and mixed with 5 ml of guanidine hydrochloride 6 M-ethylenediaminetetraacetic acid 0.2 M for a minimum of 72 h at room temperature. Three DNA extractions were performed using the manual column method (High Pure PCR Template Preparation Kit; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), except in Spanish centers (Vall d'Hebron University Hospital and Ramón y Cajal University Hospital) where DNA extraction was also done in triplicate using an automated extraction method (NucliSens easyMAG, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). The consensual PCR protocol consisted of a real-time multiple PCR (Duffy et al. 2013) that allows the amplification of a *T. cruzi* satellite DNA region and a linearized recombinant plasmid used as an internal amplification control. This assay has a limit of detection (LOD) of 0.70 parasite equivalents/mL and a limit of quantification (LOQ) of 1.53 parasite equivalents/mL. The RT-PCR was carried out in duplicate from each of the extractions. At least one amplification of the six performed with an amplification cycle (cycle threshold) of *T. cruzi* below 40 and a correct value of Internal Amplification Control (IAC) was interpreted as positive. To consider them as correct, the values of the IAC should meet Tukey's criteria.

To assess the homogeneity of the results obtained by the different laboratories, a harmonization panel consisting of ten tubes containing blood with uninfected guanidine and infected with 1, 10, and 100 parasitic equivalents per milliliter of *T. cruzi* strains TcV and TcVI was processed. The samples were processed blindly by the different laboratories, and the results were evaluated by an external center in charge of providing the panel and analyzing the results (Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, Buenos Aires, Argentina). On the other hand, and following the same work scheme, four external quality control panels were analyzed during the study period.

HLA typing

The typing of HLA-B alleles was carried out from the dried blood samples on paper (dried blood spots [DBS]). For this purpose, DNA was extracted using DNA Elution Solution reagent (catalog no. 159994; Qiagen, Carpinteria, CA, USA), and the concentration and quality were evaluated by measuring the absorbance at 260 and 280 nm using the Colibri microvolume spectrometer (Titertek-Berthold, Pforzheim, Germany). The characterization of the HLA-B alleles was carried out by PCR sequence-specific oligonucleotide (SSO) (Luminex Corp., Austin, TX, USA), following the instructions of the Lifecodes HLA typing kit (Immucor; Diagnóstica Longwood, Zaragoza, Spain). Briefly, the PCR-SSO/Luminex consisted of amplification with biotinylated primers of the most polymorphic regions of the HLA-B gene, followed by hybridization of the amplified product with specific probes for each allele located on the surface of Luminex microspheres and revealed with conjugated streptavidin with phycoerythrin. Finally, it was analyzed using an xMAP100 fluoroanalyzer (Luminex Corp.).

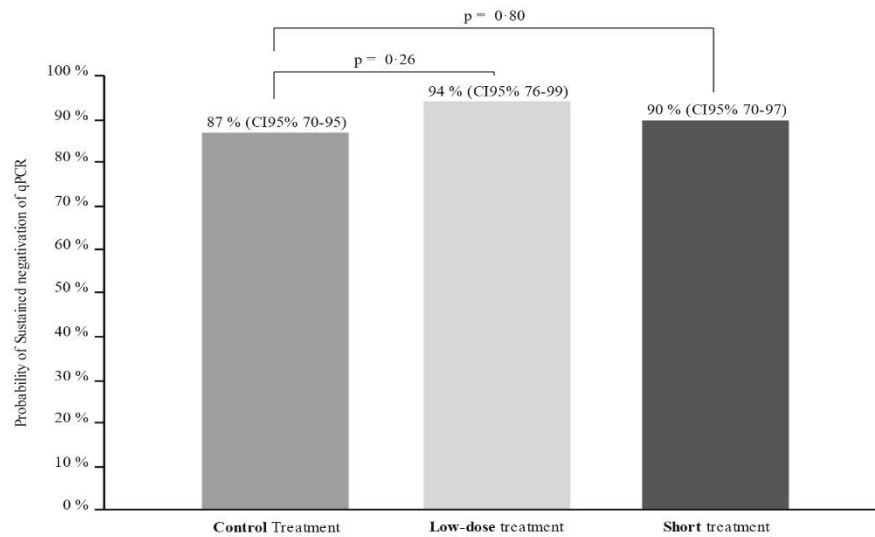
BNZ serum concentration

Quantification of BNZ was done from dried blood samples on paper (DBS). The quantification was performed by liquid chromatography (ACQUITY ultra performance liquid chromatography high-strength silica T3 C18, 2.1 × 50 mm; Waters, Milford, MA, USA) coupled to triple-quadrupole mass spectrophotometry (Xevo TQ; Waters).

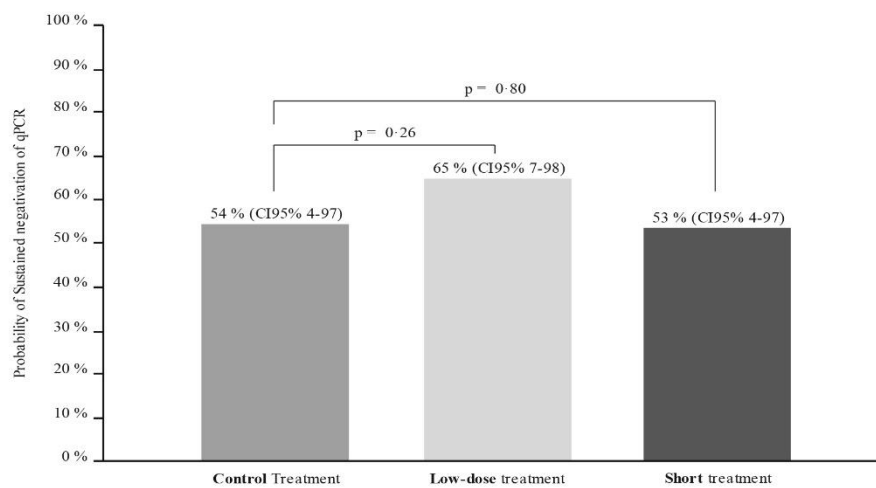
5. Sensitivity analysis of the primary outcome

The following sensitivity analysis were performed using the ITT data set after multiple imputation as stated in Methods.

1. Sensitivity analysis excluding Brazil and Spain



2. Sensitivity analysis considering CCC individuals

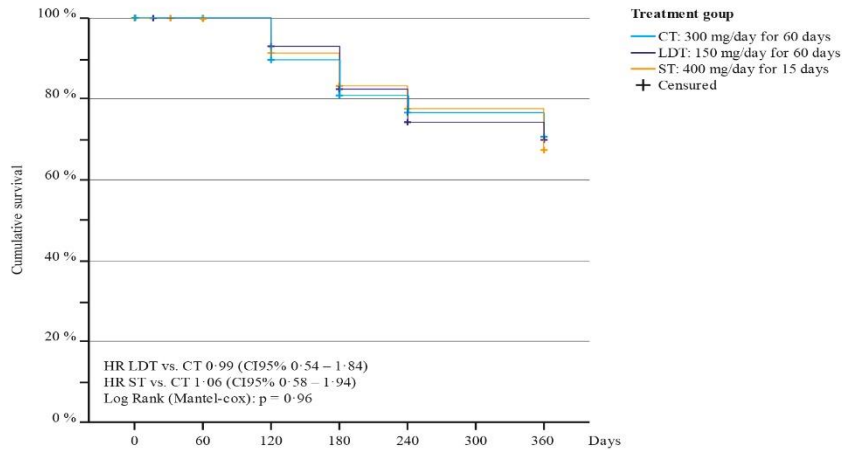


Control treatment: 300mg/day for 60 days; Low-dose treatment: 150mg/day for 60 days; Short treatment: 400mg/day for 15 days.

6. Survival analysis of sustained qPCR negativization

Time until positivation was described by means of the Kaplan-Meier estimator of the survival function in the intention-to-treat and per-protocol set. A Log Rank (Mantel-cox) test was used to compare each experimental arm to the CT. A multivariable Cox regression including country of origin was used to calculate Mantel-Haenszel hazard ratios. Lost to follow-up and protocol deviations were included and censored at the last visit before lost to follow-up. All cases that ended the follow-up without presenting the outcome, were censored at day 360.

Intention-to-treat analysis



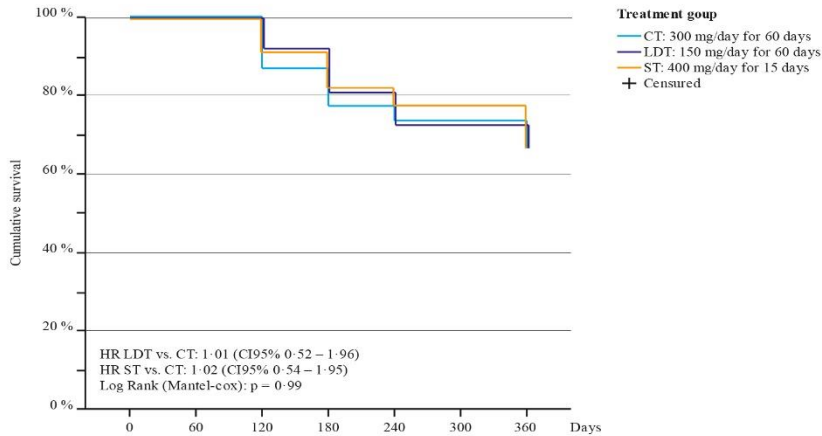
Number at risk
(number censored)

CT	78 (0)	71 (7)	62 (9)	55 (10)	46 (16)	0 (58)
LDT	77 (0)	73 (4)	65 (7)	57 (8)	50 (9)	0 (56)
ST	79 (0)	73 (6)	66 (7)	59 (8)	53 (10)	0 (56)

Mean time of sustained qPCR negativation in days (CI95%)

CT	315 (294-335)
LDT	315 (295-334)
ST	318 (299-337)

Per protocol analysis.



Number at risk
(number censored)

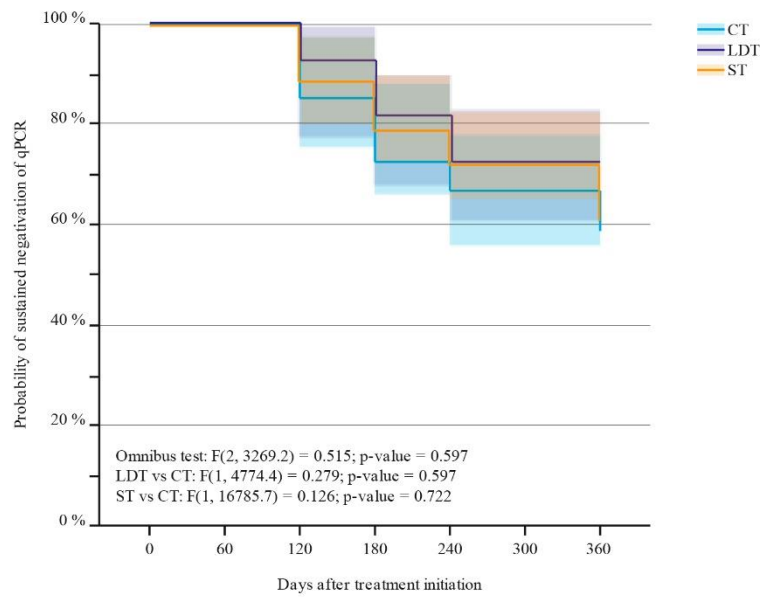
CT	53 (0)	46 (0)	41 (0)	39 (0)	0 (37)
LDT	62 (0)	57 (0)	50 (0)	45 (0)	0 (42)
ST	67 (0)	61 (0)	55 (0)	52 (0)	0 (45)

Mean time of sustained qPCR negativation in days (CI95%)

CT	306 (281-332)
LDT	310 (289-3342)
ST	317 (296-337)

Intention-to-treat analysis with the imputed datasets:

Omnibus logrank test was used to assess differences between the treatment arms. Additionally, pairwise comparisons were performed between all treatment arms, adjusting the significance by the Benjamini-Hochberg method. Inferences for the χ^2 statistic based on multiply imputed datasets were performed using the D_2 statistic.

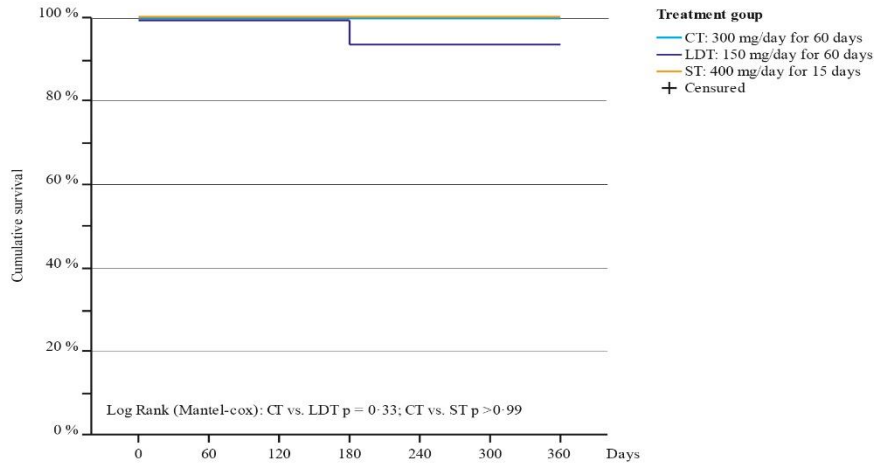


Abbreviations: CT: control treatment, LDT: low-dose treatment; ST: short treatment; HR: hazard ratio

7. Per-protocol survival analysis per country

Time until positivization was described by means of the Kaplan-Meier estimator of the survival function in the per-protocol set of each country. A Log Rank (Mantel-cox) test was used to compare each experimental arm to the CT. All cases that ended the follow-up without presenting the outcome, were censored at day 360.

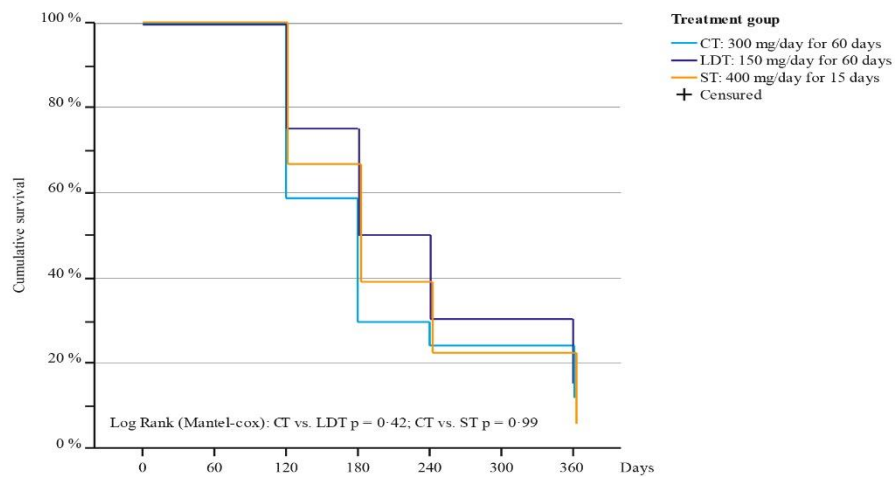
Per protocol analysis.
Country: Argentina



Number at risk
(number censored)

CT	16 (0)	16 (0)	16 (0)	16 (0)	0 (16)
LDT	17 (0)	17 (0)	16 (0)	16 (0)	0 (16)
ST	19 (0)	19 (0)	19 (0)	19 (0)	0 (19)

Per protocol analysis.
Country: Brazil

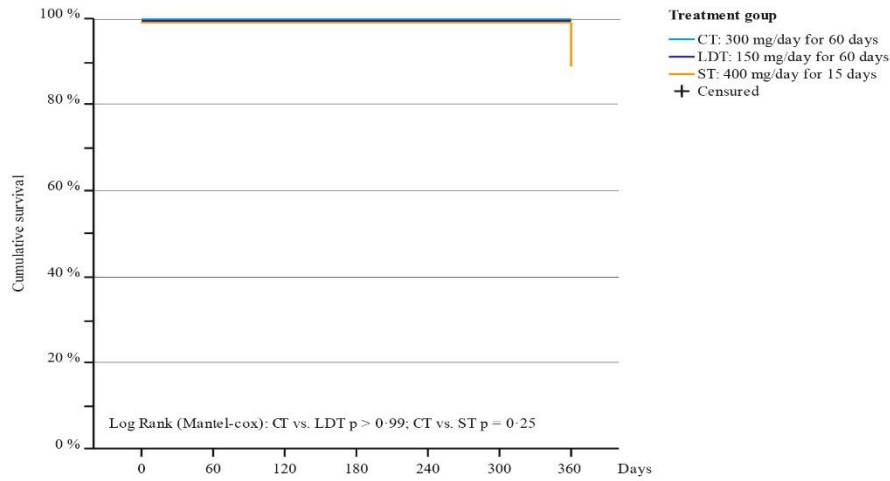


Number at risk
(number censored)

CT	17 (0)	10 (0)	5 (0)	4 (0)	0 (2)
LDT	20 (0)	15 (0)	10 (0)	6 (0)	0 (3)
ST	18 (0)	12 (0)	7 (0)	4 (0)	0 (1)

Per protocol analysis.

Country: Colombia

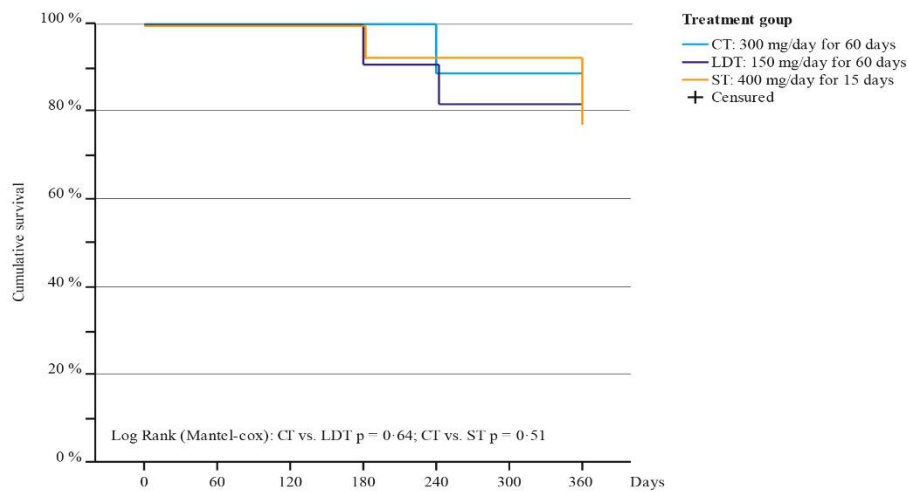


Number at risk
(number censored)

CT	11 (0)	11 (0)	11 (0)	11 (0)	0 (11)
LDT	14 (0)	14 (0)	14 (0)	14 (0)	0 (14)
ST	17 (0)	17 (0)	17 (0)	17 (0)	0 (15)

Per protocol analysis.

Country: Spain



Number at risk
(number censored)

CT	9 (0)	9 (0)	9 (0)	8 (0)	0 (8)
LDT	11 (0)	11 (0)	10 (0)	9 (0)	0 (9)
ST	13 (0)	13 (0)	12 (0)	12 (0)	0 (10)

Abbreviations: CT: control treatment; LDT: low-dose treatment; ST: short-treatment.

8. Safety profile (overall and by country) and list of SAE.**Overall**

	Overall (n=234)	Current treatment 300mg/60days (n=78)	Low-dose treatment 150mg/60days (n=77)	Short treatment 400mg/15days (n=79)	p
At least one AE	177 (76)	62 (79)	56 (73)	59 (77)	0.51
Number of AE per patient; median; IQR	3 (2-5)	3 (2-6)	2.5 (1-5)	3 (2-5)	0.35
Treatment-related adverse events	522/673 (78)	210/266 (79)	158/203 (78)	154/204 (75)	0.67
Severity of AE					0.51
Mild	557 (83)	212 (80)	170 (84)	175 (86)	
moderate	100 (15)	47 (18)	28 (14)	25 (12)	
Severe	16 (2)	7 (3)	5 (2)	4 (2)	
Serious adverse events (SAE) ^a	8/177 (4)	4/62 (6)	2/56 (3)	2/59 (3)	0.66
Patients with AE leading to temporary interruption	26 (11)	12 (15)	8 (10)	6 (8)	0.29
Patients with AE leading to permanent discontinuation	20 (8)	11 (14)	7 (9)	2 (2)	0.03
Cutaneous toxicity	99 (42)	44 (56)	27 (35)	28 (35)	0.01
Pruritus	61 (26)	26 (33)	23 (30)	12 (15)	
Rash	81 (35)	47 (60)	18 (23)	16 (20)	
Urticarial rash	14 (6)	5 (6)	2 (3)	7 (9)	
Facial oedema	5 (2)	2 (2)	1 (1)	2 (2)	
Nervous system disorders	62 (26)	19 (24)	22 (29)	21 (27)	0.86
Headache	52 (22)	18 (23)	17 (22)	17 (21)	
Dysgeusia	13 (6)	6 (8)	3 (4)	4 (5)	
Paresthesia	10 (4)	1 (1)	3 (4)	6 (8)	
Dizziness	8 (3)	2 (2)	4 (5)	2 (2)	
Gastrointestinal disorders	91 (39)	32 (41)	29 (38)	30 (38)	0.87
Nausea/vomit	59 (26)	24 (31)	14 (18)	21 (27)	
Epigastric pain / dyspepsia	55 (24)	22 (28)	15 (19)	18 (23)	
Diffuse abdominal pain	31 (13)	11 (14)	9 (12)	11 (14)	
Diarrhea	15 (6)	5 (6)	4 (5)	6 (8)	
General symptoms	82 (35)	26 (33)	27 (35)	29 (37)	0.85
Asthenia	9 (4)	1 (1)	6 (8)	2 (2)	
Anorexia	4 (2)	1 (1)	2 (3)	1 (1)	
Musculoskeletal disorders	59 (26)	18 (23)	22 (29)	19 (24)	
Sleeping disorders	36 (16)	9 (11)	11 (14)	16 (20)	
Lymphadenopathy	7 (3)	6 (8)	1 (1)	0	
Anxiety	5 (2)	2 (2)	2 (3)	1 (1)	
Herpes reactivation	6 (3)	0	3 (4)	3 (4)	
Miscellaneous	104 (44)	44 (56)	30 (39)	30 (38)	0.15
Laboratory alterations					
Leucopenia	9 (4)	3 (4)	4 (5)	2 (3)	0.47
Alanine aminotransferase increase	17 (7)	5 (6)	8 (10)	4 (5)	0.44
Grade 1	11/17 (65)	2/5 (40)	5/8 (62)	4/4 (100)	
Grade 2	5/17 (29)	3/5 (60)	2/8 (25)	0	
Grade 3	1/17 (6)	0	1/8 (12)	0	
Aspartateaminotransferase increase	18 (8)	7 (9)	7 (9)	4 (5)	0.57
Grade 1	7/18 (39)	4/7 (57)	3 (43)	4/4 (100)	
Grade 2	7/18 (39)	3/7 (43)	3 (43)	0	

Grade 3	4/18 (22)	0	1 (14)	0	
Alkaline Phosphatase increase	9 (4)	3 (4)	4 (5)	2 (2)	0.71
Grade 1	9/9 (100)	3/3 (100)	4/4 (100)	2/2 (100)	
Grade 2	0	0	0	0	
Grade 3	0	0	0	0	
γ - glutamyl transferase increase	11 (5)	5 (6)	3 (4)	3 (4)	0.67
Grade 1	9/11 (82) 2/11	4/5 (80)	3/3 (100)	2/3 (67)	
Grade 2	(18)	1/5 (20)	0	1 (33)	
Grade 3	0	0	0	0	

Data are shown as No. (%) unless otherwise indicated. Adverse events were analyzed in the intention to treat population.

Abbreviations: AE, adverse events; IQR, interquartile range; SAE, severe adverse events.

* Serious adverse events: when the adverse events yielded hospitalization or where considered an important threat for patients life. It included hypersensitivity cutaneous reactions, congestive heart failure, arrhythmia, myocardial infarction, and neutropenia.

Adverse events Argentina

	Overall (n=60)	Current treatment 300mg/60days (n=20)	Low-dose treatment 150mg/60days (n=20)	Short treatment 400mg/15days (n=20)	p
Patients with AE	47 (78)	16 (80)	15 (75)	16 (80)	0.91
Number of AE per patient; mean; IQR	2.5 (2-4.5)	4 (2-5)	2 (2-5)	2 (1.5-3)	0.32
Treatment-related adverse events	115/146 (79)	49/62 (79)	37/45 (82)	29/39 (74)	0.68
Serious adverse events (SAE)	2/47 (4)	1/16 (6)	1/15 (7)	0	0.58
Intensity					0.11
Mild	108 (74)	43 (69)	32 (71)	33 (85)	
moderate	36 (25)	19 (31)	11 (24)	6 (15)	
Severe	2 (1)	0	2 (4)	0	
Patients with AE leading to temporary interruption	14 (23)	7 (35)	4 (20)	3 (15)	0.30
Patients with AE leading to permanent discontinuation	5 (8)	2 (10)	3 (15)	0	0.22
Cutaneous toxicity	30 (50)	13 (65)	7 (35)	10 (50)	0.16
Nervous system disorders	12 (20)	5 (25)	4 (20)	3 (15)	0.73
Gastrointestinal disorders	23 (38)	8 (40)	8 (40)	7 (35)	0.93
General symptoms	14 (23)	3 (15)	6 (30)	5 (25)	0.52
Laboratory alterations*	8 (13)	2 (10)	5 (25)	1 (5)	0.15
Miscellaneous	8 (13)	2 (10)	3 (15)	3 (15)	0.87

Data are shown as No. (%) unless otherwise indicated.

Abbreviations: AE, adverse events; IQR, interquartile range; SAE, severe adverse events.

*Laboratory alterations directly reported by investigators

Adverse events Brazil

	Overall (n=60)	Current treatment 300mg/60days (n=20)	Low-dose treatment 150mg/60days (n=20)	Short treatment 400mg/15days (n=20)	p
Patients with AE	40 (68)	14 (70)	13 (65)	13 (65)	0.93
Number of AE per patient; mean; IQR	2 (1-4)	2 (1-3)	2 (1-3)	3 (2-5)	0.24
Treatment-related adverse events	103/132 (78)	38/48 (79)	29/35 (83)	36/49 (73)	0.57
Serious adverse events (SAE)	3/40 (7)	1/14 (7)	0	2/13 (15)	0.33
Intensity					0.11
Mild	102 (77)	34 (71)	32 (91)	36 (73)	
moderate	26 (20)	13 (27)	3 (9)	10 (20)	
Severe	4 (3)	1 (2)	0	3 (6)	
Patients with AE leading to temporary interruption	2 (3)	2 (10)	0	0	0.13
Patients with AE leading to permanent discontinuation	3 (5)	2 (10)	0	1 (5)	0.35
Cutaneous toxicity	22 (37)	7 (35)	8 (40)	7 (35)	0.93
Nervous system disorders	14 (24)	7 (35)	4 (20)	3 (15)	0.30
Gastrointestinal disorders	17 (29)	6 (30)	5 (25)	6 (30)	0.92
General symptoms	18 (30)	6 (30)	4 (20)	8 (40)	0.39
Laboratory alterations*	0	0	0	0	
Miscellaneous	18 (30)	7 (35)	4 (20)	7 (35)	0.49

Data are shown as No. (%) unless otherwise indicated.

Abbreviations: AE, adverse events; IQR, interquartile range; SAE, severe adverse events.

*Laboratory alterations directly reported by investigators

Adverse events Colombia

	Overall (n=55)	Current treatment 300mg/60days (n=18)	Low-dose treatment 150mg/60days (n=18)	Short treatment 400mg/15days (n=19)	p
Patients with AE	47 (85)	17 (94)	15 (83)	15 (79)	0.39
Number of AE per patient; mean; IQR	5 (3-7)	5.5 (3-8)	5 (2-6)	4 (2.5-6)	0.38
Treatment-related adverse events	227/264 (86)	97/108 (90)	67/81 (83)	63/75 (84)	0.32
Serious adverse events (SAE)	3/47 (6)	2/17 (12)	1/15 (7)	0	0.40
Intensity					0.34
Mild	228 (86)	93 (86)	68 (84)	67 (89)	
moderate	29 (11)	10 (9)	11 (14)	8 (11)	
Severe	7 (3)	5 (5)	2 (2)	0	
Patients with AE leading to temporary interruption	7 (13)	3 (17)	2 (11)	2 (10)	0.83
Patients with AE leading to permanent discontinuation	7 (13)	4 (22)	2 (11)	1 (5)	0.29
Cutaneous toxicity	26 (47)	14 (78)	7 (39)	5 (26)	0.01
Nervous system disorders	24 (44)	7 (39)	7 (39)	10 (53)	0.62
Gastrointestinal disorders	33 (60)	11 (61)	11 (61)	11 (58)	0.97
General symptoms	27 (79)	11 (61)	10 (56)	6 (32)	0.16
Laboratory alterations*	16 (29)	6 (33)	6 (33)	4 (21)	0.63
Miscellaneous	24 (44)	12 (67)	8 (44)	4 (21)	0.02

Data are shown as No. (%) unless otherwise indicated.

Abbreviations: AE, adverse events; IQR, interquartile range; SAE, severe adverse events.

*Laboratory alterations directly reported by investigators

Adverse events Spain

	Overall (n=59)	Current treatment 300mg/60days (n=20)	Low-dose treatment 150mg/60days (n=19)	Short treatment 400mg/15days (n=20)	p
Patients with AE	43 (73)	15 (75)	13 (68)	15 (75)	0.87
Number of AE per patient; mean; IQR	3 (1-4)	2 (1-4.5)	2.5 (1-4)	3 (2-5)	0.61
Treatment-related adverse events	79/140 (56)	26/48 (54)	27/44 (61)	26/43 (55)	0.01
Serious adverse events (SAE)	0	0	0	0	
Intensity					0.70
Mild	119 (91)	42 (87)	38 (90)	39 (95)	
moderate	9 (7)	5 (10)	3 (7)	1 (2)	
Severe	3 (2)	1 (2)	1 (2)	1 (2)	
Patients with AE leading to temporary interruption	3 (5)	0	2 (10)	1 (5)	0.33
Patients with AE leading to permanent discontinuation	5 (8)	3 (15)	2 (10)	0	0.22
Cutaneous toxicity	21(36)	10 (50)	5 (26)	6 (30)	0.25
Nervous system disorders	12 (20)	0	7 (37)	5 (10)	0.01
Gastrointestinal disorders	18 (30)	7 (35)	5 (26)	6 (30)	0.84
General symptoms	23 (39)	6 (30)	7 (37)	10 (50)	0.42
Laboratory alterations*	5 (8)	2 (10)	1 (5)	2 (10)	0.83
Miscellaneous	20 (34)	8 (40)	8 (42)	4 (20)	0.27

Data are shown as No. (%) unless otherwise indicated.

Abbreviations: AE, adverse events; IQR, interquartile range; SAE, severe adverse events.

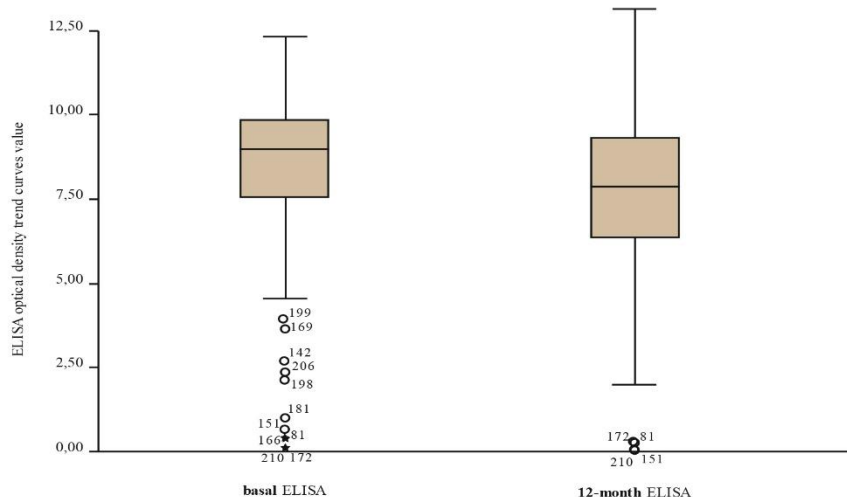
*Laboratory alterations directly reported by investigators

Serious adverse events (patient listing)

Patient id	Treatment group	Event day	Characteristics
94	300 mg/day 60d	7	Generalized rash with fever requiring hospital care
128	150 mg/day 60d	54	Decompensated heart failure requiring inpatient care
142	300 mg/day 60d	7	Generalized rash with fever requiring hospital care
163	400 mg/day 15d	60	Decompensated heart failure requiring inpatient care with fatal outcome
178	400 mg/day 15d	7	Sustained supraventricular tachycardia requiring hospital care
192	150 mg/day 60d	67	Acute myocardial infarction
207	300 mg/day 60d	28	Severe neutropenia (total count 0)
249	300 mg/day 60d	28	Severe neutropenia (total count 0)

9. Serology absorption rates at inclusion and end of follow-up

The following boxplots are the result of optical density trend curves from an ELISA method. Due to a skewed distribution of values, a Wilcoxon signed-rank test for paired values was used to compare means. We considered as outliers those values 1.5 times the IQR. They were revised for consistency.

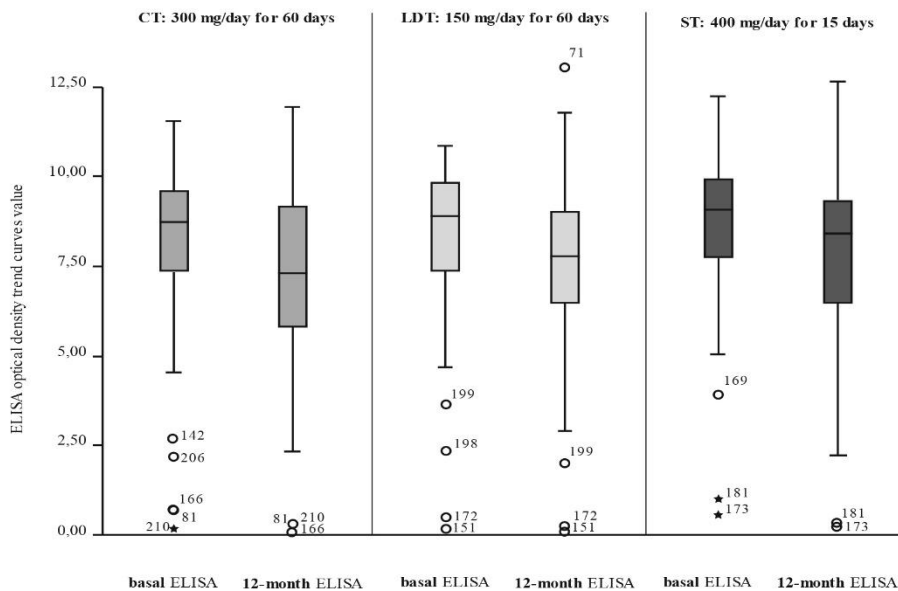


Mean basal ELISA: 8·22 (SD 2·33); Mean 12-month ELISA: 7·54 (SD 2·54)

Wilcoxon signed-rank test: -6·882; p < 0·001

*Outliers: After revision, these individuals presented consistent values between basal and 12-month determinations.

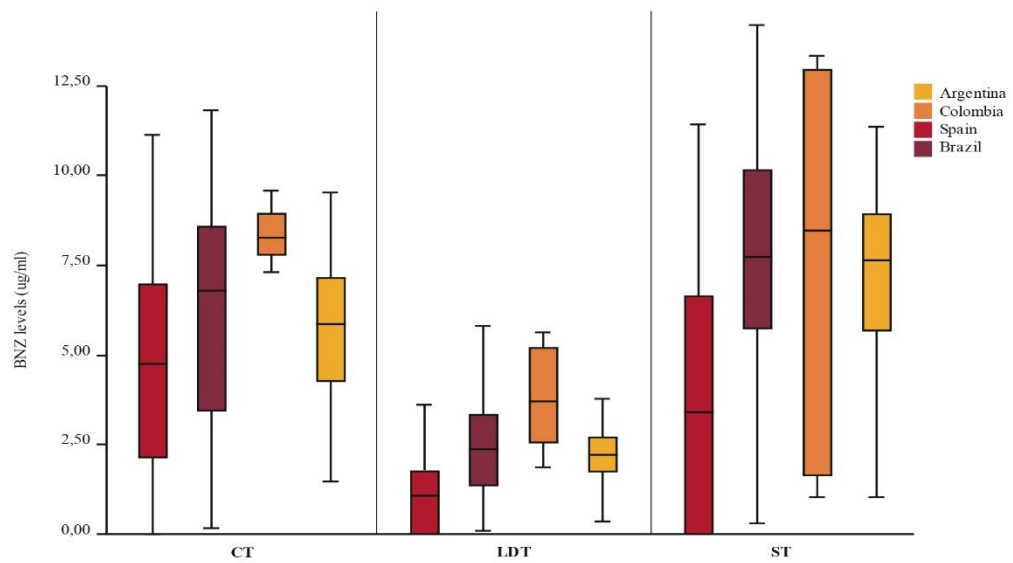
The following boxplots represent ELISA value distribution within each treatment group.



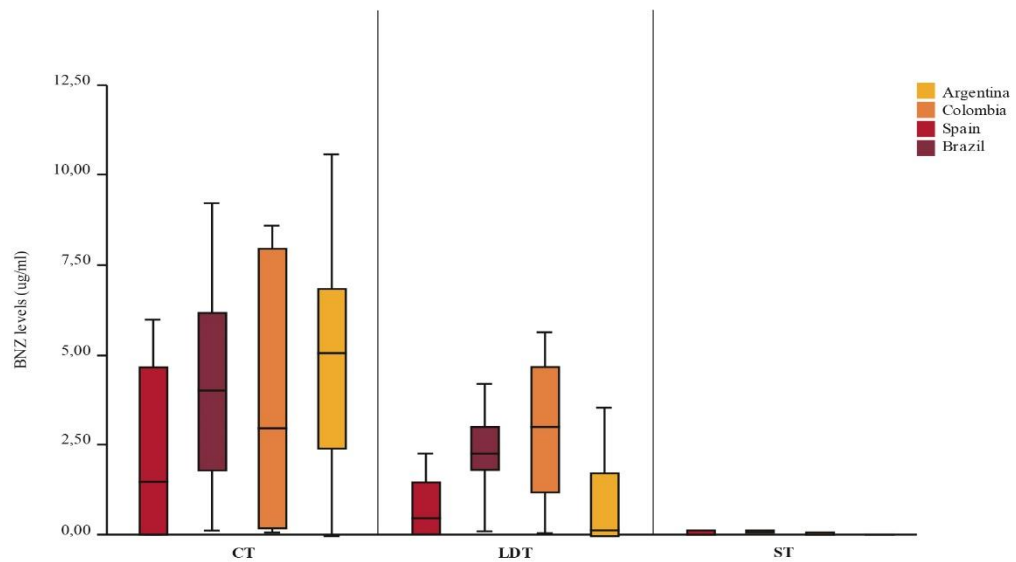
10. Benznidazole levels.

Determination of BNZ levels were done at 15 days of treatment and 60 days. BNZ levels are presented in ug/mg by country and treatment arm. Then, a comparison between BNZ levels, treatment efficacy and permanent discontinuation is shown.

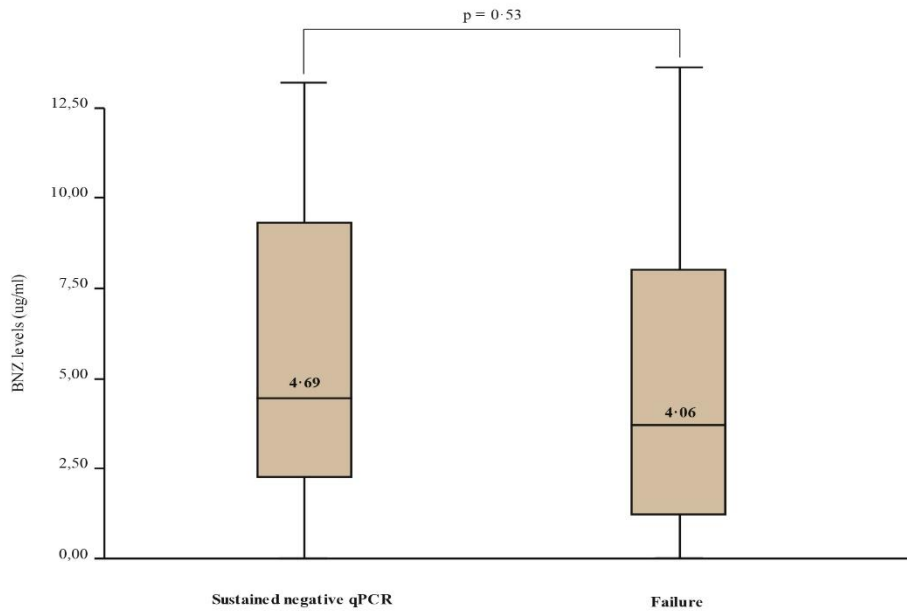
1. BNZ levels at 15 days by country.



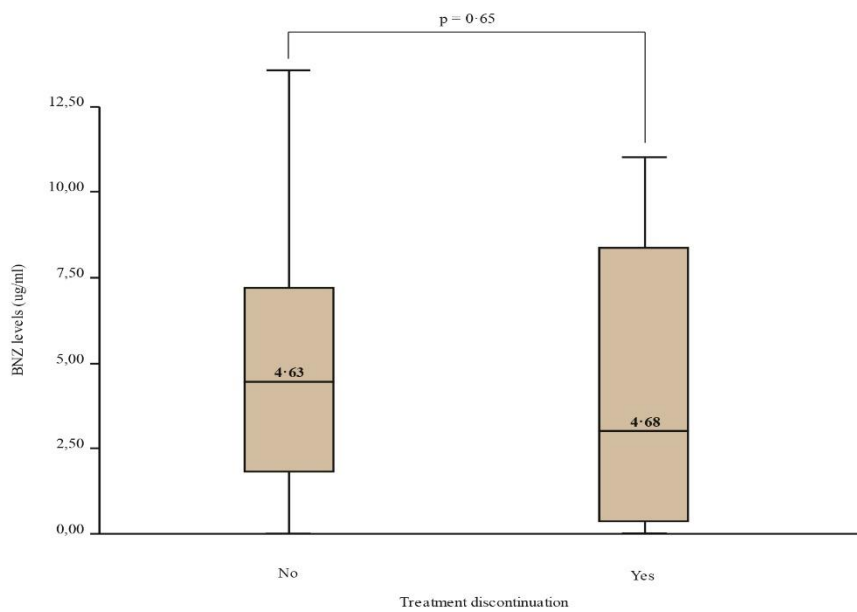
2. BNZ levels at 60 days by country



1. Comparison between BNZ levels at 15 days of participants who presented a sustained qPCR negativization and those who did not.



2. Comparison between BNZ levels at 15 days of participants who interrupted the treatment definitively and those who did not.



*Due to a skewed distribution of values a Mann-Whitney U was used to compare means between both groups.

11. Most frequent HLA-B alleles in each country.

The following table presents the most frequent HLA-B alleles in each country. The numbers correspond to individuals presenting the allele so both heterozygosis or homozygosis are counted as same.

ARGENTINA	N	BRAZIL	N	COLOMBIA	N	SPAIN	N
B*07:02	8	B*08:01	8	B*15:01	9	B*35:05	23
B*35:05	8	B*35:01	8	B*40:02	9	B*51:01	10
B*12:04	7	B*14:02	7	B*35:43	8	B*15:04	6
B*39:03	7	B*44:02	7	B*44:03	8	B*40:02	6
B*18:01	6	B*51:01	7	B*07:02	7	B*35:01	5
B*44:03	6	B*07:02	6	B*51:01	6	B*48:01	5
B*40:02	4	B*18:01	6	B*08:01	5	B*18:01	4
B*41:01	4	B*44:03	5	B*14:02	5	B*44:03	4
B*48:01	4	B*50:01	5	B*35:01	4	B*51:13	4
B*51:01	4	B*40:04	4	B*38:01	4	B*15:01	3

N: number of patients were the specific HLA-B allele was found.

10.3. Annex 3: Revisió sistemàtica: associació entre qPCR i CCC

*Bosch-Nicolau P, Espinosa-Pereiro J, Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Molina I. Association Between *Trypanosoma cruzi* DNA in Peripheral Blood and Chronic Chagasic Cardiomyopathy: A Systematic Review. *Front Cardiovasc Med.* 2022 Jan 31;8:787214. doi: 10.3389/fcvm.2021.787214. PMID: 35174221.



Association Between *Trypanosoma cruzi* DNA in Peripheral Blood and Chronic Chagasic Cardiomyopathy: A Systematic Review

Pau Bosch-Nicolau^{1,2}, Juan Espinosa-Pereiro^{1,2}, Fernando Salvador^{1,2}, Adrián Sánchez-Montalvá^{1,2} and Israel Molina^{1,2*}

¹ Tropical Medicine & International Health Unit Vall d'Hebrón - Drassanes, Infectious Diseases Department, PROSICS Barcelona, University Hospital Vall d'Hebrón, Barcelona, Spain, ² Medicine Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Chronic chagasic cardiomyopathy (CCC) is the most important complication of patients with Chagas disease (CD). The role of persistent detection of DNA in peripheral blood and its association to CCC is unknown. We performed a systematic review up to July 2021, including studies that reported ratios of CCC and PCR positivity among non-treated adult patients. We identified 749 records and selected 12 for inclusion corresponding to 1,686 patients. Eight studies were performed in endemic countries and 4 in non-endemic countries. Only two studies showed an association between CCC and *Trypanosoma cruzi* parasitemia by means of PCR detection. Six studies reported greater positive PCR ratios among patients with CCC than in the patients with indeterminate chagas disease (ICD) with no statistical significance. A significant risk of bias has been detected among most of the studies. Therefore, while we performed a meta-analysis, wide inter-study heterogeneity impeded its interpretation.

Conclusions: With the available information, we could not establish a correlation between PCR-detectable parasitemia and CCC.

Systematic Review Registration:

https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display_record.php?ID=CRD42020216072, identifier: CRD42020216072.

Keywords: Chagas disease, Chagas cardiomyopathy, *T. cruzi*, polymerase chain reaction, PCR

INTRODUCTION

Chagas disease (CD) is a protozoal disease caused by *Trypanosoma cruzi*, a zoonotic infection mainly found in endemic areas of the American continent. It affects about 8 million people worldwide and because of globalization and international migrations during the last decades, it has become a cause of concern in non-endemic countries (1).

Chagas disease has an acute phase that generally runs its course asymptomatic or with rather unspecific symptomatology. Once patients overcome this phase, they enter a chronic phase, defined by the absence of trypomastigotes in the blood smear. Most people with *T. cruzi* infection are diagnosed at this stage. Approximately 30–40% of chronically infected patients will develop visceral involvement comprising the chronic chagasic cardiomyopathy (CCC), the digestive form, or both during the following 10–30 years after infection (2).

OPEN ACCESS

Edited by:

Livia Passos,
Brigham and Women's Hospital and
Harvard Medical School,
United States

Reviewed by:

Erik Josef Behringer,
Loma Linda University, United States
Marcelo Santos Da Silva,
São Paulo State University, Brazil

*Correspondence:

Israel Molina
imolina@vhebron.net

Specialty section:

This article was submitted to
General Cardiovascular Medicine,
a section of the journal
Frontiers in Cardiovascular Medicine

Received: 30 September 2021

Accepted: 28 December 2021

Published: 31 January 2022

Citation:

Bosch-Nicolau P, Espinosa-Pereiro J, Salvador F, Sánchez-Montalvá A and Molina I (2022) Association Between *Trypanosoma cruzi* DNA in Peripheral Blood and Chronic Chagasic Cardiomyopathy: A Systematic Review. *Front. Cardiovasc. Med.* 8:787214. doi: 10.3389/fcvm.2021.787214

CCC is considered the cause of at least 7,000 deaths every year and is the most common reason for performing heart transplants in Latin America. The principal underlying causes are sudden death from malignant arrhythmias and heart failure as a consequence of dilated cardiomyopathy (3).

Both host immune response and the persistence of infection are crucial on CCC progression (4). Host factors, such as genetic polymorphisms involved in the immune response have been proposed as prognosis markers (5). Regarding the role of *T. cruzi* persistence, several studies have evidenced that visceral involvement is directly linked to the parasite presence on such organs in both human and animal models (6). Besides, an association between certain discrete typing units (DTU), which are used to group *T. cruzi* genetic diversity, and its virulence and tissue tropism has been described (7).

Blood parasites can be detected by PCR. However, parasite dynamics is still a matter of debate. While in the acute phase, the presence of *T. cruzi* in the blood is constant, in the chronic phase low level parasitemia is observed in a subset of patients (8). Different PCR assays have been developed to detect the parasite DNA with initial difficulties in standardizing techniques to obtain reliable and comparable results (9). However, in recent years, notable advances have been made with new methodologies showing reliable results that have been used to monitor the parasite load in patients with CCC and follow-up the effectiveness of etiologic treatments (10). Besides, the relationship between parasitemia or the presence of parasitic DNA on peripheral blood, and disease progression is controversial (11, 12).

Therefore, this systematic review has the objective of assessing the association between the presence of parasitic DNA of *T. cruzi* on peripheral blood through PCR and CCC.

MATERIALS AND METHODS

Study Design

We conducted a systematic review following the standardized guidance (13), and we adhered to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) statement using a flow diagram and following its checklist to ensure that all recommended information is captured and findings are properly reported (14). The review protocol was registered in the PROSPERO database (registration ID number: CRD42020216072).

Eligibility Criteria and Patient Population

We included clinical trials, controlled observational and cross-sectional studies in adult patients (>16 years old) with chronic CD reporting data on the results of the peripheral blood *T. cruzi* PCR and CCC.

Eligible studies had to establish the chronic CD diagnosis through two different positive serological tests. Indeterminate Chagas disease (ICD) concerns patients diagnosed with a chronic CD that presented with normal ECG and/or echocardiogram, regardless of the presence or absence of gastrointestinal disease. CCC was defined as electrocardiographic or echocardiographic alterations not attributed to other conditions. We included

studies considering any PCR protocol whenever the same procedure was maintained throughout the study.

Studies assessing the impact of treatment with benznidazole, nifurtimox, or azole-derivative drugs were excluded. In addition, we excluded studies focusing on acute infections, pregnant women, children, or immunocompromised patients.

Literature Search, Data Collection, and Reporting of Results

We searched Medline, EMBASE, and LILACS databases. Additionally, we tracked citations to relevant studies in Scopus and the ISI Web of Knowledge for review purposes, and manually screened references lists of these studies. We adapted the search strategy to the requirements of each database (**Supplementary Material Appendix 1**). There were no language or publication period restrictions. We conducted the last search during July 2021.

One reviewer (PBN) screened the titles and abstracts resulting from the search against inclusion criteria. We obtained a full-text copy of eligible references to finally decide on their inclusion. A second reviewer (JEP) independently checked the eligibility decisions for accuracy. We discussed disagreements until a decision was reached; and planned to involve a third investigator if discrepancies remained.

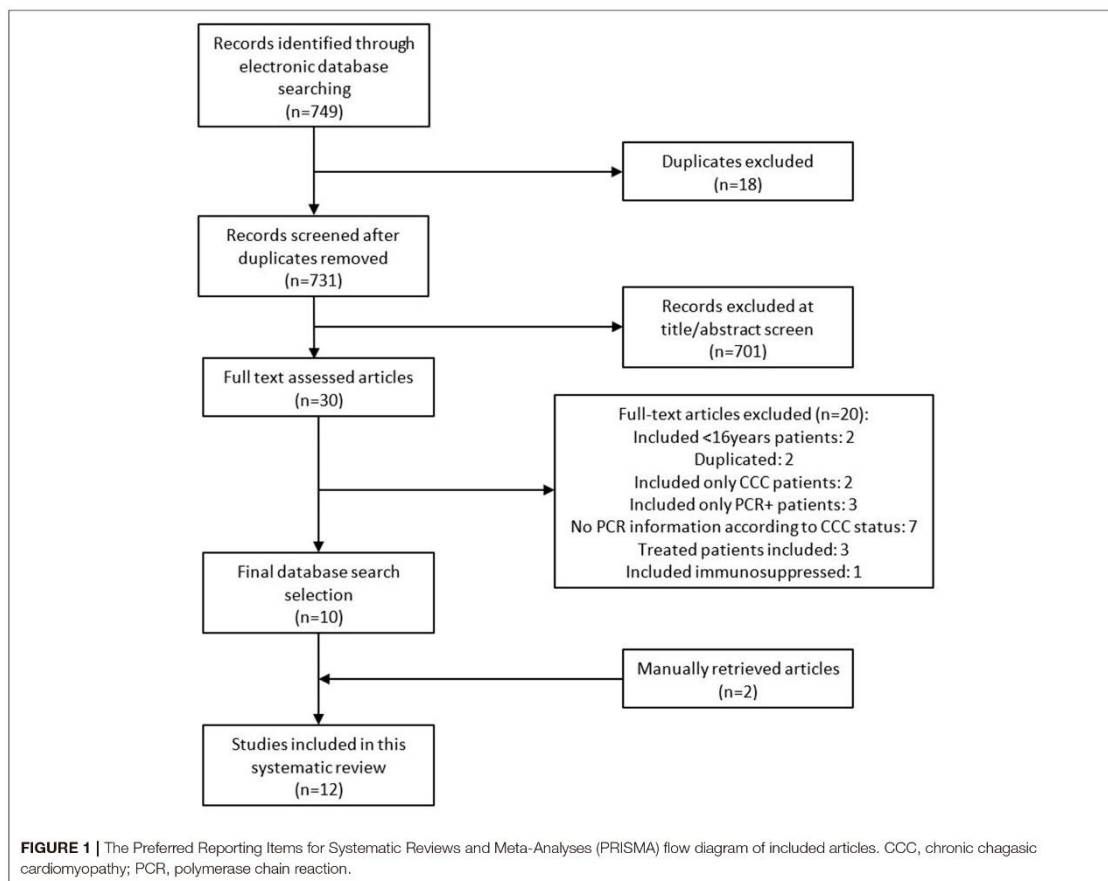
Two researchers (PBN and JEP) extracted data from included studies using the standardized extraction forms. No pilot study was conducted due to the low number of articles included. Whenever possible, article authors were contacted for unreported or additional data to minimize the missing data. For each study, we collected (when available): study design, baseline characteristics, cardiac involvement, PCR method, PCR status of the included patients at the inclusion, and association measures as reported by authors of each study. We independently assessed the risk of bias for each study using a modified Quality In Prognosis Studies (QUIPS). Tool checklist (**Supplementary Material Appendix 2**), appropriate for prognostic factor review questions (15).

Statistical Analysis

We described the population of each study and the frequencies of positive PCR among ICD and CCC participants. The association of PCR status and visceral involvement was extracted as the amount of positive PCR among ICD participants and CCC participants, using as association measure the odds ratios (ORs) and 95% *CI*. Pooled OR was calculated using the Mantel-Haenszel approach with a random effects model due to the heterogeneity of each study population. Inter-study heterogeneity was assessed with a restricted maximum likelihood model and reported as the I^2 and tau statistics. We adhered to the methods recommended in the Cochrane Handbook for Systematic Reviews of interventions whenever possible (16).

RESULTS

Our search retrieved 749 records. After removing duplicates and reading titles and abstracts, we discarded 719 records as they were *in vitro* experiments, were performed in animals,



corresponded to *Trypanosoma* species other than *T. cruzi*, included acute infection patients or treated patients, or did not report visceral involvement. Of the remaining 30 reports, we proceeded to a full-text review and finally included 10 articles. The characteristics of excluded studies are reported in **Supplementary Material Appendix 3** (8, 11, 17–34). After checking the reference lists of these studies, we identified two additional eligible studies. The complete eligibility process is depicted in a PRISMA flowchart (**Figure 1**).

Finally, we included 12 studies comprising 1,686 patients (12, 35–45), which are described in **Table 1**. Eight studies were cross-sectional studies, 3 were designed as prospective cohorts, and 1 was a case-control study. Countries where studies were performed in endemic areas were as follows: 3/8 (37.5%) in Brazil, 3/8 (37.5%) in Chile, 1 (12.5%) in Argentina, and 1 (12.5%) in Bolivia. Among them, 1 was performed in a rural site, 2 in urban facilities, and 5 combined patients living in both urban and rural contexts. Four studies included patients from non-endemic countries: 3 from Spain where more than 90% of patients came

from Bolivia and 1 from Japan. Patients' ages ranged from 16 to 81 years old, and most of them were women (58.8%; 885/1,505).

Chronic chagasic cardiomyopathy assessment was performed using ECG in all studies. In 4 (33.3%) studies, ECG was combined with echocardiography, in 1 (8%) was combined with chest radiography, and in 4 (33.3%), the 3 ancillary tests were performed. CCC classification was very heterogeneous and included either predefined criteria by the authors (35–37, 40, 43) or standardized classifications as Minnesota criteria (12, 38), Kuschnir criteria (39, 44, 45), Rocha criteria (42), and New York Heart Association (NYHA) classification (41). Among the included patients, 998 (59.2%) were classified as ICD and 688 (40.8%) as CCC. CCC proportion among different studies varied from 12.1% (40) in a study including young childbearing-aged women to 80% (43) in a study including patients under the suspicion of organ involvement in Latin-American people living in Japan. However, the last study included only 5 patients. Cardiologic characteristics of patients with CCC are summarized in **Supplementary Material Appendix 4**.

TABLE 1 | Summary of the characteristics of the included studies.

References and country	Study design	Study site	Included (excluded)	Age	Sex	Excluded comorbidities	CCC assessment	Clinical form	PCR technique*	PCR results	Association measure
Salomone et al. (35) Argentina	Cross-sectional	Endemic (urban)	66 (23)	55 y (SD ± 12) ICD: 52 y (SD ± 9) CCC: 59 y (SD ± 12)	64% F ICD: 70% F CCC: 59% F	Yes	EKG + EchoC	ICD: 27 (39.7%) CCC: 41 (60.3%)	Qualitative c-PCR 1 sample Kineto-plast DNA	Global + PCR: 14/68 (21%) ICD: 2/27 (7.4%) CCC: 12/41 (29.2%)	OR 5.17 (95%CI 1.06–25.38)
Carrasco et al. (36) Chile	Cross-sectional	Endemic (rural)	38 (225)	ICD: 40.57 y (SD ± 10.59) CCC: -HF 68.4 y (SD ± 12.9) -PM: 54.1 y (SD ± 8.4) -Altered EKG: 53.4 y (SD ± 19.1)	ICD: 62% M CCC: 62% M	No	EKG + EchoC + Thoracic X-Ray	ICD: 26 (68.4%) CCC: 12 (31.6%)	Qualitative c-PCR 1 sample Kineto-plast DNA	Global + PCR: 18/38 (54.7%) ICD: 10/26 (38%) CCC: 8/12 (66%)	OR 3.20 (95%CI 0.76–13.48)
Zulantay et al. (37) Chile	Prospective cohort	Endemic (urban and rural)	30 (0)	33.2 y (R 18–50)	53.3% M	Yes	EKG	ICD: 18 (60%) CCC: 12 (40%)	Qualitative c-PCR 1 sample Kineto-plast DNA	Global + PCR: 17/30 (56.6%) ICD: 10/18 (55.5%) CCC: 7/12 (58.3%)	OR 1.12 (95%CI 0.26–4.91)
Borges-Pereira et al. (38) Brazil	Cross-sectional	Endemic (rural)	12 (0)	48.6 y (R 16–82) ICD: 43.5 y CCC: 64.4 y	58.8% F ICD: 70% F CCC: 42.9% F	No	EKG	ICD: 6 (50%) CCC: 6 (50%)	Qualitative c-PCR 1 sample Kineto-plast DNA	Global + PCR: 9/12 (75%) ICD: 5/6 (83.3%) CCC: 4/6 (66.6%)	OR 0.40 (95%CI 0.03–6.18)
Murcia et al. (39) Spain	Prospective cohort	Non endemic	181 (0)	33 y (SD ± 11)	No reported	No reported	EKG + EchoC + Thoracic X-Ray	ICD: 116 (64%) CCC: 65 (36%)	Qualitative c-PCR 1 sample Kineto-plast DNA	Global + PCR: 123/181 (68%) ICD: 81/116 (69.8%) CCC: 42/65 (64.6%)	OR 0.79 (95%CI 0.41–1.50)
Sabino et al. (12) Brazil	Cross-sectional	Endemic (urban and rural)	485 (115)	IND (PCR-): 48.4 y (SD ± 10.1) IND (PCR+): 49.1 y (SD ± 10.6) CCC (PCR-): 49.2 y (SD ± 6.3) CCC (PCR+): 47.8 y (SD ± 7.1)	53.6% M IND: 52.3% M CCC: 59.4% M	Yes	EKG + EchoC	ICD: 279 (57.5%) CCC: 206 (42.5%)	Quantitative rt-PCR 1 sample Kineto-plast DNA	Global + PCR: 304/485 (62.7%) ICD: 143/279 (51.3%) CCC: 161/206 (78.1%)	OR 3.48 (95%CI 2.31–5.23)

(Continued)

TABLE 1 | Continued

References and country	Study design	Study site	Included (excluded)	Age	Sex	Excluded comorbidities	CCC assessment	Clinical form	PCR technique*	PCR results	Association measure
Kapinski et al. (40) Bolivia	Cross-sectional	Endemic (urban and rural)	83 (337)	ICD: 27 y (R 22–34) CCC: 32 y (R 24–39)	100% F	No reported	EKG	IND: 73 (87.9%) CCC: 10 (12.1%)	Quantitative rt-PCR 1 sample Kinoplast DNA	Global + PCR: 36/83 (43.4%) ICD: 33/73 (45.2%) CCC: 3/10 (33.3%)	OR 0.52 (95%CI 0.12–2.17)
Apt et al. (41) Chile	Case-control	Endemic (urban and rural)	200 (0)	ICD: 50.5 y (R 20–77) CCC: 56.4 y (R 25–81)	ICD: 79% F CCC: 68% F	Yes	EKG + EchoC	ICD: 100 (50%) CCC: 100 (50%)	Qualitative c-PCR 1 sample Kinoplast DNA	Global + PCR: 145/200 (72.5%) ICD: 72/100 (72%) CCC: 73/100 (73%)	OR 1.05 (95%CI 0.57–1.96)
Sanchez-Montalvá et al. (45) Spain	Cross-sectional	Non endemic	455 (316)	39 y (R 31–46.5) ICD: 37 y (R 31–44) CCC: 42 y (R 36–49)	68.2% F	Yes	EKG + EchoC + Thoracic X-Ray	ICD: 302 (66.4%) CCC: 153 (43.6%)	Qualitative rt-PCR 1 sample Satellite DNA	Global + PCR: 118/455 (25.9%) ICD: 76/302 (25.2%) CCC: 42/153 (27.4%)	OR 1.13 (95%CI 0.72–1.75)
D'Ávila et al. (42) Brazil	Cross-sectional	Endemic (urban and rural)	91 (0)	ICD: 44 y (SD ± 10.3) CCC: 54 y (SD ± 10.3)	ICD: 65.2% F CCC: 33.8% F	No reported	EKG + EchoC + Thoracic X-Ray	ICD: 23 (33.8%) CCC: 68 (66.2%)	Quantitative c-PCR 1 sample Satellite DNA	Global + PCR: 65/91 (71.4%) ICD: 16/23 (69.6%) CCC: 49/68 (72%)	OR 1.13 (95%CI 0.40–3.17)
Salvador et al. (44) Spain	Prospective cohort	Non endemic	38 (16)	36 y (R 22–55)	75.6% F	No reported	EKG + Thoracic X-Ray	ICD: 27 (71%) CCC: 11 (29%)	Qualitative rt-PCR 1 sample Satellite DNA	Global + PCR: 16/38 (42.1%) ICD: 11/27 (40.7%) CCC: 5/11 (45.4%)	OR 1.21 (95%CI 0.29–4.98)
Imai et al. (43) Japan	Cross-sectional	Non endemic	5 (12)	57.6 y (R 49–68)	60% F	No	EKG + EchoC	ICD: 1 (20%) CCC: 4 (80%)	Qualitative rt-PCR 1 sample Satellite DNA	Global + PCR: 3/5 (60%) ICD: 1/1 (100%) CCC: 2/4 (50%)	OR 0.33 (95%CI 0.01–12.82)

CCC, chronic chagasic cardiomyopathy; c-PCR, conventional polymerase chain reaction; EchoC, echocardiography; EKG, electrocardiogram; ICD, indeterminate chagas disease; R, range; RR, risk ratio; rt-PCR, real time polymerase chain reaction; SD, standard deviation; y, years; PM, pacemaker; HF, heart failure.
*PCR methodology: specifying PCR technique (conventional PCR or real time PCR) and target of the used primer (kinoplast DNA or nuclear satellite DNA).

All the included studies used a PCR for DNA parasite detection in peripheral blood. However, many different protocols were used for its determination. All studies used a single venous blood sample for PCR determination. Six studies (50%) used a conventional PCR method (35–39, 41) while the other half used real-time PCR method (12, 40, 42–45). Only four studies used a quantitative method to report PCR results (12, 40–42) while the rest of the studies used a qualitative method. There is a wide variation regarding primers used. Most studies (8/12; 66.3% used a real time PCR method based on the amplification of a genomic DNA sequence of the Kinetoplast. In the other 4 studies, satellite DNA amplification was used (42–45). Parasite detection in patients with ICD ranged from 7.4 (35) to 100% (43). When considering patients with CCC, parasite detection varied from 27.4 (45) to 78.1% (12).

The results of the risk of bias assessment using the QUIPS scale are shown in **Supplementary Material Appendixes 5, 6**. Most studies included a representative population with CD. However, 2 studies were considered at an overall high risk as one included only childbearing-aged women (40), and the other included patients under suspicion of organ involvement (43). As per study attrition, most of the studies were classified as low risk of bias since basal characteristics including PCR and organ assessment were performed at the inclusion and, in consequence, data were available for all participants included in the studies. Regarding outcome measurement (PCR), all the studies specified their protocol and almost all included control samples and maintained the same procedure in all samples. As per CCC assessment, six studies were rated at low risk of bias since they included blind ECG assessment and/or double assessment by different investigators (12, 37, 38, 40, 41, 45). Conversely, two studies that neither used a standardized classification nor reported their ECG or echocardiographic findings were considered at high risk of bias (35, 43). Considering study confounders, all the studies but one was rated as having a moderate to high risk of bias. Most of the studies did not consider cardiovascular risk factors and other possible heart diseases or performed a stratified data analysis. Finally, result presentation and statistical analysis were classified at a moderate to high risk of bias in a wide group of studies. Most of them were designed for another purpose and we retrieved the specific information from their results.

An association between CCC and *T. cruzi* parasitemia by means of PCR detection was found in 2 studies (12, 35). They all were performed in endemic regions and found a greater PCR positivity between patients with CCC and ICD with ORs of 5.17 (CI 1.06–25.36) and 3.48 (CI 2.31–5.23). In one study, although a risk ratio (RR) of 4.45 was reported, it included both cardiac and digestive forms on the analysis, and when OR was calculated with only CCC patients, we could not achieve statistical significance (36). None of the non-endemic studies identified an association between parasite DNA detection in peripheral blood and CCC. Six studies reported greater positive PCR ratios among patients with CCC than in patients with ICD although differences did not achieve statistical significance (36, 37, 41, 42, 44, 45). The remaining 4 studies reported

a positive PCR rate that favored patients with ICD (38–40, 43).

When we meta-analyzed the OR, pooled results showed that the estimated OR for positive *T. cruzi* PCR of patients with CCC compared to patients with ICD was 1.36 (95% CI: 0.87–2.12) (**Figure 2**). However, we found significant heterogeneity among studied variables in the meta-regression analysis. To diminish variability, we grouped studies by patient's countries of origin and by PCR technique with the same results. Thus, no conclusions can be achieved from the meta-analysis.

DISCUSSION

In this review, despite 8 out of 12 studies reporting higher ratios of positive PCR among patients with CCC, we could not find a correlation between parasitemia by means of PCR and CCC. When we analyzed the characteristics of the included studies, in only 2 studies, the proportion of PCR positivity was significantly greater within CCC (12, 35). These studies were performed in an endemic region and their specific objective was to determine the correlation between parasitemia and CCC. It has been suggested that patients in endemic regions are prone to parasite re-exposure, contributing to higher rates of CCC and parasitemia among patients with CD (45). In the same line, in a study performed in a non-endemic country, the positive PCR ratio decreased in patients with longer periods since the first arrival (8). Also, geographic distribution should play a role in CCC development and parasitemia burden. *T. cruzi* genetic diversity is unequally distributed among different countries, and some authors have reported a cardiac tropism of some discrete typing units (DTUs) (7). In this review, included patients came mostly from 4 different countries and only one of them reported DTUs determination (42).

Age was higher among patients with CCC in studies performed in endemic countries recruiting the general population (range 49.2–68 years) than in non-endemic countries (range 33–42 years). Regardless of the age *per se* having been described as a risk factor for CCC and its mortality, results from different reports are inconsistent (46). On one hand, study participants in their second to the fourth decade of life may have not yet developed target organ damage, or it is too incipient, as it takes on average 20–30 years after the acute infection. On the other hand, older people often associate other cardiovascular risk factors and this could lead to a misinterpretation of the CCC assessment (47). In fact, only three studies were excluded from their analysis due to other cardiovascular risk factors (12, 41, 45). Male sex has been related to CCC development and higher mortality rates (48). Although, this predisposition was described as an independent risk factor from parasitemia (20). Among the included studies, the male proportion ranged from 31.8 to 66.2%. As none of the included studies conducted stratified analysis by sex or age, results should be interpreted with caution.

Classically, CCC assessment has involved ECF, chest X-ray, and clinical status, as they are easy to collect and widely available. Echography, a non-invasive examination, has been progressively studied in CD and its performance has been introduced in

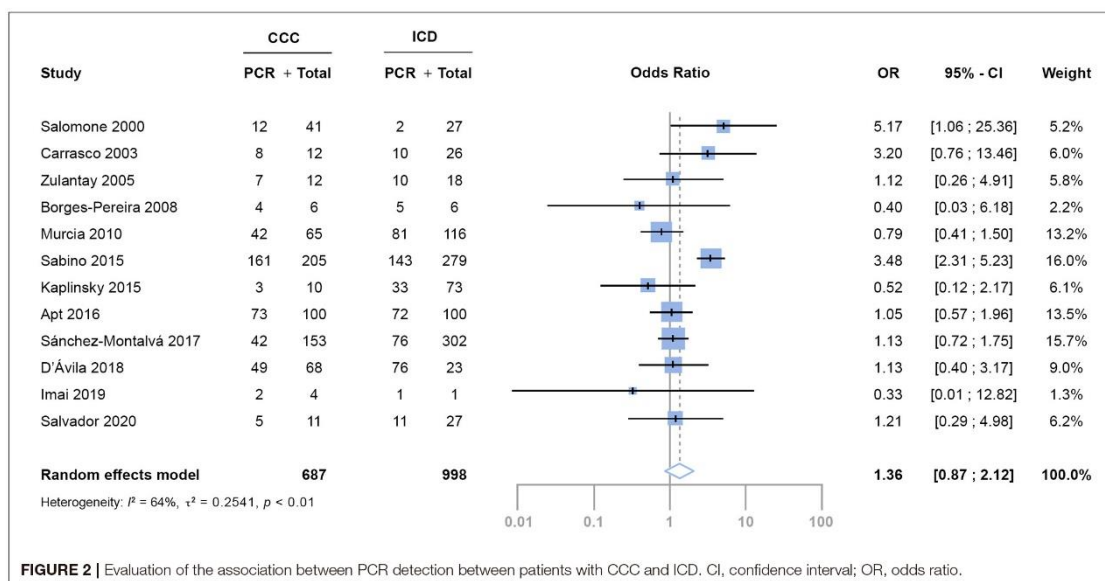


FIGURE 2 | Evaluation of the association between PCR detection between patients with CCC and ICD. CI, confidence interval; OR, odds ratio.

different CCC classifications (49). ECG abnormalities are usually seen before the patient develops a malignant arrhythmia or heart failure (50). However, echocardiographic alterations as diastolic dysfunction can appear before electrical abnormalities develop and may be used as an early marker of CCC (45). In this review, the CCC assessment was very heterogeneous. While 3 studies performed only an ECG and 1 study included a chest X-ray, 8 of 12 studies used echocardiography to complete the cardiac evaluation. CCC classifications were disparate, while 5 authors used a non-standardized classification (35–37, 40, 43), 7 used different standardized criteria (12, 38, 39, 41, 42, 44, 45). Conduction system alterations as right-bundle block and left anterior hemiblock prevailed over other arrhythmias or contraction abnormalities in most of the studies (**Supplementary Material Appendix 3**). Two studies (39, 42) did not provide cardiological findings of their participants, and only 4 studies (41, 42, 44, 45) provided the distribution of disease severity. As a result, between-study comparisons of CCC severity are not feasible.

Current PCR-based methods for *T. cruzi* detection have shown high sensitivity and specificity compared with classical methods, such as blood culture or xenodiagnosis (8). However, sample collection, conservation, sample volume, DNA extraction method, and primers used may influence its performance (9). As a result, in recent years, many initiatives have pursued the standardization of these techniques (33). In the present review, earlier studies used conventional PCR methods preferably using as molecular targets of the kinetoplast DNA sequences. On the other hand, later studies preferred real-time PCR (rt-PCR) techniques toward satellite or minicircle DNA sequences which showed better sensitivity and specificity results and allowed quantification (9). Only four studies used a quantitative method

(12, 40–42) but parasitemia levels were not related to any clinical outcome. Parasitemia levels are usually low in chronic patients with CD compared with parasitemia levels in patients with acute CD. Different studies have analyzed the correlation between quantitative results of *T. cruzi* in peripheral blood and organ damage with inconsistent results (41, 50). Parasite detection ratios ranged widely within the included studies. In patients with ICD, the detection ranged from 7.4 (35) to 100% (43) while in patients with CCC varied from 27.4 (45) to 78.1% (12). Besides the previously described factors, parasite dynamics in blood have not been thoroughly characterized. Intermittent parasitemia is constant in the chronic phase of CD but its periodicity, triggers, determinants, or reservoirs are still unknown (8). Thus, although the internal variability is probably acceptable among all studies as they used the same method throughout, lack of sensitivity could result in low positive ratios precluding differences detection.

This systematic review has several limitations. As a neglected tropical disease, scarce investment over time has limited the generation of high-quality evidence (51). A significant risk of bias has been detected among most of the studies resulting from small sample sizes, differences among study designs, differences not reporting on basal characteristics, different CCC assessments, and PCR methods along with the fact that most of the studies were not even designed for this purpose. To improve studies comparability, we have grouped them by the main confounding factors: country of origin and quality of PCR technique but variability remained. Therefore, while we have performed a meta-analysis, wide inter-study heterogeneity (I^2 64%, $p < 0.01$) impedes a robust interpretation of its results. A patient-level meta-analysis could improve the consistency and robustness of the results and provide evidence to better inform physicians treating people living with CD.

In conclusion, with the current information, we could not establish a correlation between PCR-detectable parasitemia and CCC. Better prospective studies with a defined follow-up, representative population, homogeneous criteria, and standardized methods for PCR detection are needed to answer this question.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PB-N has majorly contributed to this study through study designing, abstract and articles revision, data analysis, and

manuscript writing. JE-P has contributed to this study through abstract and article revision and final article review. FS, AS-M, and IM contributed through study design and article reviewing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

AS-M was supported by a postdoctoral grant Juan Rodés (JE18/00022) from the Instituto de Salud Carlos III through the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2021.787214/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Basile L, Jansá JM, Carlier Y, Salamanca DD, Angheben A, Bartoloni A, et al. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. *Eurosurveillance*. (2011) 16:19968. doi: 10.2807/ese.16.37.19968-en
- Pérez-Molina J, Molina I. Chagas disease. *Lancet*. (2018) 391:82–94. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31612-4
- Bocchi E, Arias A, Verdejo H, Diez M, Gómez E, Castro DP. The reality of heart failure in Latin America. *J Am Coll Cardiol*. (2013) 62:949–58. doi: 10.1016/j.jacc.2013.06.013
- Machado F, Dutra W, Esper L, Gollob K, Teixeira M, Factor S, et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol*. (2012) 34:753–70. doi: 10.1007/s00281-012-0351-7
- Casares-Marfil D, Strauss M, Bosch-Nicolau P, Lo Presti M, Molina I, Chevillard C, et al. A genome-wide association study identifies novel susceptibility loci in chronic Chagas cardiomyopathy. *Clin Infect Dis*. (2021) 73:672–9. doi: 10.1093/cid/ciab090
- Tarleton R. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol*. (2001) 31:550–4. doi: 10.1016/S0020-7519(01)00158-8
- Burgos J, Diez M, Vigliano C, Bisio M, Risso M, Duffy T, et al. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin Infect Dis*. (2010) 51:485–95. doi: 10.1086/655680
- Sulleiro E, Salvador F, Martínez de Salazar P, Silgado A, Serre-Delcor N, Oliveira I, et al. Contributions of molecular techniques in the chronic phase of Chagas disease in the absence of treatment. *Enfermedades Infecc Microbiol Clin*. (2020) 38:356–60. doi: 10.1016/j.eimce.2020.06.002
- Schijman A, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejía Jaramillo A, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. (2011) 5:e931. doi: 10.1371/journal.pntd.0000931
- Moreira OC, Ramírez JD, Velázquez E, Melo MFAD, Lima-Ferreira C, Guhl F, et al. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. *Acta Trop*. (2013) 125:23–31. doi: 10.1016/j.actatropica.2012.08.020
- Norman FE, Pérez-Ayala A, Pérez-Molina JA, Flores-Chavez M, Cañavate C, López-Vélez R. Lack of association between blood-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA and cardiac involvement in a non-endemic area. *Ann Trop Med Parasitol*. (2011) 105:425. doi: 10.1179/1364859411Y.0000000033
- Sabino E, Ribeiro A, Lee T, Oliveira C, Carneiro-Proietti A, Antunes A, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood by PCR is associated with Chagas cardiomyopathy and disease severity. *Eur J Heart Fail*. (2015) 17:416–23. doi: 10.1002/ehf.220
- Riley R, Moons K, Snell K, Ensor J, Hooff L, Altman D, et al. A guide to systematic review and meta-analysis of prognostic factor studies. *BMJ*. (2019) 364. doi: 10.1136/bmj.k4597
- Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*. (2021) 372:n71. doi: 10.1136/bmj.n71
- Hayden J, van der Windt D, Cartwright J, Côté P, Bombardier C. Assessing bias in studies of prognostic factors. *Ann Intern Med*. (2013) 158:280–6. doi: 10.7326/0003-4819-158-4-201302190-00009
- Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* | Cochrane Training. Available online at: <https://training.cochrane.org/handbook> (accessed September 15, 2021).
- Marcon GG, Andrade P, de Albuquerque D, Wanderley JS, de Almeida E, Guariento M, et al. Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. *Diagn Microbiol Infect Dis*. (2002) 43:39–43. doi: 10.1016/S0732-8893(02)00366-8
- Borges-Pereira J, Castro J, Campos J, Nogueira S, Zauza P, Marques P, et al. [Study of the infection and morbidity of Chagas' disease in municipality of João Costa: National Park Serra da Capivara, Piauí, Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop*. (2002) 35:315–22. doi: 10.1590/S0037-86822002000400007
- Brenière S, Bosseno M, Noireau F, Yacsik N, Liegeard P, Aznar C, et al. Integrate study of a Bolivian population infected by *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. (2002) 97:289–95. doi: 10.1590/S0074-02762002000300002
- Basquiera A, Sembaj A, Aguerri A, Omelianiuk M, Guzmán S, Moreno Barral J, et al. Risk progression to chronic Chagas cardiomyopathy: influence of male sex and of parasitaemia detected by polymerase chain reaction. *Heart*. (2003) 89:1186–90. doi: 10.1136/heart.89.10.1186
- Pompilio M, Dorval M, Cunha R, Brito C, Borges-Pereira J. [Epidemiological, clinical and parasitological aspects of Chagas' disease in Mato Grosso do Sul State]. *Rev Soc Bras Med Trop*. (2005) 38:473–8. doi: 10.1590/S0037-86822005000600005
- Hidron A, Gilman R, Justiniano J, Blackstock A, Lafuente C, Selum W, et al. Chagas cardiomyopathy in the context of the chronic disease transition. *PLoS Negl Trop Dis*. (2010) 4:e688. doi: 10.1371/journal.pntd.000688
- Llaguno MM, Pertili L, da Silva M, Bunazar P, Reges A, Faleiros A, et al. The relationship between heart rate variability and serum cytokines in chronic chagasic patients with persistent parasitemia. *Pacing Clin Electrophysiol*. (2011) 34:724–35. doi: 10.1111/j.1540-8159.2010.03025.x

24. Ballinas-Verdugo M, Reyes P, Mejía-Domínguez A, López R, Matta V, Monteón V. Enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction performance using Mexican and Guatemalan discrete typing unit I strains of *Trypanosoma cruzi*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* (2011) 11:1569–75. doi: 10.1089/vbz.2010.0205
25. de Freitas V, da Silva S, Sartori A, Bezerra R, Westphalen E, Molina T, et al. Real-time PCR in HIV/*Trypanosoma cruzi* coinfection with and without Chagas disease reactivation: association with HIV viral load and CD4 level. *PLoS Negl Trop Dis.* (2011) 5. doi: 10.1371/journal.pntd.0001277
26. Ramos J, Torrús D, Amador C, Jover F, Pérez-Chacón F, Ponce Y, et al. Multicenter epidemiological and clinical study on imported Chagas diseases in Alicante, Spain. *Pathog Glob Health.* (2012) 106:340–5. doi: 10.1179/204773212Y.0000000039
27. Saavedra M, Zulantay I, Apt W, Martínez G, Rojas A, Rodríguez J. Chronic Chagas disease: PCR-xenodiagnosis without previous microscopic observation is a useful tool to detect viable *Trypanosoma cruzi*. *Biol Res.* (2013) 46:295–8. doi: 10.4067/S0716-97602013000300011
28. Gilber S, Alban S, Gobor L, Bescrovaine J, Myiazaki M, Thomaz-Soccol V. Comparison of conventional serology and PCR methods for the routine diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev Soc Bras Med Trop.* (2013) 46:310–5. doi: 10.1590/0037-8682-0046-2013
29. Melo M, Moreira O, Tenório P, Lorena V, Lorena-Rezende I, Júnior W, et al. Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients. *Parasit Vectors.* (2015) 8:154. doi: 10.1186/s13071-015-0770-0
30. Antunes A, Ribeiro A, Sabino E, Silveira M, Oliveira C, Botelho A. Benzimidazole therapy for Chagas disease in asymptomatic *Trypanosoma cruzi* -seropositive former blood donors: evaluation of the efficacy of different treatment regimens. *Rev Soc Bras Med Trop.* (2016) 49:713–20. doi: 10.1590/0037-8682-0165-2016
31. Pereira M, Batista A, Aguiar C, Marcon G, Martins L, Guariento M, et al. The detection of *Trypanosoma cruzi* by nested-PCR in elderly patients: relationship to the clinical and epidemiological profile. *Pathog Glob Health.* (2016) 110:228–32. doi: 10.1080/20477724.2016.1232850
32. Volpato F, Sousa G, D'Ávila D, Galvão L, Chiari E. Combined parasitological and molecular-based diagnostic tools improve the detection of *Trypanosoma cruzi* in single peripheral blood samples from patients with Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* (2017) 50:506–15. doi: 10.1590/0037-8682-0046-2017
33. Sulleiro E, Muñoz-Calderson A, Schijman A. Role of nucleic acid amplification assays in monitoring treatment response in chagas disease: Usefulness in clinical trials. *Acta Trop.* (2019) 199:105120. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.105120
34. Buss L, Campos de Oliveira-da Silva L, Moreira C, Manuli E, Sales F, Morales I, et al. Declining antibody levels to *Trypanosoma cruzi* correlate with polymerase chain reaction positivity and electrocardiographic changes in a retrospective cohort of untreated Brazilian blood donors. *PLoS Negl Trop Dis.* (2020) 14:1–14. doi: 10.1371/journal.pntd.0008787
35. Salomone O, Juri D, Omelianuk M, Sembaj A, Aguerri A, Carriazo C, et al. Prevalence of circulating *Trypanosoma cruzi* detected by polymerase chain reaction in patients with Chagas' cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* (2000) 85:1274–6. doi: 10.1016/S0002-9149(00)00747-5
36. Carrasco V, Andrade W, Jercic MI, Fernández GJ, Miranda C, Rivera J. [Clinical study of measure of parasitemia in patients infected with *Trypanosoma cruzi* in Atacama, Chile]. *Rev Med Chil.* (2003) 131:881–6. doi: 10.4067/S0034-98872003000800007
37. Zulantay I, Arribada A, Honores P, Sánchez G, Solari A, Ortiz S, et al. [No association between persistence of the parasite and electrocardiographic evolution in treated patients with Chagas disease]. *Rev Med Chil.* (2005) 133:1153–60. doi: 10.4067/S0034-98872005001000004
38. Borges-Pereira J, Sarquis O, Zauza P, Britto C, Lima M. [Epidemiology of Chagas disease in four rural localities in Jaguaruana, State of Ceará: seroprevalence of infection, parasitemia and clinical characteristics]. *Rev Soc Bras Med Trop.* (2008) 41:345–51. doi: 10.1590/S0037-86822008000400005
39. Murcia L, Carrilero B, Muñoz M, Iborra M, Segovia M. Usefulness of PCR for monitoring benzimidazole response in patients with chronic Chagas' disease: a prospective study in a non-disease-endemic country. *J Antimicrob Chemother.* (2010) 65:1759–64. doi: 10.1093/jac/dkq201
40. Kaplinski M, Jois M, Galdos-Cardenas G, Rendell V, Shah V, Do R, et al. Sustained domestic vector exposure is associated with increased chagas cardiomyopathy risk but decreased parasitemia and congenital transmission risk among young women in Bolivia. *Clin Infect Dis.* (2015) 61:918–26. doi: 10.1093/cid/civ446
41. Apt W, Arribada A, Zulantay I, Saavedra M, Muñoz C, Toro B, et al. Chronic Chagas cardiomyopathy in Chile. Importance of *Trypanosoma cruzi* burden and clinical evaluation. *Acta Trop.* (2016) 162:155–66. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.06.025
42. D'Ávila D, Galvão L, Sousa G, Britto C, Moreira O, Chiari E. Monitoring the parasite load in chronic Chagas disease patients: comparison between blood culture and quantitative real time PCR. *PLoS ONE.* (2018) 13. doi: 10.1371/journal.pone.0208133
43. Imai K, Misawa K, Osa M, Tarumoto N, Sakai J, Mikita K, et al. Chagas disease: a report of 17 suspected cases in Japan, 2012–2017. *Trop Med Health.* (2019) 47:38. doi: 10.1186/s41182-019-0168-3
44. Salvador F, Sánchez-Montalva A, Martínez-Gallo M, Sulleiro E, Franco-Jarava, C, et al. Serum IL-10 levels and its relationship with parasitemia in chronic Chagas disease patients. *Am J Trop Med Hyg.* (2020) 102:159–63. doi: 10.4269/ajtmh.19-0550
45. Sánchez-Montalvá A, Salvador F, Rodríguez-Palomares J, Sulleiro E, Sao-Avilés A, Roure S, et al. Chagas cardiomyopathy: usefulness of EKG and echocardiogram in a non-endemic country. *PLoS ONE* (2016) 11:e0157597. doi: 10.1371/journal.pone.0157597
46. Rassi A, Rassi A, Rassi S. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. *Circulation.* (2007) 115:1101–8. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.627265
47. Triposkiadis F, Xanthopoulos A, Butler J. Cardiovascular aging and heart failure: JACC review topic of the week. *J Am Coll Cardiol.* (2019) 74:804–13. doi: 10.1016/j.jacc.2019.06.053
48. Rassi A, Rassi A Jr., Little W, Xavier S, Rassi S, Rassi AG, et al. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med.* (2006) 355:799–808. doi: 10.1056/NEJMoa053241
49. Rocha M, Ribeiro A, Teixeira M. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. *Front Biosci.* (2003) 8:480–6. doi: 10.274/1926
50. Echeverría L, Rojas L, Rueda-Ochoa O, Gómez-Ochoa S, González Rugeles C, Díaz M, et al. Circulating *Trypanosoma cruzi* load and major cardiovascular outcomes in patients with chronic Chagas cardiomyopathy: a prospective cohort study. *Trop Med Int Health.* (2020) 25:1534–41. doi: 10.1111/tmi.13487
51. Sangenito LS, Branquinha MH, Santos ALS. Funding for Chagas disease: a 10-year (2009–2018) survey. *Trop Med Infect Dis.* (2020) 5. doi: 10.3390/tropicalmed5020088

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Bosch-Nicolau, Espinosa-Pereiro, Salvador, Sánchez-Montalvá and Molina. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.