



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

“EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES INMUNOGÉNICAS DE LA
ENOLASA CONSENSO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*, MEDIANTE UN
ABORDAJE BIOINFORMÁTICO PARA SU USO COMO VACUNA”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA

Presenta:

L.B. Alejandro Díaz Hernández

Directora de Tesis:

D. C. María Lilia Cedillo Ramírez

Codirector de Tesis:

D. C. Alejandro Carabarán Lima



Puebla, Pue, diciembre 2021



BUAP

Puebla, Pue. a 9 de diciembre 2021

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
P R E S E N T E.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría del alumno **Alejandro Díaz Hernández**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

"Evaluación de las propiedades inmunogénicas de la enolasa consenso de *Trypanosoma cruzi*, mediante un abordaje bioinformático para su uso como vacuna"

A nuestro juicio, el alumno **Alejandro Díaz Hernández** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"

D.C. Patricia Lozano Zarain

D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia

D.C. Margarita Ma. De la Paz Arenas Hernández

D.C. Alberto Ramirez Mata



Agradecimientos personales

A mis padres, Angélica y Enrique, ustedes me han enseñado todo lo que sé, los amo, gracias por tanto, y a Pablo, nunca dejes de luchar por lo que quieres, ve a tu propio ritmo. Esto no hubiese sido posible sin ustedes, les debo todo lo que soy, he sido y seré. A mi familia, abuelos, tíos, primos, Stitch y familia en general, gracias a todos.

Al D.C. Alejandro Carabarin Lima, gracias Doc por abrirme las puertas de su laboratorio durante todo este tiempo, por apoyarme tanto y en todo durante estos años, por el apoyo total para mi primera publicación científica, he aprendido tanto de usted, no solo en el ámbito profesional, sino en el personal. Su apoyo y pasión por la ciencia han sido trascendentales en mi formación y en la de tantos estudiantes, gracias por inspirarnos a ser científicos.

A la D.C. María Cristina G. V., por apoyarme siempre en el laboratorio, por estar dispuesta a resolver mis dudas y brindarme todo lo necesario para completar este trabajo, por la paciencia y comprensión.

A la D.C. María Lilia Cedillo R., por aceptarme como su estudiante durante estos dos años, por su apoyo incondicional total en mi formación y por ser un ejemplo para la comunidad estudiantil.

A mi comité revisor, la D.C. Rosa del Carmen Rocha G., por su apoyo durante estos dos años, así como sus recomendaciones; a la D.C. Patricia Lozano Z., por sus comentarios y críticas constructivas, la crítica siempre será bienvenida; a la D.C. Margarita Ma. De la Paz Arenas H., por enseñarme a ser más estricto en mis trabajos y al D.C. Alberto Ramírez M. por sus observaciones y correcciones en esta tesis. Gracias a todos por tanto y por el apoyo para enriquecer este trabajo.

A la D.C. Minerva Arce F. y la D.C. Olivia Rodríguez M., por su valiosa colaboración en la publicación de mi primer artículo científico.

A mis compañeras de Médica: Suemy, muchas gracias por ser mi amiga durante estos dos años y por darme alojamiento, tienes un corazón enorme; a Nain, por todas las pláticas y apoyo; a Michelle por ayudarme con todas las dudas que tenía. Sin ustedes este tiempo hubiese sido más difícil, gracias.

A Anita, gracias por ser la mejor compañera que pude y podré tener, por apoyarme, escucharme y creer en mí, Te amo. Gracias a tu familia por ser tan buenos conmigo, les quiero mucho.

A mis amigos de toda la vida: Gus, Montse, Juan, Manuel, Vero, Cinthya, Fabri, Dani, Pili y Karla; sin ustedes mi vida sería mucho más aburrida, gracias por estar en la buenas, en las malas y en las más chingonas, les quiero.

A mis profesores del Instituto de Ciencias, han cambiado mi percepción en la ciencia y todo lo que significa ser un investigador; al D.C. Luis Javier por avivar en mí el interés y curiosidad natural que tiene un investigador nato, gracias.

A mí, por seguir jugando al científico. No dejes de hacer preguntas Alex, ve y descubre lo que no sabes, que no sabes.

Agradecimientos institucionales

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por ser mi *alma mater*, brindarme nuevas oportunidades y retos, por darme la oportunidad de crecer y conocerme más.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el desarrollo de este proyecto, con número de becario: 989374

Al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por las facilidades prestadas durante el desarrollo de esta tesis

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Programa IV. Investigación y Posgrado. Apoyar a los programas de posgrado para lograr su incorporación al Padrón Nacional de Calidad. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2017-2021.

A mis abuelitas:

Eva y Belli, las llevo en el corazón

Es necesario dar gracias de estar en descontento con uno mismo. ¡Ojalá pueda uno estarlo siempre! El desacuerdo de la vida con lo que debería ser, es precisamente el signo de la vida, el movimiento ascendente de lo pequeño a lo grande, de lo peor a lo mejor. Y este desacuerdo es la condición del bien. Cuando el hombre permanece tranquilo y satisfecho de sí mismo, esto es un mal.

Contenido

Índice de tablas	8
Índice de figuras.....	8
Resumen.....	10
1. Introducción.....	11
1.1 ¿Qué es la enfermedad de Chagas?.....	11
1.2 Revisión bibliográfica.....	14
1.2.1 Transmisión	14
1.2.2 Morfología y ciclo de vida del parásito	15
1.2.3 Clasificación.....	19
1.2.4 Patogenia y espectro clínico	22
1.2.5 Diagnóstico	25
1.2.6 Tratamiento y profilaxis.....	26
1.2.7 Necesidad de una vacuna.....	30
1.2.8 Enolasa como posible inmunógeno.....	30
1.2.9 Antecedentes directos.....	32
1.3 Justificación.....	33
1.4 Hipótesis	33
1.5 Objetivo general	34
1.6 Objetivos específicos.....	34
Materiales y métodos	35
2.1 Estrategia experimental	35
2.2 Expresión y purificación de rTcENO	36
2.3 Análisis con distintos fondos genéticos	37
2.4 Reestructuración del proyecto	38
2.5 Generación de clústeres de enolasas	39
2.6 Obtención de secuencia consenso y modelado por homología.....	39
2.7 Análisis de las propiedades fisicoquímicas, inmunogénicas y predicción de epítopes asociados a Células B y T	40
2.8 Docking molecular y análisis de interacciones.....	41
2.9 Construcción de Quimera proteica.....	42
3. Resultados.....	43

3.1 Purificación de la rTcENO	43
3.2 Análisis con distintos fondos genéticos	44
3.3 Clústeres de enolasa de <i>T. cruzi</i>	49
3.4 Secuencia consenso.....	50
3.5 Modelado por homología	53
3.6 Análisis de las propiedades fisicoquímicas e inmunogénicas	63
3.7 Docking molecular e interacciones proteína-receptor.....	70
3.8 Quimera basada en epítopes.....	75
4. Discusión de resultados	76
Conclusiones	86
Perspectivas	86
Bibliografía	87
Anexos.....	96
Anexo 1. Secuencias proteicas de Enolasa	96
Anexo 2. Esquema de colores Clustal X y composición aminoacídica	98
Anexo 3. Artículo de revisión publicado.....	99
Anexo 4. Congresos donde fue presentado este trabajo.....	110

Índice de tablas

Tabla	Título	Página
1	Clasificación de DTU's	22
2	Datos de curva de crecimiento	45
3	Secuencias de DTU's utilizadas	49
4	Valores de MolProbity para proteína modelada	62
5	Valores de ProtParam y Vaxign 2 para proteína modelada	63
6	Epítopes reportados por Vaxign 2.0 para MHC-I y II	65
7	Epítopes reportados por BepiPred 2.0 y Discotope 2.0	65
8	Valores reportados por plataformas de Docking molecular	70

Índice de figuras

Figura	Título	Página
1	Distribución global de casos de enfermedad de Chagas reportados	13
2	Etapas y morfología general de <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
3	Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	18
4	Distribución geográfica aproximada de <i>T. cruzi</i> , con ciclos de transmisión domésticos y selváticos	20
5	Distribución geográfica de <i>T. cruzi</i> , con base a una revisión bibliográfica de 137 artículos	21
6	Vías de transmisión para <i>T. cruzi</i> , y fases de la enfermedad de Chagas.	25
7	Estructura cristalina de la TcENO	31
8	Electroforesis y restricción del plásmido pRSETB::TcENO	43
9	Perfil electroforético y purificación de la rTcENO y sus diversos controles con la cepa <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS	44
10	Perfil electroforético de la rTcENO y sus diversos controles con la cepa <i>E. coli</i> pLysE	46
11	Perfil electroforético de la rTcENO y sus diversos controles con la cepa <i>E. coli</i> Star	46
12	Perfil electroforético de la rTcENO y sus diversos controles con la cepa <i>E. coli</i> Rosetta	47
13	Membrana de nitrocelulosa en la que se muestra rTcENO obtenida de todas las cepas	48
14	Secuencias aminoacídicas de los DTU's H8 y CL Brener	49

15	Secuencia consenso de la enolasa de <i>T. cruzi</i> , con longitud de 429 aminoácidos	50
16	Alineamiento múltiple mediante Clustal Omega	51
17	Alineamiento múltiple con esquema de color Clustal X	52
18	Valores obtenidos por el modelaje con Swiss-Model	54
19	Gráfico de calidad local entre el modelo y la estructura cristalizada	55
20	Comparación de QMEAN del modelo contra diversas estructuras obtenidas experimentalmente	55
21	Alineamiento entre modelo y templado con esquema de color QMEAN	56
22	Alineamiento entre modelo y templado con esquema de color para estructuras secundarias	56
23	Representación 3D del modelo en coloración QMEAN y estructura secundaria	58
24	Alineamiento detallado entre el modelo y templado	59
25	Acercamiento a regiones faltantes del templado	60
26	Superposición de ambas estructuras proteicas	61
27	Gráficos de Ramachandran por MolProbity	62
28	Secuencia consenso con epítopes resaltados	64
29	Enolasa consenso con epítopes para MHC-I	66
30	Enolasa consenso con epítopes para MHC-II	67
31	Enolasa consenso con epítopes para células B resaltados	68
32	Mapa global de protección usando la enolasa consenso	69
33	Docking molecular con enolasa consenso y TLR 2	71
34	Docking molecular con enolasa consenso y TLR 4	72
35	Análisis PDBsum con enolasa consenso y TLR 2	73
36	Análisis PDBsum con enolasa consenso y TLR 4	74
37	Estructura de la quimera proteica para MHC-I	75
38	Estructura de la quimera proteica para MHC-I y II	76

Resumen

Actualmente no existe vacuna para la Tripanosomiasis americana, clasificada por la OMS como una enfermedad tropical desatendida y provocada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, misma que por su endemicidad la padece gran parte de Latinoamérica, aproximadamente 8 millones a nivel mundial. Inicialmente este trabajo fue planteado para realizarse de forma experimental, sin embargo debido a la pandemia ocasionada por la COVID-19 se reestructuró el proyecto, con el objetivo principal de proponer una secuencia consenso de la proteína enolasa, proveniente de distintas cepas de *T. cruzi* para su uso como vacuna, evaluando principalmente sus propiedades inmunogénicas a nivel bioinformático.

A partir de bases de datos especializadas se obtuvieron 15 secuencias de la enolasa, que al alinearse resultaron en una secuencia consenso, esta secuencia se modeló por homología, misma que se evaluó y validó a través de distintos programas y plataformas bioinformáticas con la finalidad de conocer sus propiedades fisicoquímicas, potencial inmunogénico, así como los MHC's más representativos y la predicción de epítopes para células B y T; posteriormente se realizó Docking molecular con los receptores asociados a membrana TLR 2 y 4, para visualizar las interacciones a nivel de respuesta inmune innata que pudiesen existir. Finalmente se diseñó una construcción quimérica con los epítopes más representativos para la población latinoamericana.

La enolasa consenso resultante de 429 aminoácidos mostró un alto potencial inmunogénico con seis epítopes para MHC-I, siete epítopes para MHC-II, todos ellos altamente representativos de la enolasa presente en cepas del continente americano, así como cinco epítopes para células B. En cuanto al Docking molecular con los receptores, se mostró una alta afinidad y baja constante de disociación, lo cual podría conducir a una respuesta inmune de tipo innata que coadyuve a la eliminación del parásito.

Concluyendo, la secuencia consenso propuesta en este trabajo de la enolasa supone proveer una respuesta inmune ideal, así como las quimeras proteicas, las cuales necesitan un mayor estudio y evaluación experimental para comprobar si confieren protección a la mayoría de las cepas que provocan la enfermedad de Chagas.

Palabras clave: Chagas, *Trypanosoma cruzi*, bioinformática, secuencia, enolasa consenso, epítopes, inmunógeno, quimera, vacuna.

1. Introducción

1.1 ¿Qué es la enfermedad de Chagas?

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es una enfermedad relativamente nueva, descubierta en 1909 por el Dr. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, médico brasileño [1]. El Dr. Chagas contribuyó a la erradicación de la malaria en Brasil, siendo epidemiólogo y sanitarista, gracias a ello, en 1906 fue invitado a trabajar en el Instituto Osvaldo Cruz, a cargo del Dr. Osvaldo Cruz, donde en 1908 durante una campaña contra la malaria en la población de Lassance, estado de Minas Gerais, encontró unos insectos hematófagos a los cuales localmente se les conocía como “barbeiros”, debido a las picaduras frecuentes en el rostro de los pobladores; estos insectos comúnmente se encontraban en viviendas de obreros, con techos de paja y muros de adobe [2]. Al examinar microscópicamente los insectos, estos presentaban en su intestino protozoarios flagelados, que no se encontraban previamente descritos en la literatura, sin embargo, su morfología se asemejaba al tripanosoma causante de la enfermedad del sueño, por lo cual envió insectos infectados al Dr. Osvaldo Cruz, quien infectó monos de la especie *Calletox penicillata*, y 20 días después comprobó la enfermedad mediante un examen sanguíneo al microscopio, encontrando los parásitos descritos por el Dr. Chagas [2]. La confirmación de una presunta enfermedad derivada de este parásito, ocurrió el 14 de abril de 1909, cuando el Dr. Chagas examinó a una niña de 2 años llamada Berenice Soares de Moura, quien presentaba un cuadro febril combinado con hepato y esplenomegalia, a la que sospechando padecía malaria, se le realizó un frotis sanguíneo, encontrando una tripanosomiasis derivada del parásito al cuál posteriormente nombró como *Trypanosoma cruzi*, en honor a su mentor Osvaldo Cruz [1], [3].

El descubrimiento del parásito *T. cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas, es considerado como una proeza por parte del Dr. Chagas, ya que fue la primera vez que se descubrió el agente etiológico y sus transmisores, antes que la enfermedad

[4]. En cuanto a la transmisibilidad de este parásito, puede realizarse por distintas vías, sin embargo, el principal vector son las chinches hematófagas, conocidas como triatominos, vinchucas, chinches besuconas y algunos otros nombres, según sea la zona geográfica; estas especies pertenecen al orden *Hemiptera*, familia *Reduviidae* y subfamilia *Triatominae*; aunque existen distintas especies a lo largo de varios países, las chinches transmisoras de *T. cruzi* son endémicas del continente americano [5]. Se calcula que existen de 6-8 millones de personas infectadas a nivel mundial, causando aproximadamente 50,000 muertes por año, y de 65-100 millones están en riesgo de ser infectadas [3], ya sea por su ubicación geográfica, su situación socioeconómica, o ambas. La enfermedad de Chagas es considerada como una Enfermedad Tropical Desatendida (NTD), por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y algunas otras organizaciones como el Centro para el Control de Enfermedades (CDC), siendo especialmente común en áreas tropicales donde las personas no tienen acceso a agua limpia o formas seguras de eliminar los desechos humanos [6].

Aunque la distribución de la enfermedad de Chagas se encuentra principalmente focalizada en 21 países de América Latina (**Figura 1**), en los últimos años se ha observado una mayor incidencia en países norteamericanos, como Estados Unidos y la región Sur de Canadá [7], así como algunos casos reportados en Europa central, Asia y Oceanía [8]. Es importante diferenciar que, a pesar de existir casos en regiones ajenas al continente americano, no se han reportado avistamientos de las chinches hematófagas ya descritas; los casos reportados en estas regiones responden a los flujos migratorios constantes [3], y la falta de controles y tamizaje en donaciones de sangre y órganos, donde solo seis países europeos (España, Italia, Francia, Suiza, Reino Unido y Suecia) contemplan un cribado para Chagas [9]. Esta falta de regulación en la política sanitaria propone un escenario ideal para la propagación de Chagas en zonas no endémicas, contemplando que el 4% de migrantes latinoamericanos que radican en Europa, son portadores de Chagas en su forma crónica [10].

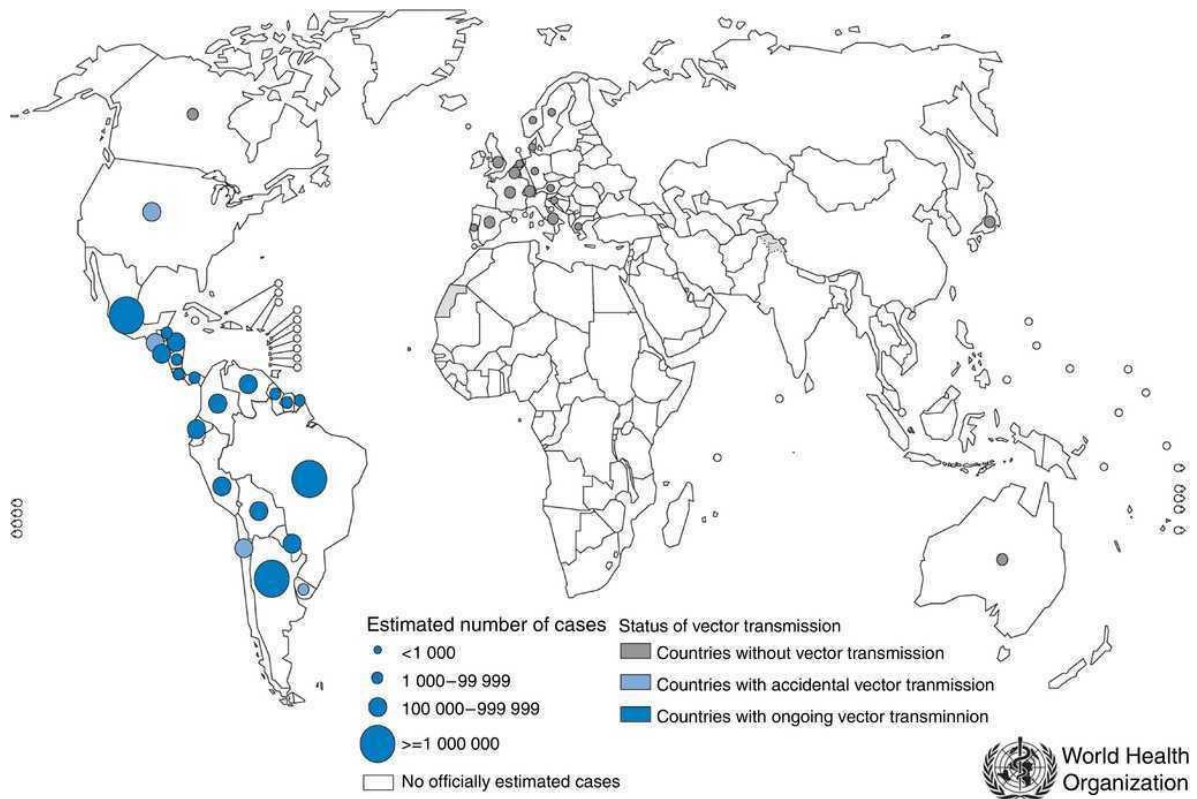


Figura 1. Distribución global de casos de Chagas reportados, tomada de [11].

En México existen diversas estimaciones, las más conservadoras proyectan 1.1 millones de personas infectadas [5], mientras que otros autores refieren que la cifra pudiese alcanzar 5.5 millones [12]. La diferencia de estimaciones es probablemente resultado de cifras subestimadas, provocadas por la falta, durante décadas, de un registro preciso y a profundidad por parte de los sistemas de salud, que permitan determinar con mayor certeza la población infectada por Chagas, principalmente en regiones selváticas y endémicas, como lo es el sur de México, Centroamérica y algunas regiones de Sudamérica. En nuestro país Hoffman logró correlacionar por primera vez al triatomino como transmisor de Chagas en 1928, y en 1940, Luis Mazzoti reportó los dos primeros casos humanos en Tejomulco, Oaxaca [5].

1.2 Revisión bibliográfica

1.2.1 Transmisión

T. cruzi es transmitido a humanos principalmente a través de chinches hematófagas (>80%), también por transfusiones sanguíneas (10-20%), de manera congénita a través de madres infectadas (2-10%) y, aunque menos frecuente, también por trasplante de órganos, ingesta oral accidental (bebidas), y accidentes de laboratorio (2%) [13], [14]. En el mundo se han identificado más de 130 especies del principal vector natural para Chagas, con tres géneros de importancia médica que son *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*, encontrados a lo largo de todo el continente Americano; en México se han reportado 32 especies, 19 pertenecientes al género *Triatoma*, seis al género *Meccus*, dos al género *Panstrongylus* y una especie de los géneros *Belminus*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Paratriatoma* y *Rhodnius* [15]; existen 13 especies relacionadas con la vivienda, de las cuales 11 presentan hábitos peridomiciliarios y dos hábitos intradomiciliarios con especial importancia epidemiológica; *Triatoma barberi* y *Triatoma dimidiata* [5]. Aunque en la actualidad los triatomíneos son genéticamente resistentes al diclorodifeniltricloroetano (DDT), su densidad poblacional disminuyó considerablemente y de forma general, debido al rociado sistemático con DDT utilizado en la Campaña Nacional de Erradicación Palúdica, iniciada en México en 1956 [4], según algunos autores esto pudo influenciar directamente los casos de Chagas en México.

Aunque la infección en humanos se da principalmente por chinches hematófagas, aproximadamente 150 especies de animales domésticos (perros, gatos, cerdos, etc) y animales salvajes (armadillos, tlacuaches, ardillas, etc) pueden servir como reservorios de Chagas [16]. El parásito presenta dos fases de desarrollo en mamíferos infectados, principalmente humanos: Tripomastigote sanguíneo (fase no replicativa, pero infectiva en humanos e invertebrados) y Amastigote intracelular (fase replicativa en humanos) [17].

1.2.2 Morfología y ciclo de vida del parásito

La complejidad del ciclo de vida de *T. cruzi*, involucra cuatro estadios principales (**Figura 2**) morfológica y bioquímicamente distintos [18], pero bien definidos, que reflejan su complejidad durante la infección, teniendo en cuenta variables tanto del hospedero y su sistema inmune, como del parásito. Los principales estadios del parásito son:

- **Epimastigote**, forma no infectiva de 20-25 μm de longitud, se encuentra en cultivos celulares y de forma natural en el intestino medio del insecto vector, replicándose de forma profusa para posteriormente dar lugar a su forma de tripomastigote metacíclico. El kinetoplasto se encuentra entre el núcleo y el bolsillo flagelar, el flagelo forma una membrana ondulante pequeña [19].
- **Tripomastigote metacíclico**, forma infectiva en humanos de 20 - 25 μm de longitud, incluyendo el flagelo que inicia en la parte posterior del parásito. Presenta un gran núcleo central, posteriormente se ubica el kinetoplasto en la región subterminal; es la forma no replicativa en invertebrados, se encuentra en el intestino grueso y la región perianal del insecto, cuando el triatomino excreta, el parásito se deposita junto a las heces fecales para penetrar a través de lesiones en la piel o por mucosas [19].
- **Tripomastigote sanguíneo**, forma de diagnóstico y no replicativa en humanos, encontrada en torrente sanguíneo. También llamada forma de transición, infectiva tanto en el vector como en vertebrados, puede infectar nuevas células nucleadas o pasar a un vector invertebrado no infectado, cerrando de esta manera el ciclo, presenta una morfología muy similar a la fase de tripomastigote metacíclico [14].
- **Amastigote intracelular**, forma replicativa en humanos y no infectiva; es redondeado u ovoide de forma “leishmanoide”, se encuentra comúnmente en células musculares. Mide de 2–2.5 μm , en esta fase pueden apreciarse

de manera clara el núcleo, posteriormente el kinetoplasto, luego el bolsillo flagelar y finalmente el flagelo sobresaliendo en la parte inferior [20].

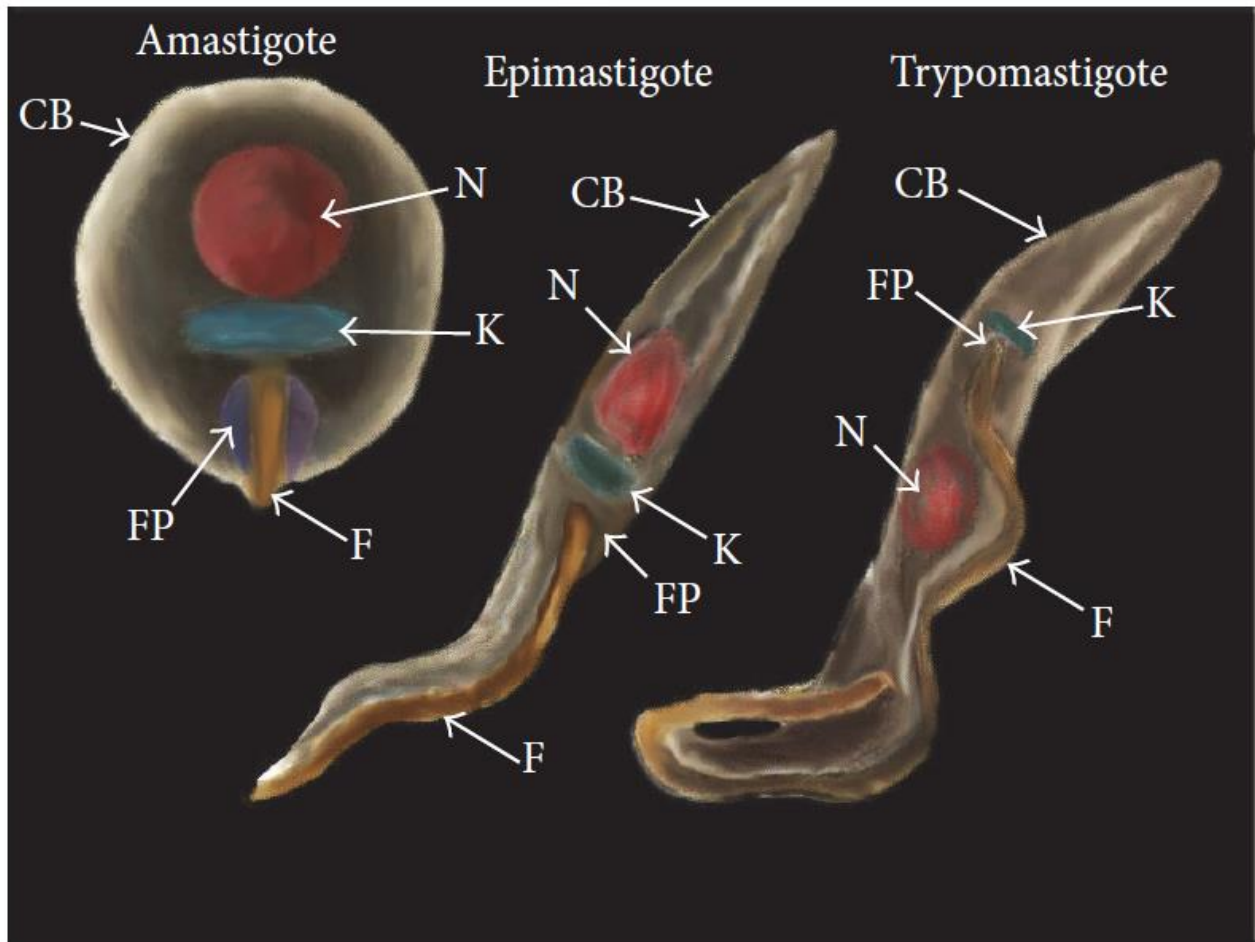


Figura 2. Etapas y morfología general de *Trypanosoma cruzi*, donde: Cuerpo celular (CB); núcleo (N); kinetoplasto (K); bolsillo flagelar (FP) y flagelo (F); imagen tomada de [19].

El proceso del ciclo de vida involucra distintos pasos (**Figura 3**). Considerando que el ciclo comience con la succión de sangre infectada en un mamífero, por parte de un triatomino sano, el insecto estará succionando el parásito en su forma de tripomastigote sanguíneo, los tripomastigotes ingeridos se diferenciarán a forma de epimastigote, replicándose intensamente en el intestino medio, luego de ello el insecto al volver a alimentarse, pasará los parásitos del intestino medio hacia el intestino grueso y la región perianal, donde se diferenciarán hacia tripomastigote metacíclico, en esta zona al deyectar sus heces, el insecto estará

expulsando también al parásito, que infectará al encontrarse muy cerca de la zona donde fue picado el vertebrado [17], [19]. La mayoría de las infecciones llevadas por esta vía suelen terminarse gracias al hospedador, quien se inocula así mismo el parásito al rascarse en la zona donde fue picado, ya que la picadura suele causar prurito intenso, provocando inflamación en el sitio de inoculación (también conocido como Chagoma), el mismo caso puede aplicarse para zonas de mucosa como parpados, utilizando la conjuntiva como vía de entrada, causando un edema palpebral (también conocido como signo de Romaña) [17]. Aunque esta es la forma de transmisión más común, existen otras previamente mencionadas donde, aunque el ciclo de vida puede variar, las etapas en vertebrados e invertebrados siguen siendo las mismas.

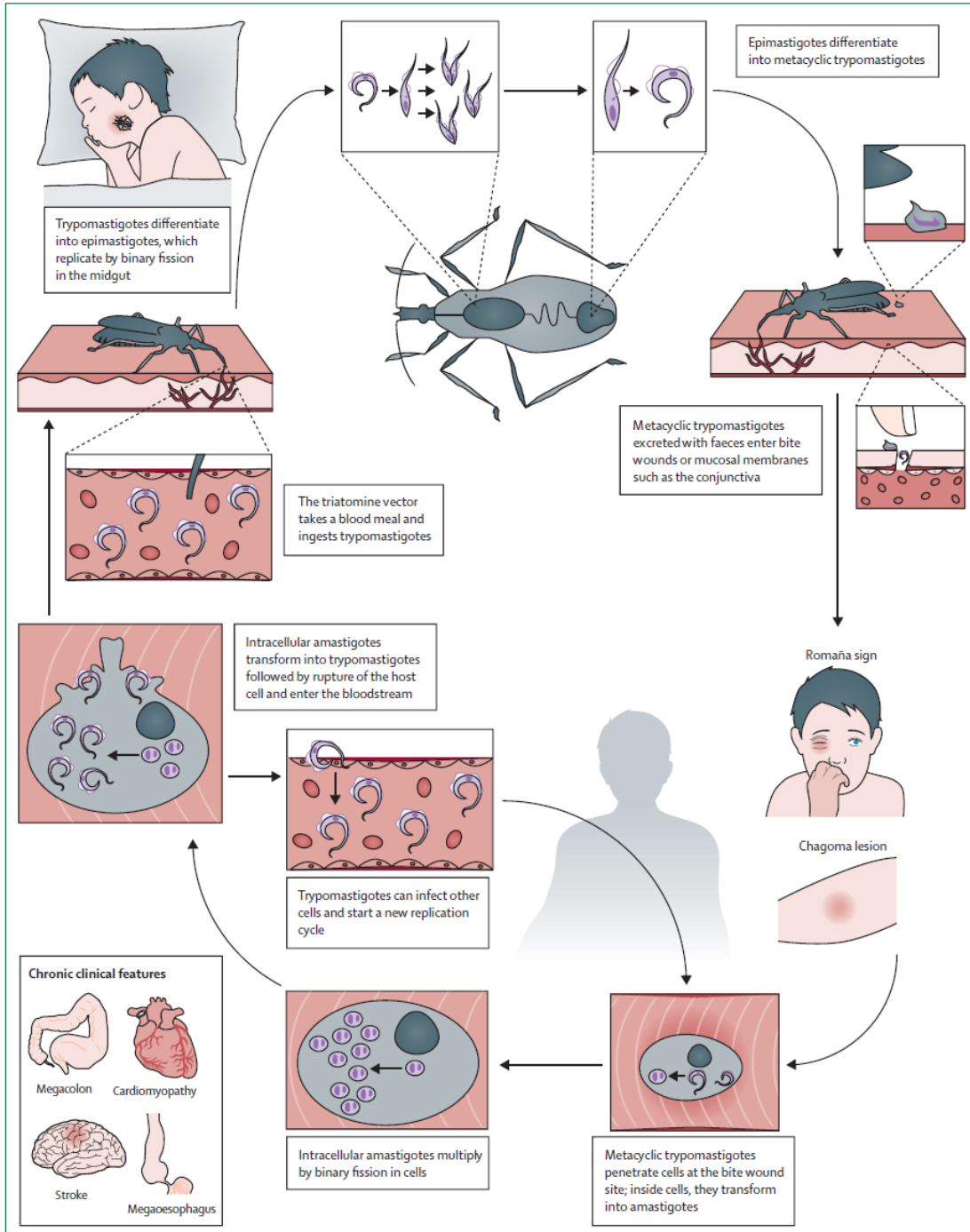


Figura 3. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*, tomado de [17].

1.2.3 Clasificación

A pesar de que *T. cruzi* tiene una forma de reproducción asexual, existe una gran heterogeneidad con variación genotípica y fenotípica, es por ello por lo que se ha clasificado en seis clados o unidades taxonómicas altamente relacionadas entre sí, desde TcI, hasta TcVI, estas han sido divididas con base en sus Unidades Discretas de Tipificación (DTU) [21]. El concepto de DTU surge por la necesidad de clasificar las distintas cepas de *T. cruzi*, recibiendo diversas clasificaciones a lo largo de los años, como zimodemas, esquizodemas, biodemas, clones, linajes, clados y haplotipos, hasta llegar al concepto de DTU en 1999, que decide dividir al parásito en dos grupos mayores, clasificándolos con base en sus características biológicas, bioquímicas y moleculares, usando técnicas como: Electroforesis de enzimas multilocus (MLEE); Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD); Amplificación del gen miniexón o SL, y finalmente de las regiones 24S α y 18S rDNA; recientemente se han agregado técnicas como PCR-RFLP de 12 locis, para una mayor fiabilidad en algunos protocolos [21]–[24]. El concepto de DTU se define como el conjunto de poblaciones que son genéticamente más similares entre sí, que entre otras poblaciones y son identificables mediante marcadores moleculares comunes, a veces denominados tags o etiquetas [22]. Actualmente el uso de las DTU es considerado fiable para análisis epidemiológicos y estudios experimentales de evolución [21]; los clústeres genéticos dentro de *T. cruzi* se ajustan perfectamente a esta definición, por ello se le han asignado seis DTU [23], [24], y aunque comparten perfiles para ciertos marcadores moleculares, no son necesariamente idénticos a nivel genético y a menudo pueden distinguirse con marcadores adicionales, es por ello que las cepas de *T. cruzi* deben ser consideradas como familias de clones estrechamente relacionadas, y no como un solo clon [21].

Esta diversidad genética ha sido relacionada a una distribución geográfica (**Figura 4**), patogénesis, características clínicas y respuesta a terapia, todas bien definidas por el tipo de DTU; aunque esta distribución resulta mayormente concentrada en América latina, cada vez se reportan más casos hacia el norte del continente [17].

Recientemente se ha reportado el primer caso en humano, de un tipo de DTU (Tcbat), que solía encontrarse exclusivamente en murciélagos de las especies *Noctilio spp.*, *Myotis spp.* y *Artibeus spp.*, sin embargo, su transmisibilidad parece permanecer delimitada al vector principal (*Triatoma sordida*) en zonas selváticas y en un muy bajo porcentaje (**Figura 5**) [25], [26]. Aunque la distribución del parásito en México mayormente corresponde al DTU TcI, pueden existir otros DTU subestimados y no detectados por falta de investigación y cribado profundo, principalmente en áreas endémicas.

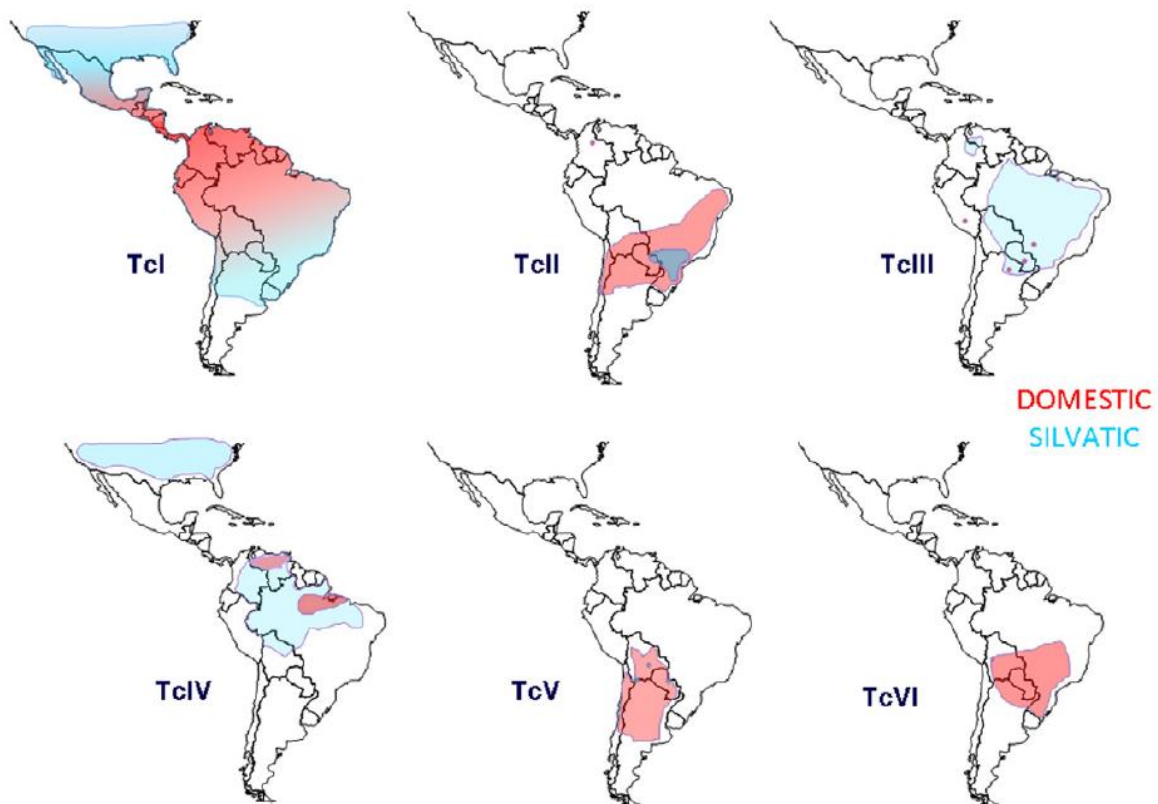


Figura 4. Distribución geográfica aproximada de *Trypanosoma cruzi*, con ciclos de transmisión domésticos y selváticos, tomado de [21].

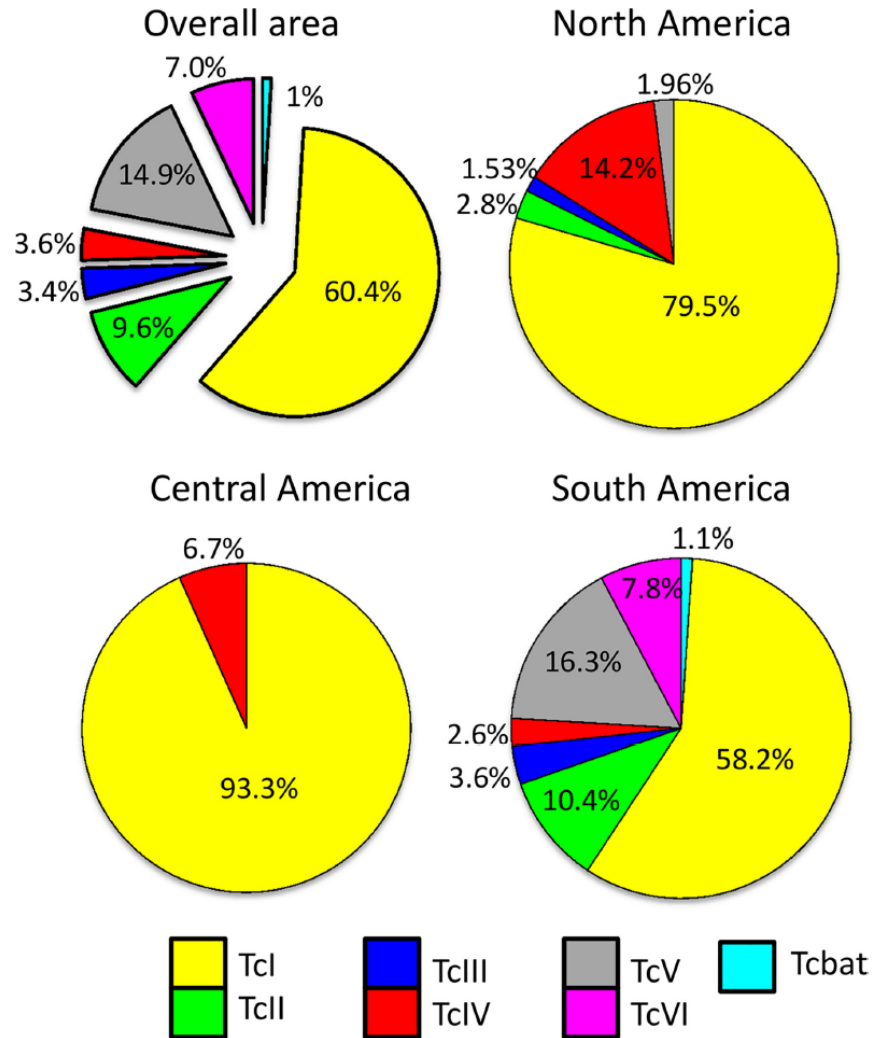


Figura 5. Distribución geográfica de *Trypanosoma cruzi*, con base a una revisión bibliográfica de 137 artículos, donde se obtuvo una n total de 6,243 DTU (TcI-TcVI y Tcbat) identificados en todo el continente americano, con n=459 en Norteamérica, n=120 en Centroamérica y n= 5655 en Sudamérica, tomado de [25].

Esta diversidad de DTU's puede deberse a la plasticidad del genoma de *T. cruzi*, ya que se conoce pueden coexistir varios DTU en un mismo vector y en un mismo hospedero, lo que pudiera ocasionar hibridaciones y cambios genéticos no convencionales, dando lugar a los distintos DTU existentes [25]. Aun cuando las relaciones evolutivas del parásito no han sido completamente elucidadas, dos de ellos (TcV y TcVI) claramente parecen provenir de una hibridación de TcII y TcIII, siendo estos sus padres directos putativos; TcIII y TcIV, pudieron haber sido originados de una hibridación previa por parte de TcI y TcIII, sin embargo, algunos

autores afirman que no es así [25]. TcI y TcII parecen seguir siendo los linajes más puros, que evolucionaron separadamente desde un ancestro en común, hace aproximadamente 1-3 millones de años [25].

A pesar de que el concepto de DTU pareciera estar bien establecido, siguiendo marcadores bien definidos (**Tabla 1**) para diferenciarse entre sí, no existe un consenso total para el estándar de oro con el objetivo de definir los distintos linajes de *T. cruzi*, ya que existen combinaciones inusuales y complejas a nivel de marcadores moleculares, como es el caso de Tcbat, que solo es distinguible por medio de una PCR-RFLP [21] y han desembocado en protocolos más recientes, pero sin lograr un consenso universal, que pudiese contribuir a comprender mejor las implicaciones epidemiológicas que tienen los distintos DTU's.

Tabla 1. Tamaño de productos de PCR (pb) para la clasificación de distintos DTU de *Trypanosoma cruzi*, tomado de [21].

DTU	24S α rDNA	Gen SL	18S rDNA
TcI	110	350	175
TcII	125	300	165
TcIII	110	-	165
TcIV	120	-	155
TcV	110	300	165
TcVI	125	300	-

1.2.4 Patogenia y espectro clínico

La patogenia ocasionada por *T. cruzi* suele ser bien focalizada durante la infección, se ha encontrado que el tipo de DTU determina el tropismo a tejidos presentado por los parásitos, ya sea durante infecciones experimentales [27] o casos clínicos en humanos. Es importante tener en cuenta este tropismo, ya que será determinante en las manifestaciones clínicas derivadas de la infección, especialmente durante la fase crónica, y aunque se desconoce la razón de dicho tropismo, diversos autores reportan una tendencia hacia la infección de musculo cardiaco por parte del DTU TcI, derivando en diversas complicaciones cardiacas y una alta parasitemia, derivando en una mayor virulencia; mientras que el grupo TcII parece mostrar un tropismo hacia bazo e hígado y una menor parasitemia

[27]. Aunque estas diferencias pudiesen explicar las distintas proporciones derivadas de las infecciones reportadas por *T. cruzi*, se debe seguir indagando acerca de los polimorfismos genéticos en los DTU's y sus consecuencias en la patogenia, para poder entender mejor la epidemiología de la enfermedad de Chagas. Las complicaciones cardíacas son las más comunes en la enfermedad de Chagas, sin embargo, las lesiones ocasionadas por *T. cruzi* dependerán de las características del parásito, su estadio y DTU, así como del hospedero y su sistema inmune; dando lugar a características clínicas como megacolon, megaesófago y en ocasiones derrames cerebrovasculares [17]. Un problema en la detección temprana de esta enfermedad es la ausencia de síntomas específicos, lo que usualmente lleva a detectarla solo cuando se presentan signos patognomónicos, tales como el Chagoma y el signo de Romaña [17]. La enfermedad de Chagas tiene una gran capacidad de propagación siendo transmitida por diferentes vías, ya sea a través de insectos hematófagos, transfusiones de sangre, donación de órganos, por vía oral a través de alimentos e incluso de forma accidental con muestras contaminadas [28]. Por otro lado, el principal linaje del parásito que se encuentra en México es el DTU TcI [25], el cual como se ha mencionado tiene un marcado tropismo hacia el corazón, haciendo este órgano uno de los principales sitios anatómicos afectados por la infección del protozoario.

Una vez inoculado el parásito, se produce la fase aguda de la enfermedad, que suele durar entre 15 y 40 días, la mayoría de estos casos son asintomáticos y se producen durante la infancia [29], [30]. Durante esta fase podemos observar o no los siguientes signos y síntomas: Chagoma, signo de Romaña, fiebre, cefalea, dolor articular y muscular, anorexia, vómitos, diarrea, somnolencia, apatía, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia, edema y convulsiones [31], [32]. Todo este abanico de síntomas hace que la enfermedad de Chagas sea muy difícil de diagnosticar, excepto el Chagoma y el signo de Romaña, que son los signos patognomónicos de la enfermedad. En esta fase, suelen producirse muertes en el 5-10% de las personas infectadas, generalmente por miocarditis grave, meningoencefalitis o ambas [33].

Alrededor del 60-70% de los infectados, no desarrollan signos o síntomas, por lo que pasan directamente a la fase crónica indeterminada. Esta fase se caracteriza por una seropositividad de los anticuerpos contra *T. cruzi*, un electrocardiograma de 12 derivaciones normal y un examen radiológico normal de tórax, esófago y colon [33]. El periodo de duración de la fase crónica indeterminada puede variar de 10 a 30 años [12], e incluso el paciente puede morir derivado de otras complicaciones y no saber nunca que ha tenido la enfermedad de Chagas. Esta fase es bastante crítica para la población, ya que el paciente no es consciente del riesgo que representa su enfermedad, la ignorancia sobre su padecimiento también representa un gran reto para el sistema de salud, que es detectar la infección lo más temprano posible. Se cree que en México ha habido una considerable transmisión de la enfermedad de Chagas a través de la transfusión de sangre y por la donación de órganos, debido a la falta de regulación para la detección de *T. cruzi* durante décadas. Fue hasta que se aplicó la norma NOM-253-SSA1-2012, que dicta la obligatoriedad del tamizaje de los donadores de sangre, que se detectó un mayor número de casos y se evitaron los contagios por esta vía [16].

El 30-40% restante de los infectados por *T. cruzi* pasará a la fase crónica sintomática. Aunque ésta suele ser la progresión que tiene un paciente de Chagas, se han detectado progresiones directas de la fase aguda a las formas clínicas, es decir, cardiomiopatía, megaesófago, megacolon y trastornos cardiodigestivos, en sólo el 5-10% de los pacientes [34]. Existe una distribución epidemiológica diferente en el continente americano que también marca una diferencia en las presentaciones clínicas de la enfermedad de Chagas. Las afectaciones digestivas se distribuyen principalmente, pero no exclusivamente, en la región de América del Sur (sobre todo en Argentina, Brasil y Bolivia), y se encuentran en el 10-15% de los pacientes infectados de forma crónica. En el caso de las patologías encontradas en América Central y del Norte, existen principalmente cardiopatías que se desarrollan en el 20-30% de los pacientes, siendo el trastorno más común en la enfermedad de Chagas [5], [33], [35]; esta variación en las patologías puede explicarse por un tropismo definido por el DTU

de *T. cruzi*, cuyos mecanismos completos aún se está dilucidando. Con base en esto, la enfermedad de Chagas se puede dividir en dos fases: aguda y crónica, esta última consistiendo en una etapa asintomática (antes llamada indeterminada) y la etapa sintomática (Figura 6).

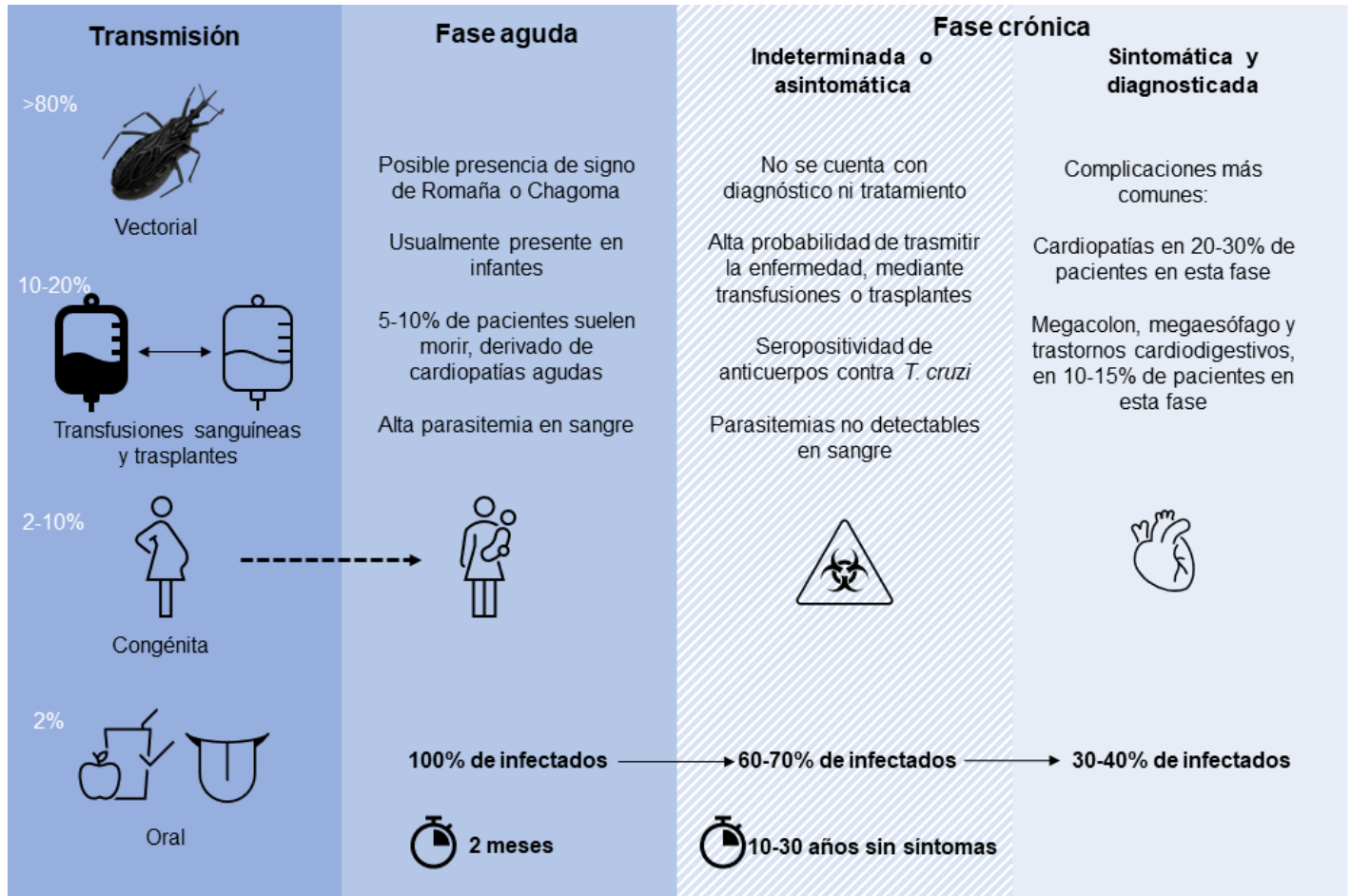


Figura 6. Vías de transmisión para *Trypanosoma cruzi*, y fases de la enfermedad de Chagas.

1.2.5 Diagnóstico

El diagnóstico etiológico de la enfermedad de Chagas se basa en la evaluación clínica, epidemiología y pruebas de laboratorio. Sin embargo, el subregistro es muy frecuente debido a que los síntomas son inespecíficos, mostrando desde fiebre, dolores de cabeza, arritmias, cansancio generalizado y estreñimiento; hasta

signos patognomónicos más evidentes. Para el diagnóstico de laboratorio, los exámenes adecuados dependen de la etapa clínica del paciente, sin embargo, aunque existen distintas pruebas de diagnóstico, no han sido validados de forma independiente ni comparados entre sí [36].

En la etapa aguda los estudios se centran en la búsqueda y reconocimiento de *T. cruzi* en sangre (parasitológica directa), debido a que en las etapas iniciales de la enfermedad se encuentran parasitemias importantes y a medida que transcurre la infección van disminuyendo hasta hacerse mínimas y aleatorias. En las etapas crónicas (indeterminada y sintomática) las parasitemias son transitorias y por ello el diagnóstico se realiza fundamentalmente mediante el hallazgo de anticuerpos circulantes contra *T. cruzi* [36].

Las pruebas de diagnóstico más usadas en México son basadas en el algoritmo inmunodiagnóstico, que contempla la determinación de anticuerpos séricos y al menos dos pruebas de diferente formato: Hemaglutinación indirecta, ELISA, Inmunofluorescencia indirecta, PCR o Western Blot [16]. Aunque menos frecuentes, también se realizan exámenes parasitoscópicos: examen directo y tinción de extendidos de sangre, microhematocrito, método de Strout (concentración de parásitos mediante centrifugación), Xenodiagnóstico (positividad del 9 - 87.5%) con las limitaciones que implican el tiempo y sangre requeridos [13]. En general se recomienda para áreas rurales y de recursos escasos o reducidos, el xenodiagnóstico, microscopia y microhematocrito durante la fase aguda, mientras que para la fase crónica se recomienda el uso de prueba rápida; en cuanto a las áreas urbanas se recomienda usar PCR durante la fase aguda, y para la fase crónica hemaglutinación indirecta, ELISA e inmunofluorescencia indirecta [36].

1.2.6 Tratamiento y profilaxis

Actualmente solo existen dos drogas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, el Nifurtimox y Benznidazol, ambas desarrolladas en el siglo pasado, 1965 y 1971 respectivamente [13]; sin embargo la producción de estos

medicamentos se ha visto constantemente interrumpida y limitada, debido a que el benznidazol fue fabricado por Roche hasta 2003, después entre 2004-2006 se llevó a cabo una transferencia tecnológica para su producción en el Laboratorio Farmacéutico del Estado de Pernambuco, en Brasil; luego de intermitentes periodos de producción y una evidente falta de suministro en toda Latinoamérica, el laboratorio argentino Elea junto con la Fundación Mundo Sano comenzaron con la producción de benznidazol, bajo el nombre de Abarax, abasteciendo al territorio argentino, latinoamericano y mundial a través de programas de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) [13], [37]. En cuanto al nifurtimox, este se produce en el Salvador por la farmacéutica Bayer [37], que recientemente reformuló el fármaco mediante su programa CHICO (CHagas disease in Children treated with nifurtimOx), mostrando presentaciones de 120 mg y 30 mg, con el objetivo de mejorar la precisión de la dosificación, seguridad y cumplimiento de tratamiento en infantes [38].

En México, el tratamiento está indicado en casos de infección aguda, niños y jóvenes con infección crónica reciente, jóvenes y adultos con serología positiva hasta la edad de 60 años. En sujetos mayores de 70 años no se sugiere el tratamiento por la relación riesgo/beneficio a esa edad [16], sin embargo, la evidencia científica sobre la efectividad de los fármacos ha llevado a incluir en el tratamiento a adultos en fase crónica que no presenten una cardiomiopatía avanzada [39], ni comorbilidades que afecten el tratamiento.

Como se ha mencionado, ambos tratamientos antiparasitarios están indicados especialmente durante la fase aguda, congénita, reactivaciones y fase crónica en pacientes jóvenes o con altas probabilidades de éxito en el tratamiento. La probabilidad de éxito para pacientes en condiciones ideales (fase aguda y sin comorbilidades graves), suele ser del 60% a través de estos tratamientos [40]. Usualmente la droga más usada suele ser el benznidazol por su tolerabilidad, mayor experiencia en su uso y posiblemente mejor eficacia frente al nifurtimox; ambas drogas son administradas de forma oral, usualmente por 60 días para benznidazol y 60-90 días para nifurtimox [41]. A pesar de que la toxicidad y tasa de interrupción en el tratamiento es baja en infantes (4%), mientras que en

pacientes adultos estas drogas son muy poco toleradas, con tasas de interrupción de 29.7% y 43.8% para benznidazol y nifurtimox respectivamente [41]. Es importante tener en cuenta que existen cepas resistentes a una u otra droga, y usualmente la resistencia a una obedece a serlo para la restante, se cree que esta resistencia está relacionada con la delección del gen para la enzima NADPH flavin-reductasa [40].

En cuanto a su toxicidad el nifurtimox presenta efectos adversos como anorexia, pérdida de peso, alteraciones psíquicas como excitabilidad y somnolencia, manifestaciones digestivas como náuseas, vómito, cólicos intestinales y diarreas; el benznidazol muestra manifestaciones cutáneas tales como hipersensibilidad, dermatitis con erupciones cutáneas, además de edema generalizado, fiebre, linfoadenopatía, dolor articular y muscular, así como depresión de la médula ósea, trombocitopenia purpura y agranulocitosis [40]. En general las manifestaciones de la piel y médula ósea son más intensas usando benznidazol, mientras que las afectaciones a sistema nervioso (cefalea, anorexia, polineuropatía, vómitos e insomnio), son más intensas en el uso de nifurtimox [40]; sin embargo, ambas causan disfunción renal y hepática derivada de los metabolitos altamente reactivos de estas drogas, siendo unidos covalentemente a ADN y proteínas nucleares de hígado; se cree que la enzima citocromo P450 es la proteína más relevante en el metabolismo nitroreductivo de ambas drogas [40] pudiendo ser inhibida por la formación de aductos, desembocando en un daño global provocado por el estrés oxidativo y uniones covalentes no deseadas.

A pesar de su longevidad, el mecanismo de ambas drogas no ha sido investigado a detalle, pero debido a su naturaleza química se piensa que se esparcen por difusión pasiva [42]. El mecanismo de acción para nifurtimox inicialmente se basó en la reducción de un electrón, formando un radical anión con acción citotóxica, agotando el NADPH y generando especies reactivas de oxígeno, sin embargo, diversos estudios han contradicho esa hipótesis; siendo el mecanismo más aceptado la formación de un grupo nitroso e hidroxilaminas, seguido de una

fragmentación que produce un grupo nitrilo insaturado de cadena abierta, este nitrilo forma aductos con el ADN y grupos tiol presentes en metabolitos de baja masa molecular, así como con proteínas [42]. En el caso del benznidazol, la reacción involucra generación de hidroxilaminas y grupos hidroxilos, que luego forman un intermediario dihidroxidihidro, para descomponerse en un grupo glioxal altamente reactivo; se ha demostrado que este grupo actúa de forma covalente formando aductos con proteínas, nucleótidos y pequeñas moléculas como glutatión, lo que provoca rupturas de ADN, bases nitrogenadas y aminoácidos [42], [43], así como el uso limitado de glutatión como cofactor en enzimas de desintoxicación, como glioxalasa I y II [44]. En general ambos fármacos basan su efectividad en interferir durante la síntesis de proteínas, ADN y ARN, tanto en nivel nuclear como de kinetoplasto.

Diversos factores contribuyen al desarrollo de la enfermedad de Chagas en América Latina y México, algunos de ellos son la globalización, vejez, pobreza, acceso limitado a la atención sanitaria, falta de conocimiento sobre la enfermedad y de las prácticas básicas de higiene, así como la transmisión congénita/oral y el subregistro clínico [45]. Sin embargo, existen medidas profilácticas al alcance de toda la población, que podrían prevenir la propagación de esta enfermedad, entre ellas están las medidas de control de vectores, como la aplicación sistemática de plaguicidas de origen piretroide en zonas domésticas y peridomiciliarias [46], mejoras constantes en las viviendas de materiales naturales, como el barro, el adobe o la paja, que sirven de reservorios naturales para los triatomíneos, mayor compromiso político y comunitario para el desarrollo e implementación de programas de prevención, control y erradicación de vectores, así como informes oportunos de infección y transmisibilidad entre las comunidades endémicas o de alta incidencia [47], fortalecimiento de los sistemas de salud para la detección oportuna de la enfermedad de Chagas en pacientes agudos y crónicos, así como el acceso al tratamiento en caso de ser necesario; la detección de la enfermedad de Chagas en los bancos de sangre y en aquellos pacientes que se someten a trasplantes de órganos para evitar la transmisión por estas vías, de acuerdo con la

norma obligatoria NOM-253-SSA1-2012 [16], el cribado serológico universal en las mujeres en edad fértil y el tratamiento antiparasitario antes del embarazo en las mujeres infectadas, ya que esto ha demostrado su eficacia en la disminución de la transmisión congénita para futuros embarazos [48], las campañas de promoción de la salud para dar a conocer la enfermedad en la población general y particularmente en las regiones de alta incidencia; recomendaciones sobre la manipulación segura de los alimentos y la higiene adecuada antes de su ingesta para evitar la transmisión oral, que aunque poco frecuente, existe un riesgo latente de contagio a través de las heces de los triatominos en alimentos [29].

1.2.7 Necesidad de una vacuna

Actualmente no existe una vacuna capaz de contrarrestar, ni prevenir la enfermedad y su diseminación en el organismo. Sin embargo, han sido considerables los esfuerzos por desarrollar una, usando plataformas que incluyen el uso de ADN, vacunas atenuadas, virus y bacterias modificadas, proteínas recombinantes, con diversas formulaciones y adyuvantes [49], algunas han demostrado ser efectivas en la prevención de cardiopatías, siendo esto especialmente relevante, ya que son una de las principales complicaciones durante la enfermedad. Algunos estudios sugieren que el uso combinado de vacunas con las drogas actuales, pueden reducir el tiempo del tratamiento y por consiguiente su toxicidad, así como efectos secundarios, sin comprometer la efectividad del tratamiento [49]. Es evidente la necesidad de avances y estrategias alternativas para pacientes con Chagas, y una vacuna representa una oportunidad atractiva, con el objetivo principal de prevenir la infección, o al menos retrasar la progresión en la infección, coadyuvar en el tratamiento, así como reducir la transmisión congénita del parásito.

1.2.8 Enolasa como posible inmunógeno

La enolasa (2-fosfo-D-glicerato hidrolasa, EC 4.2.1.11) es una metaloenzima que cataliza la deshidratación reversible de D-2-fosfoglicerato (PGA) a

fosfoenolpiruvato (PEP) tanto en glucólisis como en gluconeogénesis (**Figura 7**). Esta proteína muestra diversos motivos conservados, particularmente en su sitio catalítico, lo que ha llevado a pensar que las enzimas de diversas especies comparten muchas propiedades cinéticas similares.

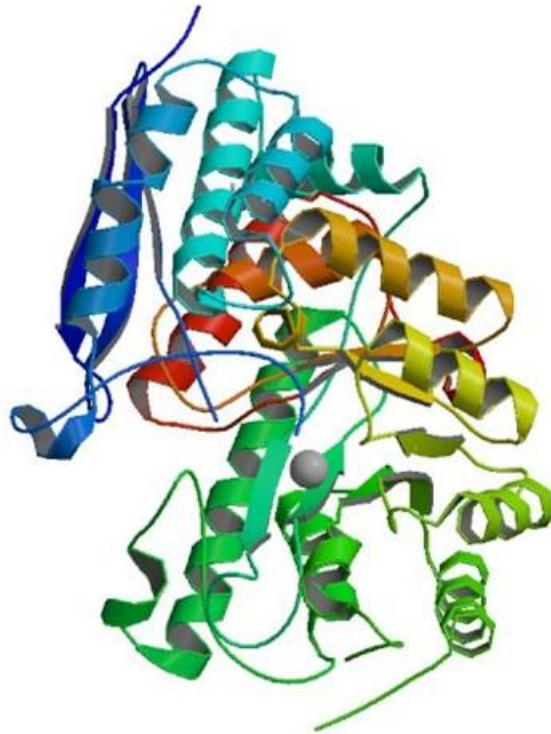


Figura 7. Estructura cristalina de la TcENO (Enolasa de *Trypanosoma cruzi*), extraída de PDB, con código: 4G7F.

Por otra parte, varios estudios han demostrado que la enolasa, es una proteína multifuncional, ya que no solo participa en el metabolismo, sino que también es capaz de generar una respuesta inmune Th1 (considerada fundamental para eliminación de parásitos intracelulares), debido a la producción de anticuerpos y Th2 contra de algunos organismos, como: *Plasmodium falciparum*, *Ascaris suum* y *Candida albicans*, reduciendo la parasitemia en un 80 y 60% respectivamente, así como producción de inmunoglobulinas IgG1 e IgG2a, para el caso de *C. albicans* [50]–[52] debido a que contiene secuencias aminoacídicas altamente conservadas a lo largo de diversas especies, particularmente en su sitio catalítico. Esta proteína, también actúa como un receptor de plasminógeno en la superficie celular

de ciertos patógenos y ha sido implicada en funciones nucleares en protozoos, así como en células animales y de plantas [53].

1.2.9 Antecedentes directos

Existen numerosos trabajos respecto a la enfermedad de Chagas, así como importantes aportaciones al desarrollo de una vacuna o tratamiento, una de las más directas a este trabajo es la de Carabarán-Lima *et al* [54], en la cual se estudió el gen que codifica a la enolasa recombinante de *T. cruzi* (rTcENO), donde se amplificó, clonó, secuenció y finalmente se purificó la proteína recombinante. Para corroborar si esta proteína presentaba respuesta inmunogénica se llevaron a cabo estudios *in silico* y experimentales corroborando que la rTcENO contiene motivos característicos de la enolasa; adicionalmente, se identificó una región transmembranal, y esto podría indicar la localización potencial de la TcENO en una región externa del parásito y en membrana, anclada a ella mediante hélices transmembranales identificadas en el análisis computacional [54]. Además de que fueron predichos epítopes para linfocitos B, así como para linfocitos T citotóxicos, estos resultados sugieren la posibilidad de que rTcENO pueda desarrollar respuestas inmunes del tipo humoral y celular; de igual manera en estudios posteriores se detectó la presencia de anticuerpos anti-rTcENO en sueros de ratones inmunizados experimentalmente con la rTcENO, demostrando que la proteína recombinante purificada fue reconocida por los sueros de ratones; estos resultados indican que rTcENO tiene propiedades inmunogénicas y podría proponerse y estudiarse como candidato para el desarrollo de una vacuna.

Partiendo de estos estudios, que indican un potencial inmunogénico contra la enfermedad de Chagas por parte de la rTcENO, se debe tener en cuenta que existen distintas cepas o DTU's del parásito, y dado que el objetivo principal de desarrollar una vacuna es conferir protección contra la mayoría o preferiblemente todas las variantes de *T. cruzi*, se debe tener una proteína y por tanto una secuencia consenso que represente a la mayor cantidad de DTU's, ya que aunque el proceso de reproducción en el parásito es asexual y su nivel de recombinación

debería ser muy bajo, se tienen identificadas diferencias discretas pero significativas en algunas regiones de su genoma, que pudieran ser de importancia al buscar profilaxis contra todas las variantes conocidas del parásito.

1.3 Justificación

La problemática principal al hablar sobre la enfermedad de Chagas es la alta incidencia de la enfermedad en Latino América y su rápida diseminación a nivel mundial, aunado a esto, los dos medicamentos existentes para su tratamiento ocasionan daños severos a la salud y no son del todo efectivos, por lo cual existe la necesidad de tener un método profiláctico y efectivo como lo es una vacuna. Por lo anterior, en este trabajo se evaluarán las características inmunogénicas de la enolasa de *Trypanosoma cruzi* como un inmunógeno universal, al obtener una secuencia consenso a partir del gen proveniente de los diversos DTU's y posteriormente analizar sus propiedades inmunogénicas mediante análisis bioinformáticos

1.4 Hipótesis

La secuencia consenso obtenida a partir de los diferentes DTU's, mostrará las características inmunológicas necesarias *in silico* para ser un buen inmunógeno, y proponerla para el desarrollo de una vacuna eficaz y de amplio espectro de efectividad contra *Trypanosoma cruzi*.

1.5 Objetivo general

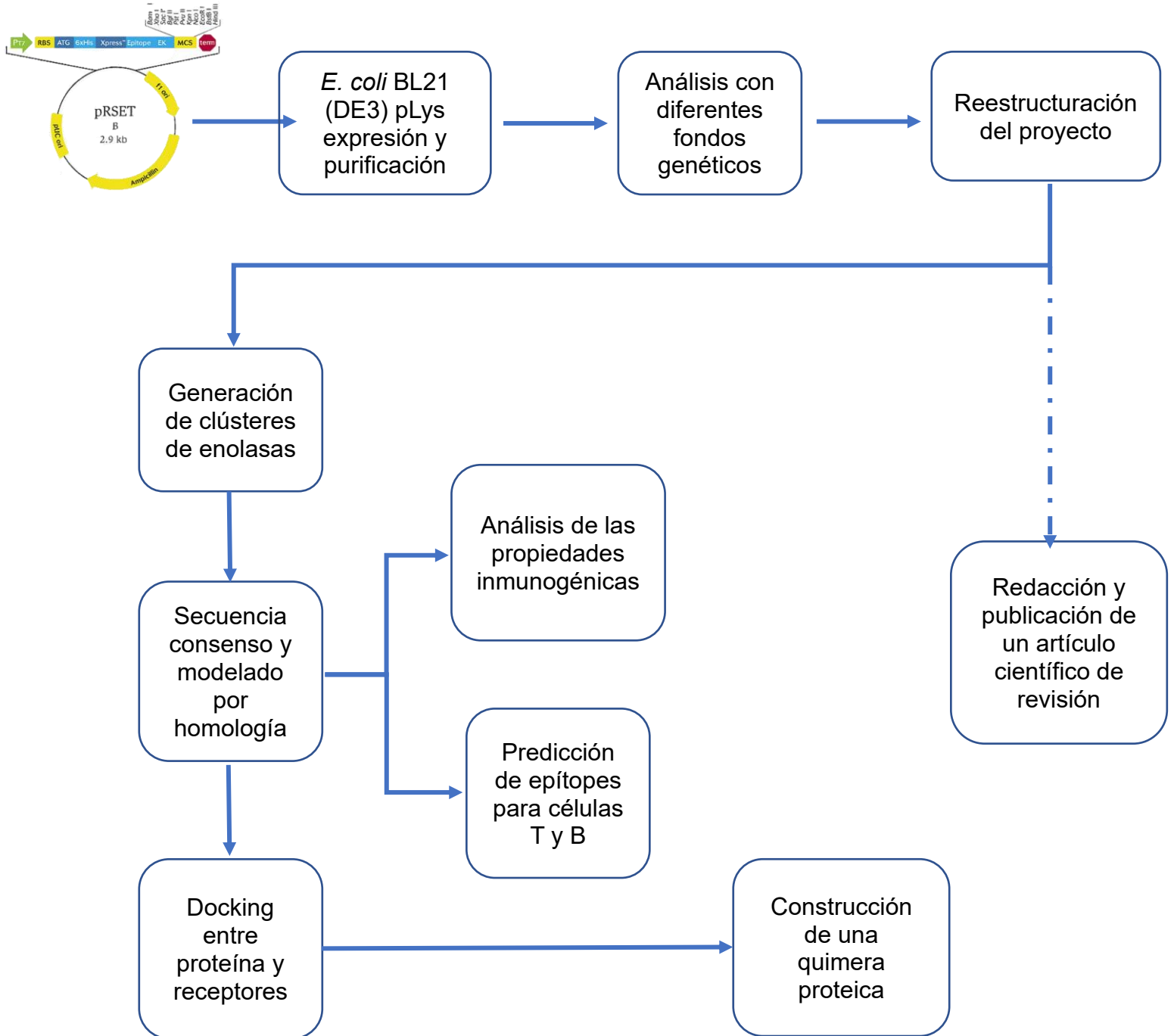
Evaluar las propiedades inmunogénicas de la enolasa consenso de *Trypanosoma cruzi* mediante un abordaje bioinformático.

1.6 Objetivos específicos

- Generar clústeres de secuencias de enolasas, a partir de distintos DTU's de *T. cruzi* y obtener una secuencia consenso.
- Realizar un modelado por homología de la secuencia consenso para obtener la estructura terciaria y analizar sus características fisicoquímicas.
- Analizar *in silico* las propiedades inmunogénicas de la enolasa consenso.
- Determinar la presencia de epítopes reconocidos por el sistema de antígenos leucocitarios humanos o HLA's conservados para población de Latinoamérica.
- Determinar los mecanismos de activación inmunológica de la enolasa consenso mediante Docking molecular entre la proteína y receptores asociados a membrana
- Construir una quimera proteica con epítopes predichos para MHC-I.

Materiales y métodos

2.1 Estrategia experimental



2.2 Expresión y purificación de rTcENO

A partir de células *E. coli* DH5 α , se extrajo el plásmido pRSETB::TcENO resistente a Ampicilina (Amp), mismo que fue digerido por las enzimas *Kpn* I y *Hind* III, para visualizar mediante una electroforesis de agarosa el gen correspondiente a la rTcENO. Luego se transformaron células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS resistentes a cloranfenicol (CM), con el plásmido purificado pRSETB::TcENO. Se procedió a tomar una azada de las células transformadas, para inocular 5 mL de medio Luria Bertani (LB) adicionado con 100 mg de Amp y 5 mg de CM; fueron cultivadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente el precultivo se adicionó a 50 mL de medio LB con 100 mg de Amp y 5 mg de CM, dejándolo crecer a 37°C con agitación continua hasta alcanzar una Densidad Óptica (DO) de 0.4 - 0.6, a una longitud de 600 nm. Una vez obtenida la DO, se tomó 1 mL de este cultivo y se guardó a -80°C, identificándolo como “No Inducido”, puesto que se utilizó como control en el proceso de purificación de la proteína. La expresión de la rTcENO se indujo usando isopropil- β -ditiogalactósido (IPTG), a una concentración final de 1mM durante 3 horas bajo agitación a 37°C; después de este tiempo se disminuyó la temperatura a 28°C y se mantuvo en agitación durante 21 horas; de este cultivo se recuperó 1 mL y también se guardó a -80°C, identificándolo como “Inducido”.

Luego de la expresión inducida, se procedió a la recolección de células bacterianas por centrifugación de los 48 ml de cultivo restante a 13,000 rpm por 5 minutos. La purificación de la rTcENO se comenzó resuspendiendo la pastilla celular en solución de lisis, que contiene Tris-HCl 50 mM a pH: 8, cloruro de sodio 10 mM, tiocianato de guanidina 4 M e inhibidores de proteasas a 7X. Posteriormente, se realizó la ruptura celular por sonicación durante 5 minutos, con pulsos de 7 segundos, amplitud de 50-60 y manteniéndolo en hielo, repitiendo este proceso al menos 3 veces hasta lograr clarificar el líquido; seguido de una centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C; se obtuvo el sobrenadante denominado “extracto”, y se guardó la pastilla empaquetada en 1 mL de medio LB a -80°C para su posterior uso. Luego se purificó la rTcENO mediante cromatografía de afinidad de Ni-NTA-agarosa, adicionando 500 μ L de resina y pasando 2 volúmenes de etanol, 3 de agua tridestilada estéril a flujo constante,

posteriormente se agregó 3 volúmenes de buffer de carga y se dejó pasar a 20 segundos por gota. Se colocaron 3 volúmenes de la solución A (Binding), y una vez pasada, se añadió el extracto, para recuperarlo de nuevo guardando 1 mL a -80°C. Se procedió a lavar con 10 volúmenes de solución B (Wash), recuperando el último mililitro y guardándolo a -80°C. A continuación, se pasaron 3 volúmenes de solución C (Elución) y se recuperó en tubos eppendorf estériles; después se adicionaron 3 volúmenes de buffer Strip a la columna, recuperando el primer mililitro y dejando pasar el resto. Finalmente se guardó la columna con 3 volúmenes de buffer Strip a 4°C, y todas las alícuotas de la purificación se almacenaron a -80°C, añadiendo previamente 50µL de EDTA 0.01 M por cada mililitro de elución obtenido.

El análisis de la expresión de la proteína rTcENO fue realizado por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida a una concentración del 12% (SDS-PAGE), añadiendo 10 µL por pozo, de una mezcla 1:1 de buffer de carga y eluidos, cada uno hervido a 100°C por 10 minutos. Se utilizó como marcador de peso molecular el reactivo All Blue™ #1610373 de Biorad®, y las muestras obtenidas durante la purificación se colocaron en el siguiente orden: No inducido, Inducido, Eluído 1, Eluído 2, Eluído 3, Wash, Strip, Pastillas y Extracto. Posteriormente el gel se tiñó con azul de Coomassie para corroborar la presencia de la proteína.

2.3 Análisis con distintos fondos genéticos

Una vez identificada la presencia de proteína en el gel y con base en los resultados obtenidos, se procedió a realizar una curva de crecimiento para las cepas de *E. coli* Star, Rosetta y pLysE, todas previamente transformadas con el plásmido pRSETB::TcENO, usando cultivos de 50 mL de medio LB, buscando alcanzar una DO de 0.4 a 600 nm para todas las cepas, luego de alcanzar esa densidad se procedió a añadir IPTG a 1mM, para posteriormente realizar 3 mediciones de DO, cada una en intervalos de 1 hora; una vez obtenidos los resultados se graficaron desde el tiempo 0 (No inducido), hasta el tiempo 3 (Inducido). Posteriormente se realizó el mismo proceso de purificación, descrito

anteriormente con las tres cepas de *E. coli* y se analizaron cada uno de los tiempos con geles SDS-PAGE de manera individual, mismos que fue teñidos con azul de Coomassie.

Luego de observar los patrones presentes en los geles de poliacrilamida, se procedió a realizar nuevamente un SDS-PAGE, con muestras del tiempo 2 (Medio y Pastilla celular) para las tres cepas y posterior al SDS-PAGE, se realizó un Western Blot, donde las proteínas del gel se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 80 V durante 1 hora, manteniendo el buffer de transferencia a una temperatura de 4°C. Al terminar, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau, para corroborar la presencia de la rTcENO y después se lavó con agua tridestilada estéril hasta remover el colorante. La membrana se bloqueó con leche descremada al 4% (p/v) diluida en PBS estéril pH 7.5 durante 1 hora a 37°C, y se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0.05% (PBS-T) de 10 minutos cada uno. Posteriormente, se incubó la membrana durante 2 horas a 37°C con el anticuerpo anti-histidinas (1:5000 en PBS), para luego retirarse con 3 lavados de PBS-T; una vez lavada, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina, (1: 5000) incubándolo durante 1 hora a 37°C, luego el segundo anticuerpo se retiró y se realizaron 3 lavados con PBS-T para remover el exceso. Finalmente se añadió a la membrana 1 mL del sustrato revelador BCIP/NBT™ de Merck®.

2.4 Reestructuración del proyecto

A partir de este punto se vieron interrumpidos los trabajos experimentales, situación derivada de la pandemia por SARS-Cov-2, y se optó por reestructurar el proyecto teniendo en cuenta la incertidumbre sobre la situación sanitaria y el no poder volver a los laboratorios de forma presencial a corto plazo. Durante este proceso se comenzó a trabajar en la publicación de un artículo de revisión, relacionado al tema principal de la enfermedad de Chagas, que fue publicado con el título de: “Risk of COVID-19 in Chagas Disease Patients: What Happen with Cardiac Affectations?” [55].

2.5 Generación de clústeres de enolasas

Partiendo del gen que codifica para la enolasa de *T. cruzi* H8, correspondiente al DTU I, con número de acceso a GenBank: KC862322.1 y una longitud de 1,151 pb, es decir la secuencia de la rTcENO obtenida por Carabarán-Lima *et al* [54], se realizó una búsqueda de secuencias en bases de datos generales y especializadas, tales como National Center for Biotechnology Information (NCBI) y la base de datos especializada en patógenos de la familia *Trypanosomatidae* (TriTrypDB), que pertenece al programa Eukaryotic Pathogen, Vector and Host Informatics Resource (VEuPathDB) [56]. La búsqueda se realizó utilizando el gen de la enolasa cepa *T. cruzi* CL Brener con número de acceso: XM_814607.1 como templado, en los programas Blastn de NCBI y TriTrypDB; siendo que esta cepa es la mejor caracterizada hasta ahora y el gen reportado tiene una longitud de 1,290 pb.

En cuanto a NCBI se realizó una búsqueda de secuencias altamente similares (megablast) y se seleccionaron las secuencias con el mayor porcentaje de identidad, un e-value de 0.0 y una cobertura mayor al 85%. Mientras que para el caso de TriTrypDB se utilizaron los criterios de búsqueda en genomas, exclusivamente de *T. cruzi* y sus diferentes DTU's, en el programa blastn y se seleccionaron las secuencias con un e-value de 0.0, un score mayor a 2000, una identidad mayor al 95% y 0 gaps en todas las secuencias encontradas.

Una vez obtenidas las secuencias de ambas bases de datos, se procedió a clasificarlas en sus distintos DTU's, así como a traducir todas las secuencias, de DNA a aminoácidos mediante código genético estándar, en el programa bioinformático EMBOSS Transeq [57], para luego descargarlas y analizarlas.

2.6 Obtención de secuencia consenso y modelado por homología

El análisis de las secuencias traducidas se llevó a cabo en el programa Jalview [58], considerando las 15 secuencias seleccionadas y se llevó a cabo un alineamiento múltiple usando Clustal Omega. Los factores que se analizaron

fueron: la conservación de la secuencia a lo largo de todos los DTU's disponibles, las mutaciones, huecos presentes en las secuencias y las propiedades bioquímicas de los aminoácidos basadas en la coloración del esquema Clustal X.

A partir de la secuencia consenso, se procedió a realizar un modelado por homología a través de la plataforma SWISS-MODEL [59], usando como plantilla la proteína enolasa cristalizada, depositada en la base de datos Protein Data Bank (PDB) con código PDB: 4G7F [60], perteneciente al DTU VI, CL Brener. Esta proteína cuenta con una secuencia de 429 aminoácidos, de los cuales fueron modelados 419, con una resolución de 2.40 Å y obtenida por difracción de rayos X. Dentro del modelado por homología, se analizaron características como puntuación de: QMEAN, C β , todos los átomos de la estructura, el potencial de solvatación y de ángulo de torsión, siendo todos entre más cercanos a cero, mejores valores; así como valores de calidad local para cada aminoácido de la estructura modelo, comparada con el templado, y un gráfico de comparación con puntuaciones para estructuras de tamaño similar, pero obtenidas experimentalmente. Este programa también muestra un alineamiento entre el templado y la estructura modelada, que pueden ser analizadas mediante diferentes esquemas de color. Una vez obtenida la proteína modelada, se superpusieron tanto la cristalizada, como la modelada, mediante el programa UCSF Chimera [61], para analizar sus diferencias a nivel de secuencia y estructura.

Finalmente se obtuvieron una serie de gráficos de Ramachandran, para evaluar y validar la calidad del modelado a través de la plataforma SWISS-MODEL, que utiliza el programa MolProbity 4.4 [62].

2.7 Análisis de las propiedades fisicoquímicas, inmunogénicas y predicción de epítopes asociados a Células B y T

Para analizar las características fisicoquímicas, inmunogénicas y la predicción de epítopes de la proteína modelada, se usaron programas en línea y servicios

bioinformáticos, como ProtParam [63] para conocer las características fisicoquímicas de la secuencia; Vaxign 2.0 [64] para evaluar las propiedades inmunogénicas, así como los Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA) de referencia que reconocen la secuencia consenso, en combinación con la plataforma Immune Epitope Database (IEDB) [65], para la predicción de epítopes del complejo principal de histocompatibilidad tipo I y II (MHC I y II) asociados principalmente a la población Latinoamericana, seleccionando solo los epítopes con un $p\text{-value} \leq 0.01$ para ambos casos. La selección y validación de los epítopes se realizó en primera instancia por su representatividad en los supertipos de HLA's, y luego por la presencia de sitios de corte proteosomal para el caso del MHC-I, a través de la plataforma NetChop 3.1 [66].

En cuanto a la presencia de epítopes para células B, la selección y validación se realizó con los programas BepiPred 2.0 [67] y Discotope 2.0 [68], mediante un análisis de forma lineal y estructural respectivamente, para identificar las regiones de la proteína con mayor probabilidad de ser reconocidas por anticuerpos. Para tener una mejor identificación de los epítopes para MHC I y II, así como los correspondientes a células B, se realizaron visualizaciones por medio del programa UCSF Chimera, resaltando sus respectivas regiones.

2.8 Docking molecular y análisis de interacciones

Se llevaron a cabo estudios de Docking molecular para analizar la afinidad de unión entre la proteína modelada y receptores asociados a membrana, específicamente los Toll-like Receptors (TLR's) 2 (PDB ID: 2Z7X) y 4 (PDB ID: 4G8A), ambos en su forma monomérica. El Docking fue llevado a cabo a través del servidor HDOCK [69] el cual reporta más de 100 modelos con base en el Docking score, y se seleccionó el de mejor puntuación para ambos casos. Una vez seleccionado el modelo, se descargó el archivo en formato “.pdb”; posteriormente se subió el mismo archivo a la plataforma PRODIGY [70], la cual indica la energía libre de Gibbs (ΔG) o afinidad de unión entre el receptor y la proteína modelada. Finalmente, el análisis de las interacciones y la visualización del complejo

proteína-receptor, se realizaron utilizando PDBsum [71] y UCSF Chimera respectivamente.

2.9 Construcción de Quimera proteica

Con base en los resultados obtenidos, se diseñaron dos quimeras proteicas que contienen epítopes predichos, principalmente para células T, siendo seis para el MHC-I y siete para el MHC-II; para unir estos epítopes se utilizaron los péptidos conectores, también llamados péptidos de fusión: “GPGPG, GGGS y EAAAK” por su alta flexibilidad y rigidez respectivamente. Ambas quimeras fueron conformadas por una Caperuza (Cap) de tipo 0 (m7G(5')pppN1pN2p), una secuencia Untranslated Region (UTR) con el gen codificante para la β -globina en la región 5', un linker EAAAK, una secuencia Kozak seguida inmediatamente de los epítopes CTL y HTL, separados por los linkers GGGS y GPGPG respectivamente, un linker EAAAK unido a una UTR con el gen para la α -globina en la región 3', y finalmente una cola poli A de 120-150 bases.

3. Resultados

3.1 Purificación de la rTcENO

Para verificar que la cepa de mantenimiento *E. coli* DH5 α contenía el plásmido, se realizaron dos electroforesis, la primera con el DNA plasmídico sin digerir y la segunda con el plásmido pRSETB::TcENO (4,000 pb) digerido por las enzimas *Kpn* I y *Hind* III (**Figura 8**), mismas que liberaron el segmento correspondiente al gen para la rTcENO.

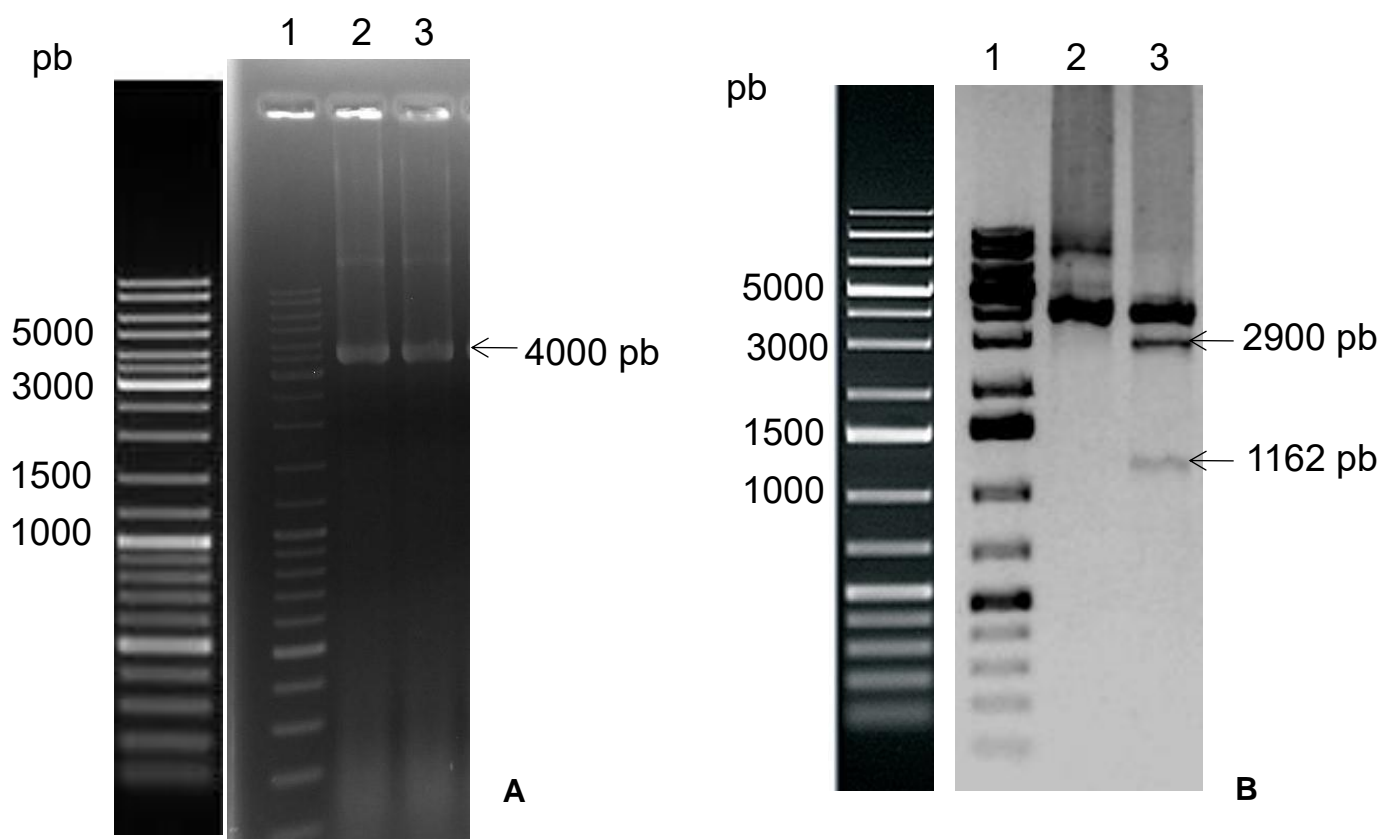


Figura 8. Extracción y restricción del plásmido pRSETB::TcENO; **A)** Electroforesis sin digerir, Carril 1: MPM Generuler 1kb, Carril 2: pRSETB::TCENO sin digerir y Carril 3: pRSETB::TCENO; **B)** Electroforesis del plásmido digerido por las enzimas *Kpn* I y *Hind* III, Carril 1: MPM Generuler 1kb Plus, Carril 2: pRSETB::TCENO digerido con *Kpn* I, Carril 3: pRSETB::TCENO digerido parcialmente con *Kpn* I y *Hind* III.

Una vez que se verificó la presencia del plásmido, se llevó a cabo una transformación en la cepa *E. coli* BL21(DE3) pLysS, para continuar con una expresión inducida y purificación de la proteína rTcENO, que fue analizada con un SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie (**Figura 9**) junto a sus respectivos controles a lo largo del proceso de expresión y purificación, con un peso aproximado de 46.5 kDa.

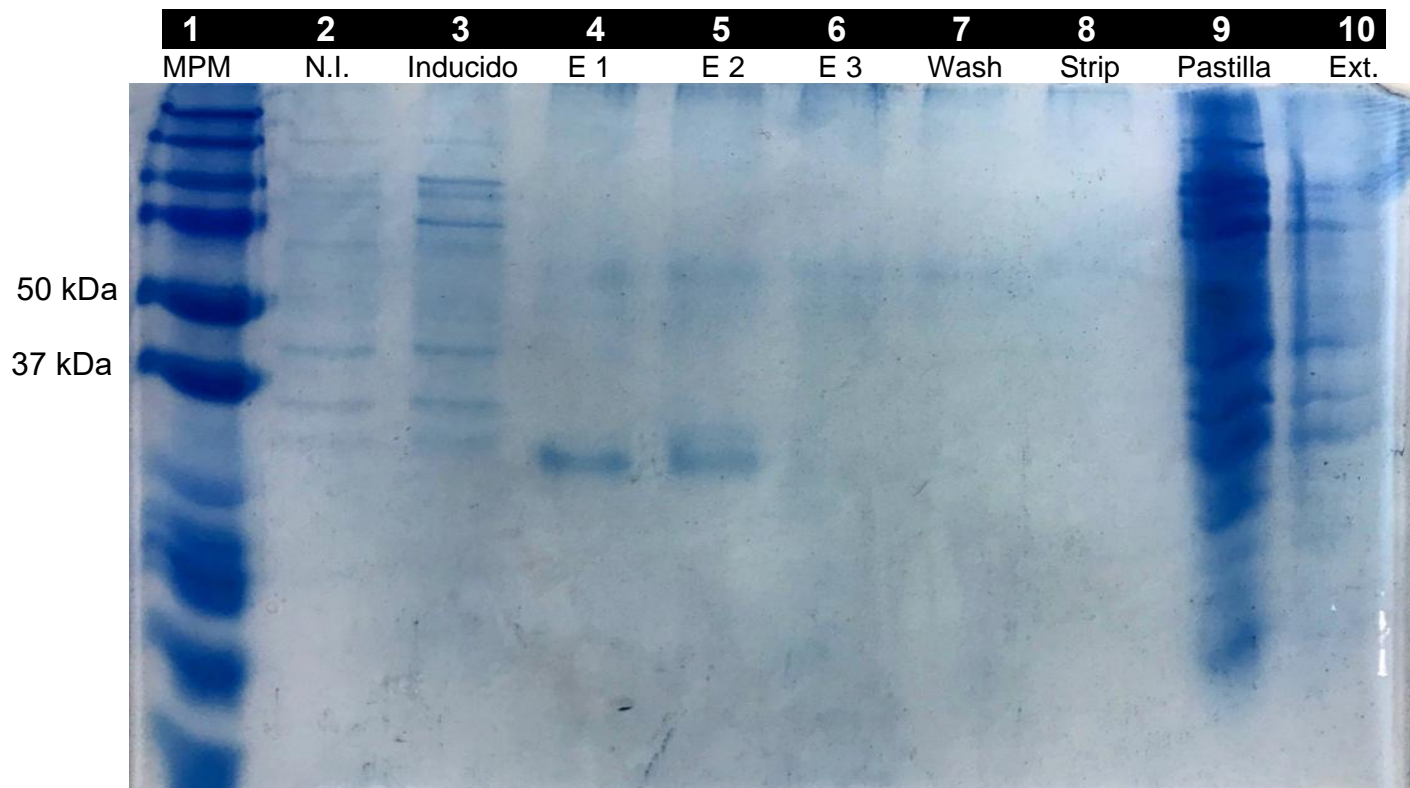
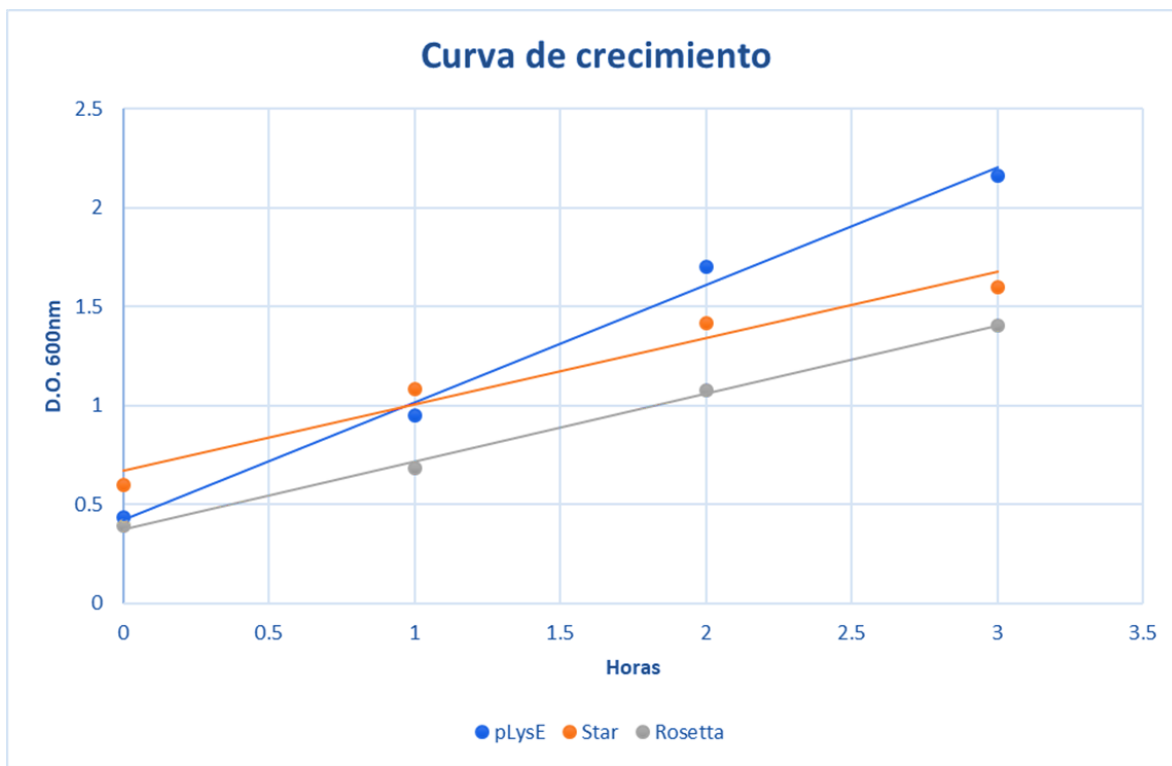


Figura 9. Perfil electroforético de la purificación para la rTcENO, y sus diversos controles a lo largo del proceso; Carril 1: MPM All Blue™, Carril 2: No inducido, Carril 3: Inducido, Carril 4: Eluido 1, Carril 5: Eluido 2, Carril 6: Eluido 3, Carril 7: Wash, Carril 8: Strip, Carril 9: Pastilla, Carril 10: Extracto.

3.2 Análisis con distintos fondos genéticos

Se procedió a realizar un análisis con una curva de crecimiento para las cepas de *E. coli* pLysE, Star y Rosetta, todas previamente transformadas con el plásmido pRSETB::TcENO, en 50 mL de medio LB, inducido con IPTG a 1mM, en donde se realizaron tres mediciones de DO, cada una en intervalos de 1 hora, graficando los

resultados desde el tiempo 0 (No inducido), hasta el tiempo 3 (Inducido) (**Gráfica 1 y Tabla 2, respectivamente**).



Gráfica 1. Datos de crecimiento bacteriano para las cepas, en tiempo 0 (no inducido) y tiempos 1-3 (inducido).

Tabla 2. Datos obtenidos para las distintas cepas de *E. coli*.

Horas	DO en cepas			
	pLysE	Star	Rosetta	
0	0.435	0.6	0.39	No Inducido
1	0.95	1.081	0.685	.
2	1.7	1.417	1.079	Inducidos
3	2.166	1.602	1.406	.

Posteriormente se realizó el mismo proceso de purificación descrito anteriormente con las tres cepas de *E. coli* y se analizaron cada uno de los tiempos con geles SDS-PAGE de manera individual, mismos que fue teñidos con azul de Coomassie (**Figuras 10, 11 y 12**).

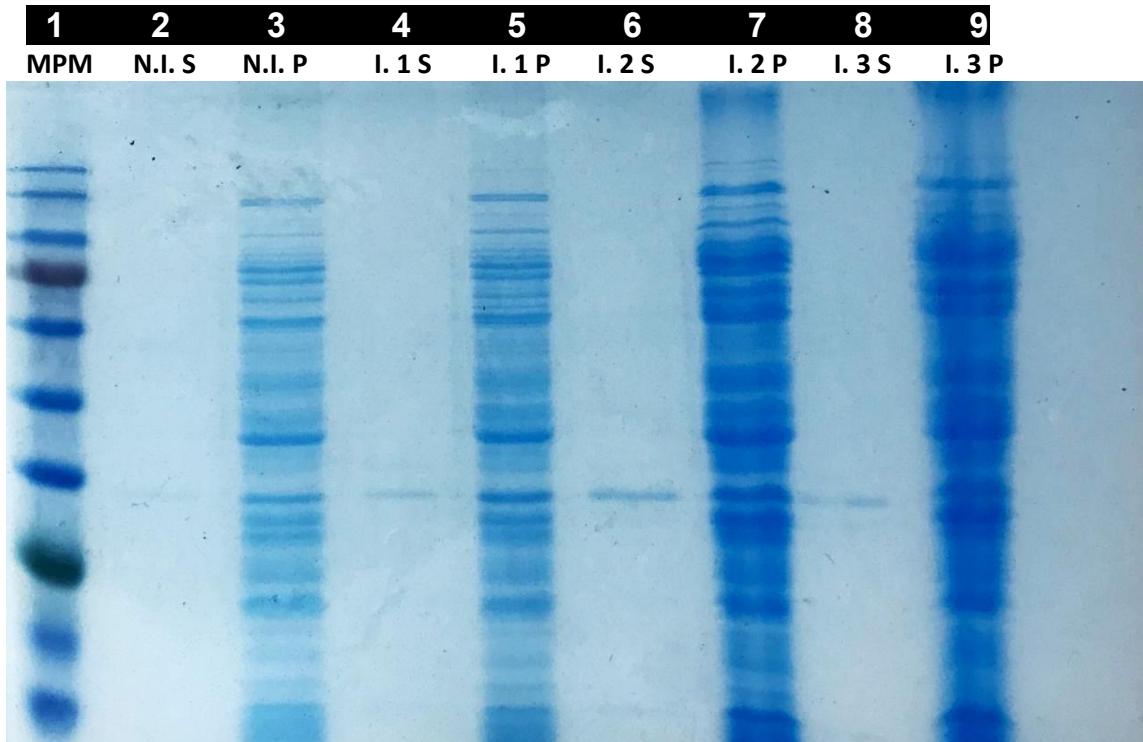


Figura 10. Perfil electroforético de la purificación de la rTcENO con la cepa *E. coli* pLysE, y distintos tiempos a lo largo del proceso; Carril 1: MPM All Blue™, Carril 2 y 3: No inducido S y P, Carril 4 y 5: Inducido T1 S y P, Carril 6 y 7: Inducido T2 S y P, Carril 8 y 9: Inducido T3 S y P. Sobrenadante (S) y Pastilla (P).

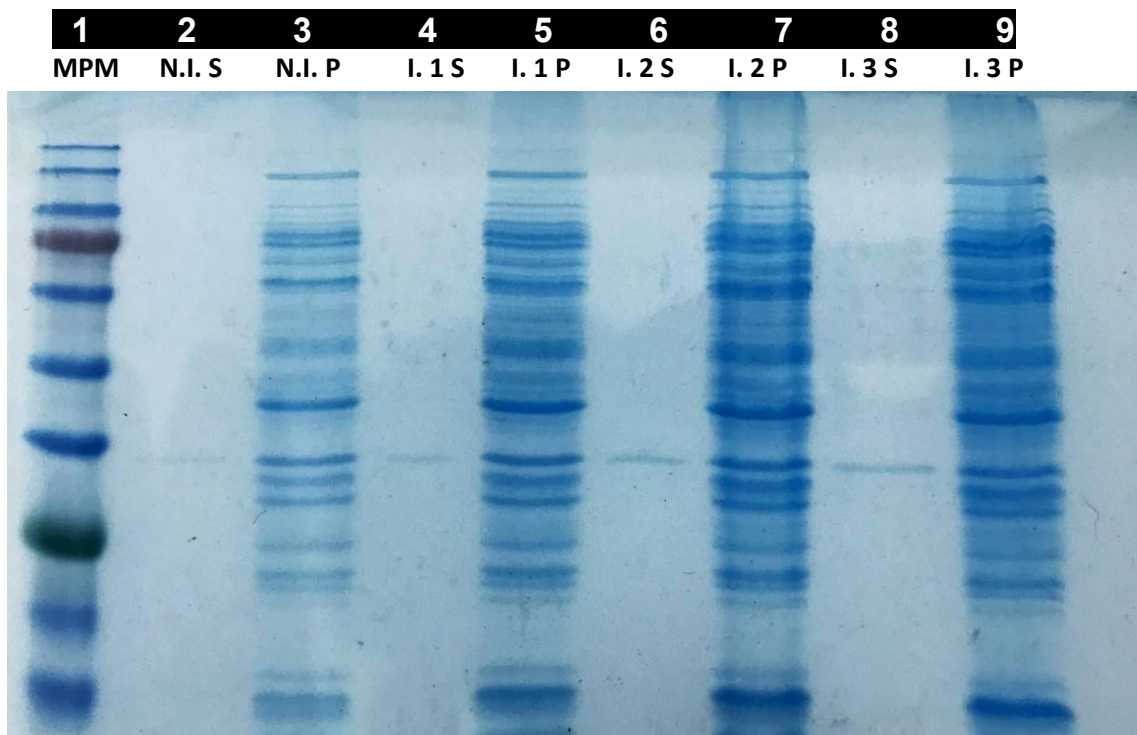


Figura 11. Perfil electroforético de la purificación para la rTcENO con la cepa *E. coli* Star, y distintos tiempos a lo largo del proceso; Carril 1: MPM All Blue™, Carril 2 y 3: No inducido S y P, Carril 4 y 5: Inducido T1 S y P, Carril 6 y 7: Inducido T2 S y P, Carril 8 y 9: Inducido T3 S y P. Sobrenadante (S) y Pastilla (P).

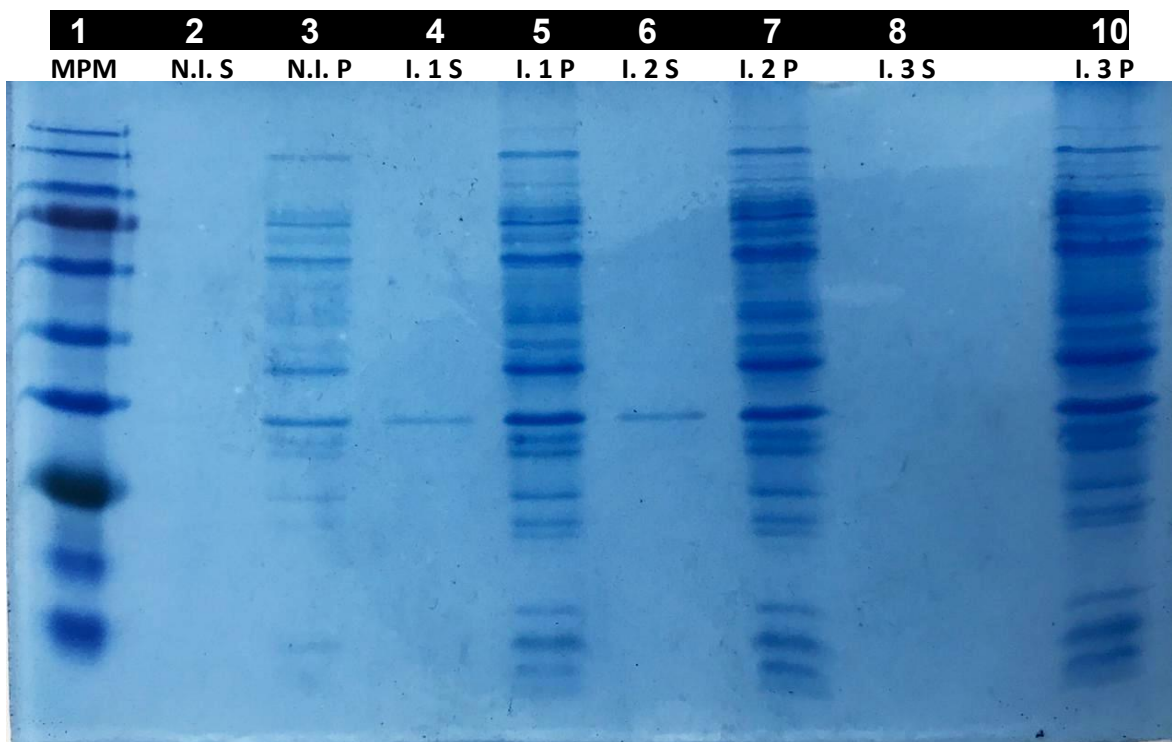
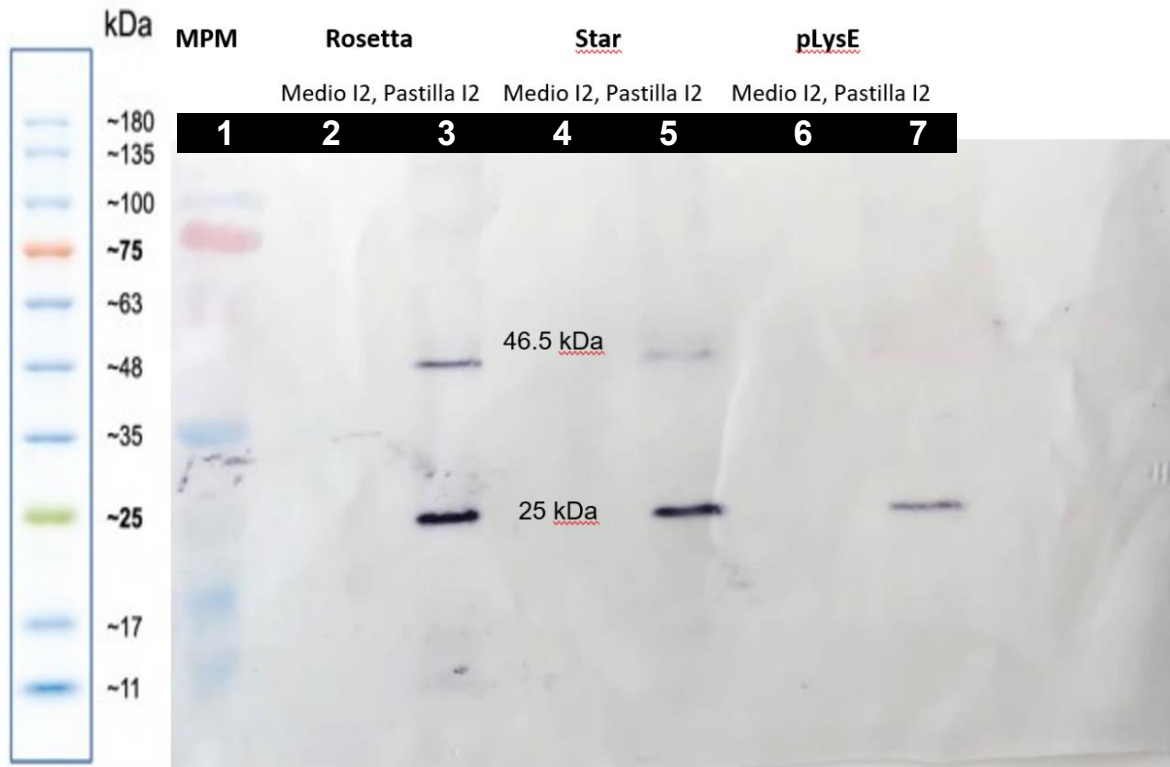


Figura 12. Perfil electroforético de la purificación para la rTcENO con la cepa *E. coli* Rosetta, y distintos tiempos a lo largo del proceso; Carril 1: MPM All Blue™, Carril 2 y 3: No inducido S y P, Carril 4 y 5: Inducido T1 S y P, Carril 6 y 7: Inducido T2 S y P, Carril 8 y 10: Inducido T3 S y P. Sobrenadante (S) y Pastilla (P).

Nuevamente se realizó un SDS-PAGE, con muestras del tiempo 2 (Sobrenadante y Pastilla celular) de las tres cepas y posteriormente se usó para la técnica de Western Blot, donde fue revelado usando anticuerpos anti-histidinas e IgG anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina, usando como sustrato 1 mL del sustrato revelador BCIP/NBT™ de Merck® (**Figura 13**).



Tris-Glycine
4~20%

Figura 13. Membrana de nitrocelulosa con la rTcENO de las tres cepas. Carril 1: MPM, Carril 2 y 3: *E. coli* Rosetta T2 Medio y Pastilla, Carril 4 y 5: *E. coli* Star T2 Medio y Pastilla, Carril 6 y 7: *E. coli* pLysE T2 Medio y Pastilla.

3.3 Clústeres de enolasa de *T. cruzi*

La búsqueda en bases de datos arrojó un total de 15 secuencias codificantes para la Enolasa de *T. cruzi*, 13 provenientes de la base de datos TriTrypDB y 2 pertenecientes a NCBI (**Tabla 3**). Las 15 secuencias son pertenecientes a distintas DTU's (I-VI), a excepción del DTU IV, debido a que no se encontraron secuencias disponibles para esta cepa.

Tabla 3. Secuencias codificantes para Enolasas seleccionadas de la base de datos pública (n=15; 13 en TriTrypDB y 2 en NCBI*).

DTU					
I	II	III	IV	V	VI
Dm 28c	Esmeraldo	231		Bug2148	TCC
Jrcl 4	Y				Marinkellei B7
Sylvio X10/1	Ycl6				TulaCl2
Brazil A4					CL Brener Non-Esmeraldo-like
H8 *					CL Brener *
5	3	1	0	1	5

Una vez identificadas las secuencias a utilizar, estas fueron traducidas a aminoácidos mediante el programa EMBOSS Transeq, por código genético universal, obteniendo un total de 429 aminoácidos para todas las secuencias, a excepción del DTU H8, que debido a su menor cantidad de nucleótidos (1,151 pb), codifica para 384 aminoácidos (**Figura 14**).

>EMBOSS_CLBrener

```
MTIQKVHGREGILDSRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHEACELRDDD KRRYLGGKCLNAVKNVNDVL
APALVGKDELQQSTLDKLMRDLDGTPNKS KLGANAILGCSMAISKAAAARKGVPLYRYLAELAGTKEVRLPVP
CFNVINGGKHAGNALPFQEFMIAPVKAGSFNEALRMGAEVYHSLKSI IKKKYQDAVNVGDEGGFAPPITDIN
EPLPILMEAIEQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLTFKSPEATWVTAKQLAETYAKWVSEYPIVSLED
PYDQDDFDGDFAGITEALKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKTAIEKKACNSLLLKINQIGTITEAIEASKFCMSNGW
SVMVSHRSGETEDTYIADLVVGLGTGQIKTGAPCRGERTAKLNQLLRIEEELGAHAKFGFPAWS*
```

>EMBOSS_H8

```
MTIQKVHGREGILDSRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHEACELRDDD KRRYLGGKCLNAVKNVNDVL
APALVGKDELQQSTLDKLMRDLDGTPNKS KLGANAILGCSMAISKAAAARKGVPLYRYLAELAGTKEVRLPVP
CFNVINGGKHAGNALPFQEFMIAPVKAGSFTSAAHGAEVYRSLRASSESTQMNVNVGDEGGFAPPITDINEPLP
ILMEAIEQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLTFKSPEATWVTAKQLAETYAKWVSEYPIVSLEDPYDQ
DDFDGDFAGITEALKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKTAIEKKACNSLLLKINQIGTITEAIEASKFCMSNGWSVMV
SHRSGETEDTYIADLVVVSX
```

Figura 14. Secuencias aminoacídicas de enolasa. Como ejemplo las secuencias de a.a. de los DTU's CL Brener (429 aa) y H8 (384 aa) que fue la única secuencia corta. La primera usada como referencia.

3.4 Secuencia consenso

Todas las secuencias alineadas presentaron una longitud de 429 aa, excepción del DTU H8, que presentó 384 aa, esta diferencia se vio reflejada en el alineamiento mostrando 4 gaps y una terminación en la posición 388, debido a un codón incompleto representado por una “x” (**Figura 16**) sin embargo, la mayoría de las secuencias presentaron una alta identidad y conservación, casi del 100% a lo largo de la secuencia aminoacídica. El DTU Marinkellei B7, fue la cepa que mostró más mutaciones puntuales en 14 posiciones, seguida del DTU 231, que solo presentó una mutación en la posición 308. También podemos observar una mutación constante en la posición 330, donde 7 DTU's presentaron Treonina (T) incluyendo la secuencia de referencia y 8 presentaron Metionina (M). Debido a esta última variación, la secuencia consenso resultante presentó una M (en rojo) en la posición 330, de un total de 429 aminoácidos (**Figura 15**). También se analizó la secuencia mediante el esquema de colores Clustal X, que dividió los aminoácidos en 9 categorías por colores, mostrando sus propiedades bioquímicas, cargas y conservación a lo largo del alineamiento, esto con el fin de apreciar mejor las características de las secuencias (**Figura 17**).

```
MTIQKVGREILDSRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHEACELRDDD KRRYLGKG  
CLNAVKNVNDVLPALVVKDELQQSTLDKLMRDL DGT PNKSKLGANAILGCSMAISKAAAA  
RKGVPLYRYLAELAGTKEVRLPVPCFNVINGGKHAGNALPFQEFMIAPVKAGSFNEALRMG  
AEVYHSLKSI I KKKYQDAVNVGDEGGFAPPITDINEPLPILMEAIEQAGHKGRFAICMDS  
AASETYDENKKQYNLTFKSPEATWVTAKQLAETYAKWVSEYP IVSLEDPYDQDDFDGFAGI  
TEALKGKAQVVGDDLTVTNVSR IKMAIEKKACNSLLLKINQIGTITEAIEASKFCMSNGWS  
VMVSHRSGETEDTYIADLVVGLGTGQIKTGAPCRGERTAKLNQLLRIEEEELGAHAKFGFPA  
WS
```

Figura 15. Secuencia consenso de la enolasa de *T. cruzi*, con longitud de 429 aminoácidos. Se puede apreciar en rojo la mutación constante (TxM) en la posición 330 de la secuencia aminoacídica, presente en las 8 de las 15 secuencias de enolasa analizadas respecto a la enolasa de referencia CL Brener.

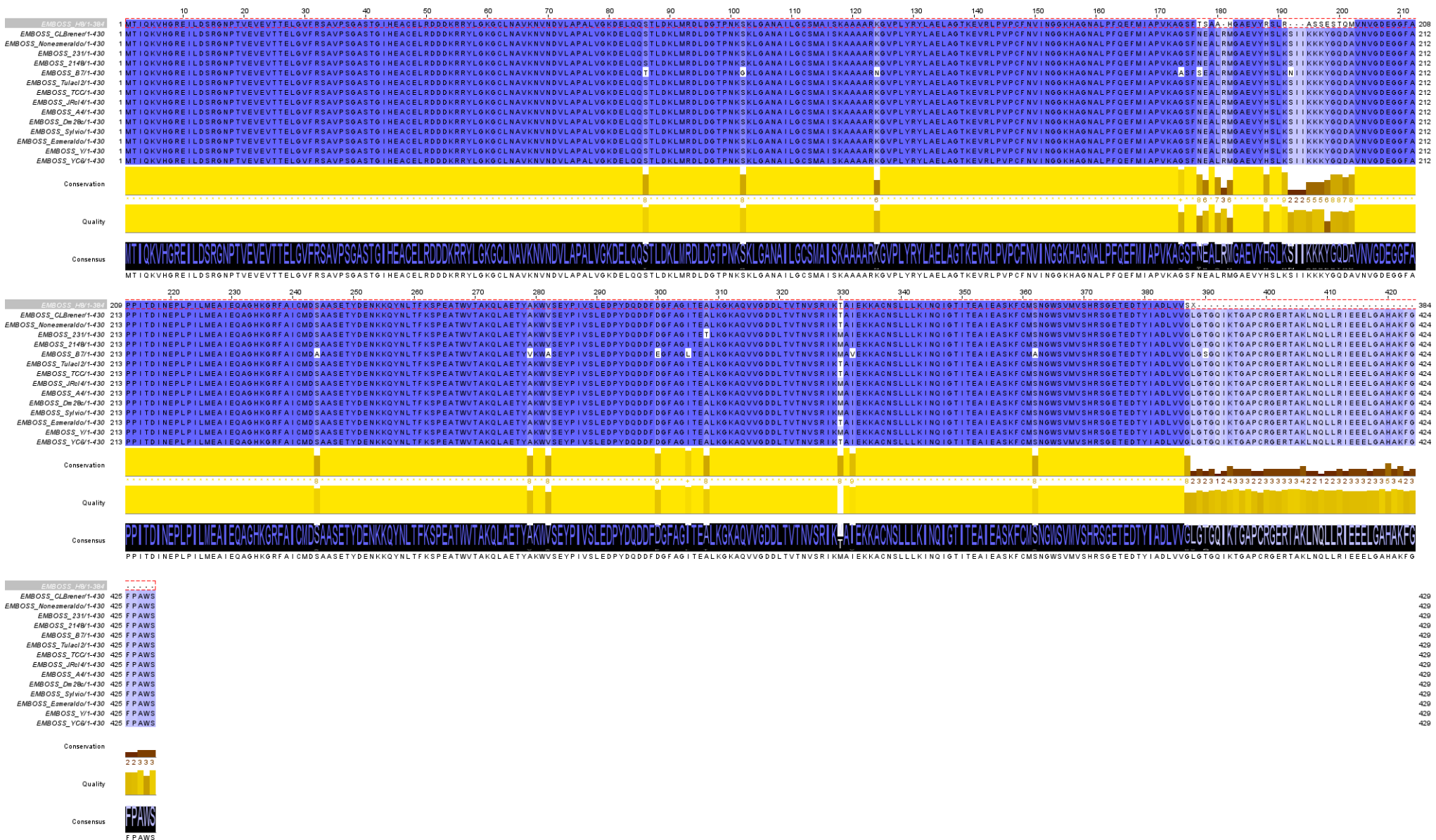


Figura 16. Alineamiento múltiple tipo Clustal Omega de las secuencias correspondientes a la proteína enolasa de distintos DTU's de *T. cruzi*, en donde se resalta su conservación.

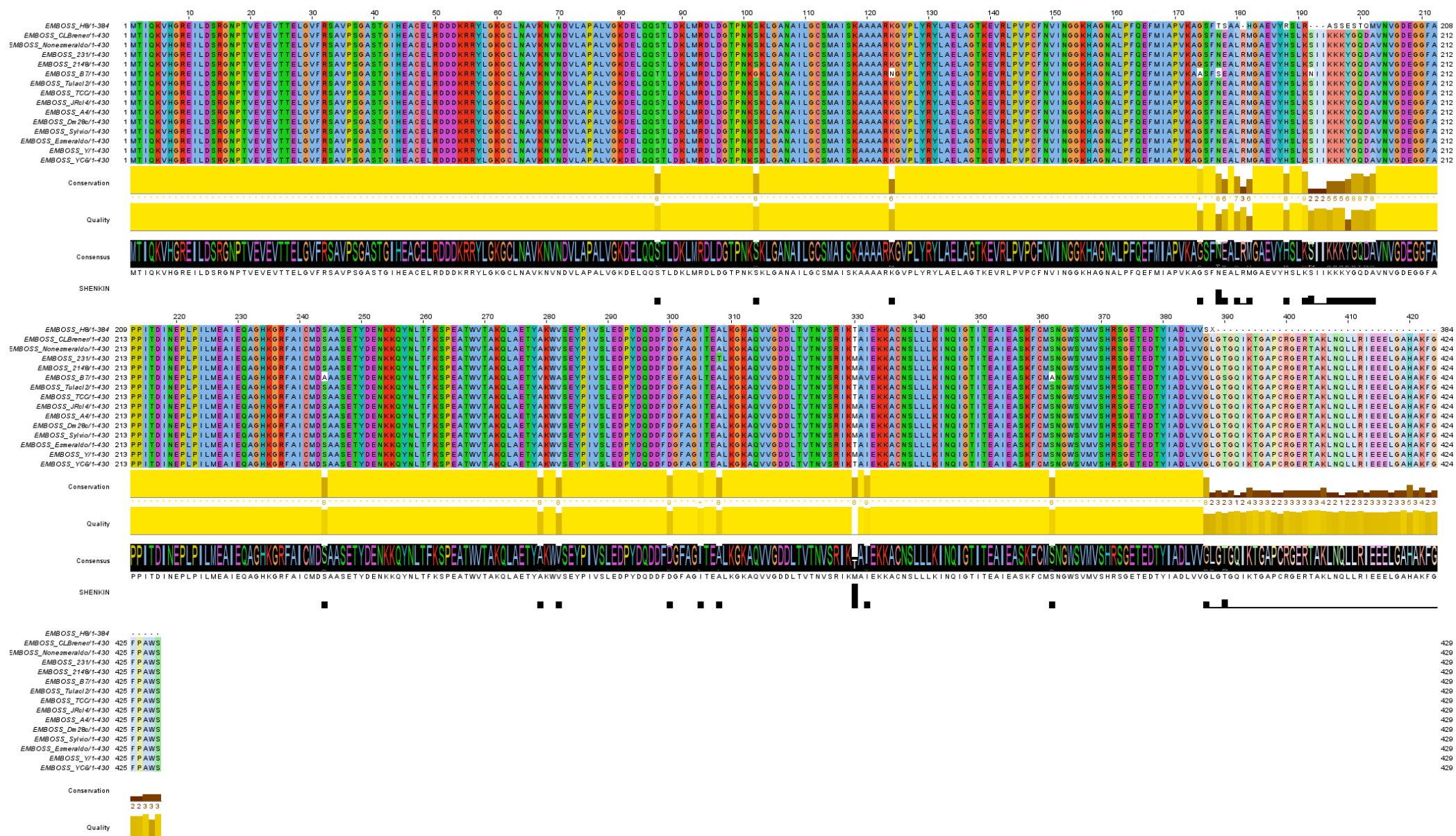


Figura 17. Alineamiento múltiple coloreado por el esquema Clustal X, del programa Jalview para las secuencias correspondientes a la proteína enolasa de distintos DTU's de *T. cruzi* analizadas en este estudio.

3.5 Modelado por homología

Con base en la secuencia consenso de 429 aminoácidos, se procedió a realizar un modelado por homología en la plataforma SWISS-MODEL, con la plantilla de una enolasa de *T. cruzi* DTU CL Brener, lo cual arrojó una identidad de 99.77%, con respecto a la plantilla con código PDB: 4G7F, así como diversos valores que estiman la calidad del modelado, tales como el QMEAN (grado de natividad o autenticidad) de -0.28, siendo entre más cercano a cero un mejor valor, así como buenos valores $C\beta$, interacción entre todos los átomos de la estructura, el potencial de solvatación y de ángulo de torsión (**Figura 18**) y el (Global Model Quality Estimation) GMQE, de 0.96, siendo entre más cercano a uno, un valor más fiable; también se obtuvieron valores de calidad local para cada aminoácido, mostrando la similitud esperada de los residuos correspondientes al modelo (eje X), con la posición de residuos en la estructura (eje Y), siendo los residuos con puntuación menor a 0.6, considerados de baja calidad (**Figura 19**). El programa de modelado también muestra una gráfica de comparación, con una puntuación en la proteína modelo de: Z-score <1, que se compara con puntuaciones de estructuras experimentales de tamaño similar, utilizando como referencia el valor normalizado de QMEAN (**Figura 20**).

Al comparar ambas secuencias aminoacídicas se pudo observar una alta similitud, tanto por el esquema de color con base en la puntuación QMEAN, coloreando de naranja las regiones con baja puntuación y de azul las que presentaron una puntuación ideal (**Figura 21**). También se observa una similitud bajo un esquema de color a nivel de estructuras secundarias, mostrando diversas laminas beta y alfa hélices en regiones idénticas de ambas secuencias, a lo largo de casi toda la proteína modelada (**Figura 22**).

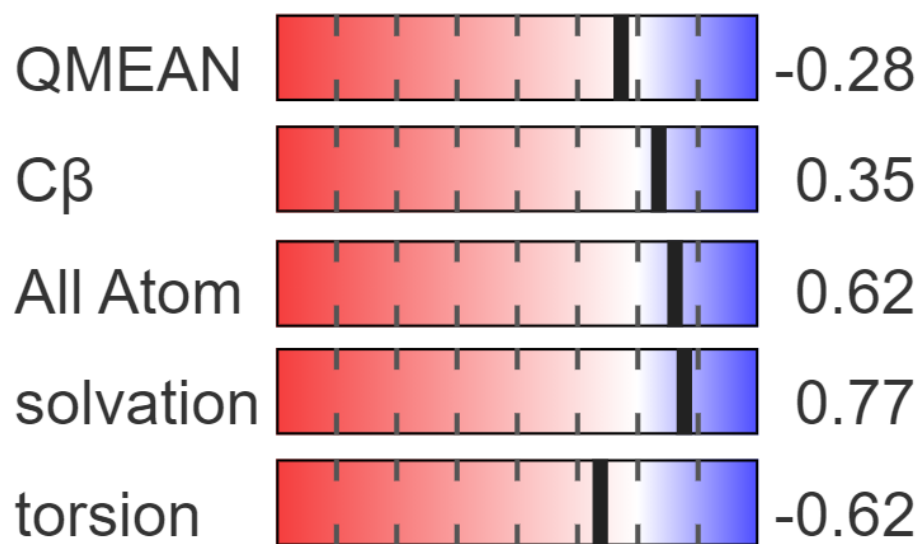


Figura 18. Valores obtenidos por el modelaje en Swiss-Model.

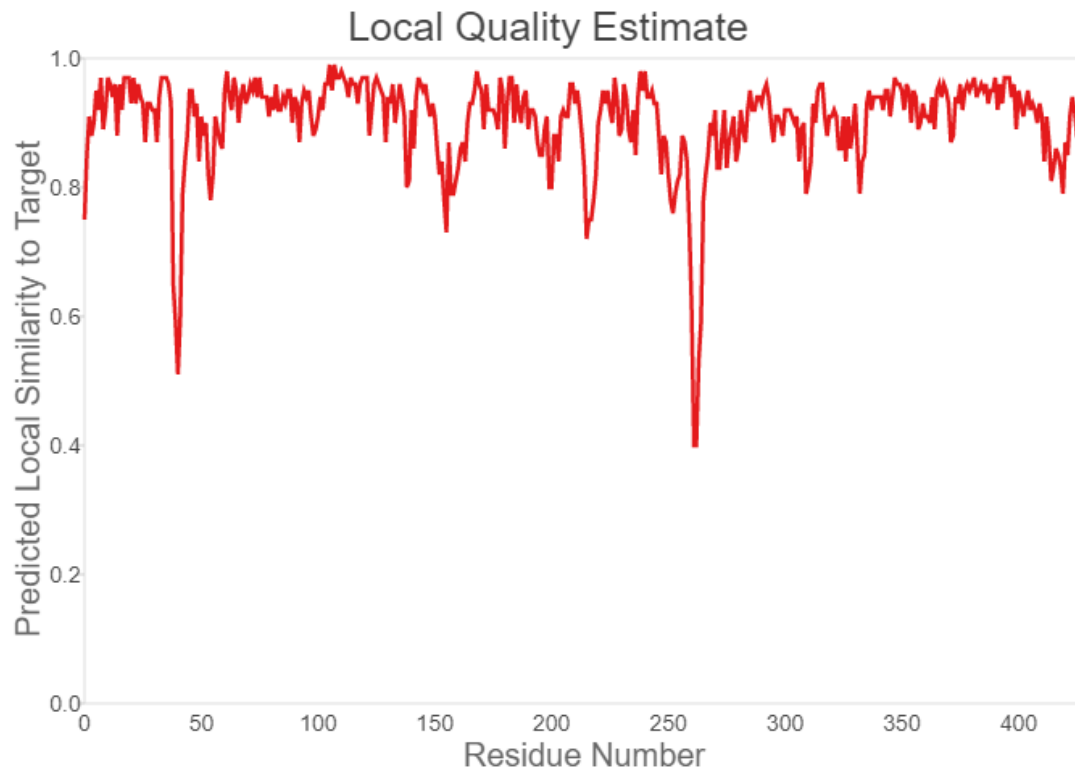


Figura 19. Gráfico de calidad local entre el modelo y la estructura cristalizada.

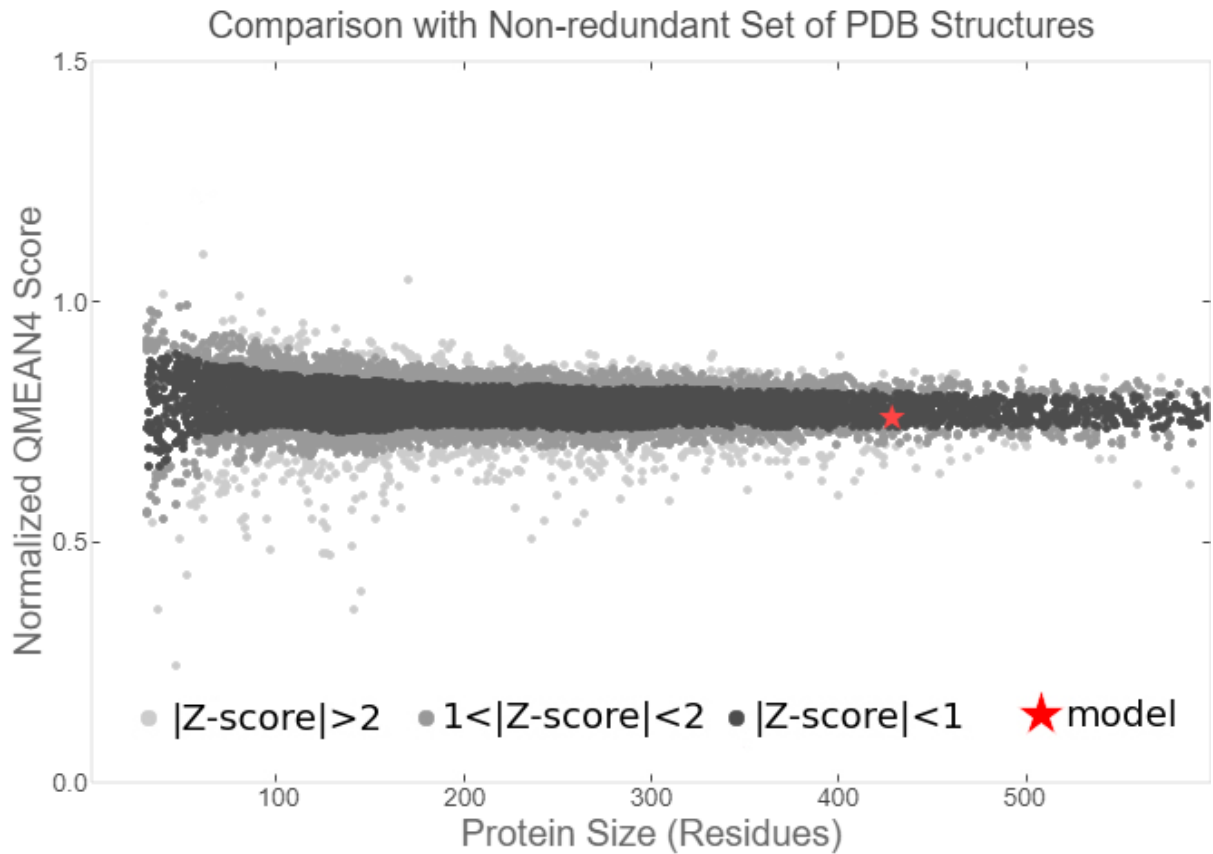


Figura 20. Comparación del QMEAN de la proteína modelada, con otras estructuras obtenidas experimentalmente.

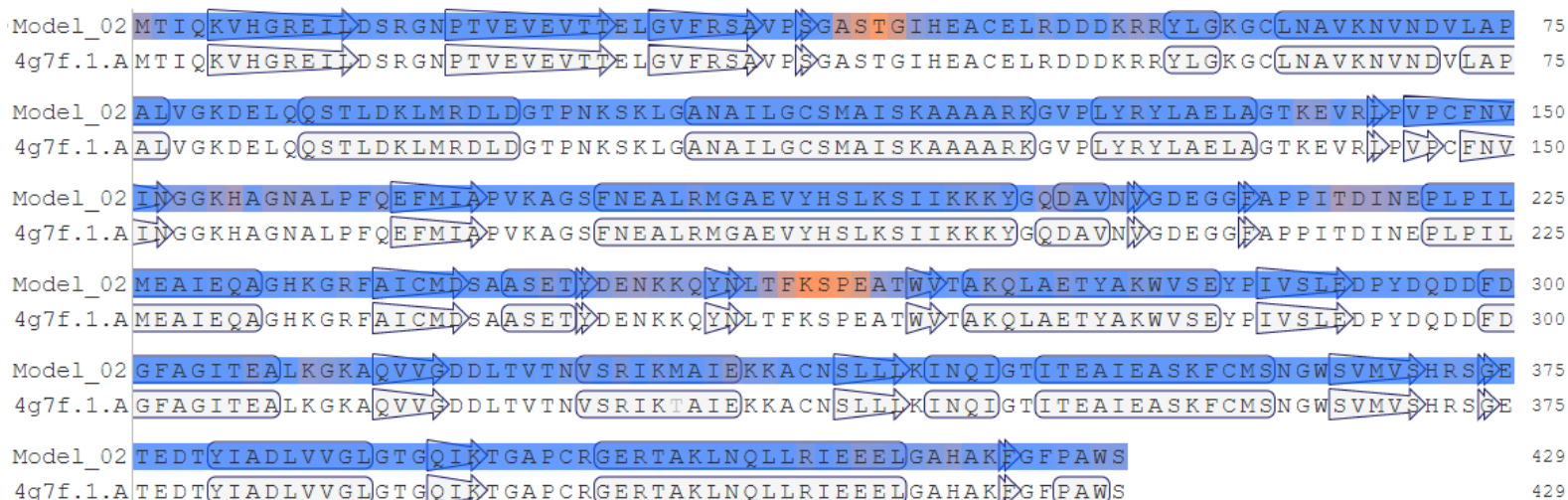


Figura 21. Alineamiento entre ambas secuencias proteicas, modelo de secuencia consenso (Model_02) y templado de la proteína 4G7F, usando el esquema de color QMEAN, marcado en naranja las regiones con baja puntuación.



Figura 22. Alineamiento entre ambas secuencias proteicas, modelo de secuencia consenso y templado de la proteína 4G7F, usando el esquema de color para estructuras secundarias, en verde laminas beta y en morado hélices alfa.

Estas similitudes también se pueden apreciar en el modelo 3D, que corresponde a la proteína modelada, tanto bajo el esquema QMEAN, donde se identifican dos regiones de color naranja correspondientes a 10 aminoácidos, y el estructural que muestra alfa hélices y betas plegadas (**Figura 23**).

Una vez obtenida la proteína modelada bajo el formato PDB con sus diversos puntajes y análisis, se procedió a analizarla mediante el programa UCSF Chimera, superponiendo la estructura original correspondiente a la proteína cristalizada 4G7F, con la estructura modelada, dando un valor Root-Mean-Square Deviation (RMSD), de 0.068. En este alineamiento estructural se obtuvo nuevamente una identidad de 99.77%, sin embargo, el alineamiento muestra una región de 10 aminoácidos faltantes en la estructura cristalizada así como también se aprecia el único cambio aminoacídico entre ambas secuencias, en la posición 330 (**Figura 24**). Los aminoácidos faltantes en la estructura cristalizada se pueden apreciar ausentes mediante la representación 3D de la superposición (**Figura 25**), correspondientes a las regiones 39 a 42 y 260 a 265, con los aminoácidos "A, S, T, G y T, F, K, S, P, E" respectivamente, mismos cuyas regiones se encuentran de color rojo en la proteína modelada superpuesta. También se puede apreciar una región coloreada en amarillo, que corresponde al único cambio aminoacídico de una Metionina por una Treonina (**Figura 26**).

Finalmente se analizó la estructura modelada mediante 4 gráficos de Ramachandran (General, Glicina, Prolina y Pre-prolina) (**Figura 27**), donde se obtuvieron valores de MolProbity, puntaje general de Ramachandran y uniones deficientes en la estructura (**Tabla 4**).

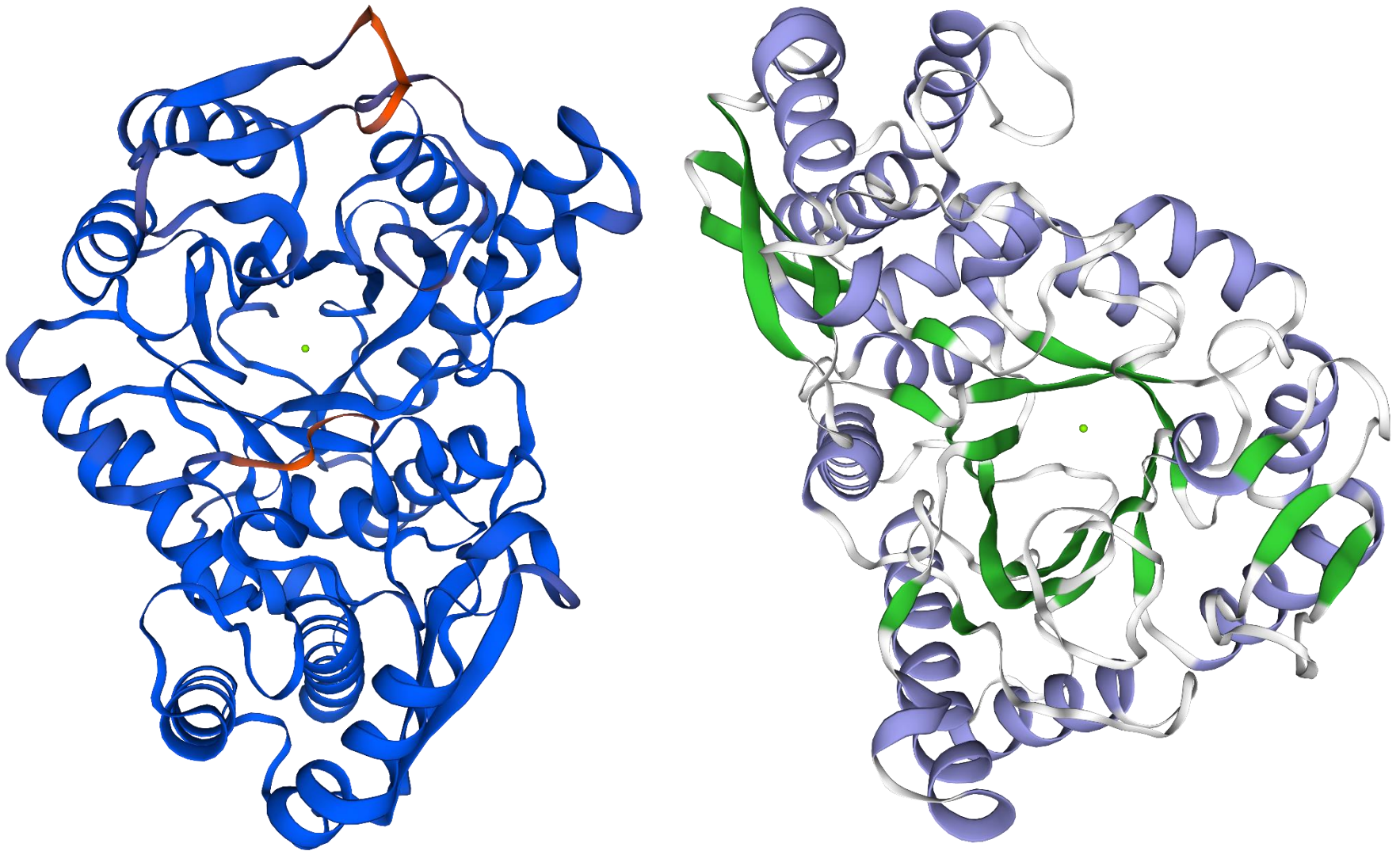


Figura 23. Representación 3D de la proteína modelada a partir de la secuencia consenso; lado izquierdo bajo el esquema de color QMEAN; lado derecho, bajo esquema de coloración estructural para laminas beta y alfa hélices.

		1	11	21	31	41																																													
RMSD: ca																																																			
4g7f, chain A	1	M	T	I	Q	K	V	H	G	R	E	I	L	D	S	R	G	N	P	T	V	E	V	E	V	T	T	E	L	G	V	F	R	S	A	V	P	S	G	A	S	T	G	I	H	E	A	C	E	L	R
model_02.pdb, chain A	1	M	T	I	Q	K	V	H	G	R	E	I	L	D	S	R	G	N	P	T	V	E	V	E	V	T	T	E	L	G	V	F	R	S	A	V	P	S	G	A	S	T	G	I	H	E	A	C	E	L	R
		51	61	71	81	91																																													
RMSD: ca																																																			
4g7f, chain A	51	D	D	D	K	R	R	Y	L	G	K	G	C	L	N	A	V	K	N	V	N	D	V	L	A	P	A	L	V	G	K	D	E	L	Q	Q	S	T	L	D	K	L	M	R	D	L	D	G	T	P	N
model_02.pdb, chain A	51	D	D	D	K	R	R	Y	L	G	K	G	C	L	N	A	V	K	N	V	N	D	V	L	A	P	A	L	V	G	K	D	E	L	Q	Q	S	T	L	D	K	L	M	R	D	L	D	G	T	P	N
		101	111	121	131	141																																													
RMSD: ca																																																			
4g7f, chain A	101	K	S	K	L	G	A	N	A	I	L	G	C	S	M	A	I	S	K	A	A	A	A	R	K	G	V	P	L	Y	R	Y	L	A	E	L	A	G	T	K	E	V	R	L	P	V	P	C	F	N	V
model_02.pdb, chain A	101	K	S	K	L	G	A	N	A	I	L	G	C	S	M	A	I	S	K	A	A	A	A	R	K	G	V	P	L	Y	R	Y	L	A	E	L	A	G	T	K	E	V	R	L	P	V	P	C	F	N	V
		151	161	171	181	191																																													
RMSD: ca																																																			
4g7f, chain A	151	I	N	G	G	K	H	A	G	N	A	L	P	F	Q	E	F	M	I	A	P	V	K	A	G	S	F	N	E	A	L	R	M	G	A	E	V	Y	H	S	L	K	S	I	I	K	K	K	Y	G	Q
model_02.pdb, chain A	151	I	N	G	G	K	H	A	G	N	A	L	P	F	Q	E	F	M	I	A	P	V	K	A	G	S	F	N	E	A	L	R	M	G	A	E	V	Y	H	S	L	K	S	I	I	K	K	K	Y	G	Q
		201	211	221	231	241																																													
RMSD: ca																																																			
4g7f, chain A	201	D	A	V	N	V	G	D	E	G	G	F	A	P	P	I	T	D	I	N	E	P	L	P	I	L	M	E	A	I	E	Q	A	G	H	K	G	R	F	A	I	C	M	D	S	A	A	S	E	T	Y
model_02.pdb, chain A	201	D	A	V	N	V	G	D	E	G	G	F	A	P	P	I	T	D	I	N	E	P	L	P	I	L	M	E	A	I	E	Q	A	G	H	K	G	R	F	A	I	C	M	D	S	A	A	S	E	T	Y
		251	261	271	281	291																																													
RMSD: ca																																																			
4g7f, chain A	251	D	E	N	K	K	Q	Y	N	L	T	F	K	S	P	E	A	T	W	V	T	A	K	Q	L	A	E	T	Y	A	K	W	V	S	E	Y	P	I	V	S	L	E	D	P	Y	D	Q	D	D	F	D
model_02.pdb, chain A	251	D	E	N	K	K	Q	Y	N	L	T	F	K	S	P	E	A	T	W	V	T	A	K	Q	L	A	E	T	Y	A	K	W	V	S	E	Y	P	I	V	S	L	E	D	P	Y	D	Q	D	D	F	D
		301	311	321	331	341																																													
RMSD: ca																																																			
4g7f, chain A	301	G	F	A	G	I	T	E	A	L	K	G	K	A	Q	V	V	G	D	D	L	T	V	T	N	V	S	R	I	K	T	A	I	E	K	K	A	C	N	S	L	L	L	K	I	N	Q	I	G	T	I
model_02.pdb, chain A	301	G	F	A	G	I	T	E	A	L	K	G	K	A	Q	V	V	G	D	D	L	T	V	T	N	V	S	R	I	K	T	A	I	E	K	K	A	C	N	S	L	L	L	K	I	N	Q	I	G	T	I
		351	361	371	381	391																																													
RMSD: ca																																																			
4g7f, chain A	351	T	E	A	I	E	A	S	K	F	C	M	S	N	G	W	S	V	M	V	S	H	R	S	G	E	T	E	D	T	Y	I	A	D	L	V	V	G	L	G	T	G	Q	I	K	T	G	A	P	C	R
model_02.pdb, chain A	351	T	E	A	I	E	A	S	K	F	C	M	S	N	G	W	S	V	M	V	S	H	R	S	G	E	T	E	D	T	Y	I	A	D	L	V	V	G	L	G	T	G	Q	I	K	T	G	A	P	C	R
		401	411	421																																															
RMSD: ca																																																			
4g7f, chain A	401	G	E	R	T	A	K	L	N	Q	L	L	R	I	E	E	E	L	G	A	H	A	K	F	G	F	P	A	W	S																					
model_02.pdb, chain A	401	G	E	R	T	A	K	L	N	Q	L	L	R	I	E	E	E	L	G	A	H	A	K	F	G	F	P	A	W	S																					

Figura 24. Secuencias aminoacídicas de ambas proteínas 4G7F y Model_02 (Enolasa consenso), correspondientes a la enolasa de *T. cruzi*. en 39-42 y 260-265 a.a. faltantes e recuadro blanco la mutación T por M

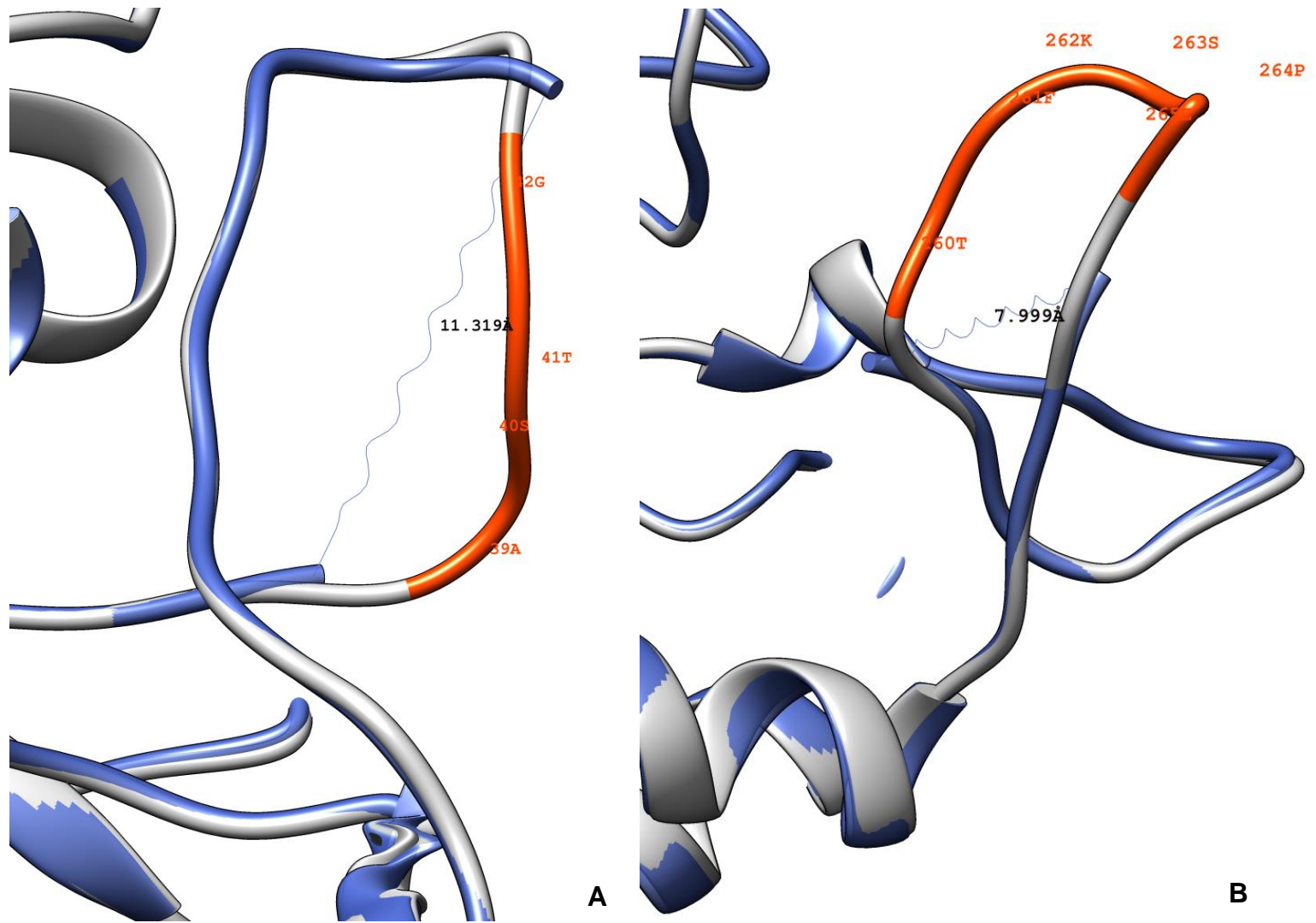


Figura 25. Acercamiento a las regiones 39 - 42 **(A)** y 260 - 265 **(B)**, con los aminoácidos “A, S, T, G y T, F, K, S, P, E” respectivamente.

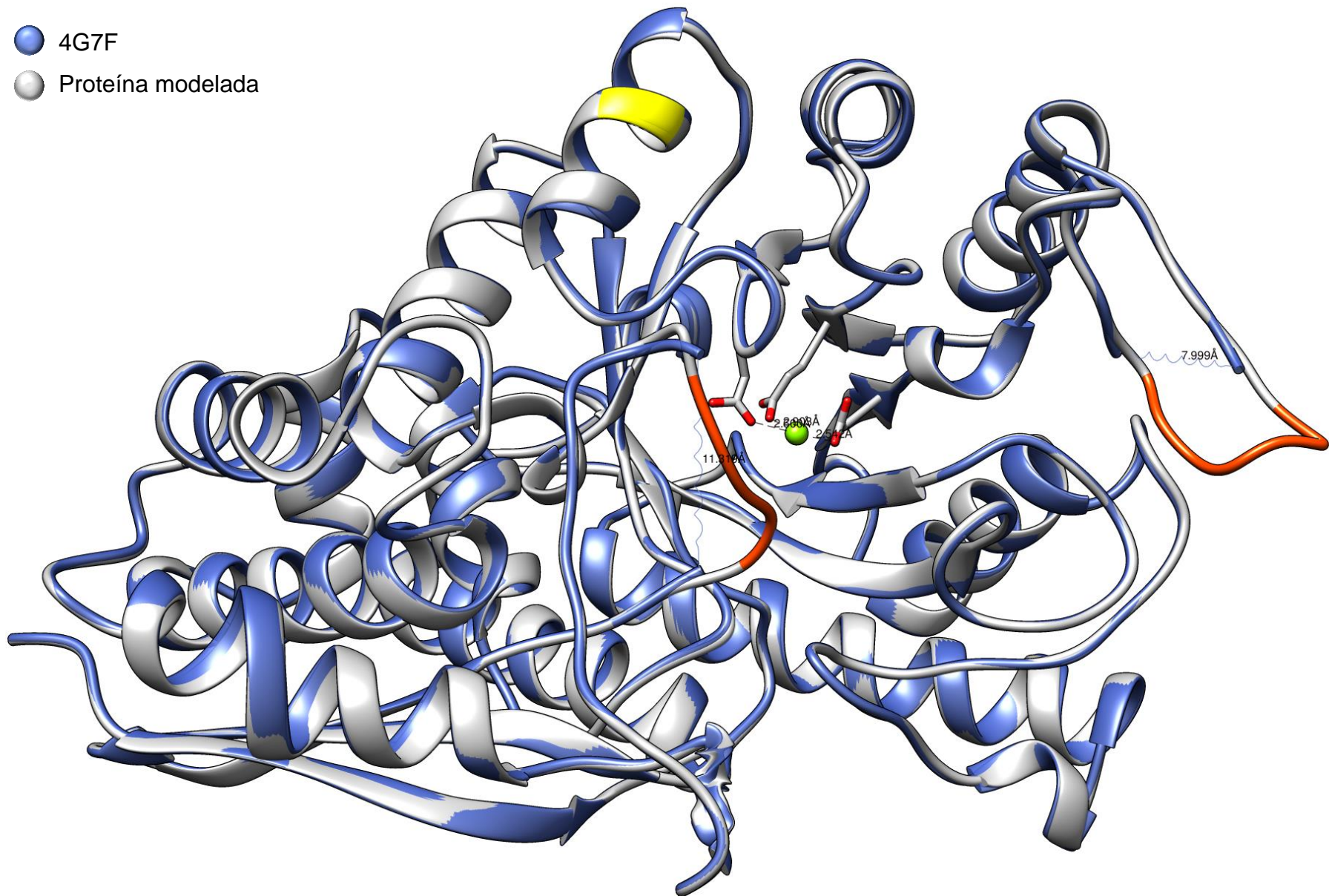


Figura 26. Superposición de ambas estructuras proteicas, con la región amarilla correspondiente a la sustitución por Metionina en la posición 330 y en rojo las regiones faltantes en la estructura 4G7F.

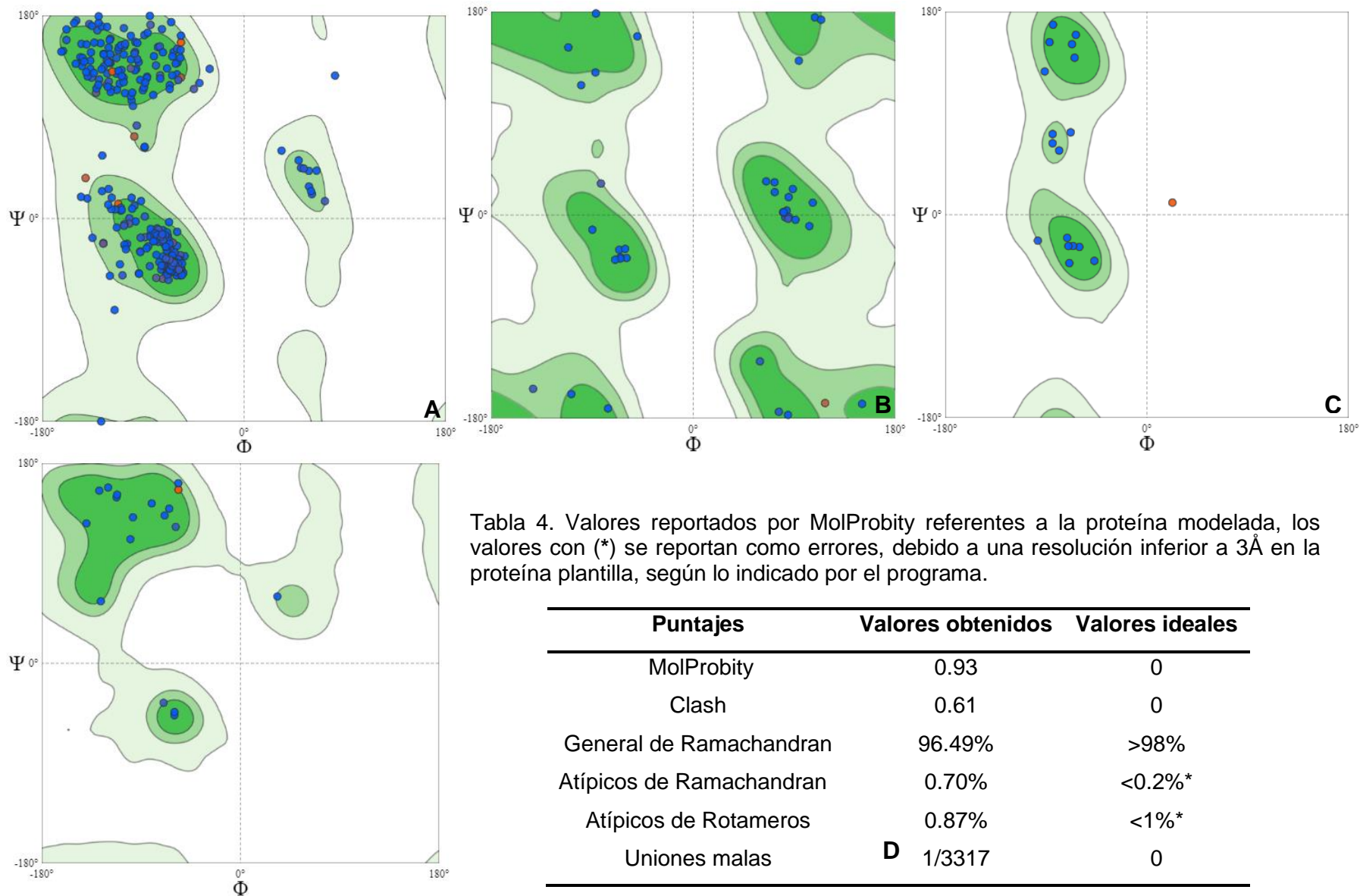


Figura 27. Gráficos de Ramachandran correspondientes a: **A**, Grafico general (sin prolina, ni glicina); **B**, Grafico exclusivo de glicina; **C**, Grafico exclusivo de prolina; **D**, Grafico de aminoácidos que preceden inmediatamente a la prolina en la secuencia.

3.6 Análisis de las propiedades fisicoquímicas e inmunogénicas

Los resultados del análisis para las propiedades fisicoquímicas e inmunogénicas comenzaron con el uso de la plataforma especializada ProtParam, que indica valores cruciales, tales como el peso molecular, horas de vida media en distintos organismos y su estabilidad (**Tabla 5**); en cuanto a las características inmunogénicas, la plataforma principal fue Vaxign 2.0, de la cual se obtuvieron valores de adhesión, ubicación y puntaje Vaxign-ML, que indica la probabilidad de ser un buen antígeno vacunal.

Tabla 5. Valores reportados por las plataformas ProtParam y Vaxign 2.0, para la proteína modelada.

Programas	Valores obtenidos	Valores ideales
ProtParam	46,474.05 Da (Peso molecular)	N/A
	5.92 (Punto Isoeléctrico teórico)	N/A
	50 (Residuos cargados positivamente Arg + Lys)	N/A
	55 (Residuos cargados negativamente Asp + Glu)	N/A
	C ₂₀₄₉ H ₃₂₇₉ N ₅₆₃ O ₆₃₁ S ₁₈ (Fórmula)	N/A
	6,540 (Átomos totales)	N/A
	30, >20 y >10 (Horas de vida media en mamíferos, levadura y bacteria respectivamente)	N/A
	39.77 (Índice de inestabilidad, estable)	<40
Vaxign 2.0	0.2 (Adhesión)	1
Vaxign 2.0	1.0 (Ubicación citoplasmática o superficie)	1
Vaxign 2.0	91.7 (Puntaje Vaxign-ML)	≥90

De igual forma se utilizaron Vaxign 2.0 e IEDB, para la predicción de epítopes del MHC-I y II, usando HLA's de referencia, principalmente para población Latinoamericana. Se obtuvieron más de 1,500 combinaciones posibles para cada complejo principal de histocompatibilidad, y con base en su p-value ≤ 0.01, se seleccionaron seis epítopes para MHC-I, y siete para MHC-II, mostrando tres regiones empalmadas con epítopes para MHC-I (**Figura 28**). Los epítopes correspondientes al MHC-I, se analizaron a través de la plataforma NetChop 3.1, donde se identificó la presencia de corte proteosomal en estas regiones (**Tabla 6**).

En cuanto a los epítopes para células B, se utilizaron las plataformas BepiPred 2.0 y Discotope 2.0 por separado, realizando un análisis lineal y estructural respectivamente, ambos mostraron cinco regiones similares con alta probabilidad de ser reconocidas por anticuerpos (**Tabla 7**), con tres regiones empalmadas con uno o más epítopes para HLA's. Para tener una mejor perspectiva e identificación de los epítopes para MHC- I y II, así como los correspondientes a células B, se realizaron visualizaciones por medio del programa UCSF Chimera, resaltando las respectivas regiones (**Figuras 29, 30 y 31, respectivamente**).

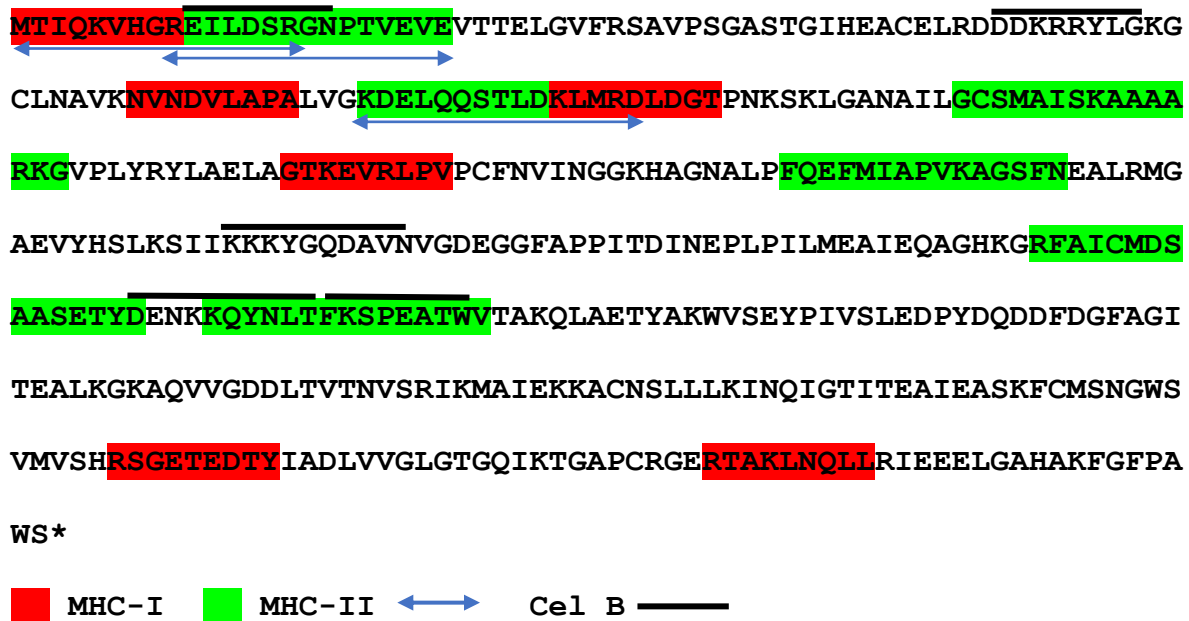


Figura 28. Secuencia consenso de 429 aminoácidos con epítopes resaltados, en color rojo epítopes del MHC-I, verde epítopes correspondientes al MHC-II e indicados con flecha los que se encuentran empalmados, y en líneas negras epítopes para células B.

Tabla 6. Epítopes de enolasa para MHC- I y II reportados por Vaxign 2.0

MHC- I	Corte proteosomal	HLA Supertipos	MHC- II	HLA Supertipos
MTIQKVHGR	4	A68, A33, A31, A11	GCSMAISKAAAARKG	DPA1, DPB1, DRB5, DRB1, DRB3
GTKEVRLPV	4	A68, A30, A01	KDELQQSTLDKLMRD	DPA1, DPB1, DRB5
NVNDVLAPA	3	A02, A68	KQYNLTFKSPEATWV	DRB5, DRB1
KLMRDLGDT	4	A02	RFAICMDSAASETVD	DRB1
RSGETEDTY	2	A30, B58, B15	REILDSRGNPTVEVE	DRB1, DQA1, DQB1
RTAKLNQLL	4	A24, B58, B57	MTIQKVHGREILDSR	DRB3, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1
			FQEFMIAPVKAGSFN	DRB1, DQA1, DQB1

Tabla 7. Epítopes de enolasa para células B reportados por BepiPred 2.0 y Discotope 2.0

Epítopes B	Tamaño	Empalme con epítopes HLA
EILDSRGN	8	Si (2)
DDKRRYLG	8	No
KKKYGQDAVN	10	No
DENKKQYNLT	10	Si (2)
FKSPEATW	8	Si

El análisis realizado por Vaxign 2.0, incluye un mapa mundial con el porcentaje de protección predicha, con base en los HLA's de referencia, para cada país o región. Se muestran los epítopes de la proteína enolasa modelada que pueden unirse al MHC- I o II de células T, y la información disponible en la base de datos IEDB para evaluar su potencial como antígeno protector. El mapa muestra una excelente protección, principalmente para gran parte de Latinoamérica, con la mayoría de sus regiones con un 100% de protección predicha (**Figura 32**).

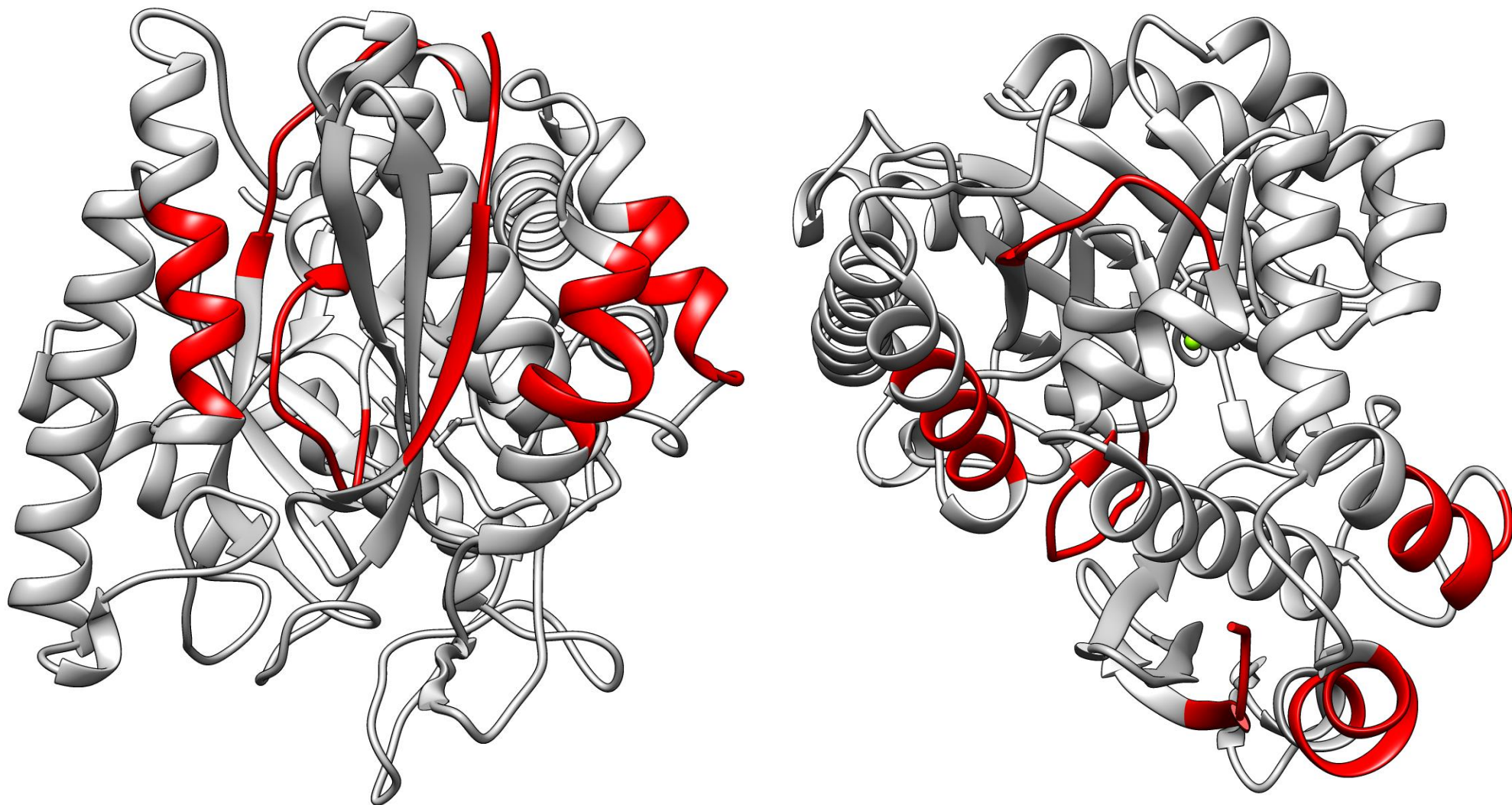


Figura 29. Estructura de enolasa consenso con epítopes MHC- I resaltados, mostrando seis epítopes detallado en la Tabla 6.

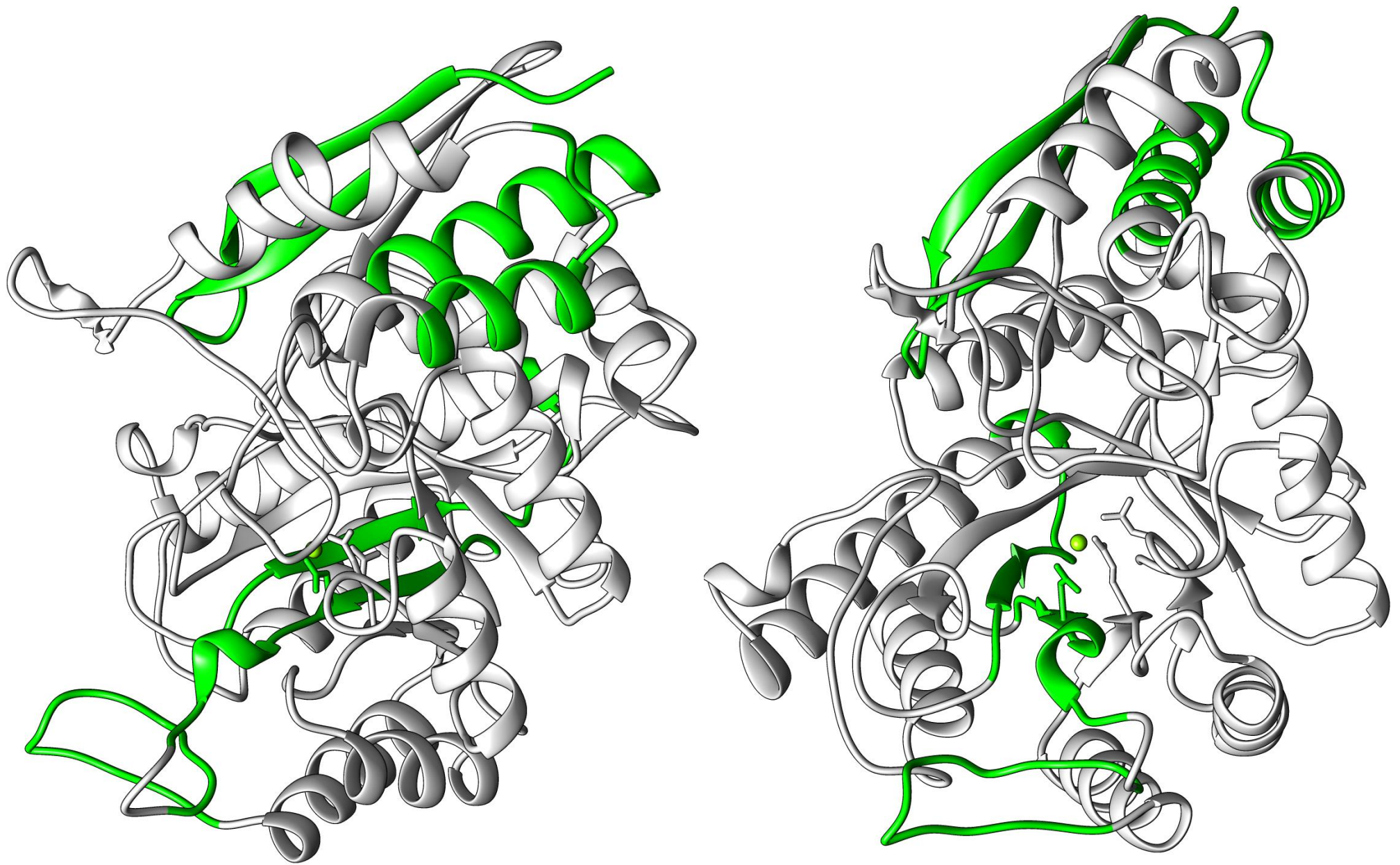


Figura 30. Estructura de enolasa consenso con epítipes MHC- II resaltados, mostrando siete epítipes detallado en la Tabla 6.

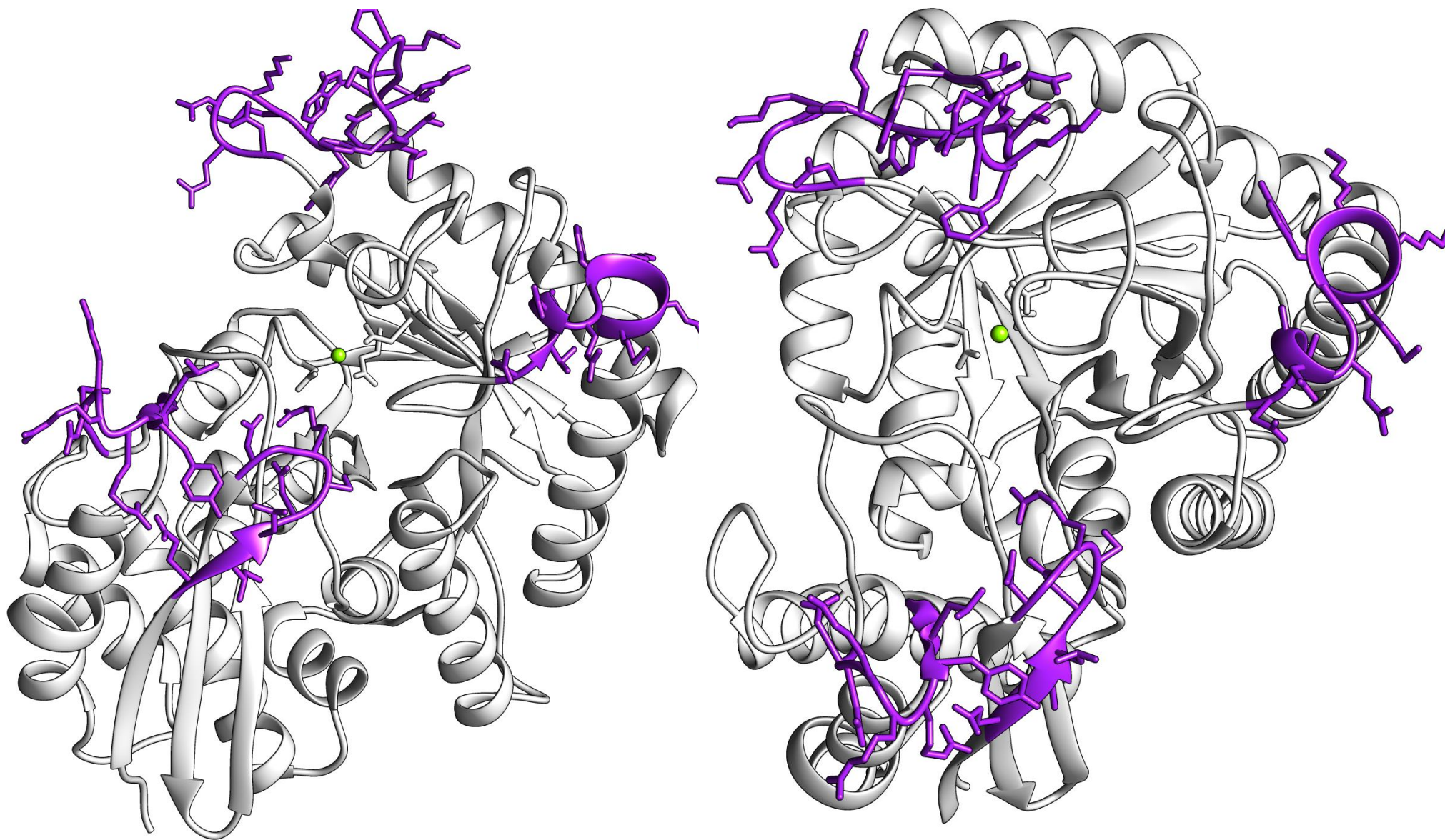


Figura 31. Estructura de enolasa consenso con epítopes para Células B resaltados, mostrando cinco epítopes, detallados en la Tabla 7.

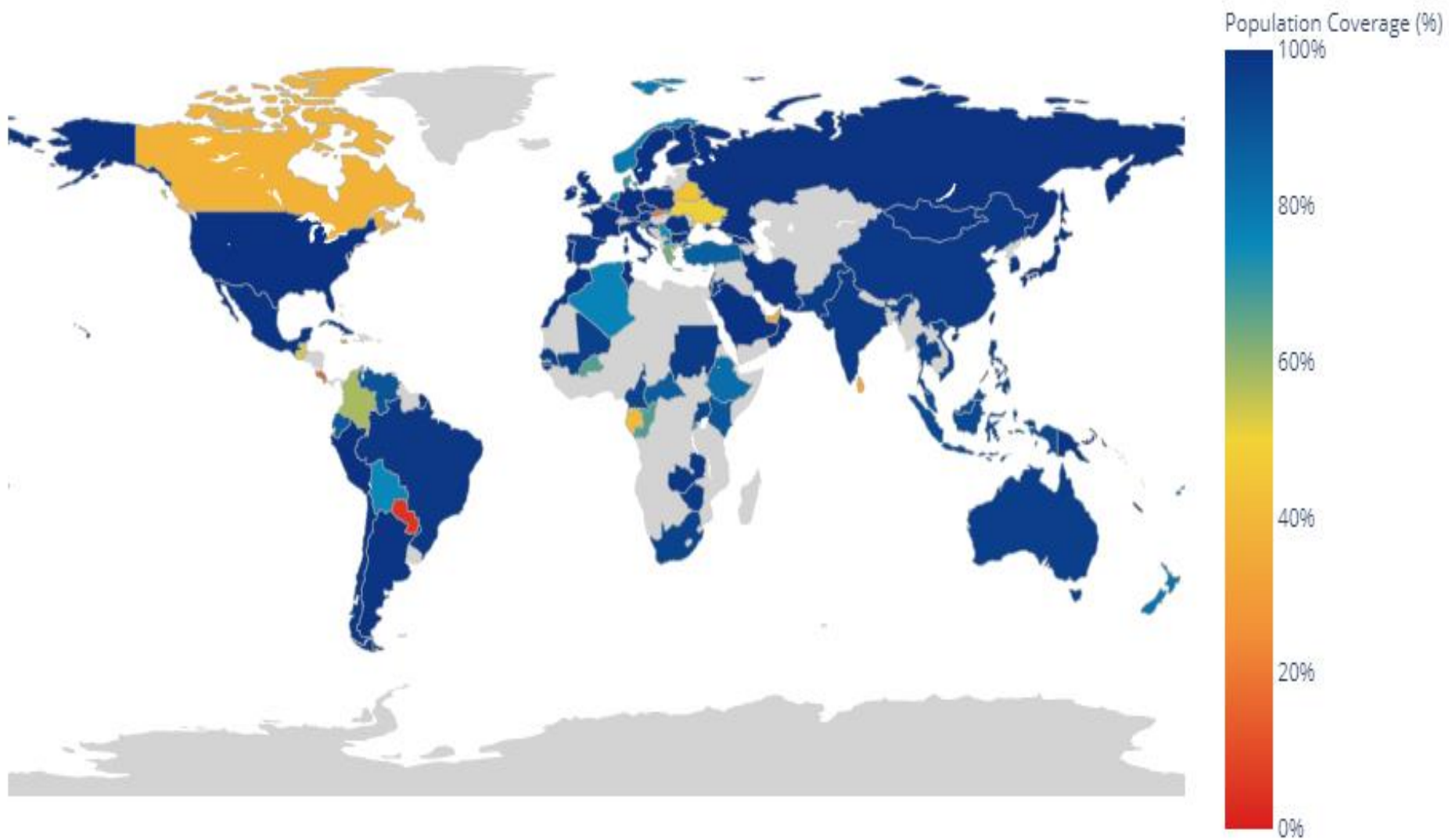


Figura 32. Mapa global de protección virtual usando la proteína enolasa modelada completa, con base en los HLA's de cada región y su población.

3.7 Docking molecular e interacciones proteína-receptor

El análisis de Docking o acoplamiento molecular entre la proteína modelada y los TLR's 2/4, realizado con HDock reportó más de 150 modelos posibles por cada receptor y con base en un sistema arbitrario de puntuación llamado Docking score, se seleccionaron los de mejor puntaje, siendo -249.7 y -262.99 respectivamente, ambos modelos fueron descargados en formato .pdb, visualizados con UCSF Chimera (**Figuras 33 y 34, respectivamente**) y enviados al servidor PRODIGY que indicó la energía libre de Gibbs (ΔG) y la Constante de disociación (K_d) a 25°C, ambas mostrando alta probabilidad de unión entre el receptor y la proteína modelada (**Tabla 8**).

Tabla 8. Valores reportados por las plataformas de Docking molecular

Receptor (PDB)	HDOCK	PRODIGY	
	Docking score	Energía de afinidad ΔG (kcal/mol)	Constante de disociación K_d (M) 25°C
TLR 2 (2Z7X)	-249.7	-18.1	5.0E-14
TLR 4 (4G8A)	-262.99	-18.6	2.5E-14

Para obtener una mejor visualización de las interacciones entre la proteína modelada y los TLR's, se analizaron los archivos de acoplamiento generados en HDock por medio de la plataforma PDBsum, mostrando información más detallada, así como diagramas con distintas interacciones de ambos archivos de acoplamiento molecular. El análisis entre la proteína modelada acoplada al TLR 2 mostró únicamente nueve interacciones de puentes de sal entre la cadena A (Enolasa consenso) y la cadena C (TLR 2), así como ocho y siete residuos interactuando respectivamente en una área de 2003 y 1884 Å² para la cadena A y C (**Figura 35**); en cuanto al análisis con el TLR 4, se mostraron tres puentes salinos, ocho puentes de hidrógeno y 257 uniones débiles, 36 residuos de la cadena A (Enolasa consenso) interactuando con 38 de la cadena B (TLR 4), en una área de 1980 y 1950 Å² para la cadena A y B (**Figura 36**). Finalmente se visualizaron ambos acoplamientos por medio del programa UCSF Chimera, para resaltar y visualizar estructuralmente los puntos de contacto en las interacciones de ambos archivos.

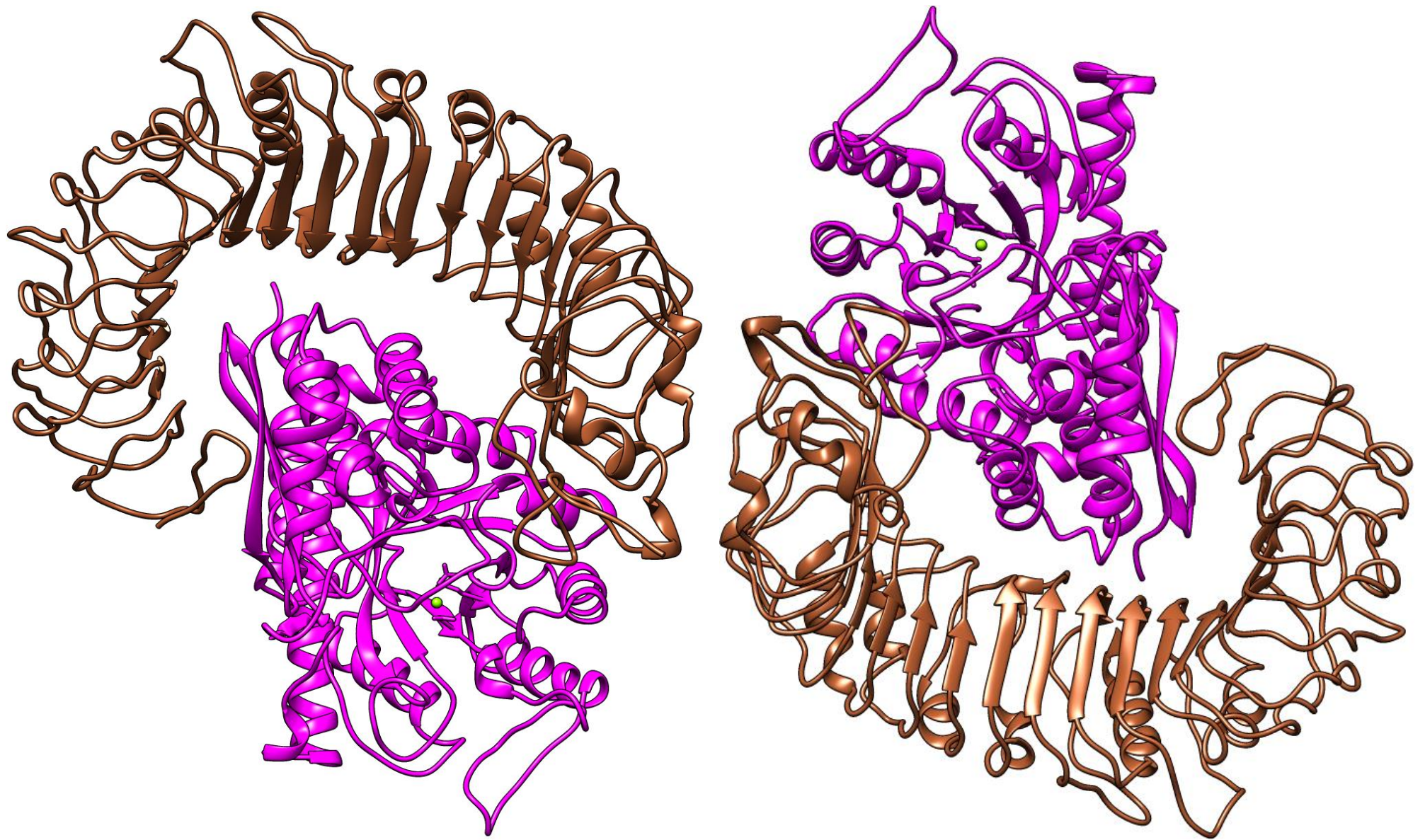


Figura 33. Diferentes ángulos del Docking molecular entre TLR 2 (café) y enolasa consenso (magenta)

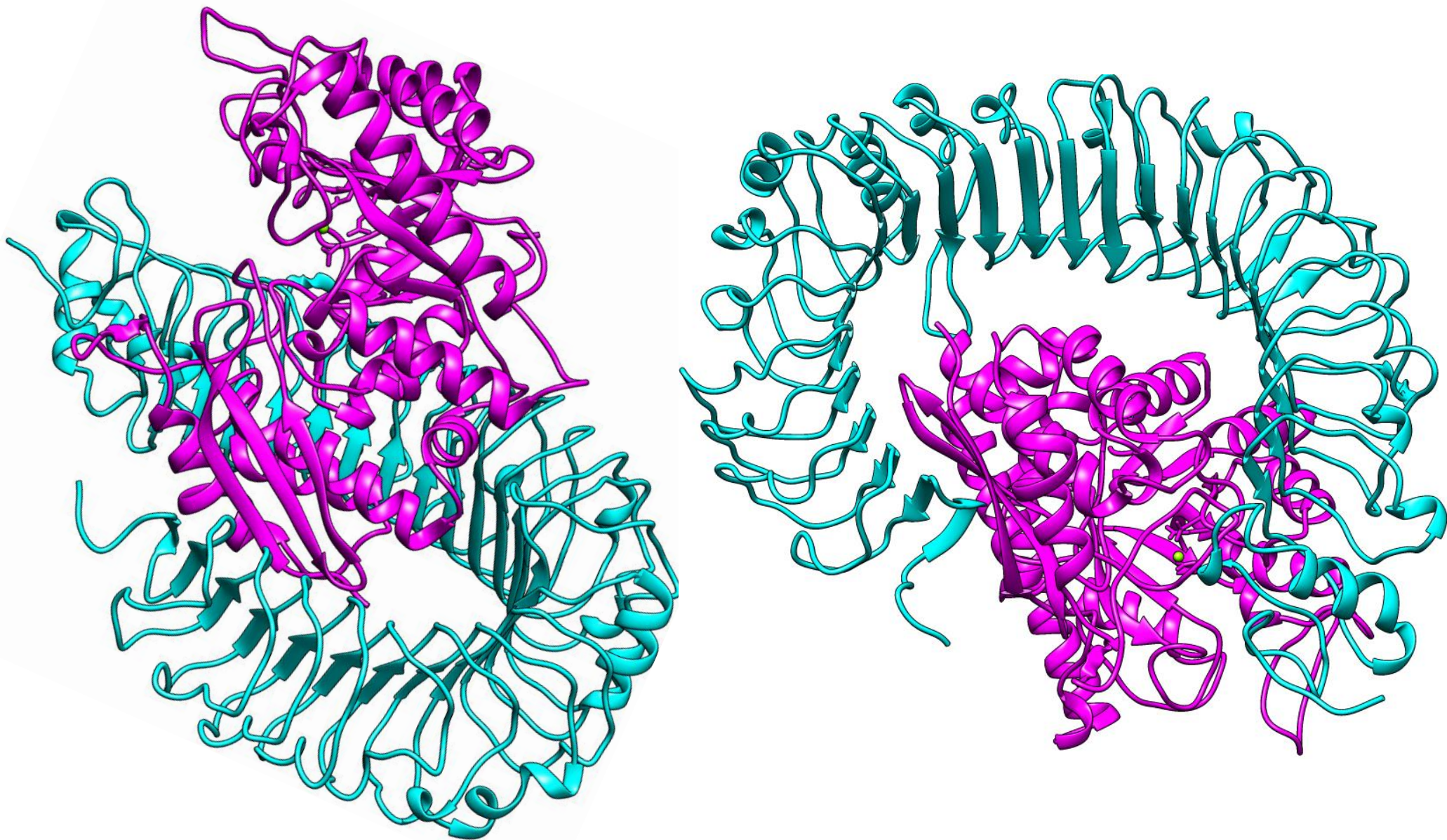
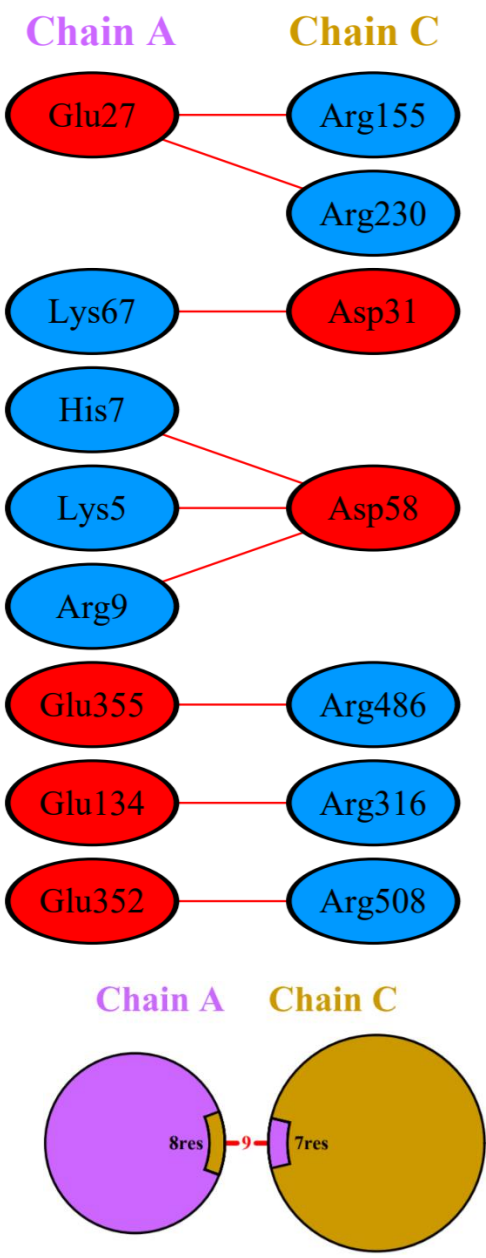


Figura 34. Diferentes ángulos del Docking molecular entre TLR 4 (cian) y enolasa consenso (magenta)



— Salt bridges — Disulphide bonds — Hydrogen bonds ||||| Non-bonded contacts

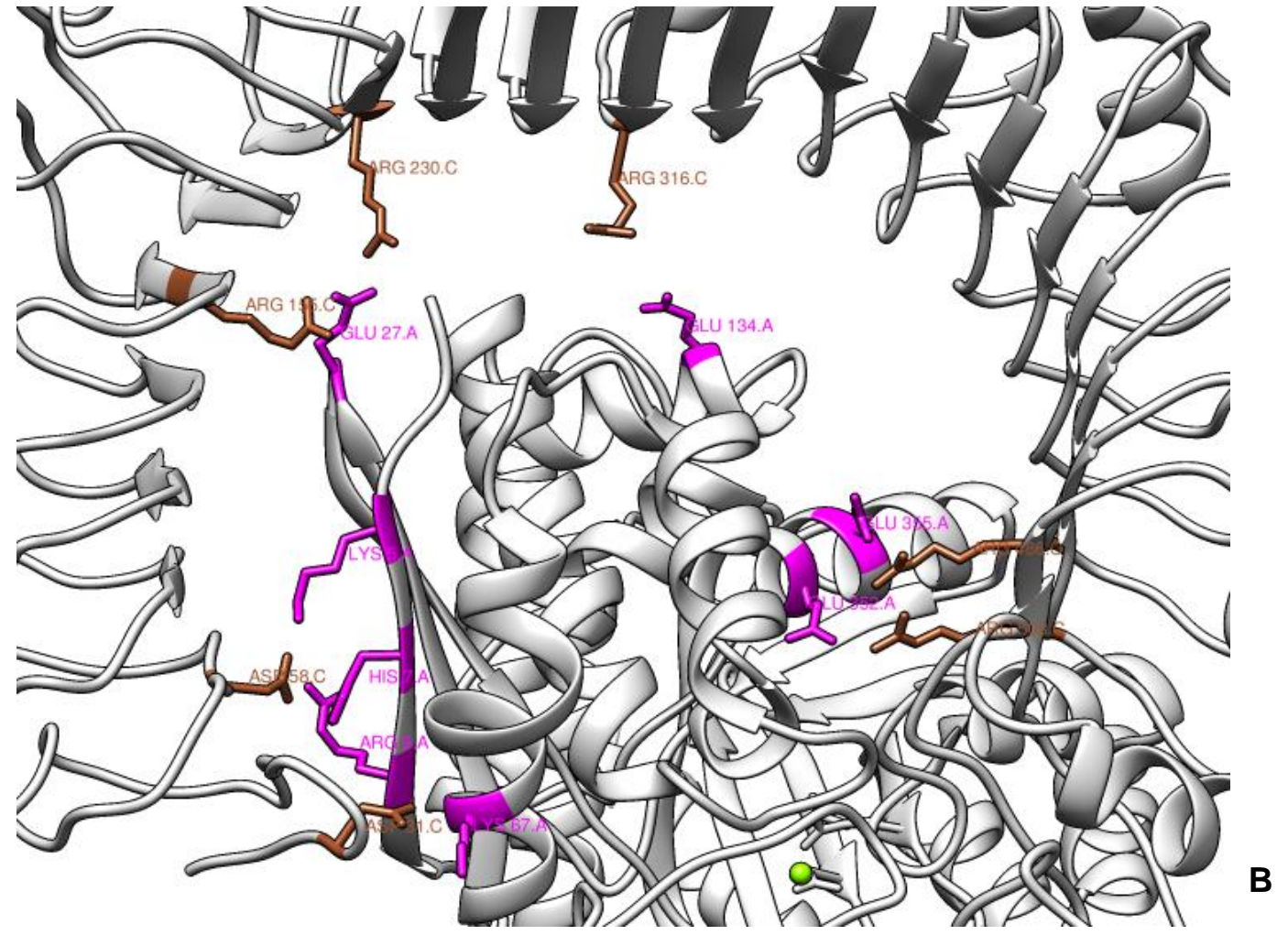


Figura 35. Resultados del análisis PDBsum, **A)** Esquemas con tipo y numero de interacciones entre residuos de la cadena A y cadena C; **B)** Visualización de puntos de contacto para puentes salinos, entre TLR 2 (café) y enolasa consenso (magenta)

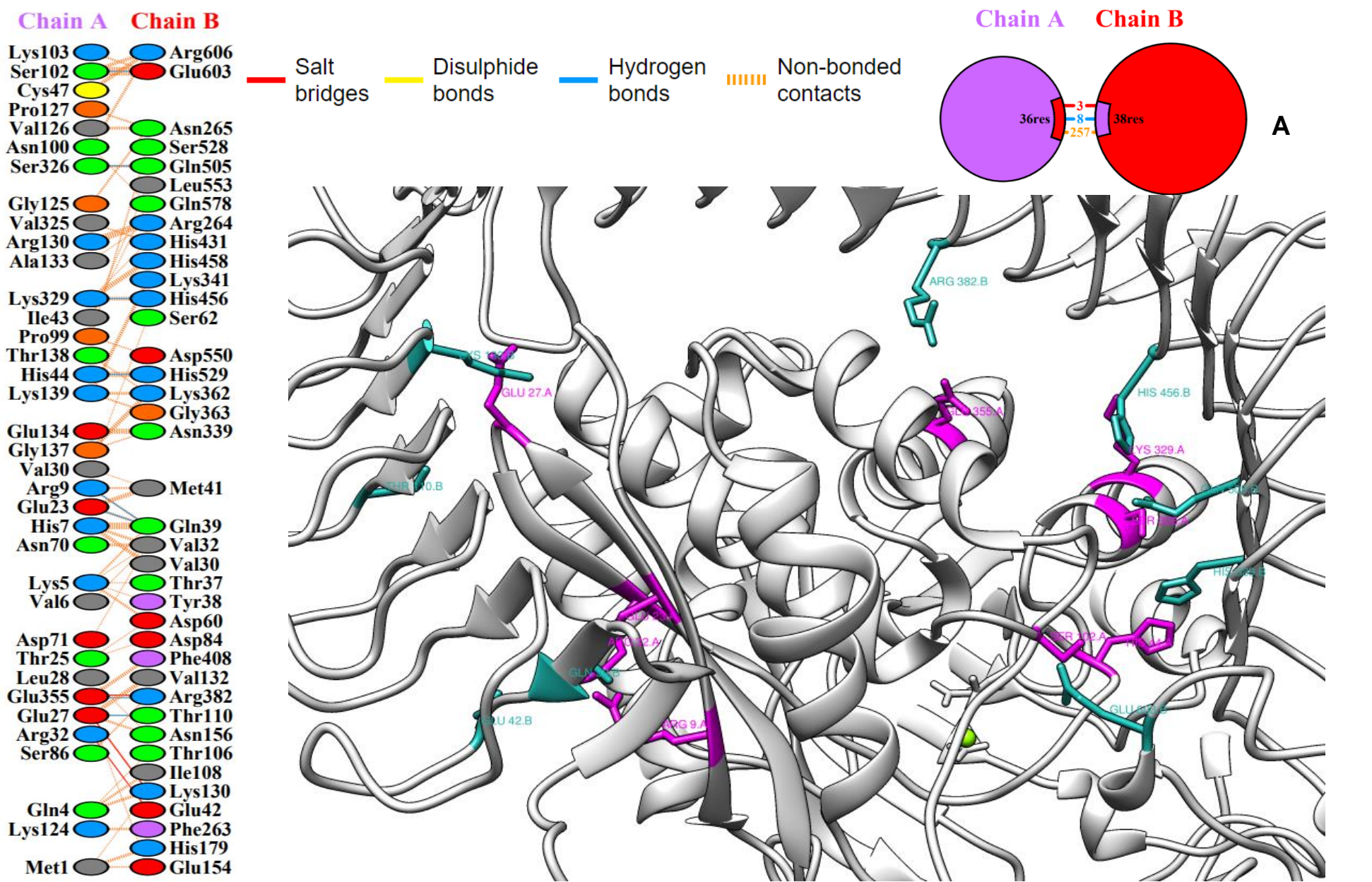


Figura 36. Resultados del análisis PDBsum, **A**) Esquemas con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena A y cadena B; **B**) Visualización de puntos de contacto, puentes salinos, H-H y uniones débiles entre TLR 4 (cian) y enolasa consenso (magenta)

3.8 Quimera basada en epítopes

Con base en los resultados obtenidos por las distintas plataformas y programas bioinformáticos se procedió a realizar el diseño manual de dos quimeras, con la información correspondiente a los epítopes para el MHC- I y II. La estructura de la primera quimera en dirección 5' a 3' presenta una caperuza de tipo 0, una secuencia UTR con la información necesaria para la β -globina, un conector proteico de tipo rígido EAAAK, una secuencia Kozak seguida inmediatamente de seis epítopes CTL para MHC- I detectados con la plataforma Vaxign 2.0 y separados por conectores GGGG, nuevamente un conector EAAAK unido a una UTR con el gen correspondiente a la α -globina en la región 3', unida a una cola de poli A de 120 – 150 pares de bases (**Figura 37**).

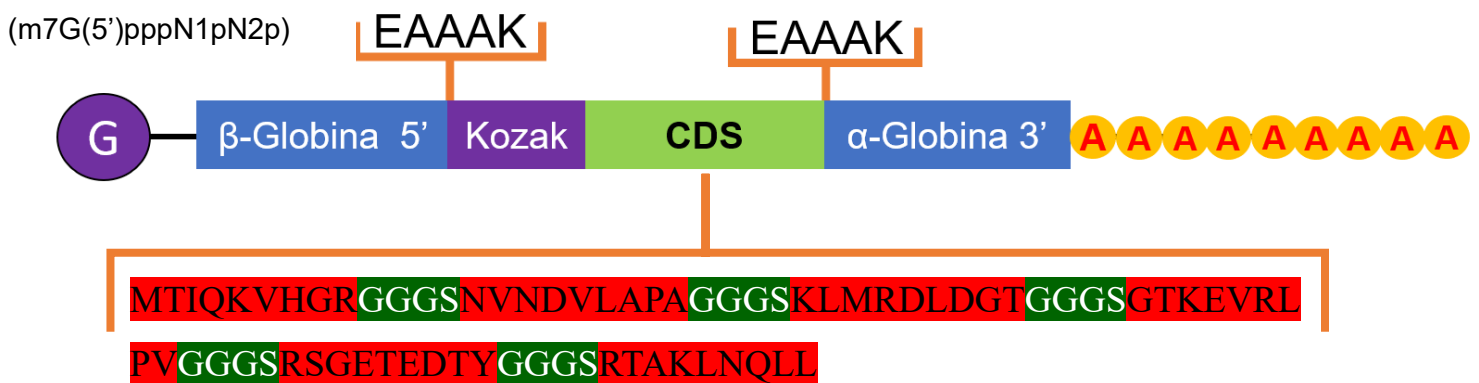


Figura 37. Estructura general de la quimera proteica con epítopes para el MHC- I

En cuanto a la segunda quimera su diseño fue similar, partiendo de una caperuza tipo 0 en la región 5' seguida de una UTR codificante para la β -globina, un conector proteico de tipo rígido EAAAK, una secuencia Kozak unida a siete epítopes HTL para MHC-II también detectados a través de los análisis bioinformáticos, estos fueron separados por conectores GPGPG entre cada epítopes, seguidos de un conector EAAAK unido a una UTR con la información para la α -globina en la región 3', unida a una cola de poli A de 120 – 150 pares de bases (**Figura 38**).

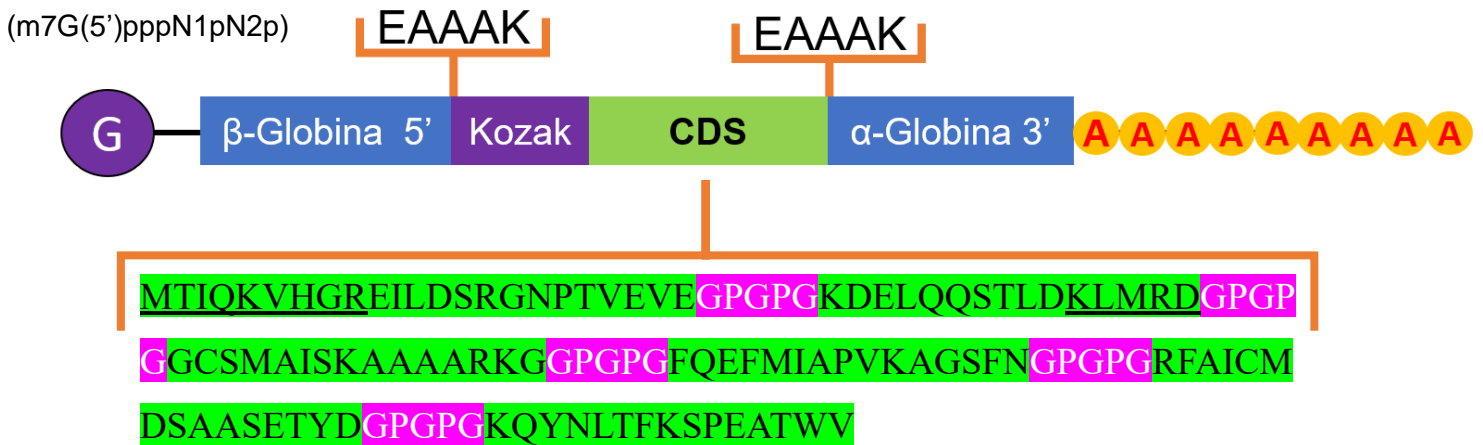


Figura 38. Estructura general de la quimera proteica con epítopes para el MHC-II, incluyendo regiones pertenecientes al MHC-I, subrayadas

4. Discusión de resultados

Trypanosoma cruzi fue identificado hace más de 110 años, como el agente causante de la enfermedad de Chagas [1], y ha tomado una gran importancia epidemiológica en México, América Latina y el mundo. Esta enfermedad es endémica en diversas regiones de Latinoamérica y México, se caracteriza por generar diversos problemas gastrointestinales y cardiacos, tales como megacolon/esófago y cardiopatía chagásica crónica [17] dependiendo del tipo de DTU presente en la enfermedad [27], [55], siendo que en México predomina el linaje TcI, asociado a tropismo cardiaco [25]. De manera general la enfermedad presenta dos fases, iniciando con una fase aguda, pudiendo durar de 15 a 40 días y en muchos casos no existen síntomas, pero pueden llegar a presentarse el chagoma y signo de Romaña, como signos patognomónicos; también pueden producirse muertes súbitas derivadas de miocarditis grave [31]. Posterior a esta fase aguda, se presenta la fase crónica que se subdivide en asintomática y sintomática, donde se encuentran el 70 y 40% de infectados respectivamente, como se puede observar en la **Figura 6**, durante la fase asintomática el paciente desconoce de su condición, lo cual puede facilitar la transmisión de la enfermedad,

una vez identificada la patología se clasifica como sintomática o diagnosticada, y se pueden o no presentar cardiomiopatías, megasíndromes y trastornos cardiodigestivos [72], [73].

El primer caso de Chagas en México fue reportado por primera vez en 1940 [5], desde entonces han sido pocos los esfuerzos para mitigar las afectaciones e infecciones por *T. cruzi* en el mundo y especialmente México, tanto así que ha sido clasificada por la OMS como una NTD's [7], esto aunado a una evidente ausencia de medicamentos efectivos y proyecciones de hasta 5.5 millones de infectados [12] hacen urgente y necesaria la búsqueda de alternativas de carácter profiláctico para la tripanosomiasis americana.

El planteamiento original de este trabajo estuvo orientado hacia la investigación experimental con base en el enfoque de vacunología reversa, que aprovecha el uso de herramientas bioinformáticas para la predicción de antígenos potenciales, abaratando costos, tiempo y dilucidando nuevos antígenos incapaces de encontrar con metodologías tradicionales; una de las principales limitantes de esta metodología es que por ahora, reduce el análisis a proteínas expuestas en superficie, reconocidas por el sistema inmunológico [74]. Aprovechando esta característica y partiendo del trabajo realizado por Carabarin-Lima *et al.*, 2014 [54] se utilizó a la Enolasa, una metaloenzima multifuncional con código E.C. 4.2.1.11 que cataliza la deshidratación reversible de D-2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato [75], esta proteína muestra diversos motivos conservados en su sitio catalítico. Se llevaron a cabo estudios experimentales e *in silico*, donde se amplificó, clonó, secuenció y purificó a la enolasa, también fue identificada una región transmembranal que sugiere una localización en superficie, de igual manera fueron predichos epítopes para linfocitos B y linfocitos T citotóxicos, sugiriendo el desarrollo de respuestas inmunes de tipo humoral y celular [54] por lo que se propone a la enolasa como un buen inmunógeno. En estudios posteriores se detectó la presencia de anticuerpos anti-rTcENO en sueros de ratones inmunizados experimentalmente con la rTcENO, demostrando que la enolasa recombinante purificada fue reconocida por los sueros de ratones; estos

resultados indican que la rTcENO tiene propiedades inmunogénicas para estudiarse y proponerse como candidato para el desarrollo de una vacuna.

Con base en estos resultados se procedió a verificar, clonar, expresar y purificar a la rTcENO inicialmente en células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS y se analizó mediante un SDS-PAGE mostrado en la **Figura 9**, donde se identificó a la rTcENO por medio de su peso molecular aproximado. Una vez identificada la presunta proteína de interés, se realizó una evaluación de curva de crecimiento en las cepas *E. coli* Star, Rosetta y pLysE, todas previamente transformadas con el plásmido pRSETB::TcENO, donde la cepa pLysE mostró un mayor crecimiento celular en menor tiempo registrado en la **Gráfica 1**. Una vez identificado el tiempo de crecimiento celular, se procedió a analizar la producción de rTcENO para cada una de las cepas, utilizando geles SDS-PAGE individuales teñidos que se pueden observar en las **Figuras 10, 11 y 12**, mostrando nuevamente una banda aproximada de 46.5 kDa, presuntamente correspondiente a la rTcENO en todas las cepas pero con diferentes intensidades entre ellas, lo cual podría pero no necesariamente indicar diversos niveles de producción proteica, para analizar esto se realizó un Western Blot con muestras del tiempo 2 de cada cepa, mismo que fue revelado con anticuerpos anti-histidinas que se unen a la etiqueta presente en la rTcENO y un anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina, el resultado de este ensayo se puede observar en la **Figura 12**, que muestra una disminución de la intensidad en el bandeo, siendo *E. coli* Rosetta la cepa que mejor produce la proteína y confirma la presencia de la rTcENO por la unión altamente específica de anticuerpos. Esta discrepancia entre el tiempo de crecimiento celular de la cepa Rosetta, misma que necesitó un mayor tiempo para aumentar su densidad celular y a su vez produjo la mayor cantidad de rTcENO, pudiera explicarse con el uso de codones raros presentes en la secuencia del gen, ya que al provenir de un parásito, pudiese necesitar mayor tiempo para su correcta traducción, y verse favorecida por las características de *E. coli* Rosetta.

El siguiente paso lógico en el proyecto contemplaba la purificación a mayor volumen de la rTcENO utilizando la cepa *E. coli* Rosetta, sin embargo, esto se vio interrumpido abruptamente derivado de la pandemia ocasionada por el virus SARS-Cov-2, y se optó por reestructurar el proyecto ante la posibilidad de no poder volver a los laboratorios de forma presencial a corto plazo. Durante este proceso se realizó la publicación de un artículo de revisión, relacionado al tema principal de la enfermedad de Chagas, enfocado a las cardiopatías, y que fue publicado con el título de: “Risk of COVID-19 in Chagas Disease Patients: What Happen with Cardiac Affectations?” [55].

El cambio global realizado en esta tesis se puede observar en el diagrama de **Estrategia experimental**, y teniendo en cuenta que aún, cuando *T. cruzi* presenta una reproducción asexual y por tanto sus variaciones a nivel genético deberían ser mínimas, se ha encontrado una diversidad genética considerable y discreta, que se ve principalmente asociada en el tropismo hacia músculo cardiaco u otros órganos, dependiendo del tipo de DTU presente en la infección. Por ello, el objetivo principal ha sido proponer una secuencia consenso de la proteína enolasa, proveniente de la mayor cantidad disponible de cepas o DTU's, para su uso como vacuna, evaluando principalmente sus propiedades inmunogénicas a nivel bioinformático, buscando conferir protección contra la mayoría de las variantes conocidas. Diversos estudios validan el uso de herramientas bioinformáticas en la búsqueda de nuevas vacunas, desde el uso de TriTrypDB para la búsqueda confiable de nuevos antígenos en *T. cruzi*, por parte de Michel-Todó L. *et al.*, 2019 [76].

Teniendo en cuenta lo anterior y a partir de las bases de datos NCBI y TriTrypDB, se obtuvieron 13 y 2 secuencias de la enolasa, respectivamente, pertenecientes a casi todos los DTU's conocidos y se muestran en la **Tabla 3**, como se puede observar no se encontraron secuencias para el DTU IV, y esto se explica por la constante asociación de esta variante con perros, así como otros mamíferos domésticos en regiones altamente aisladas como el Chaco Paraguayo [77], y por

tanto la falta de estudio a nivel de secuenciación de genoma. Después, las secuencias se tradujeron a aminoácidos, usando el código genético universal, lo cual supone una ventaja pensando, en la expresión de esta proteína usando un código genético más convencional en fondos genéticos de *E. coli*, y resultando en 429 aminoácidos para 14 secuencias de 1,290 pb, mientras que la secuencia inicial de referencia contenida en el plásmido pRSETB::TcENO, es decir, la correspondiente a la variante H8 tiene 1,151 pb, que codifican para 384 aminoácidos, por tanto y buscando una mayor fiabilidad, la cepa de referencia pasó a ser la correspondiente a la CL Brener, ya que es la variante más estudiada a nivel mundial. La diferencia entre ambas variantes se puede observar en la **Figura 14**, mientras que las secuencias aminoacídicas de todos los DTU's se encuentran en el **Anexo 1**.

Luego de contar con las 15 secuencias aminoacídicas, se procedió a realizar un alineamiento múltiple mediante Clustal Omega, para poder obtener una secuencia consenso y poder observar las diferencias entre los DTU's, siendo la variante Marinkellei B7, la que mostró más mutaciones puntuales, con 14 a lo largo del alineamiento y que se pueden observar en la **Figura 16**, también es importante mencionar que se identificó una mutación constante en la posición 330, donde siete DTU's presentaron Treonina (T) y ocho presentaron Metionina (M), al final, la secuencia consenso presentó una M en la posición 330, de un total de 429 aminoácidos. Una vez que se contó con la secuencia consenso, se realizó un modelado por homología en la plataforma SWISS-MODEL, utilizando como plantilla la estructura cristalizada de la enolasa de *T. cruzi* DTU CL Brener (PDB: 4G7F), que mostró una identidad de 99.77% a nivel de secuencia, y valores de QMEAN: -0.28, GMQE: 0.96, que indican el grado de natividad o autenticidad y calidad del modelo global, respectivamente. Al respecto, el modelado por homología realizado por Vedamurthy G. *et al.*, 2019 [78] en la misma plataforma muestra valores de GMQE: 0.72, identidad de 46.89% y general de Ramachandran de 98.5%, mientras que la enolasa consenso obtuvo GMQE: 0.96, identidad de 99.77% y general de Ramachandran de 96.49%. Estos datos indican

que el modelado es altamente fiable, y se ven confirmados con una gráfica de comparación mostrada en la **Figura 20**, que utiliza el valor QMEAN del modelo, y lo compara con el obtenido por estructuras experimentales cristalizadas de tamaño similar, mostrando valores ideales, así como el gráfico de comparación local, visualizado en la **Figura 19**, que solo arroja dos regiones menores a 0.6 (mala calidad), mismas correspondientes a las regiones 39 a 42 y 260 a 265, con los aminoácidos “A, S, T, G y T, F, K, S, P, E” respectivamente, y que se pueden apreciar bajo la representación 3D y el esquema de coloración QMEAN de la **Figura 23**, coloreando de naranja estos diez aminoácidos, que a pesar de ser idénticos en secuencia lineal, no se encuentran en la estructura cristalizada, pero si los podemos apreciar en la **Figura 25**. Aún con esta ausencia a nivel estructural, la superposición de ambas estructuras muestra un RMSD de 0.068, que también valida la similitud entre ambos modelos, y solo se muestra un cambio a nivel de aminoácido en la posición 330, que parece no afectar a la estructura de alfa hélice y se aprecia de color amarillo en la **Figura 26**. Finalmente, el análisis de la estructura con gráficos de Ramachandran, mostró un valor general de 96.49%, frente a un ideal de 98%, sin embargo, este valor se puede explicar por la ausencia de las regiones mencionadas, que estarían dejando sin plantilla a los aminoácidos del modelo, entre ellos, una glicina que por su flexibilidad, pudiese contribuir a una conformación teórica, que resulte en un impedimento estérico; otro valor importante es el MolProbity Score, que indica un valor global del modelado, con base a todos los datos obtenidos, siendo en este caso de 0.93 y que entre más cercano a cero, pero menor a la resolución del templado (2.40 Å), será un mejor valor.

Después de tener una validación por diversos programas y puntajes bioinformáticos, se realizaron análisis de las propiedades fisicoquímicas con la plataforma ProtParam, indicando un peso molecular ya esperado, también horas de vida media en distintos organismos y su estabilidad de 39.77, siendo ambas ideales para procesos de purificación. En cuanto a las características inmunogénicas, fueron analizadas por la plataforma Vaxign 2.0, obteniendo un

valor de adhesión ideal, una ubicación citoplasmática esperada y un puntaje Vaxign-ML de 91.7, que indica la probabilidad que tiene la enolasa consenso de ser un buen antígeno vacunal, con base, en bancos de datos de inmunógenos probados experimentalmente. Usando en combinación la plataforma IEDB, se predijeron los epítopes para MHC-I y II, con más de 1,500 combinaciones iniciales para ambos casos, utilizando los HLA's de referencia para población Latinoamericana; eligiendo inicialmente aquellos con un $p\text{-value} \leq 0.01$, luego descartándolos por su representatividad en los supertipos de HLA's, y finalmente por la presencia de sitios de corte proteosomal para el caso del MHC-I. Los resultados fueron seis epítopes para MHC- I y siete epítopes para el MHC-II, que se aprecian en forma lineal en la **Figura 28**, con los HLA's seleccionados en la **Tabla 6**. Estos resultados, indicaron tres epítopes MHC- II empalmados con regiones de epítopes MHC- I, lo cual, podría coadyuvar a generar una respuesta inmune completa de tipo humoral y celular. También se identificaron epítopes para células B, por análisis de tipo lineal y estructural, donde ambos mostraron cinco regiones, que se pueden apreciar en la **Tabla 7**, con alta probabilidad de ser reconocidas por anticuerpos, y mostrando empalme en tres regiones con uno o más epítopes correspondientes a HLA's. Para tener una mejor perspectiva e identificación de los epítopes para MHC- I y II, así como los correspondientes a células B, se realizaron visualizaciones 3D, por medio del programa UCSF Chimera, resaltando las respectivas regiones en las **Figuras 29, 30 y 31**, donde se puede apreciar que la mayoría se encuentran en la parte exterior de la enolasa consenso, lo que facilitaría su reconocimiento. El análisis por Vaxign 2.0, también muestra un mapa mundial con el porcentaje de protección predicha para cada país o región, con base en los HLA's de referencia usados, los epítopes de la proteína modelada que puedan unirse al MHC-I o II de células T y la información disponible en la base de datos IEDB para evaluar que tan buen antígeno protector pudiera ser. El mapa puede observarse en la **Figura 32**, y muestra una excelente protección, principalmente para gran parte de Latinoamérica, con la mayoría de sus regiones mostrando un 100% de cobertura predicha. El análisis de las propiedades inmunogénicas y predicción de epítopes realizado por Ong E. *et al.*,

2020 [79] muestra una revisión de diversas vacunas para SARS-CoV-2 en desarrollo, a través de la plataforma Vaxign, mostrando valores Vaxign-ML >90 para tres proteínas, mientras que otro estudio realizado por Khan M. *et al.*, 2021 [80] muestra la obtención de 18 epítopes a través de la plataforma IEDB, enfocados a poblaciones específicas acordes a su HLA, estas plataformas son por excelencia las más usadas en el diseño e investigación de nuevos antígenos, sin embargo, el reciente desarrollo de la plataforma Vaxign 2.0 combina las dos plataformas anteriores, mostrando valores validados por ambos servidores. En el caso de la enolasa modelada se obtuvo un Vaxign-ML de 91.7, una cobertura casi total para HLA's representativos de Latinoamérica, así como un total de 18 epítopes validados de forma lineal y estructural.

Una vez definidas las regiones de interés, se procedió a realizar un análisis de Docking molecular, entre la proteína modelada y los TLR's 2/4, utilizando las plataformas HDOCK y PRODIGY, mismas que mostraron más de 150 modelos para cada uno y eligiendo los mejores acoplamientos con base en el Docking score, que se pueden observar en las **Figuras 33** y **34**. Estos ensayos arrojaron valores de ΔG : -18.1 y K_d : 5.0E-14 para el TLR 2, así como ΔG : -18.6 y K_d : 2.5E-14 para el TLR 4. Un análisis de Docking molecular realizado por Saha R. *et al.*, 2021 [81] reporta valores para ΔG de hasta -19.9, similares a los obtenidos en este trabajo, estos datos sugieren una alta probabilidad de unión entre el receptor y la proteína modelada, por lo tanto, una probable activación de respuesta inmune innata, a nivel de receptores asociados a membrana, que pudiera coadyuvar a la eliminación del parásito en el huésped, a través, de la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IFN- γ , que a su vez puede estimular la producción de especies reactivas de nitrógeno. Finalmente, se realizó un análisis con la plataforma PDBsum, con información más detallada y diagramas con las interacciones presentes entre ambas proteínas, mostrando únicamente nueve interacciones de puentes salinos entre la cadena A (Enolasa consenso) y la cadena C (TLR 2), en el segundo análisis se mostraron tres puentes salinos, ocho puentes de hidrógeno y 257 uniones débiles entre la cadena A (Enolasa

consenso) y la cadena B (TLR 4). Ambas interacciones se pueden apreciar en las **Figuras 35** y **36**. El análisis a detalle de las uniones presentes en los acoplamientos, describe cuantitativa y cualitativamente las uniones, siendo especialmente altas para el TLR 4, con numerosas interacciones de tipo electrostático y Van der Waals, esta información refuerza la probable interacción necesaria para activar los receptores, ya que estas interacciones son fundamentales para la estabilización del complejo proteico, que desemboca en una respuesta inmune innata, que puede activar una respuesta inmune adaptativa inmediata.

Al tener identificados los epítopes con mayor probabilidad de activar una respuesta inmune que ayude a la eliminación de *T. cruzi*, se inició con el diseño manual de dos quimeras proteicas que pudiesen proponerse como potenciales vacunas de mRNA. La primera quimera, con epítopes para el MHC- I se puede observar en la **Figura 37**, que consta principalmente de una caperuza tipo 0 que ayuda a aumentar la inmunogenicidad, también contiene una secuencia Kozak, con el objetivo de facilitar el reconocimiento y por tanto la iniciación de la traducción, luego la región CDS contiene los epítopes separados por un conector GGS, indicado por su flexibilidad en epítopes de hasta nueve aminoácidos, también se encuentran dos regiones UTR que flanquean la quimera, con los genes codificantes para β -globina y α -globina, que ayudan a generar una mayor estabilidad y aumentar la traducción [82]–[84] Para el caso de la segunda quimera se siguió la misma estructura, a excepción de los epítopes, que en este caso son correspondientes al MHC- II, pero debido a su longitud, algunos de ellos se empalman con epítopes para MHC-I, como se aprecia en la **Figura 38**, separados por conectores GPGPG, que brindan una mayor flexibilidad, necesaria en epítopes de mayor longitud. El diseño de ambas quimeras ha sido de manera general, ya que se necesitan evaluaciones *in silico* más profundas para proponer una estructura más detallada, sin embargo, y basándonos en los resultados obtenidos los epítopes propuestos muestran un considerable potencial para continuar estudiándose y proponerse como vacuna. El diseño de ambas quimeras proteicas que contienen los epítopes más representativos de la enolasa consenso se realizó

de forma manual, ya que es una propuesta basada en estructuras diseñadas y validadas por distintos autores como Saadi M. et al., 2017; Srivastava S. et al., 2018; Michel-Todó L. et al., 2019; He J. et al., 2020; Khan M. et al., 2021; Saha R. et al., 2021 [76], [80], [81], [85]–[87], siguiendo recomendaciones enfocadas al uso de péptidos de fusión, genes estabilizadores y potenciadores de traducción, así como el uso de caperuza tipo cero para potenciar la respuesta inmune. Si bien los análisis con las herramientas bioinformáticas, por distintos grupos de investigación no son exclusivos de *T. cruzi*, sino que abarca otros modelos, esto puede validar su uso que cada vez está más presente en el desarrollo de vacunas y búsqueda de nuevos antígenos, mismos que necesitan complementarse a través de investigación y validación *in vitro* e *in vivo*.

El tipo de respuesta inmune ideal para la eliminación de *T. cruzi* en humanos aún no está completamente dilucidado, pero diversos estudios sugieren una respuesta tipo Th1 como fundamental para la eliminación del parásito [73], así como una respuesta inmune humoral que coadyuve con la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-2 e IFN- γ [88], que a su vez estimulen la producción de especies reactivas de nitrógeno [73], así como la producción de anticuerpos para la eliminación del parásito en torrente sanguíneo [88]. Los resultados obtenidos en este trabajo identifican a los epítopes seleccionados y especialmente a la enolasa consenso modelada, como serios candidatos a brindar protección contra la enfermedad de Chagas, a través de la activación de una respuesta inmune Th1/Th2, presentando hasta ahora una inmunogenicidad teórica ideal contra casi todas las cepas conocidas de *T. cruzi*. Sin embargo, se requiere realizar más estudios complementarios tanto *in silico* como *in vitro* e *in vivo*, para confirmar que la enolasa consenso o las quimeras proteicas propuestas puedan conferir inmunidad frente a una infección por *T. cruzi*.

Conclusiones

- Se generó una secuencia consenso de enolasa con base en 15 secuencias independientes de diversos DTU's representativa para *T. cruzi*.
- Se modeló la secuencia consenso con valores ideales que sugieren un modelado de calidad.
- La enolasa modelada muestra propiedades inmunogénicas ideales para una respuesta inmune de tipo celular y e innata.
- La proteína modelada muestra los epítopes necesarios que predicen teóricamente una protección ideal contra *T. cruzi* y para la mayoría de regiones endémicas de esta enfermedad.
- Los epítopes seleccionados y contenidos en las quimeras mostraron una buena representatividad para la población latinoamericana.
- La enolasa consenso modelada y las quimeras proteicas sugieren con base en sus resultados teóricos una protección potencial contra la infección de *T. cruzi*.

Perspectivas

- Profundizar en el diseño y validación *in silico* de las quimeras proteicas, para luego analizarlas a nivel *in vivo*.
- Sintetizar el gen de la enolasa consenso para realizar evaluaciones de expresión y purificación proteica.
- Evaluar y analizar la respuesta inmune conferida por la enolasa consenso de manera experimental en ratones.

Bibliografía

- [1] C. Chagas, “Nova trypanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotripanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem.,” *Mem Inst Oswaldo Cruz*, vol. 1, no. 2, pp. 159–218, 1909.
- [2] C. Náquira and R. Cabrera, “Short review of chagas disease history after a century of its discovery and the current situation in peru,” *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, vol. 26, no. 4, pp. 494–504, 2009.
- [3] K. C. F. Lidani *et al.*, “Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem,” *Journal of Physical Oceanography*, vol. 49, no. 6. American Meteorological Society, 2019. doi: 10.3389/fpubh.2019.00166.
- [4] Ó. Velasco-Castrejón and B. Rivas-Sánchez, “Notes for the history of Chagas’ disease in Mexico,” *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, vol. 65, pp. 57–79, Feb. 2008, [Online]. Available: www.medigraphic.com
- [5] J. Rojo-Medina, C. Ruiz-Matus, P. M. Salazar-Schettino, and J. F. González-Roldán, “Enfermedad de Chagas en México,” *Gaceta Medica de Mexico*, vol. 154, no. 5, pp. 605–612, Sep. 2018, doi: 10.24875/GMM.18004515
- [6] CDC, “CDC - Enfermedades tropicales desatendidas - Enfermedades,” *Centers for Disease Control and Prevention*, nov. 05, 2020. <https://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/diseases/index.html> (accessed Mar. 28, 2021).
- [7] DNDi, “Enfermedad de Chagas | DNDi América Latina,” *Drugs for Neglected Diseases initiative*, 2020. <https://www.dndial.org/es/enfermedades/enfermedad-chagas/> (accessed Mar. 28, 2021).
- [8] G. A. Schmunis and Z. E. Yadon, “Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem,” *Acta Tropica*, vol. 115, no. 1–2, pp. 14–21, Jul. 2010, doi: 10.1016/j.actatropica.2009.11.003.
- [9] ISGLOBAL, “Europa no hace los deberes contra la enfermedad de Chagas-ISGLOBAL,” *Instituto de Salud Global Barcelona*, 2015. <https://www.isglobal.org/-/europa-no-hace-los-deberes-contr-la-enfermedad-de-chag-1#> (accessed Mar. 28, 2021).
- [10] A. Requena-Méndez *et al.*, “Prevalence of Chagas Disease in Latin-American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-analysis,” *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 9, no. 2, 2015, doi: 10.1371/journal.pntd.0003540.

- [11] I. Molina, F. Salvador, and A. Sánchez-Montalvá, "Actualización en enfermedad de Chagas," *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 34, no. 2, pp. 132–138, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.eimc.2015.12.008.
- [12] A. Carabarin-Lima *et al.*, "Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update," *Acta Tropica*, vol. 127, no. 2, pp. 126–135, Aug. 2013. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.04.007.
- [13] PAHO, "Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chagas Disease," Washington, D.C, 2019. Accessed: Mar. 30, 2021. [Online]. Available: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/49653/9789275120439_eng.pdf?sequence=6&isAllowed=y
- [14] C. Bern, L. A. Messenger, J. D. Whitman, and J. H. Maguire, "Chagas Disease in the United States: a Public Health Approach," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 33, no. 1, pp. 1–42, Jan. 2019, doi: 10.1128/CMR.
- [15] M. P. Salazar-Schettino *et al.*, "Enfermedad de Chagas en México," *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, vol. 59, no. 3, pp. 6–16, jun. 2016.
- [16] Secretaria de Salud, "MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN MÉXICO," México, 2019. Accessed: Oct. 26, 2020. [Online]. Available: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/447946/Manual_de_Procedimientos para la Enfermedad de Chagas en Mexico.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/447946/Manual_de_Procedimientos_para_la_Enfermedad_de_Chagas_en_Mexico.pdf)
- [17] J. A. Pérez-Molina and I. Molina, "Chagas disease," *The Lancet*, vol. 391, no. 10115. Lancet Publishing Group, pp. 82–94, Jan. 06, 2018. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31612-4.
- [18] H. B. Tanowitz *et al.*, "Perspectives on Trypanosoma cruzi-Induced Heart Disease (Chagas Disease)," *Progress in Cardiovascular Diseases*, vol. 51, no. 6, pp. 524–539, May 2009, doi: 10.1016/j.pcad.2009.02.001.
- [19] Á. D. L. C. Pech-Canul, V. Monteón, and R. L. Solís-Oviedo, "A Brief View of the Surface Membrane Proteins from Trypanosoma cruzi," *Journal of Parasitology Research*, vol. 2017. Hindawi Limited, 2017. doi: 10.1155/2017/3751403.
- [20] D. E. Teixeira, M. Benchimol, P. H. Crepaldi, and W. de Souza, "Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of Trypanosoma cruzi, the Causative Agent of Chagas Disease," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, no. 8, Aug. 2012, doi: 10.1371/journal.pntd.0001749.
- [21] B. Zingales *et al.*, "The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications," *Infection, Genetics*

and Evolution, vol. 12, no. 2. pp. 240–253, Mar. 2012. doi: 10.1016/j.meegid.2011.12.009.

- [22] M. Tibayrenc, “Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach,” *International Journal for Parasitology*, vol. 28, pp. 85–104, 1998.
- [23] S. Brisse, J. Verhoef, and M. Tibayrenc, “Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages,” *International Journal for Parasitology*, vol. 31, pp. 1218–1226, Mar. 2001, [Online]. Available: www.parasitology-online.com
- [24] B. Zingales *et al.*, “A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI,” *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 104, no. 7, pp. 1051–1054, Nov. 2009.
- [25] S. F. Brenière, E. Waleckx, and C. Barnabé, “Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory,” *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 10, no. 8, Aug. 2016, doi: 10.1371/journal.pntd.0004792.
- [26] J. D. Ramírez *et al.*, “First Report of Human *Trypanosoma cruzi* Infection Attributed to TcBat Genotype,” *Zoonoses and Public Health*, vol. 61, no. 7, pp. 477–479, Nov. 2014, doi: 10.1111/zph.12094.
- [27] L. A. Botero, A. M. Mejía, and O. Triana, “Caracterización biológica y genética de dos clones pertenecientes a los grupos I y II de *Trypanosoma cruzi* de Colombia,” 2007.
- [28] V. Balouz, F. Agüero, and C. A. Buscaglia, “Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps,” *Advances in Parasitology*, vol. 97, pp. 1–45, 2017, doi: 10.1016/bs.apar.2016.10.001.
- [29] J. R. Coura, “The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review,” *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 110, no. 3, pp. 277–282, 2015, doi: 10.1590/0074-0276140362.
- [30] C. Forsyth, S. Meymandi, I. Moss, J. Cone, R. Cohen, and C. Batista, “Proposed multidimensional framework for understanding Chagas disease healthcare barriers in the United States,” *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 13, no. 9. Public Library of Science, 2019. doi: 10.1371/journal.pntd.0007447.
- [31] J. P. Andrade *et al.*, “I Latin American Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chagas’ Heart Disease. Executive Summary,” *Sociedade Brasileira de Cardiologia*,

vol. 96, no. (6), pp. 434–442, 2010, doi: <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2011000600002>.

- [32] M. A. Rossi, S. G. Ramos, and R. B. Bestetti, “Chagas’ heart disease: clinical-pathological correlation,” *Frontiers in Bioscience*, vol. 8, no. 5, pp. e94–109, Jan. 2003, doi: 10.2741/948.
- [33] A. Rassi, A. Rassi, and J. A. Marin-Neto, “Chagas disease,” *The Lancet*, vol. 375, no. 9723, pp. 1388–1402, 2010. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X.
- [34] E. J. Zaidel *et al.*, “COVID-19: Implications for People with Chagas Disease,” *Global Heart*, vol. 15, no. 1, Oct. 2020, doi: 10.5334/gh.891.
- [35] S. P. Montgomery, M. C. Starr, P. T. Cantey, M. S. Edwards, and S. K. Meymandi, “Neglected parasitic infections in the United States: Chagas disease,” *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 90, no. 5, pp. 814–818, 2014, doi: 10.4269/ajtmh.13-0726.
- [36] M. de Villasante Fuentes and P. Hernández Pastor, “El diagnóstico de la enfermedad de Chagas,” *Actualización en Medicina de Familia*, vol. 11, no. 3, pp. 141–145, 2015.
- [37] J. M. Manne, C. S. Snively, J. M. Ramsey, M. O. Salgado, T. Bärnighausen, and M. R. Reich, “Barriers to Treatment Access for Chagas Disease in Mexico,” *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 7, no. 10, 2013, doi: 10.1371/journal.pntd.0002488.
- [38] Coalición Chagas, “La fase III del ensayo clínico de Bayer con nifurtimox demuestra seguridad y eficacia de la nueva formulación para tratar a los niños con la enfermedad de Chagas - News article - Chagas Coalition,” *Coalición Chagas*, 2019. http://www.coalicionchagas.org/news-article/-/asset_publisher/hJnt8AyJM2Af/content/la-fase-iii-del-ensayo-clinico-de-bayer-con-nifurtimox-demuestra-seguridad-y-eficacia-de-la-nueva-formulacion-para-tratar-a-los-ninos-con-la-enferme-1 (accessed Apr. 10, 2021).
- [39] E. Guzmán-Marin, K. Y. Acosta-Viana, and Ma. Jiménez-Coello, “La enfermedad de Chagas: retos del tratamiento,” *Revista Biomédica*, vol. 27, pp. 95–96, Dec. 2016.
- [40] J. A. Castro, M. M. de Mecca, and L. C. Bartel, “Toxic side effects of drugs used to treat Chagas’ disease (American trypanosomiasis),” *Human and Experimental Toxicology*, vol. 25, no. 8, pp. 471–479, Aug. 2006, doi: 10.1191/0960327106het653oa.
- [41] C. Crespillo-Andújar, S. Chamorro-Tojeiro, F. Norman, B. Monge-Maillo, R. López-Vélez, and J. A. Pérez-Molina, “Toxicity of nifurtimox as second-line treatment after benzimidazole intolerance in patients with chronic Chagas disease: when available

options fail,” *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 24, no. 12, pp. 1344.e1-1344.e4, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.cmi.2018.06.006.

- [42] J. Franco, L. Scarone, and M. A. Comini, “Drugs and Drug Resistance in African and American Trypanosomiasis,” in *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, vol. 51, Academic Press Inc., 2018, pp. 97–133. doi: 10.1016/bs.armc.2018.08.003.
- [43] J. Téllez, I. Romero, A. J. Romanha, and M. Steindel, “Drug transporter and oxidative stress gene expression in human macrophages infected with benznidazole-sensitive and naturally benznidazole-resistant *Trypanosoma cruzi* parasites treated with benznidazole,” *Parasites and Vectors*, vol. 12, no. 1, May 2019, doi: 10.1186/s13071-019-3485-9.
- [44] B. S. Hall and S. R. Wilkinson, “Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 56, no. 1, pp. 115–123, Jan. 2012, doi: 10.1128/AAC.05135-11.
- [45] S. K. Ault, “Chagas disease and Neglected Diseases: Challenging poverty and exclusion,” *Organización Panamericana de la Salud y Fundación Mundo Sano*, pp. 13–15, 2007.
- [46] F. Abad-Franch, L. Diotaiuti, R. Gurgel-Gonçalves, and R. E. Gúrtler, “Certifying the interruption of Chagas disease transmission by native vectors: cui bono? ”, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, vol. 108, no. 2, pp. 251–254, Apr. 2013, doi: 10.1590/0074-0276108022013022.
- [47] L. E. Echeverría *et al.*, “WHF IASC roadmap on chagas disease,” *Global Heart*, vol. 15, no. 1, Mar. 2020, doi: 10.5334/GH.484.
- [48] D. L. Fabbro *et al.*, “Trypanocide Treatment of Women Infected with *Trypanosoma cruzi* and Its Effect on Preventing Congenital Chagas,” *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 8, no. 11, 2014, doi: 10.1371/journal.pntd.0003312.
- [49] E. Dumonteil and C. Herrera, “The Case for the Development of a Chagas Disease Vaccine: Why? How? When? ”, *Tropical Medicine and Infectious Disease*, vol. 6, no. 1, p. 16, Jan. 2021, doi: 10.3390/tropicalmed6010016.
- [50] I. Pal-Bhowmick, S. Krishnan, and G. K. Jarori, “Differential susceptibility of *Plasmodium falciparum* versus yeast and mammalian enolases to dissociation into active monomers,” *FEBS Journal*, vol. 274, no. 8, pp. 1932–1945, Apr. 2007, doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05738.x.

- [51] W. qing Li *et al.*, "Immunisation with the glycolytic enzyme enolase confers effective protection against *Candida albicans* infection in mice," *Vaccine*, vol. 29, no. 33, pp. 5526–5533, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.030.
- [52] N. Chen *et al.*, "Ascaris suum enolase is a potential vaccine candidate against ascariasis," *Vaccine*, vol. 30, no. 23, pp. 3478–3482, May 2012, doi: 10.1016/j.vaccine.2012.02.075.
- [53] S. Bergmann, M. Rohde, G. S. Chhatwal, and S. Hammerschmidt, "α-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface," *Molecular Microbiology*, vol. 40, no. 6, pp. 1273–1287, 2001, doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02448.x>.
- [54] A. Carabarin-Lima *et al.*, "In silico approach for the identification of immunological properties of enolase from *Trypanosoma cruzi* and its possible usefulness as vaccine in Chagas disease," *Parasitology Research*, vol. 113, no. 3, pp. 1029–1039, 2014, doi: 10.1007/s00436-013-3737-0.
- [55] A. Diaz-Hernandez *et al.*, "Risk of COVID-19 in Chagas Disease Patients: What Happen with Cardiac Affections?," *Biology*, vol. 10(5), no. 411, May 2021, doi: 10.3390/biology.
- [56] M. Aslett *et al.*, "TriTrypDB: A functional genomic resource for the Trypanosomatidae," *Nucleic Acids Research*, vol. 38, no. SUPPL.1, Oct. 2009, doi: 10.1093/nar/gkp851.
- [57] F. Madeira *et al.*, "The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019," *Nucleic Acids Research*, vol. 47, no. W1, pp. W636–W641, Jul. 2019, doi: 10.1093/nar/gkz268.
- [58] A. M. Waterhouse, J. B. Procter, D. M. A. Martin, M. Clamp, and G. J. Barton, "Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench," *Bioinformatics*, vol. 25, no. 9, pp. 1189–1191, 2009, doi: 10.1093/bioinformatics/btp033.
- [59] A. Waterhouse *et al.*, "SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes," *Nucleic Acids Research*, vol. 46, no. W1, pp. W296–W303, Jul. 2018, doi: 10.1093/nar/gky427.
- [60] H. M. Berman *et al.*, "The Protein Data Bank," 2000. [Online]. Available: <http://www.rcsb.org/pdb/status.html>

- [61] E. F. Pettersen *et al.*, "UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 25, no. 13, pp. 1605–1612, Oct. 2004, doi: 10.1002/jcc.20084.
- [62] V. B. Chen *et al.*, "MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 66, no. 1, pp. 12–21, 2010, doi: 10.1107/S0907444909042073.
- [63] E. Gasteiger *et al.*, *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*. Humana Press, 2005. [Online]. Available: <http://www.expasy.org/tools/>.
- [64] E. Ong *et al.*, "Vaxign2: the second generation of the first Web-based vaccine design program using reverse vaccinology and machine learning," *Nucleic Acids Research*, May 2021, doi: 10.1093/nar/gkab279.
- [65] R. Vita *et al.*, "The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update," *Nucleic Acids Research*, vol. 47, no. D1, pp. D339–D343, 2019, doi: 10.1093/nar/gky1006.
- [66] M. Nielsen, C. Lundegaard, O. Lund, and C. Keşmir, "The role of the proteasome in generating cytotoxic T-cell epitopes: Insights obtained from improved predictions of proteasomal cleavage," *Immunogenetics*, vol. 57, no. 1–2, pp. 33–41, Apr. 2005, doi: 10.1007/s00251-005-0781-7.
- [67] M. C. Jespersen, B. Peters, M. Nielsen, and P. Marcatili, "BepiPred-2.0: Improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes," *Nucleic Acids Research*, vol. 45, no. W1, pp. W24–W29, Jul. 2017, doi: 10.1093/nar/gkx346.
- [68] J. V. Kringelum, C. Lundegaard, O. Lund, and M. Nielsen, "Reliable B Cell Epitope Predictions: Impacts of Method Development and Improved Benchmarking," *PLoS Computational Biology*, vol. 8, no. 12, Dec. 2012, doi: 10.1371/journal.pcbi.1002829.
- [69] Y. Yan, H. Tao, J. He, and S. Y. Huang, "The HDock server for integrated protein–protein docking," *Nature Protocols*, vol. 15, no. 5, pp. 1829–1852, May 2020, doi: 10.1038/s41596-020-0312-x.
- [70] L. C. Xue, J. P. Rodrigues, P. L. Kastiris, A. M. Bonvin, and A. Vangone, "PRODIGY: A web server for predicting the binding affinity of protein-protein complexes," *Bioinformatics*, vol. 32, no. 23, pp. 3676–3678, 2016, doi: 10.1093/bioinformatics/btw514.
- [71] R. A. Laskowski, J. Jabłońska, L. Pravda, R. S. Vařeková, and J. M. Thornton, "PDBsum: Structural summaries of PDB entries," *Protein Science*, vol. 27, no. 1, pp. 129–134, Jan. 2018, doi: 10.1002/pro.3289.

- [72] Z. A. Andrade, "Immunopathology of Chagas Disease," 1999.
- [73] K. M. Bonney, D. J. Luthringer, S. A. Kim, N. J. Garg, and D. M. Engman, "Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Diseases," *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2019, vol. 14, pp. 421–447, 2019, doi: 10.1146/annurev-pathol-020117.
- [74] R. Rappuoli, "Reverse vaccinology," *Current opinion in Microbiology*, vol. 3, no. 5, pp. 445–450, 2000, doi: 10.1016/s1369-5274(00)00119-3.
- [75] V. Pancholi, "Multifunctional α -enolase: its role in diseases," *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 58, pp. 902–920, 2001, doi: 10.1007/pl00000910.
- [76] L. Michel-Todó, P. A. Reche, P. Bigey, M. J. Pinazo, J. Gascón, and J. Alonso-Padilla, "In silico Design of an Epitope-Based Vaccine Ensemble for Chagas Disease," *Frontiers in Immunology*, vol. 10, Nov. 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.02698.
- [77] S. L. Higuera, F. Guhl, and J. David Ramírez, "Identification of Trypanosoma cruzi Discrete Typing Units (DTUs) through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay," *Parasites & Vectors*, vol. 6, no. 112, 2013, doi: 10.1186/1756-3305-6-112.
- [78] G. v. Vedamurthy, H. Ahmad, S. K. Onteru, and V. K. Saxena, "In silico homology modelling and prediction of novel epitopic peptides from P24 protein of Haemonchus contortus," *Gene*, vol. 703, pp. 102–111, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.gene.2019.03.056.
- [79] E. Ong, M. U. Wong, A. Huffman, and Y. He, "COVID-19 Coronavirus Vaccine Design Using Reverse Vaccinology and Machine Learning," *Frontiers in immunology*, vol. 11, p. 1581, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.01581.
- [80] M. T. Khan *et al.*, "Immunoinformatics and molecular dynamics approaches: Next generation vaccine design against West Nile virus," *PLoS ONE*, vol. 16, no. 6 June, Jun. 2021, doi: 10.1371/journal.pone.0253393.
- [81] R. Saha, P. Ghosh, and V. L. S. P. Burra, "Designing a next generation multi-epitope based peptide vaccine candidate against SARS-CoV-2 using computational approaches," *3 Biotech*, vol. 11, no. 2, Feb. 2021, doi: 10.1007/s13205-020-02574-x.
- [82] Z. Zhong *et al.*, "mRNA therapeutics deliver a hopeful message," *Nano Today*, vol. 23. Elsevier B.V., pp. 16–39, Dec. 01, 2018. doi: 10.1016/j.nantod.2018.10.005.
- [83] D. P. Sagili Anthony, K. Sivakumar, P. Venugopal, D. K. Sriram, and M. George, "Can mRNA Vaccines Turn the Tables During the COVID-19 Pandemic? Current Status and

Challenges,” *Clinical Drug Investigation*, vol. 41, no. 6. Adis, pp. 499–509, Jun. 01, 2021. doi: 10.1007/s40261-021-01022-9.

- [84] I. Peixeiro, A. L. Silva, and L. Romão, “Control of human β -globin mRNA stability and its impact on beta-thalassemia phenotype,” *Haematologica*, vol. 96, no. 6, pp. 905–913, Jun. 2011, doi: 10.3324/haematol.2010.039206.
- [85] M. Saadi, A. Karkhah, and H. R. Nouri, “Development of a multi-epitope peptide vaccine inducing robust T cell responses against brucellosis using immunoinformatics based approaches,” *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 51, pp. 227–234, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.meegid.2017.04.009.
- [86] S. Srivastava, M. Kamthania, S. Singh, A. K. Saxena, and N. Sharma, “Structural basis of development of multi-epitope vaccine against middle east respiratory syndrome using in silico approach,” *Infection and Drug Resistance*, vol. 11, pp. 2377–2391, 2018, doi: 10.2147/IDR.S175114.
- [87] J. He *et al.*, “Vaccine design based on 16 epitopes of SARS-CoV-2 spike protein,” *Journal of Medical Virology*, vol. 93, no. 4, pp. 2115–2131, Apr. 2021, doi: 10.1002/jmv.26596.
- [88] E. Dumonteil *et al.*, “Safety and immunogenicity of a recombinant vaccine against *Trypanosoma cruzi* in Rhesus macaques,” *Vaccine*, vol. 38, no. 29, pp. 4584–4591, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.vaccine.2020.05.010.

Anexos

Anexo 1. Secuencias proteicas de Enolasa

>EMBOSS_H8

```
MTIQKVHGREILD SRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHEACELRDDDKRRYLGGKCLNAVKNVNDVL
APALVGKDELQQSTL DKLMRDL DGT PNKSKL GANA I LGCSMAI SKAAAARKGVPLYRYLAELAGTKEVRLPVP
CFNVI NGGKHAGNALPFQEFMIAPVKAGSFTSAAHGAEVYRSLRASSESTQMVNVGDEGGFAPPITDINEPLP
ILMEAI EQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLTFKSPEATWVTAKQLAETYAKWVSEYPIVSLEDPYDQ
DDFDGDFAGITEALKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKTAIEKKACNSLLLKINQIGTITEAIEASKFCMSNGWSVMV
SHRSGETEDTYIADLVVVSX
```

>EMBOSS_Dm28c

```
MTIQKVHGREILD SRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHEACELRDDDKRRYLGGKCLNAVKNVNDVL
APALVGKDELQQSTL DKLMRDL DGT PNKSKL GANA I LGCSMAI SKAAAARKGVPLYRYLAELAGTKEVRLPVP
CFNVI NGGKHAGNALPFQEFMIAPVKAGSFNEALRMGAEVYHSLKSI IKKKYQDAVNVGDEGGFAPPITDIN
EPLPILMEAI EQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLTFKSPEATWVTAKQLAETYAKWVSEYPIVSLED
PYDQDDFDGDFAGITEALKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKMAIEKKACNSLLLKINQIGTITEAIEASKFCMSNGW
SVMVSHRSGETEDTYIADLVVGLGTGQIKTGAPCRGERTAKLNQLLRIEEEELGAHAKFGFPAWS*
```

>EMBOSS_Sylvio

```
MTIQKVHGREILD SRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHEACELRDDDKRRYLGGKCLNAVKNVNDVL
APALVGKDELQQSTL DKLMRDL DGT PNKSKL GANA I LGCSMAI SKAAAARKGVPLYRYLAELAGTKEVRLPVP
CFNVI NGGKHAGNALPFQEFMIAPVKAGSFNEALRMGAEVYHSLKSI IKKKYQDAVNVGDEGGFAPPITDIN
EPLPILMEAI EQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLTFKSPEATWVTAKQLAETYAKWVSEYPIVSLED
PYDQDDFDGDFAGITEALKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKMAIEKKACNSLLLKINQIGTITEAIEASKFCMSNGW
SVMVSHRSGETEDTYIADLVVGLGTGQIKTGAPCRGERTAKLNQLLRIEEEELGAHAKFGFPAWS*
```

>EMBOSS_JRc14

```
MTIQKVHGREILD SRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHEACELRDDDKRRYLGGKCLNAVKNVNDVL
APALVGKDELQQSTL DKLMRDL DGT PNKSKL GANA I LGCSMAI SKAAAARKGVPLYRYLAELAGTKEVRLPVP
CFNVI NGGKHAGNALPFQEFMIAPVKAGSFNEALRMGAEVYHSLKSI IKKKYQDAVNVGDEGGFAPPITDIN
EPLPILMEAI EQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLTFKSPEATWVTAKQLAETYAKWVSEYPIVSLED
PYDQDDFDGDFAGITEALKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKMAIEKKACNSLLLKINQIGTITEAIEASKFCMSNGW
SVMVSHRSGETEDTYIADLVVGLGTGQIKTGAPCRGERTAKLNQLLRIEEEELGAHAKFGFPAWS*
```

>EMBOSS_A4

```
MTIQKVHGREILD SRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHEACELRDDDKRRYLGGKCLNAVKNVNDVL
APALVGKDELQQSTL DKLMRDL DGT PNKSKL GANA I LGCSMAI SKAAAARKGVPLYRYLAELAGTKEVRLPVP
CFNVI NGGKHAGNALPFQEFMIAPVKAGSFNEALRMGAEVYHSLKSI IKKKYQDAVNVGDEGGFAPPITDIN
EPLPILMEAI EQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLTFKSPEATWVTAKQLAETYAKWVSEYPIVSLED
PYDQDDFDGDFAGITEALKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKMAIEKKACNSLLLKINQIGTITEAIEASKFCMSNGW
SVMVSHRSGETEDTYIADLVVGLGTGQIKTGAPCRGERTAKLNQLLRIEEEELGAHAKFGFPAWS*
```

>EMBOSS_YC6

```
MTIQKVHGREILD SRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHEACELRDDDKRRYLGGKCLNAVKNVNDVL
APALVGKDELQQSTL DKLMRDL DGT PNKSKL GANA I LGCSMAI SKAAAARKGVPLYRYLAELAGTKEVRLPVP
CFNVI NGGKHAGNALPFQEFMIAPVKAGSFNEALRMGAEVYHSLKSI IKKKYQDAVNVGDEGGFAPPITDIN
EPLPILMEAI EQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLTFKSPEATWVTAKQLAETYAKWVSEYPIVSLED
PYDQDDFDGDFAGITEALKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKTAIEKKACNSLLLKINQIGTITEAIEASKFCMSNGW
SVMVSHRSGETEDTYIADLVVGLGTGQIKTGAPCRGERTAKLNQLLRIEEEELGAHAKFGFPAWS*
```

>EMBOSS_Esmeraldo

```
MTIQKVHGREILD SRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHEACELRDDDKRRYLGGKCLNAVKNVNDVL
APALVGKDELQQSTL DKLMRDL DGT PNKSKL GANA I LGCSMAI SKAAAARKGVPLYRYLAELAGTKEVRLPVP
```

CFNVIINGGGKHAGNALPFQEFMIAPVKAGSFNEALRMGAEVYHSLKSI IKKKYQDAVNVGDEGGFAPPITDIN
EPLPILMEAIEQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLTFKSPEATWVTAKQLAETYAKWVSEYPIVSLED
PYDQDDFDGDFAGITEALKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKTAIEKKACNSLLLKINQIGTITEAIEASKFCMSNGW
SVMVSHRSGETEDTYIADLVVGLGTGQIKTGAPCRGERTAKLNQLLRIEEEELGAHAKFGFPAWS*

>EMBOSS_Y

MTIQKVHGREILDSRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHEACELRDDDKRRYLGKGCLNAVKNVNDVL
APALVGKDELQQSTLTKLMRDLTGTPNKSKLGNAILGCSMAISKAAAARKGVPLYRYLAELAGTKEVRLPVP
CFNVIINGGGKHAGNALPFQEFMIAPVKAGSFNEALRMGAEVYHSLKSI IKKKYQDAVNVGDEGGFAPPITDIN
EPLPILMEAIEQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLTFKSPEATWVTAKQLAETYAKWVSEYPIVSLED
PYDQDDFDGDFAGITEALKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKMAIEKKACNSLLLKINQIGTITEAIEASKFCMSNGW
SVMVSHRSGETEDTYIADLVVGLGTGQIKTGAPCRGERTAKLNQLLRIEEEELGAHAKFGFPAWS*

>EMBOSS_231

MTIQKVHGREILDSRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHEACELRDDDKRRYLGKGCLNAVKNVNDVL
APALVGKDELQQSTLTKLMRDLTGTPNKSKLGNAILGCSMAISKAAAARKGVPLYRYLAELAGTKEVRLPVP
CFNVIINGGGKHAGNALPFQEFMIAPVKAGSFNEALRMGAEVYHSLKSI IKKKYQDAVNVGDEGGFAPPITDIN
EPLPILMEAIEQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLTFKSPEATWVTAKQLAETYAKWVSEYPIVSLED
PYDQDDFDGDFAGITETLKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKMAIEKKACNSLLLKINQIGTITEAIEASKFCMSNGW
SVMVSHRSGETEDTYIADLVVGLGTGQIKTGAPCRGERTAKLNQLLRIEEEELGAHAKFGFPAWS*

>EMBOSS_2148

MTIQKVHGREILDSRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHEACELRDDDKRRYLGKGCLNAVKNVNDVL
APALVGKDELQQSTLTKLMRDLTGTPNKSKLGNAILGCSMAISKAAAARKGVPLYRYLAELAGTKEVRLPVP
CFNVIINGGGKHAGNALPFQEFMIAPVKAGSFNEALRMGAEVYHSLKSI IKKKYQDAVNVGDEGGFAPPITDIN
EPLPILMEAIEQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLTFKSPEATWVTAKQLAETYAKWVSEYPIVSLED
PYDQDDFDGDFAGITEALKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKMAIEKKACNSLLLKINQIGTITEAIEASKFCMSNGW
SVMVSHRSGETEDTYIADLVVGLGTGQIKTGAPCRGERTAKLNQLLRIEEEELGAHAKFGFPAWS*

>EMBOSS_CLBrenner

MTIQKVHGREILDSRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHEACELRDDDKRRYLGKGCLNAVKNVNDVL
APALVGKDELQQSTLTKLMRDLTGTPNKSKLGNAILGCSMAISKAAAARKGVPLYRYLAELAGTKEVRLPVP
CFNVIINGGGKHAGNALPFQEFMIAPVKAGSFNEALRMGAEVYHSLKSI IKKKYQDAVNVGDEGGFAPPITDIN
EPLPILMEAIEQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLTFKSPEATWVTAKQLAETYAKWVSEYPIVSLED
PYDQDDFDGDFAGITEALKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKTAIEKKACNSLLLKINQIGTITEAIEASKFCMSNGW
SVMVSHRSGETEDTYIADLVVGLGTGQIKTGAPCRGERTAKLNQLLRIEEEELGAHAKFGFPAWS*

>EMBOSS_Nonesmeraldo

MTIQKVHGREILDSRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHEACELRDDDKRRYLGKGCLNAVKNVNDVL
APALVGKDELQQSTLTKLMRDLTGTPNKSKLGNAILGCSMAISKAAAARKGVPLYRYLAELAGTKEVRLPVP
CFNVIINGGGKHAGNALPFQEFMIAPVKAGSFNEALRMGAEVYHSLKSI IKKKYQDAVNVGDEGGFAPPITDIN
EPLPILMEAIEQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLTFKSPEATWVTAKQLAETYAKWVSEYPIVSLED
PYDQDDFDGDFAGITEALKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKTAIEKKACNSLLLKINQIGTITEAIEASKFCMSNGW
SVMVSHRSGETEDTYIADLVVGLGTGQIKTGAPCRGERTAKLNQLLRIEEEELGAHAKFGFPAWS*

>EMBOSS_TCC

MTIQKVHGREILDSRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHEACELRDDDKRRYLGKGCLNAVKNVNDVL
APALVGKDELQQSTLTKLMRDLTGTPNKSKLGNAILGCSMAISKAAAARKGVPLYRYLAELAGTKEVRLPVP
CFNVIINGGGKHAGNALPFQEFMIAPVKAGSFNEALRMGAEVYHSLKSI IKKKYQDAVNVGDEGGFAPPITDIN
EPLPILMEAIEQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLTFKSPEATWVTAKQLAETYAKWVSEYPIVSLED
PYDQDDFDGDFAGITEALKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKTAIEKKACNSLLLKINQIGTITEAIEASKFCMSNGW
SVMVSHRSGETEDTYIADLVVGLGTGQIKTGAPCRGERTAKLNQLLRIEEEELGAHAKFGFPAWS*

>EMBOSS_B7

MTIQKVHGREILDSRGNPTVEVEVTTELGVFRSAVPSGASTGIHEACELRDDDKRRYLGKGCLNAVKNVNDVL
APALVGKDELQQSTLTKLMRDLTGTPNKSKLGNAILGCSMAISKAAAARKGVPLYRYLAELAGTKEVRLPVP
CFNVIINGGGKHAGNALPFQEFMIAPVKAASFSEALRMGAEVYHSLKNI IKKKYQDAVNVGDEGGFAPPITDIN

EPLPILMEAIEQAGHKGRFAICMDAAASETYDENKKQYNLTFKSPPEATWVTAKQLAETYVKWASEYPIVSLED
 PYDQDDDFEGFAGLTEALKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKMAVEKKACNSLLLKINQIGTITEAIEASKFCMANGW
 SVMVSHRSGETEDTYIADLVVGLGSGQIKTGAPCRGERTAKLNQLLRIEEELGAHAKFGFPAWS*

>EMBOSS_Tulacl2

MTIQKVHGREILDSRGNPTVEVEVTTTELGVFRSAVPSGASTGIHEACELRDDDKRRYLGGKCLNAVKNVNDVL
 APALVGKDELQQSTLDKLMRDLDTGTPNKSCLGANAILGCSMAISKAAAARKGVPLRYRLAELAGTKEVRLPVP
 CFNVIINGGKHAGNALPFQEFMIAPVKAGSFNEALRMGAEVYHSLKSIKKKYQDAVNVGDEGGFAPPITDIN
 EPLPILMEAIEQAGHKGRFAICMDSAASETYDENKKQYNLTFKSPPEATWVTAKQLAETYAKWVSEYPIVSLED
 PYDQDDDFDGFAGITEALKGKAQVVGDDLTVTNVSRIKTAIEKKACNSLLLKINQIGTITEAIEASKFCMSNGW
 SVMVSHRSGETEDTYIADLVVGLGTGQIKTGAPCRGERTAKLNQLLRIEEELGAHAKFGFPAWS*

Anexo 2. Esquema de colores Clustal X y composición aminoacídica



Clustal X Default Colouring			
Category	Colour	Residue at position	{ Threshold, Residue group }
Hydrophobic	BLUE	A,I,L,M,F,W,V	{>60%, WLVIAMFCHP}
		C	{>60%, WLVIAMFCHP}
Positive charge	RED	K,R	{>60%,KR}, {>80%, K,R,Q}
Negative charge	MAGENTA	E	{>60%,KR}, {>50%,QE}, {>85%,E,Q,D}
		D	{>60%,KR}, {>85%, K,R,Q}, {>50%,ED}
Polar	GREEN	N	{>50%, N}, {>85%, N,Y}
		Q	{>60%,KR}, {>50%,QE}, {>85%,Q,E,K,R}
		S,T	{>60%, WLVIAMFCHP}, {>50%, TS}, {>85%,S,T}
Cysteines	PINK	C	{>85%, C}
Glycines	ORANGE	G	{>0%, G}
Prolines	YELLOW	P	{>0%, P}
Aromatic	CYAN	H,Y	{>60%, WLVIAMFCHP}, {>85%, W,Y,A,C,P,Q,F,H,I,L,M,V}
Unconserved	WHITE	any / gap	If none of the above criteria are met

Amino acid composition:

Ala (A) 45 10.5%
 Arg (R) 17 4.0%
 Asn (N) 19 4.4%
 Asp (D) 23 5.4%
 Cys (C) 8 1.9%
 Gln (Q) 13 3.0%
 Glu (E) 32 7.5%
 Gly (G) 38 8.9%
 His (H) 7 1.6%
 Ile (I) 25 5.8%
 Leu (L) 36 8.4%
 Lys (K) 33 7.7%
 Met (M) 10 2.3%
 Phe (F) 13 3.0%
 Pro (P) 18 4.2%
 Ser (S) 24 5.6%
 Thr (T) 24 5.6%
 Trp (W) 4 0.9%
 Tyr (Y) 11 2.6%
 Val (V) 29 6.8%
 Pyl (O) 0 0.0%
 Sec (U) 0 0.0%

Review

Risk of COVID-19 in Chagas Disease Patients: What Happen with Cardiac Affectations?

Alejandro Diaz-Hernandez ¹, Maria Cristina Gonzalez-Vazquez ¹, Minerva Arce-Fonseca ², Olivia Rodriguez-Morales ², Maria Lilia Cedillo-Ramirez ¹ and Alejandro Carabarin-Lima ^{1,*}

- ¹ Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 14 Sur y Avenida San Claudio, Ciudad Universitaria, Puebla 72570, Mexico; alexhalo6@hotmail.com (A.D.-H.); crisp333@yahoo.com.mx (M.C.G.-V.); lilia.cedillo@correo.buap.mx (M.L.C.-R.)
- ² Departamento de Biología Molecular, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, Juan Badiano No. 1, Col. Sección XVI, Tlalpan, México City 14080, Mexico; mini_arce@yahoo.com.mx (M.A.-F.); rm.olivia@gmail.com (O.R.-M.)
- * Correspondence: alejandro.carabarin@correo.buap.mx; Tel: +52-222-2295-500 (ext. 3965)



Citation: Diaz-Hernandez, A.; Gonzalez-Vazquez, M.C.; Arce-Fonseca, M.; Rodriguez-Morales, O.; Cedillo-Ramirez, M.L.; Carabarin-Lima, A. Risk of COVID-19 in Chagas Disease Patients: What Happen with Cardiac Affectations? *Biology* **2021**, *10*, 411. <https://doi.org/10.3390/biology10050411>

Academic Editor: Qinxue Hu

Received: 7 April 2021

Accepted: 25 April 2021

Published: 6 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: The SARS-Cov-2 virus appeared as a pandemic at the end of 2019. Since then, the literature on the effects of this disease has been increasing. Chagas disease is more than 110 years old since its discovery, and the implications of these patients when co-infected with SARS-Cov-2 have not been reported. In this review, we summarize the studies to date on the cardiac affectations generated by both diseases in humans, describing their possible interrelation, the damage that coinfection could generate, the analysis of the treatment for both diseases and recommendations to avoid SARS-Cov-2 infection in patients with Chagas disease. This is the first comprehensive review of cardiac disorders that can manifest in chagasic patients as a result of coinfection.

Abstract: Background: Chagas disease is considered a neglected tropical disease. The acute phase of Chagas disease is characterized by several symptoms: fever, fatigue, body aches, headache and cardiopathy's. Chronic phase could be asymptomatic or symptomatic with cardiac compromise. Since the emergence of the pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus, the cardiovascular involvement has been identified as a complication commonly reported in coronavirus disease 2019 (COVID-19). Due to the lack of knowledge of the cardiac affectations that this virus could cause in patients with Chagas disease, the aim of this review is to describe the possible cardiac affectations, as well as the treatment and recommendations that patients with both infections should carry out. Methods: The authors revised the recent and relevant literature concerning the topic and discussed advances and limitations of studies on COVID-19 and their impact in Chagas disease patients, principally with cardiac affectations. Results: There currently exists little information about the consequences that Chagas disease patients can suffer when they are infected with COVID-19. Conclusions: This review highlights the emerging challenges of access to medical care and future research needs in order to understand the implications that co-infections (SARS-CoV-2 or other viruses) can generate in Chagas disease-infected people.

Keywords: Chagas disease; COVID-19; coinfections; cardiopathies; cardiac complications

1. Introduction

Latin America is an endemic region for Chagas disease [1], which is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and represents a complex public health problem due to the lack of vaccines and effective treatments. *T. cruzi* has the ability to affect multiple body organs, such as cardiovascular and digestive systems [2] mainly in adult populations, as well as people with little access to health and a high rate of comorbidities. These effects are very similar for the development of coronavirus disease 2019 (COVID-19), which is caused

by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2) and, since 2019, has spread throughout the world at an alarming rate, bringing many social, economic, epidemiological and health changes.

The first reported case of COVID-19 in Latin America was in São Paulo, Brazil on 25 February 2020 [3]. In Mexico City, it occurred two days later on 27 February [4]. By 2 April 2021, 130,108,655 positive cases and 2,836,363 global deaths had been reported; meanwhile, for Mexico, 2,244,268 positives cases and 203,664 deaths had been reported [5]. This increase in the rate of infection never seen before puts the underestimated population of patients with Chagas disease in Mexico at a clear disadvantage, because it increases considerably the rate of morbidity and mortality. Chagas disease is divided into two phases, acute and chronic, the latter consisting of an asymptomatic stage (formerly called indeterminate) and the symptomatic stage [6] represent an important deterioration to health, which makes the patient more susceptible to infection by the SARS-CoV-2, especially in chronic indeterminate phase due to the patient does not know they have *T. cruzi* infection.

Chagas disease belongs to the group of Neglected Tropical Diseases (NTDs), which tend to disproportionately affect sectors of the population with poor or null access to health, having an impact on early childhood development, pregnancy and worker productivity [7]. In 2018, it was estimated that 52.4 and 9.3 million Mexican people live in moderate and extreme poverty, respectively, and 20.2 million have limited or null access to health services in the country. The Mexican states with the highest rates of moderate poverty are Chiapas, Guerrero, Oaxaca and Veracruz, with 76.4%, 66.5%, 66.4% and 61.4%, respectively [8]. These states represent key regions where there is a greater registry of the vector of Chagas disease, hematophagous bugs belonging to the subfamily Triatominae. Up to 31 vector species are known in Mexico, 19 of epidemiological importance and 13 directly related to *T. cruzi* infections [9].

In Mexico, it is estimated that there are 1.1 to 5.5 million people infected with *T. cruzi* [2,10,11]. Up to the 53rd epidemiological week of 2020, 391 positive cases of Chagas have been registered in Mexico (both acute and chronic forms) [12], and it is estimated that, throughout the country, 30 million people are at risk of contracting the disease due to the fact that Chagas disease is endemic in our country [9].

This combination of poverty, endemicity, vector-prone regions and vulnerable population is the main reason why we analyzed the impact of the COVID-19 pandemic on the Mexican population suffering from Chagas disease.

The objective was to review the main condition of Chagas disease such as Chronic Chagas Cardiomyopathy (CCC) and its relationship with the pathologies caused by COVID-19, as well as the influence of treatment against COVID-19 in patients with Chagas disease, and some recommendations both to prevent the infection and to contend with both diseases.

2. Phases of the Chagas Disease

Chagas disease has a great capacity to spread being transmitted by different routes, either through blood-feeding insects, blood transfusions, organ donation, orally through food and even accidentally with contaminated samples [7]. On the other hand, the main Discrete Typing Unit (DTU) (molecular genotyping that allows to identify particular characteristics of the isolated trypanosomes) of the parasite found in Mexico is the *T. cruzi* I (TcI) [13], which has a marked tropism towards the heart [14], making this organ one of the main anatomical sites that is most affected by the protozoan infection.

Once the parasite is inoculated, the acute phase of the disease occurs, which usually takes 15–40 days; most of these cases are asymptomatic and occur during childhood [15,16]. During this phase, we can observe or not the following signs and symptoms: Inflammation around the inoculation site (chagoma), unilateral palpebral edema (Romaña sign), fever, headache, joint and muscle pain, anorexia, vomiting, diarrhea, drowsiness, apathy, lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, edema and convulsions [17,18]. This whole range of symptoms makes Chagas disease very difficult to diagnose, except for Chagoma and Romaña sign, which are the disease pathognomonic signs. In this phase, deaths usually

occur in 5–10% of infected people, generally from severe myocarditis, meningoencephalitis or both [19].

About 60–70% of those infected do not develop signs or symptoms, which is why they pass directly the indetermined chronic phase. This phase is characterized by a seropositivity of antibodies against *T. cruzi*; a normal 12-lead electrocardiogram and a normal radiology examination of the chest, esophagus and colon [19]. The period of duration for the chronic indeterminate phase can vary from 10–30 years, and even the patient can die derived from other complications and never know that he has had Chagas disease. This is a rather critical phase for the population; since the patient is not aware of the risk that their illness represents, ignorance about their condition also represents a major challenge for the health system: to detect the infection as early as possible. It is believed that, in Mexico, there has been considerable transmission of Chagas disease through blood transfusion and by organ donation due to the lack of regulation for the detection of *T. cruzi* for many years. It was not until the norm NOM-253-SSA1-2012, which dictates mandatory screening of blood donors, was applied that a greater number of cases were detected, and infections were avoided through this route [9].

The remaining 30–40% of those infected with *T. cruzi* will go into the symptomatic chronic phase. Although this is usually the progression followed by a Chagas patient, direct progressions from the acute phase to clinical forms, i.e., cardiomyopathy, megaesophagus, megacolon and cardiodigestive disorders, have been detected in only 5–10% of patients. There is a different epidemiological distribution in the American continent that also makes a difference in the clinical presentations of Chagas disease. The digestive affectations are mainly, but not exclusively, distributed in the South America region (mainly in Argentina, Brazil and Bolivia), and they are found in 10–15% of patients infected in a chronic way. For the pathologies found in Central and North America, there are mainly cardiopathies which develop in 20–30% of the patients, being the most common disorder in Chagas disease [2,6,19]. This variation in pathologies can be explained by a tropism defined by the *T. cruzi* strain, of which the full mechanism is still being elucidated [14].

Acute and Chronic Chagas Cardiomyopathy

It is well-known that the heart is the most frequently affected organ during chronic Chagas disease [20], although cardiac affectations can also be detected in the acute phase. The complexity of the *T. cruzi* life cycle, which involves four distinct morphologically and biochemically well-characterized forms [20], is reflected in the complexity of the infection, which is a pathological condition with many variables including both the parasite and the host and its immune system.

In the acute phase of heart Chagas disease of mammals, the process initiates with the inoculation of the parasite. *T. cruzi* metacyclic trypomastigotes located in the perianal region of the triatomine vector are released in the feces or urine of the vector after feeding on the host's blood. These forms can infect the mammalian host through two routes, by contact with mucosa or by penetrating through localized wounds in the epithelium. Once inside the host, the parasite rapidly invades a wide variety of nucleated mammalian cells, including myocytes, endothelial cells, neurons, fibroblasts and adipocytes. These cells are the ones that reside or are recruited into that tissue next to the wound skin [11,19] (Figure 1).

As previously mentioned, the most common DTU of *T. cruzi* found in Mexico has a marked tropism towards cardiac muscle, specifically to striated cardiac myofibrils. Despite its very rare occurrence (<1%), apparent myocarditis developed during the acute phase has been observed [21], in which myocardial inflammation is similar to those presented by other forms of myocarditis, including those caused by other infectious agents, cardiotoxins and radiation [22]. Once the parasite has infected heart tissue, a fulminant intracardiac replication can occur, with high numbers of amastigote forming amastigote nests, which may lead to myonecrosis, myocytolysis, myofibrils degeneration and intense vasculitis. This will depend largely on the genetic and immunological variants of the parasite and on the host, whose defense system could trigger an intense inflammatory response, which

consists primarily of leukocytes, including eosinophils, lymphocytes, macrophages and mast cells, accompanied by increased expression of inflammatory mediators such as cytokines, chemokines and nitric oxide synthase that also complement activation, antibody production and opsonization [20,22,23]. As the disease continues its course, leaving the acute phase and also giving rise to the adaptive immunity, the number of parasitized cells and the inflammatory response decrease considerably, bringing the myocardial tissue to a near-normal state and leaving possible abnormalities such as scarring (interstitial fibrosis), myofiber hypertrophy and continuous minimal inflammation [21]; the whole process usually takes two to four months [20]. In general terms, the characteristics of the acute-phase Chagas cardiomyopathy can range from minimal changes in the heart muscle to dilation of the atria and ventricles in the most severe cases (cardiomegaly); there may also be bundle branch block, diffuse changes of segment ST and T wave, prolonged PR interval and sinus tachycardia [22].

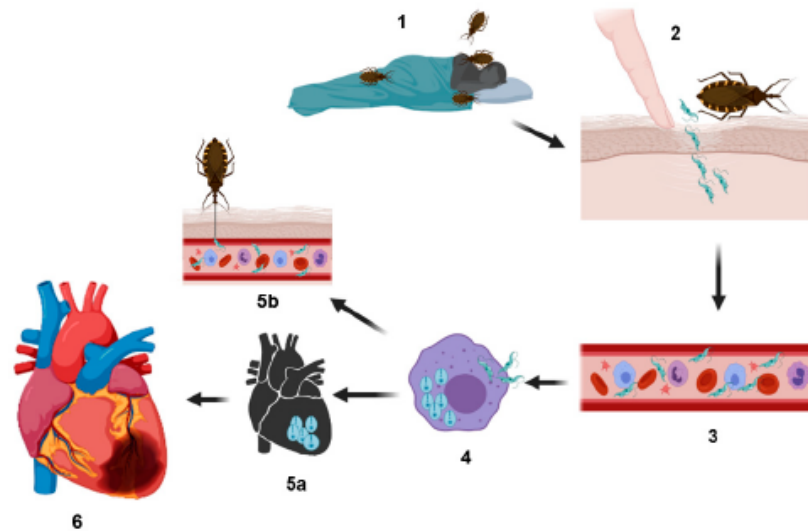


Figure 1. Representation of the biological cycle of *Trypanosoma cruzi*. Infection is generated when hematophagous bugs reach a mammalian host to feed (1), infected bug feces (containing the parasite in their form as metacyclic trypomastigotes) are released on the skin (near the bite wound) or in the mucosa of the host. Through micro-wounds caused by scratching excessive or by mucosa route, the parasite reaches the bloodstream (2 and 3) and invades different types of nucleated cells (4) (phagocytic and nonphagocytic). The parasitophorous vacuole is formed inside the infected cells to eliminate the parasite; however, *T. cruzi* trypomastigotes escape this vacuole and differentiate in amastigotes, which are the replicative forms of the parasite in the mammalian host. After several rounds of replication in the cytosol, the amastigotes differentiate into trypomastigotes, and then, the infected cells burst, and the parasites are subsequently released into the bloodstream where they can disseminate to several tissues, mainly the heart, colonizing the cardiac cells and forming the so-called amastigote nests (5a), or they can reinvade the blood cells. Finally, the circulating forms can be taken up by a new triatomine vector during a blood meal, and this vector can infect to another healthy host (5b). In other hand, cardiac affectations can be observed in the acute phase or in the chronic phase; these affectations can be in different degrees of severity (6) (see text) culminating in a heart attack, which can cause the death of the host.

The next step in the course of the disease is chronicity, where the CCC is developed. While this review focuses mainly on heart disorders, it is important to remember that there is another relevant chronic disorder, digestive, which is not so common in Mexico. In chronic phase, many people can live their whole life without any symptoms, most of them without knowing about their infection that probably happened in their childhood.

Once the infection has been present for a few decades, a slow process of inflammation and scarring of the myocardium begins, leading to general changes of heart morphology in approximately 20–30% of infected individuals [21]. These patients may or may not present ventricular failure, a process that is currently classified into five stages according to international recommendations based on ventricular dysfunction [22]. In stage A, which is the only within the chronic indeterminate form, positive serology for Chagas is detected, but no structural heart disease, neither symptoms of heart failure, the electrocardiogram and X-ray are both normal. The stage B includes patients with structural heart disease but who have never had signs or symptoms of heart failure; this phase is divided into two: B1, patients with abnormalities in the electrocardiogram or echocardiography but still without ventricular dysfunction or heart failure, and B2, also with structural heart disease, without signs or symptoms of heart failure, but with a global ventricular dysfunction. Stage C is characterized by ventricular dysfunction and signs or symptoms of heart failure. Finally, stage D encompasses advanced heart failure at rest, despite optimal medical treatment and will therefore require specialized interventions [17,22]. Hearts of patients with chronic Chagas disease are usually fully enlarged, with a dilation of the chamber that predominates over hypertrophy, giving a globular shape; in approximately half of the people who develop chronic disease, the heart shows an unusual thinning of the ventricular wall, which protrudes in the form of an aneurysm [20]. The most frequent and general pathological features of the CCC include low-grade myocarditis associated with myocytolysis, myofiber hypertrophy and interstitial fibrosis [18]. In contrast to the acute phase, in the chronic phase usually only focal areas of inflammation are found that are mainly composed of T cells and macrophages, with a few eosinophils, plasma cells and mast cells; moreover, parasites are rarely observed by conventional microscopic analysis of cardiac biopsy samples [21]. In the final stage of this phase, after suffering severe damage, some patients may need a heart transplantation. The first transplant to end-stage CCC patient was performed in 1985 at the Heart Institute in São Paulo, Brazil [24]. Although initially, it seems that a transplant would resolve the cardiac damage by *T. cruzi*, the risk of reactivation is quite high and common. The reactivation phenomenon, reported in the early 1960s, occurs mainly in patients who are under cellular suppression, either by whole-body irradiation, hematological malignancies, chemotherapy and immunologically compromised, such as those coinfecting with the Human Immunodeficiency Virus (HIV) [24]. The most frequent clinical manifestations in Chagas disease reactivation are usually meningitis, encephalitis [24], myocarditis, inflammatory panniculitis, skin nodules and even fever, signs and symptoms that lead to allograft dysfunction and probably to a rapid onset of heart failure [25]. Reported rates of reactivation in heart transplant recipients with chronic Chagas disease in Latin America vary widely from 20–90%, and the time from transplantation until reactivation of Chagas disease ranges from 11 to 23 weeks [25,26].

According to the most conservative estimations, in Mexico, there are 1.1 million people infected by *T. cruzi*, both in the acute and chronic phases. Since 2017, the Mexican government has registered both acute and chronic cases in SINAVE Epidemiological Bulletin [12]. However, these reported cases are below the predicted estimates. On the other hand, there is no correlation of heart diseases associated with Chagas disease in its acute and chronic forms, so the estimates indicate that a high percentage of these heart diseases have an origin associated with Chagas disease (Figure 2), and although there are no official data in Mexico, presumptively, some authors have predicted the percentage of cardiac affectations due to Chagas disease, with an approximate of <1% of cardiomyopathies derived from infection in the acute phase [21] and $25\% \pm 5\%$ in the chronic phase [19]. It is important to consider that the asymptomatic chronic phase contributes with more cases that are not identified or recorded, and therefore, it is possible that the total data of *T. cruzi* infections are underestimated.

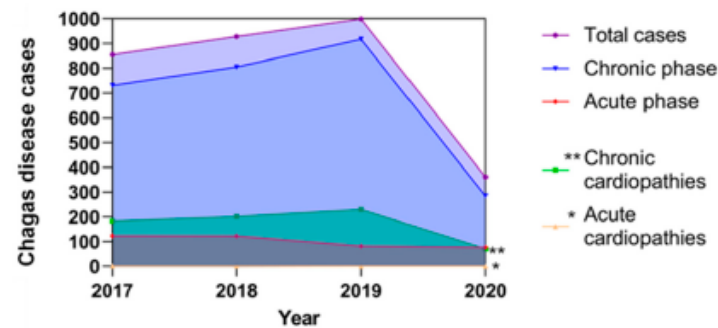


Figure 2. Reported cases of Chagas disease in Mexico and their possible correlations with cardiopathies from the period 2017–2020.

The figure represents the total reported *T. cruzi* infections in both acute and chronic phases; these data are based on the epidemiological bulletins published by the Ministry of Health in Mexico [12], as well as estimated cardiopathies related to Chagas disease that were predicted according to that described by Rassi et al. 2010 [19] and Bonney et al. 2019 [21], who propose that the prevalence of cardiopathies associated with Chagas disease corresponds to 25% in the chronic phase and less than 1% in the acute phase of the total of reported cases, respectively. The estimated cases of cardiopathies in the chronic phase are represented by double asterisks and with an asterisk the estimated cases of cardiopathies in the acute phase of Chagas disease.

3. Cardiac Implications, Patients with COVID-19 and Chagas Disease

Cardiac implications in Chagas disease were explained in previous sections, but as far as COVID-19 is concerned, the information is still in its infancy. One of the most studied processes of SARS CoV-2 infection so far is the binding to the human receptor angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), which is mainly expressed in the lungs, vascular endothelium and heart [27].

The general infection process starts primarily with the spike (S) protein protruding from the viral surface, and it is composed of homotrimers consisting of two subunits S1/S2, where S1 contains the receptor-binding domain (RBD), and it is responsible for binding to host cell surface receptors, mainly ACE2 [28,29]. After this binding, the S protein is cleaved at its polybasic site, mainly by the cell surface-associated transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2) but, also, through the cellular cathepsin L, thus activating the S2 subunit, which mediates the fusion between the viral and host cellular membranes. Cathepsin L then activates the remaining S protein into the endosomes and can compensate the entry in cells lacking TMPRSS2 [29,30]. Once the genome is released into the cytosol, open reading frames 1a and 1b (ORF1a and ORF1b) are translated into viral replicase proteins, which are cleaved into nonstructural proteins by the action of host and viral papain-like proteases; these proteins constitute RNA-dependent RNA polymerase. Then, the replicase components rearrange the endoplasmic reticulum into double-membrane vesicles that facilitate viral replication of genomic and sub-genomic RNAs; the latter are translated into accessory and viral structural proteins that facilitate virus particle formation. Finally, subsequent positive-sense RNA genomes are incorporated into new synthesized virions that are secreted from the plasma membrane [29,31,32].

The general symptoms of COVID-19 are similar to those caused by SARS-CoV [33] and the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) [28,34]; however, SARS CoV-2 infection has a relatively lower fatality rate with ~2%; about 20% of patients develop multiple severe conditions such as acute respiratory distress syndrome and multiple organ failure [35], and 23% of patients in serious conditions have heart damage [36]. Although this is current information and is constantly updated based on studies and scientific contributions, as well as new mutants of the virus that may or may not have a

significant impact on its pathogenesis, it is very likely that the main damage to heart tissue caused by SARS CoV-2 infection is based on binding to the ACE2 receptor found in type 2 pneumocytes, macrophages and cardiomyocytes, as well as perivascular pericytes [37] that seem to express more of this receptor; these cells are located outside the endothelial wall of the capillary and part of the venules. Pericytes can play an essential role in myocardial microcirculation [34], since the binding of the virus to the ACE2 receptor could trigger an inflammatory response that, in turn, can lead to myocardial dysfunction and damage, dysfunction endothelial disease, microvascular dysfunction, plaque instability and myocardial infarction [38]. Thus, the immune status caused by COVID-19 could act as a possible trigger for the progression of Chagas disease, perhaps influenced by certain parasitic factors, such as the type of strains, the parasite load and the presence of the parasite circulating in the bloodstream, as well as host factors, such as genetic susceptibility and immune status, specifically gamma-IFN [37]. There is also the possibility that even though parasitemia is absent (i.e., the chronic form), it could be reactivated due to pharmacological and disease-induced immunosuppression [39]. This potential reactivation could be caused by a severe disease similar to hemophagocytic lymphohistiocytosis (cytokine storm) during the initial immune response [40], in which there is cytokines and chemokines (IL-6, TNF-alpha and CXCL 10) production frequently related to the inflammatory immune response stimulated in CCC pathogenesis [41,42]. This condition can also be due to the presence of some viruses [43] or even the use of some COVID-19 treatments such as steroids [44], hydroxychloroquine and other immunomodulatory drugs, mainly interleukins inhibitors, which have been associated with the progression of Chagas disease [37,45]. Another important issue is the manifestation of arrhythmias, increasingly detected in COVID-19 patients [38], probably caused by proinflammatory cytokines and T-lymphocyte cardiotropism, believed to arise from the interaction between heart-produced hepatocyte growth factor and the c-Met, a receptor on naive T lymphocytes [46]. Although the pathophysiology of these arrhythmias is not entirely clear, if left unchecked, they can lead to fulminant heart failure and cardiogenic shock, which is thought to be dependent of the stage of myocardial injury and the production of proinflammatory cytokines [47] both conditions present in the CCC.

Another important aspect to consider during cardiopathies and their severity in Chagas disease is the levels of the ACE2 receptor, since some studies directly correlate with them [48,49]. Injuries such as heart failure are characterized by the activation of peptide systems, such as the renin-angiotensin system (RAS) and, particularly, the B-type natriuretic peptide (BNP) systems, as well as atrial natriuretic peptide (ANP) [48]. BNP and ANP act as potent molecular markers in patients with Chagas disease and other types of dilated cardiomyopathies. RAS acts as a master regulator for blood pressure, volume and electrolyte homeostasis. One of the components of this system is the ACE2 receptor, which is not only expressed in organs but, also, in blood vessels [48,50]; some studies have demonstrated the solubility of ACE2 in plasma, showing a significant increase in patients with heart failure and a correlation with the degree of severity of the disease [51], giving better results as a biomarker in the diagnosis and prognosis of patients with Chagas disease by independent or combined detection with BNP or ANP. Studies in chagasic patients with systolic dysfunction have shown a slight increase in ACE2 levels compared to healthy individuals; however, these levels were significantly increased in sera from patients who already had more serious clinical manifestations of heart failure, giving the ACE2 receptor an important predictive value for the necessity of cardiac transplantation and mortality rate in patients with chronic Chagas disease [48,49]. This correlation between the severity of cardiac damage and the increase in the level of ACE2 can be explained by the regulatory role of this receptor in cardiac function and remodeling, both being commonly affected by the presence of the parasite. Additionally, although ACE2 is usually an integral membrane protein, some studies show that it can be cleaved by a protease to be released into the blood serum [52]. Other studies show that blocking the production or inhibiting the effects of Angiotensin II (Ang II) could block or delay cardiac remodeling, reducing mortality and morbidity, as demonstrated experimentally by the exogenous addition of the vasodilator

Ang (1–7), which improved cardiac function after myocardial infarction [49,53]. Some beta-blockers, such as Carvedilol and Metoprolol, have been shown to inhibit the RAS, thereby reducing natriuretic peptides and improving systolic ventricular function in patients with chronic heart affectations [54]. The use of these beta-blockers could also reduce ACE2 activity, thus preventing the correlation of ACE2 activity and cardiac remodeling that reflects the severity of heart disease [49]. These results could be guiding and encouraging as an option in the treatment of patients with both diseases; however, a more detailed investigation is needed.

The ACE2 receptor plays a crucial role during infection and pathogenesis with *T. cruzi*, since increased levels of this receptor in the blood serum are significantly correlated with cardiac damage and remodeling. Therefore, this increase would present an ideal environment for infection by SARS CoV-2, since, as mentioned earlier in the text, this receptor is also key for the entry of the virus into cells and its consequent infection. This leads to projecting an alarming scenario for patients with Chagas disease who are in the chronic phase with both symptomatic and asymptomatic characteristics, and therefore, they are also highly susceptible to coinfections with SARS-CoV-2, which can result in an increase in mortality and morbidity.

It is important to identify the clinical characteristics of Chagas disease and COVID-19 (Table 1), take prophylactic measures towards patients at risk and contribute to the knowledge in medicine and current treatments focused on patients with CCA in order to avoid the possible complications that the association of both diseases entails. It should be taken into consideration that Chagas disease is classified as an NTD, and COVID-19 is a new disease under constant study, so it is important to contribute and increase reliable and recent data for both diseases.

Table 1. Clinical features on cardiac affectations due to COVID-19 and Chagas disease.

COVID-19	Chagas Disease
Rhythm abnormalities: supraventricular and ventricular tachyarrhythmias, bradyarrhythmias and chest pain or chest tightness on exertion [47].	Rhythm abnormalities: bradyarrhythmias and conduction system abnormalities and atrial/ventricular tachyarrhythmias [55].
Electrocardiogram abnormalities: QT prolongation, pseudo infarct pattern and premature ventricular complexes. Development of cardiac arrest and variations in the myocardial enzyme level [30,47,56].	Primary ST- and T-wave abnormalities, pathological Q waves or electric inactive areas [55]. Segmental/global wall motion abnormalities, dilated cardiomyopathy and function mitral/tricuspid regurgitation [21,55].
Acute coronary syndrome, venous thromboembolism and elevated levels of troponin T (>0.022 ng/mL) [57].	Aneurysms: left ventricular apical, other left ventricular segments (inferior and inferolateral walls) and uncommonly right ventricular [55].
Capillary endothelial cells dysfunction and induced micro-circulation disorder [34].	Thromboembolic events: ischemic attack or stroke, pulmonary or systemic emboli [22].
Pericardial inflammation, microvascular ischemia (through pericytes) and myocardial edema/scar (nonischemic) [47].	Microvascular abnormalities: precordial/retrosternal chest pain without evidence of epicardial coronary artery disease [22].
Prolonged myocardial inflammation and disseminated intravascular coagulation [31].	Myocardial scar/interstitial fibrosis and pericarditis [18,22].
Heart failure, including raised jugular venous pressure, peripheral edema and right upper quadrant pain [38]. Cardiac dysfunction and normal/acute injury [44].	Myocardial micronecrosis [18].
Myocarditis and fulminant myocarditis with presence of febrile and low pulse pressure, cold or mottled extremities, and sinus tachycardia [47]. Proinflammatory cytokines production (IL-6 and TNF-alpha) and high levels of creatinine kinase (>200 U/L) [34,38].	Myocarditis associated with myocytolysis, myofiber hypertrophy and cardiac remodeling, resulting in a fully enlarged heart [18,21].

4. Potential Risk of Heart Damage in Population with Chagas Disease or Other Comorbidities in the COVID-19 Pandemic

A high percentage of the Mexican population is at risk of developing health complications, since the COVID-19 pandemic has proven to be nondiscriminatory and to affect practically all sectors of the population in this country, with 1.4 million cases in 2020 [12]. In addition to this situation, the following factors can be added: (i) Mexico is the country with the highest rate of obesity in people over 15 years of age of the 37 member countries

of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), with 73% of the population being overweight and 34% of them suffering from morbid obesity, reducing life expectancy by 4.2 years [58]; (ii) a growing elderly population with approximately 8.2% of the population over 65 years of age [59]; (iii) an annual 24% of deaths are caused by cardiovascular diseases, which may be related to the fact that 17% of the Mexican population smokes and 22.8% suffers from hypertension [60] (iv) and an estimated 30 million people are at risk of developing Chagas disease [9]. All these factors make the Mexican population highly susceptible to increasing the mortality rate in COVID-19 from 2.2% worldwide to 8.5% [5], mainly among the most vulnerable population, adults over 41 years old with the aforementioned comorbidities or with harmful habits to the health such as smoking or sedentary lifestyle [61]; also, in our country there are regions with extreme poverty [62] or no access to healthcare, even more so in the context of an insufficient health system, where it is complicated to provide the population with high quality health care.

In this context, it is difficult to estimate the total number of people at risk of contracting both diseases; however, it is not difficult to imagine that Mexican society is very susceptible, due to all these conditions that propitiate an ideal scenario for the increase of mortality and morbidity in the population, which translates into a direct impact towards the most vulnerable sectors and high economic costs in health for the government.

5. Influence of COVID-19 Treatment in Patients with Chagas Disease

Currently, there are only two drugs approved for the treatment of Chagas disease, Nifurtimox and Benznidazole, which are based on the indirect inhibition of DNA, RNA and protein synthesis due to oxidative damage by the releasing of reactive oxygen species, resulting from the reaction of oxygen with unstable nitroanion metabolites, leading to the inactivation of enzymes and destruction of the parasite [63]. Although the mechanism of both drugs is not completely elucidated, it should be considered that both are highly hepatotoxic and genotoxic; additionally, these drugs are only highly effective in patients during the acute phase; as the disease progresses towards chronicity, their effectiveness decreases drastically [64,65]. Due to the damage derived from treatments with these drugs, it is necessary to consider the possible interactions that may exist with current COVID-19 treatments and the potential health effects in infected patients.

Unfortunately, the antiparasitic drugs are not useful in the chronic phase, and their cure rate is highly variable, which usually does not reach 10%, and also produces a significant number of side effects. In Mexico, the medical care of patients with CCC has two aspects, those patients who are admitted to a cardiology referral center in conditions that are controllable through the outpatient consultation and remain in this service, with a hospital internment; and those with decompensated and disabling heart failure, who require intensive care to stabilize them, and in whom the follow-up after the hospital stay must be closer [66]. Some patients with CCC are treated with palliative medications to help cope with the symptoms of cardiac involvement, or they are candidates for the implantation of cardioverter defibrillators for the primary and secondary prevention of sudden death in this vulnerable population; however, its effectiveness is controversial due to the possible triggering of ventricular arrhythmic storms [67]. Therefore, the consideration that must be taken is also towards the possible interactions that may exist with current treatments against SARS-CoV-2 and palliative treatments or procedures for patients with chronic phase Chagas disease; such treatments are not exactly trypanocidal drugs.

The management of both infections is of vital care and should be further studied in depth, especially for COVID-19, through constant updates of data, effects caused by both treatments and continuous contributions from experts in the field; therefore, we suggested taking into account and following the guidelines made by Zaidel E.J. et al. [37], who explained in detail the aspects of etiological treatment and provided recommendations for Chagas disease in the context of COVID-19 coinfection. They highlight the importance of postponing the start of treatment against Chagas disease in indeterminate and chronic stages, especially if there is a COVID-19 coinfection that presents symptoms or is under

treatment with immunosuppressive drugs; only if the patient is asymptomatic positive and currently has initiated antiparasitic treatment for Chagas disease it is recommended to continue with it. In the acute stage of Chagas disease, the situation is more complex, since this is the ideal period for treatment and elimination of the parasite, either with Nifurtimox or Benznidazole, and it is recommended to start treatment even if there is a COVID-19 coinfection, with or without symptoms. As for the reactivation status in patients with Chagas disease, it is recommended to start treatment, even if there is a coinfection with or without symptoms, since it is also a short and critical period for the elimination of the parasite. It is important to consider that priority is given to the treatment of COVID-19, mainly because of the intensity and damage that it can cause in some patients in a very short time, whether cardiac, pulmonary or generalized; unlike Chagas disease, which, with the exception of the acute phase, usually presents very prolonged periods of affectation, reaching chronicity [37].

As we have already mentioned, cardiac muscle damage is a common feature of both diseases, which can be better understood by examining these alterations and their effects on the immune system, such as TNF-alpha and IL-6 levels, as markers of cardiac inflammation caused by both diseases and, also, the serum levels of atrial natriuretic peptides, and the ACE2 receptor levels, which is the main entry pathway for SARS CoV-2 [7,68]; the observation of these pathways in common is fundamental, since there are, for example, medications to treat CCC that inhibit or block the ACE2 receptor [37], and although there is no experimental scientific evidence of direct interactions, they should be taken into account in patients with these comorbidities. Other drugs to take into consideration in CCA are those with an immunosuppressive effect, mainly due to the immunological environment that, in infected patients, could lead to a reactivation of parasitemia, a better environment for disease and a higher probability of cardiac damage, such as: azithromycin, chloroquine, hydroxychloroquine, ribavirin, ivermectin, cyclosporin A, sirolimus, colchicine, ritonavir and lopinavir [28,43,69]. Although interactions may or may not exist, special emphasis is recommended to monitor these treatments in order not to adversely affect the patient's health.

6. Recommendations for the Prevention of Chagas Disease and COVID-19

Several factors contribute to the development of Chagas disease in Latin America and Mexico; some of them are globalization, old age, poverty, limited access to healthcare, lack of knowledge of the disease and basic hygiene practices, congenital/oral transmission and underreporting [70]. However, there are prophylactic measures that are available to the whole population that could prevent the spread of this disease; these include: vector control measures, such as systematic pesticide applications in domestic and peri-domestic areas [71]; constant improvements in houses made of natural materials, such as mud, adobe or straw, which serve as natural reservoirs for triatomines; increased political and community commitment to the development and implementation of programs for the prevention, control and eradication of vectors, as well as opportune reports of infection and transmissibility among endemic or high incidence communities [43]; the strengthening of health systems for the opportune detection of Chagas disease in acute and chronic patients, as well as access to treatment if necessary; screening for Chagas disease in blood banks and in those patients who undergo organ transplants to avoid transmission through these routes, in accordance with the mandatory NOM-253-SSA1-2012 regulation [9]; universal serological screening in women of childbearing age and antiparasitic treatment before pregnancy in infected women, since it has proven effective in decreasing congenital transmission for future pregnancies [72]; health promotion campaigns to raise awareness of the disease in the general population and, particularly, in regions of high incidence and recommendations on the safe handling of food and proper hygiene before ingestion to avoid oral transmission, which, although uncommon, exists a latent risk of being infected through the feces of the triatomines [15].

In terms of prevention for COVID-19, the information is recent and constantly updated; however, there are simple and effective measures that are available to everyone that can

help to curb the massive spread and, therefore, the pandemic. Some of these are: hand washing for 20 s or use of hand sanitizer before putting on the mask and constantly after touching objects and surfaces of common use; the mandatory use of a mask in people older than two years—adjust the mask correctly ensuring to cover the nose, mouth and chin; stay at least two meters away from other people who do not live with you, in addition to using masks all the time; avoid crowds and contact with people presenting symptoms; stay at home whenever possible and go out only if it is strictly necessary, always wearing a mask; avoid poorly ventilated spaces such as bars, gyms or restaurants, as these increase the possibility of catching the virus through the air; avoid shaking hands or hugs; cover coughs or sneezes with a tissue or inside the elbow; after throwing away the tissue, wash hands immediately for 20 s or disinfect with sanitizer; constantly clean and disinfect commonly used surfaces with soap and then with disinfectants or sanitizers, always being careful not to mix them to avoid intoxication or accidents; monitor your health constantly—be alert to possible symptoms, and in case of them, go immediately to a doctor; check signs such as oxygenation and temperature if it is possible and, finally, try to maintain a healthy nutritional, physical and mental lifestyle. Although many of these measures have proven to be highly effective and simple to implement, some sectors of the population around the world have not followed them, which has contributed to the rapid spread of the virus, increasing the mortality and morbidity rates in Mexico and the world [73–75]. Additionally, there is great evidence in the literature that vitamin D is beneficial for the proper functioning of the immune system by fighting pathogens and preventing autoimmune diseases. At this time of the pandemic, until July 2020, there were 21 ongoing Vitamin D clinical trials for COVID-19 with detailed information showing that it is highly favorable, while there is currently no specific therapy for COVID-19 available [76] for the entire Mexican population.

Taking the corresponding measures for these diseases has a fairly good cost–benefit ratio, since they can avoid many complications, as they can be carried out by practically the entire population, and although they cannot guarantee not contracting the disease, they are very effective reducing the risk of acquiring them, either in people who suffer from any of them or none at all. Therefore, it is important to know and be aware of all the actions available and the impact they can have to prevent or reduce both diseases in oneself and in society in general.

7. Conclusions and Perspectives

Historically, Chagas disease has been a neglected tropical disease, and the lack of a characteristic clinical symptomatology does not allow its identification, and therefore, its registration in the acute phase is underestimated. In addition, in the chronic phase, in which patients can develop the affectations known as megas, including chronic Chagasic cardiopathy, it is of vital importance for health agencies in each country and in Mexico to carry out identification and registration in order to understand the situation and to establish appropriate measures to reduce the risks associated with this disease and, especially, to determine how to act in the case of patients with chronic Chagas disease and who may have other comorbidities or coinfections, such as with SARS-CoV-2.

On the other hand, the current COVID-19 pandemic has brought serious consequences for the general population; however, there are no studies on how this pandemic has affected patients with Chagas disease and, moreover, with cardiac involvement that can range from moderate to severe, with the presence of the SARS-CoV-2 virus, where these conditions can be a major trigger to cause death. There are also few studies on the impact that the current treatment has on the COVID-19 disease and how it might impact patients with Chagas disease. Therefore, it is important that several research groups worldwide could evaluate these patients with coinfections and, thus, have conclusive data that allow an adequate management of patients with Chagas disease, as, from now on, SARS-CoV-2 or other viruses will be pathogens with which the entire world population will coexist.

Author Contributions: Conceptualization, A.D.-H. and A.C.-L.; formal analysis, M.C.G.-V.; investigation, A.D.-H., M.C.G.-V. and M.L.C.-R.; writing—original draft preparation, A.D.-H. and A.C.-L.; writing—review and editing, M.L.C.-R., M.A.-F. and O.R.-M.; supervision, M.A.-F. and O.R.-M.; project administration, M.C.G.-V. and funding acquisition, M.L.C.-R. and A.C.-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla to M.L.C.-R. and A.C.-L.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available upon request from the corresponding authors.

Acknowledgments: A.D.-H. is thankful to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for their postgraduate scholarships (989374).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Anexo 4. Congresos donde fue presentado este trabajo

1. IV Coloquio Internacional de Investigaciones Universitarias, de la Universidad de Guadalajara, con la investigación titulada: Diseño *in silico* de una vacuna basada en epítopes contra la enfermedad de Chagas, el 5 de diciembre del 2020.
2. 8th International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (IMED), con el trabajo titulado: Evaluation of the Immunogenic Properties of *Trypanosoma cruzi* Consensus Enolase Using a Bioinformatics Approach, presentado del 4-6 de noviembre del 2021. Este trabajo fue seleccionado para publicarse como Suplemento en la revista IJID (*International Journal of Infectious Diseases*) a inicios del 2022.