



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN INMUNOGÉNICA DE PROTEÍNAS CON ALTA HOMOLOGÍA ESTRUCTURAL PARA APLICACIÓN COMO INMUNOSENSOR DIAGNÓSTICO Y SU ABORDAJE VACUNAL CONTRA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Tesis para obtener el título de:
Licenciado en Biotecnología

Presenta:

C. Alan Ruiz Santiago

Directora de tesis:

Dra. Alia Méndez Albores

Co-director de tesis:

Dr. Alejandro Carabarin Lima

Puebla, Pue.

Mayo 2024

Agradecimientos personales

A mi madre, Pilar, a quien amo con todo mi ser, gracias por ser pieza fundamental en mi desarrollo y empujarme más allá de mis límites. Gracias por exigirme más de lo que puedo dar. Sin ti, sin tu apoyo y sin tu confianza no sería la persona que soy ahora. A pesar de los momentos críticos que hemos pasado, siempre estaré orgulloso de llevar tu nombre y tu sangre, mientras estés a mi lado nada me faltará.

A mi tía María Felix, que siempre ha estado presente, compartiendo su ciencia, historia de la familia y su gran sabiduría.

A mi tía Mary, por su confianza y sabiduría al empezar la siguiente etapa de mi vida.

A mi tía Lulú. Tía, siempre has apoyado mi crecimiento y estaré siempre en deuda contigo.

A mi tío Isaías, quién me dió trabajo permitiéndome así concluir mi tesis, ganando experiencia y visión laboral. Sin ti mi visión no sería la misma, gracias por darme tu ejemplo y la oportunidad de incluirme.

A mi perro Fotón, quien ha sido un fiel acompañante en los momentos más críticos de mi tesis, de mi futuro y de mi vida.

A mis primos César, Rodrigo y Edu, amigos que conozco desde pequeños. Amigos, ustedes siempre serán mis amigos.

A mi papá, David, quien no presente, estoy seguro que se sentiría muy orgulloso.

Al D.C. Carabarán Lima, al permitirme trabajar un tema que me apasionó tanto y el cual sentí mucha gratitud. Gracias por depositar su confianza en mí y por abrirme las puertas de su laboratorio el cual me permitió desarrollar muchas habilidades. Gracias por estar al pendiente y resolver las dudas cuando se necesitaba.

A todos mis profesores de la carrera, sin duda son un importante escalón que te impulsó a alcanzar lo que quieres.

A mí.

Agradecimientos Institucionales

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por ser la principal institución a la que le debo mi desarrollo universitario y la oportunidad de desarrollarme dentro de un laboratorio.

A la Facultad de Ciencias Biológicas por contar con los docentes, las aulas y el equipo necesario para desarrollar la carrera en Biotecnología.

A mi madre:

Ma, te debo todo lo que soy

“Bueno, algo me va a pasar que no se que va a ser
Y uh, harías eso y saldrías de eso y dirías
Vaya, eso estuvo muy cerca, ¿no?
Entonces te volverías cada vez más aventurero,
Y harías más y más apuestas en cuanto a
lo que soñarías
Y finalmente soñarías
Donde estás ahora.”

- Alan Watts

Contenido

Índice de tablas	8
Índice de figuras	9
Resumen	12
1. Introducción	13
1.1. Etiología	18
1.2. Fases de la enfermedad	20
1.3. Tratamiento	21
1.4. Diagnóstico en fase aguda	22
1.4.1. Métodos directos	22
1.4.2. Biosensores	23
1.5. Pruebas de diagnóstico rápido	26
1.6. Panorama epidemiológico de la enfermedad de Chagas en México	28
1.7. Justificación	30
1.8. Hipótesis	31
1.9. Objetivo General	31
1.10. Objetivos específicos	31
2. Materiales y métodos	32
2.1. Diseño experimental	32
2.2. Determinación de proteínas con alta homología	33
2.3. Modelado y análisis filogenético	33
2.4. Determinación de propiedades fisicoquímicas y propiedades inmunogénicas	33
2.5. Docking molecular	34
2.6. Predicciones de antigenicidad, alergenicidad, toxicidad y análisis de cobertura de población	34
3. Resultados	34
3.1. Secuencia de proteínas obtenidas	34

3.2.	Predicción de estructura tridimensional	35
3.3.	Análisis filogenético de proteínas	37
3.4.	Propiedades fisicoquímicas	38
3.5.	Propiedades inmunogénicas	41
3.6.	Docking molecular	49
3.6.1.	Cardiolipina sintetasa	50
3.6.1.1.	Cardiolipina sintetasa/Toll2	50
3.6.1.2.	Cardiolipina sintetasa/Toll4	52
3.6.2.	HSP70	54
3.6.2.1.	HSP70/Toll2	54
3.6.2.2.	HSP70/Toll4	56
3.6.3.	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	58
3.6.3.1.	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa/Toll2	58
3.6.3.2.	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa/Toll4	60
3.6.4.	Enolasa	62
3.6.4.1.	Enolasa/Toll2	62
3.6.4.2.	Enolasa/Toll4	64
3.7.	Alergenicidad, toxicidad y cobertura de población	66
3.8.	C-ImmSimm	69
3.8.1.	Cardiolipina sintetasa (1 inmunización)	69
3.8.2.	Cardiolipina sintetasa (3 inmunizaciones)	70
3.8.3.	HSP70 (1 inmunización)	71
3.8.4.	HSP70 (3 inmunizaciones)	72
3.8.5.	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (1 inmunización)	73
3.8.6.	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (3 inmunizaciones)	74
3.8.7.	Enolasa (1 inmunización)	75
3.8.8.	Enolasa (3 inmunizaciones)	76
3.9.	Propuesta para el desarrollo de un biosensor de diagnóstico oportuno	77
4.	Discusión de Resultados	78

5. Conclusiones	88
Perspectivas	88
Bibliografía	89
Anexos	100

Índice de Tablas

Tabla	Título	Página
1	Esquema comparativo de los métodos utilizado para el diagnóstico de enfermedad de Chagas en fase aguda	15
2	Esquema comparativo de los métodos de diagnóstico directo en fase aguda.	23
3	Ejemplos de elementos de reconocimiento y de transductores que se emplean en la construcción de biosensores	24
4	Tabla comparativa de los biosensores reportados para diagnosticar Chagas. Se describe el tipo de biosensor, así como sus beneficios e inconvenientes.	25
5	Lista de pruebas de diagnóstico rápido comerciales para la detección serológica de <i>T. cruzi</i> (enfermedad de Chagas) IC, ensayo inmunocromatográfico; IE, ensayo inmunoenzimático. WB, sangre completa; S / P, suero o plasma.	27
6	Sensibilidades y especificidades de las pruebas en suero de las marcas de la tabla anterior.	28
7	Valores obtenidos a través de la plataforma ProtParam	38
8	Predicciones topológicas de las proteínas mediante DeepTMHMM.	41
9	Predicciones de epítopes para células B de la cardiolipina sintetasa	42
10	Predicciones de epítopes para células B para HSP70.	42
11	Predicciones de epítopes para células B de la gliceraldehído 3-fosfato	42
12	Predicciones de epítopes para células B de la enolasa	42
13	Epítopes predichos para MHC-I y II de la cardiolipina sintetasa reportados por IEDB	45
14	Epítopes predichos para MHC-I y II de la HSP70 reportados por IEDB	46
15	Epítopes predichos para MHC-I y II de la Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa reportados por IEDB.	47
16	Epítopes predichos para MHC-I y II de la enolasa reportados por IEDB.	48
17	Valores obtenidos por el docking molecular (Clus Pro).	49
18	Valores obtenidos por la plataforma PRODIGY	49
19	Esquema comparativo de diversas propiedades utilizando diferentes plataformas para el diseño vacunal.	66

Índice de figuras

Figura	Título	Página
1	Regiones de transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas;	17
2	Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
3	Curso clínico de la infección por <i>T. cruzi</i> ;	21
4	Formato PDB de la cardiolipina sintetasa modelada por SwissModel.	35
5	Formato PDB de HSP70 modelada por Alpha Fold2	36
6	Formato PDB de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa modelado por Alpha Fold 2.	36
7	Árbol Filogenético obtenido mediante MEGA11	37
8	Predicción topológica de la cardiolipina sintetasa mediante la plataforma DeepTMHMM	39
9	Predicción topológica de HSP70 mediante DeepTMHMM	40
10	Predicción topológica del gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa mediante DeepTMHMM	40
11	Predicción topológica de la enolasa mediante DeepTMHMM	41
12	Estructura de la cardiolipina sintetasa mostrando cuatro epítopes para células B representados en la tabla 9	43
13	Estructura de HSP70 mostrando 7 epítopes para células B representados en la tabla 10.	43
14	Estructura de la G3FD mostrando cuatro epítopes para células B, representados en la tabla 11	44
15	Estructura de la enolasa mostrando para células B, representados en la tabla 12	44
16	Resultados de PDBsum. A) Esquemas con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena A y H. B) Esquema general de las interacciones. C) Tipos de contacto entre las cadenas. D) Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena A y H. E) Visualización de los puntos de contacto entre TLR2 blanco) y la cardiolipina sintetasa (azul).	50
17	Resultados de PDBsum A) Esquema con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena B y H. B) Tipos de contacto entre las cadenas. C) Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena B y H.	51
18	Resultados de PDBsum. A) Esquemas con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena B y H. B) Esquema general de las interacciones. C) Tipos de contacto entre las cadenas. D) Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena B y H. E) Visualización de los puntos de contacto entre TLR4 blanco) y la cardiolipina sintetasa (azul).	52
19	Resultados de PDBsum A) Esquema con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena D y H. B) Tipos de contacto entre las cadenas. C) Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena D y H.	53
20	Resultados de PDBsum. A) Esquemas con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena A y D. B) Esquema general	54

	de las interacciones. C) Tipos de contacto entre las cadenas. D) Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena A y D. E) Visualización de los puntos de contacto entre TLR2 (blanco) y HSP70 (verde).	
21	Resultados de PDBsum A) Esquema con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena D y H. B) Tipos de contacto entre las cadenas. C) Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena D y H.	55
22	Figura 22. Resultados de PDBsum. A) Esquemas con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena B y E. B) Esquema general de las interacciones. C) Tipos de contacto entre las cadenas. D) Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena B y E. E) Visualización de los puntos de contacto entre TLR4 (blanco) y HSP70 (azul).	56
23	Resultados de PDBsum A) Esquema con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena D y E. B) Tipos de contacto entre las cadenas. C) Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena D y E.	57
24	Resultados de PDBsum. A) Esquemas con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena A y D. B) Esquema general de las interacciones. C) Tipos de contacto entre las cadenas. D) Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena A y D. E) Visualización de los puntos de contacto entre TLR2 (blanco) y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (azul).	58
25	Resultados de PDBsum A) Esquema con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena B y D. B) Tipos de contacto entre las cadenas. C) Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena B y D.	59
26	Resultados de PDBsum. A) Esquemas con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena A y D. B) Esquema general de las interacciones. C) Tipos de contacto entre las cadenas. D) Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena A y D. E) Visualización de los puntos de contacto entre TLR4 (blanco) y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (azul).	60
27	Resultados de PDBsum. A1) y A2) Esquema con tipo y número de interacciones entre las cadenas C-E Y B-E. B) y B2) Tipos de contacto entre las cadenas. C1 y C2) Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena de dichas cadenas. Resultados de PDBsum. A) Esquemas con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena A y D. B) Esquema general de las interacciones. C) Tipos de contacto entre las cadenas. D) Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena A y D. E) Visualización de los puntos de contacto entre TLR2 (blanco) y la enolasa (rosa).	61
28	Resultados de PDBsum. A) Esquemas con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena A y D. B) Esquema general de las interacciones. C) Tipos de contacto entre las cadenas. D) Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena A y D. E) Visualización de los puntos de contacto entre TLR2 (blanco) y la enolasa (rosa).	62
29	Resultados de PDBsum A) Esquema con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena B y H. B) Tipos de	63

	interacciones entre las cadenas B y H. C) Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena B y H.	
30	Resultados de PDBsum. A) Esquemas con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena A y H. B) Esquema general de las interacciones. C) Tipos de contacto entre las cadenas. D) Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena A y H. E) Visualización de los puntos de contacto entre TLR4 (blanco) y la enolasa (rosa).	64
31	Resultados de PDBsum A) Esquema con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena C y H. B) Tipos de interacciones entre las cadenas C y H. C) Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena C y H.	65
32	Mapa de cobertura virtual de la cardiolipina sintetasa en base a los HLA's de cada región.	67
33	Mapa de cobertura virtual de la HSP70 en base a los HLA's de cada región.	67
34	Mapa de cobertura virtual de la G3FD en base a los HLA's de cada región.	68
35	Mapa de cobertura virtual de la enolasa en base a los HLA's de cada región	68
36	Esquema de conteo de células, de inmunoglobulinas y de citoquinas activadas por una dosis durante 35 días (leyendas y símbolos arriba).	69
37	Esquema de conteo de células, inmunoglobulinas y de citoquinas activadas por tres dosis durante 1000 días (leyendas y símbolos arriba).	70
38	Esquema de conteo de células, de inmunoglobulinas y de citoquinas activadas por una dosis durante 35 días (leyendas y símbolos arriba).	71
39	Esquema de conteo de células, inmunoglobulinas y de citoquinas activadas por tres dosis durante 1000 días (leyendas y símbolos arriba).	72
40	Esquema de conteo de células, de inmunoglobulinas y de citoquinas activadas por una dosis durante 35 días (leyendas y símbolos arriba).	73
41	Esquema de conteo de células, inmunoglobulinas y de citoquinas activadas por tres dosis durante 1000 días (leyendas y símbolos arriba).	74
42	Esquema de conteo de células, de inmunoglobulinas y de citoquinas activadas por una dosis durante 35 días (leyendas y símbolos arriba).	75
43	Esquema de conteo de células, inmunoglobulinas y de citoquinas activadas por tres dosis durante 1000 días (leyendas y símbolos arriba).	76
44	Figura 44. Esquema general del biosensor con las nuevas proteínas	78

Resumen

La enfermedad de Chagas es una enfermedad tropical desatendida (ETD); y aunque es clasificada como enfermedad olvidada, actualmente se considera re-emergente. El agente causal es el parásito *Trypanosoma cruzi*, el cual es un protozoo flagelado transmitido principalmente mediante chinches del género Triatominae. Su re-emergencia se debe principalmente a la migración de poblaciones endémicas infectadas a zonas donde antes no se conocía la enfermedad. Por lo anterior, representa una amenaza debido a que no existe una vacuna y a las deficiencias en el diagnóstico. La enfermedad es pobremente diagnosticada lo que permite exista una evolución de una fase aguda a una crónica donde ya no es posible su cura.

Este trabajo se enfocó en buscar proteínas homólogas a la enolasa, proteína cuya antigenicidad ha sido probada previamente. Estudios *in silico* evidenció tres proteínas, la cardiolipina sintetasa, la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y la proteína de choque térmico HSP70, estas se evaluaron mediante herramientas bioinformáticas para conocer su potencial inmunogénico. El presente trabajo expone sus propiedades fisicoquímicas y la predicción de epítopes para células B y para MHC I y II. Adicionalmente se evaluó la interacción proteína-TLR2/4 mediante un docking molecular. Finalmente se realizó una simulación inmunológica ante la presencia de estos agentes.

Las tres proteínas presentan epítopes para células B y para MHC I y II. El mapa de cobertura poblacional demostró una excelente cobertura de protección para la población latinoamericana e incluso europea. El docking molecular mostró una buena afinidad para las tres proteínas en su interacción a los receptores tipo Toll a través de la formación de puentes de hidrógeno. La simulación del sistema inmune evidenció la activación de diversas células y moléculas altamente involucradas en la protección contra *Trypanosoma cruzi*.

En conclusión, las tres proteínas sugieren propiedades inmunogénicas prometedoras con alto potencial para ser corroboradas de manera *in vivo*.

Palabras clave: Chagas, *Trypanosoma cruzi*, vacuna, inmunosensor, inmunógeno.

1. Introducción

La enfermedad de Chagas (EC) pertenece al grupo de las enfermedades tropicales desatendidas (ETD) y se definen como enfermedades infecciosas capaces de proliferar en entornos económicamente pobres, y de ambiente caluroso y húmedo de los climas tropicales. Las ETD representan un grupo de infecciones parasitarias, bacterianas y virales crónicas que promueven la pobreza en las personas debido a que afectan el desarrollo infantil, producto del embarazo y la productividad de los trabajadores [3]. La enfermedad de Chagas es el resultado clínico, a largo plazo, de una infección humana crónica ocasionada por un parásito protozoario, *Trypanosoma cruzi*, esta enfermedad afecta entre 8 y 10 millones de personas en todo el mundo [4,5]. Dada la naturaleza de la enfermedad, la infección puede evolucionar en dos etapas: aguda y crónica, pudiendo llegar a causar la muerte en cualquiera de ellas [6]. *T. cruzi* utiliza como vector a los insectos triatominos, miembros de la familia de los insectos reducidos, cuando el insecto ingiere sangre de un mamífero infectado, una vez ingerido los protozoos se replican en el intestino del insecto y se excretan en sus heces [7]. *T. cruzi* ingresa al hospedero humano mediante una picadura por el insecto, transfusión de sangre o trasplante de tejido (órgano o médula ósea) de una persona infectada y por transmisión de la madre al feto durante el embarazo [7]. Aunque la enfermedad de Chagas es endémica de las Américas, principalmente América Latina, la migración desde países endémicos también ha llevado a la aparición de la enfermedad de Chagas en regiones no endémicas [8]. Se ha evaluado que más de 300.000 pacientes infectados viven en EE. UU. [9] y se ha estimado que entre 68.000 y 120.000 personas con EC viven actualmente en Europa [10].

Más allá de ser una enfermedad prevalente tanto en América Latina como en países desarrollados, con relevancia clínica y epidemiológica, la EC también es importante debido a su carga económica, esto debido a que la mortalidad temprana y la discapacidad sustancial causada por esta enfermedad a menudo ocurre en la población más productiva; los adultos y jóvenes [11]. Las complicaciones cardíacas y digestivas

con frecuencia conducen a la necesidad de tratamientos a largo plazo y de procedimientos quirúrgicos, incluida la inserción de marcapasos y desfibrilador cardíaco implantable y el trasplante de corazón, lo que aumenta aún más los costos relacionados con la enfermedad [12,13].

Un diagnóstico exitoso en la fase aguda permitiría prescribir un tratamiento tripanocida a tiempo. Durante la fase aguda de la infección, el tratamiento de la enfermedad de Chagas se centra en eliminar al parásito, y un tratamiento tripanocida a tiempo, pronostica la curación del paciente del 60 al 90% [14]. Respecto al diagnóstico de esta enfermedad en la fase aguda, donde la parasitemia está presente, la detección directa se puede lograr mediante técnicas parasitológicas como la observación microscópica del parásito en frotis de sangre o microhematocrito, xenodiagnóstico y hemocultivo [15]. Estos métodos pueden implicar largos protocolos de cultivo y a menudo implican poca sensibilidad. La presencia de parásitos en el torrente sanguíneo también se puede detectar mediante amplificación molecular de su material genético mediante métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) con mayor sensibilidad que las técnicas antes mencionadas [15]. Sin embargo, estas pruebas deben realizarse en laboratorios centralizados; involucrando equipos especializados y técnicos capacitados [16]. Así mismo, aunque existen kits comerciales para diagnosticar esta enfermedad, estos emplean antígenos solubles crudos de diferentes regiones endémicas, por lo que ocurre con frecuencia reacciones cruzadas debido a la similitud genética de los parásitos que causan estas infecciones. Adicionalmente, presentan poca estabilidad [17;18].

En los últimos años, los inmunosensores electroquímicos han ganado un interés considerable como dispositivos bioanalíticos, especialmente para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades [19]. Por tanto, estos dispositivos pueden utilizarse para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. El desarrollo de biosensores requiere de la inmovilización de un componente biológicamente activo sobre la superficie del transductor, dicho elemento de reconocimiento debe ser selectivo a antígenos específicos de *T. cruzi* presentes en el suero del paciente y por ende puede ser

detectado, generando una respuesta de señal en el sensor [16]. Tomando en cuenta la tabla 1 se puede observar los beneficios que aportan los biosensores en comparación con otros métodos de diagnóstico actualmente utilizados.

Tabla 1. Esquema comparativo de los métodos utilizado para el diagnóstico de enfermedad de Chagas en fase aguda [16].

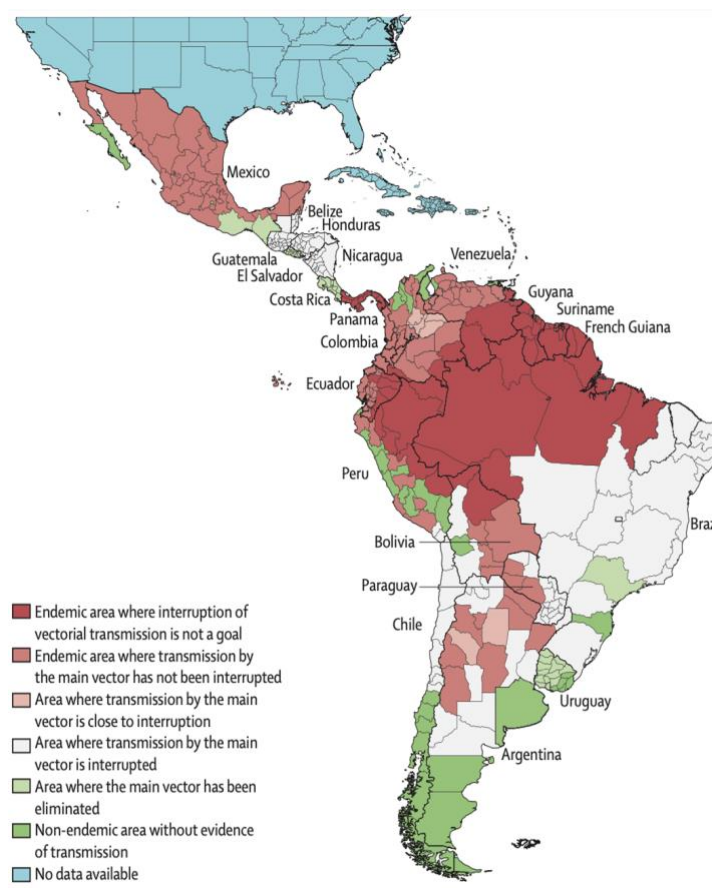
Método	Inconvenientes	Beneficios	LDD (límite de detección)	Necesita de un marcador
Métodos selectivos	- Los microorganismos necesitan crecer rápidamente - Mucho tiempo para producir resultados - Debe realizarse en un laboratorio - Necesita un área de trabajo aséptica - Requiere personal altamente capacitado - Procedimiento tedioso - Sensibilidad baja	- Bajo costo - Fácil de realizar	- No aplicable	No
Biosensores	- No disponible comercialmente para el diagnóstico de EC - Grandes dimensiones - Debe realizarse en un laboratorio (actualmente) - Se requiere más investigación y desarrollo para sistemas portátiles - Alto costo de investigación	- Detección sin marcadores - Detección cuantitativa - Sin necesidad de un área de trabajo aséptica - Rápido (mediciones en tiempo real) - Fácil de realizar. - No necesita personal capacitado - Preparación sencilla <i>in situ</i> - Alta especificidad analítica - Reducción del consumo de reactivos	~2 nM (Janissen, Richard 2017)	No

		- Reducción del tiempo de análisis - Alta sensibilidad y confiabilidad - Integración de múltiples procesos en un solo dispositivo y posible automatización - Bajo costo de fabricación - Posible regeneración del sensor para múltiples análisis		
PCR cuantitativa	- Se requieren instrumentos complejos y costosos - Requiere personal altamente capacitado - Debe realizarse en un laboratorio - Difícil de realizar - Tiempos de ensayo prolongados	- Alta selectividad y sensibilidad. - Mejora el tiempo necesario para obtener resultados	~10 nM (Janissen, Richard 2017)	Si
Test comerciales de diagnóstico rápido	- Especificidad 96,8% - Alta posibilidad de presentar falsos positivos - Solo resultados cualitativos - El método necesita un tubo y un volumen de muestra medido	- Rápido (15-25 min) - Alta sensibilidad del 99,5% - Bajo costo (menos de \$ 2 USD para el usuario final)	~20 nM (Janissen, Richard 2017)	Si

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas es problemático, ya que la detección no es obligatoria como parte del proceso de inmigración, ni es recomendada por la Academia Estadounidense de Pediatría Americana [14]. Los programas de control de vectores han sido altamente efectivos para reducir la transmisión doméstica y peridoméstica de *T. cruzi* [20,21], sin embargo, en México no existen programas establecidos de control de vectores, consenso sobre los métodos diagnósticos adecuados para la enfermedad de

Chagas aguda y crónica en las maternidades, los bancos de sangre, adicionalmente los pacientes crónicos no reciben tratamiento tripanocida [22]. Se desconoce la prevalencia real de la enfermedad porque hay informes de casos oficiales mínimos, de igual manera, también se desconoce el número de personas infectadas por diferentes vías de transmisión [22].

Figura 1. Regiones de transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas; imagen recuperada de [24].



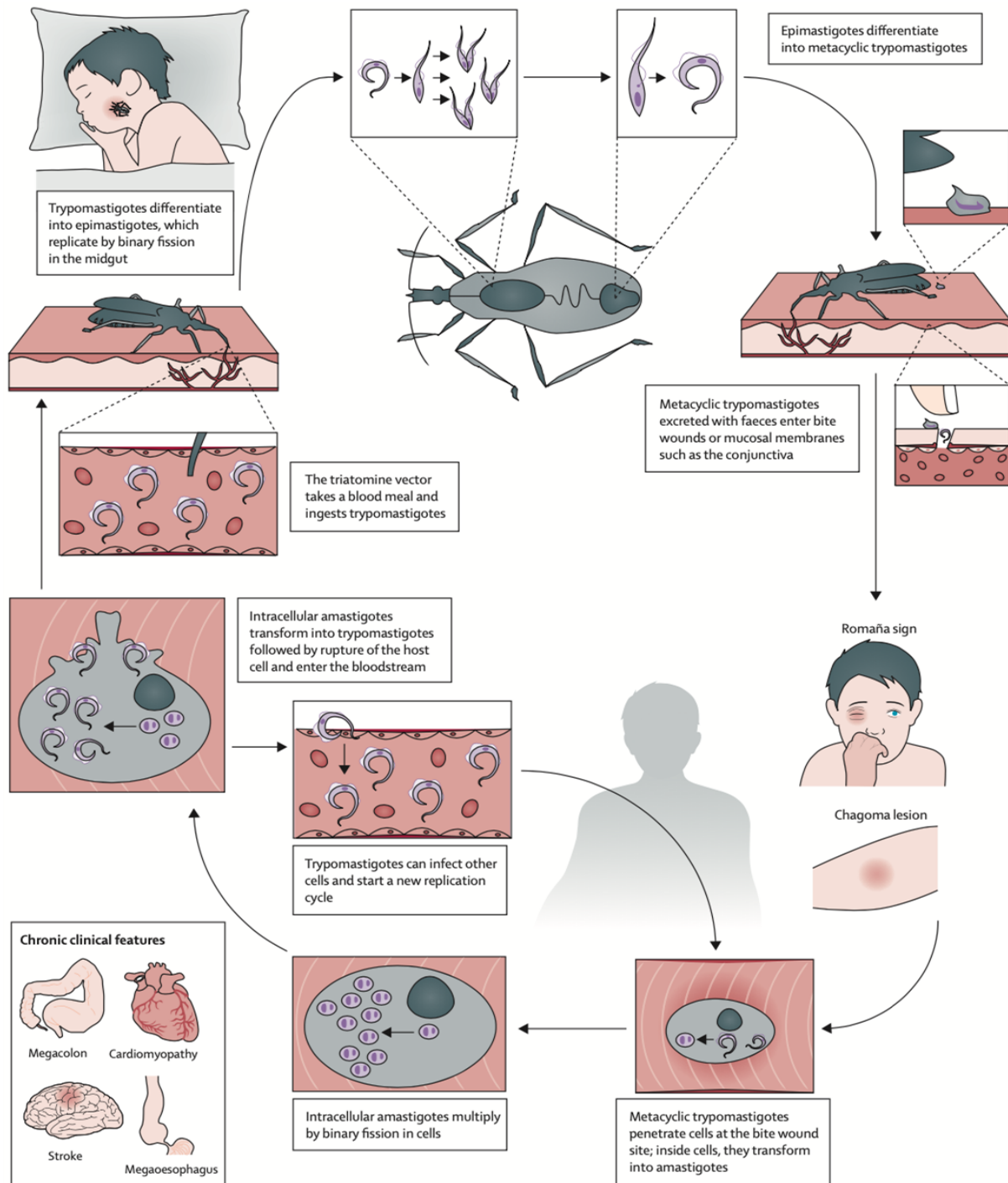
1.1. Etiología

El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo, con varias formas de desarrollo en insectos vectores y hospederos mamíferos [23]. *T. cruzi* presenta dos estadios en los humanos. El tripomastigote sanguíneo, con un flagelo que se extiende a lo largo del borde exterior de una membrana ondulante, no se divide en sangre, es la forma capaz de viajar por todo el organismo a través del torrente circulatorio; el amastigote, que no tiene flagelo, se multiplica mediante fisión binaria dentro de varios tipos de células [24].

Los insectos se infectan al extraer sangre de animales o humanos que tienen parásitos circulantes (formas tripomastigotes). En el tracto digestivo de los triatomíneos, los tripomastigotes se diferencian en epimastigotes (forma multiplicativa) y luego en tripomastigotes metacíclicos en la porción final del intestino [25]. La infección de los mamíferos ocurre cuando entran en contacto con las formas metacíclicas infecciosas del parásito que se eliminan con las heces de los triatomíneos después de la alimentación. [26]. Este contacto ocurre a través de la mucosa o por lesión, ya sea preexistente o como resultado de la picadura del insecto. [27].

Una vez en el hospedador vertebrado, los tripomastigotes metacíclicos invaden las células conectivas y retículoendoteliales locales y se diferencian en amastigotes que comienzan a replicarse por fisión binaria. Cuando la célula se llena con amastigotes, estos se transforman nuevamente en tripomastigotes. Los tripomastigotes lisan las células, invaden los tejidos adyacentes y se diseminan a través de los vasos linfáticos y el torrente sanguíneo a sitios distantes, principalmente células musculares (cardíacas, lisas y esqueléticas) y células ganglionares, donde se someten a más ciclos de multiplicación intracelular. El ciclo de transmisión se completa cuando los tripomastigotes circulantes son ingeridos por los vectores en la sangre [27].

Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*; recuperado de [24].

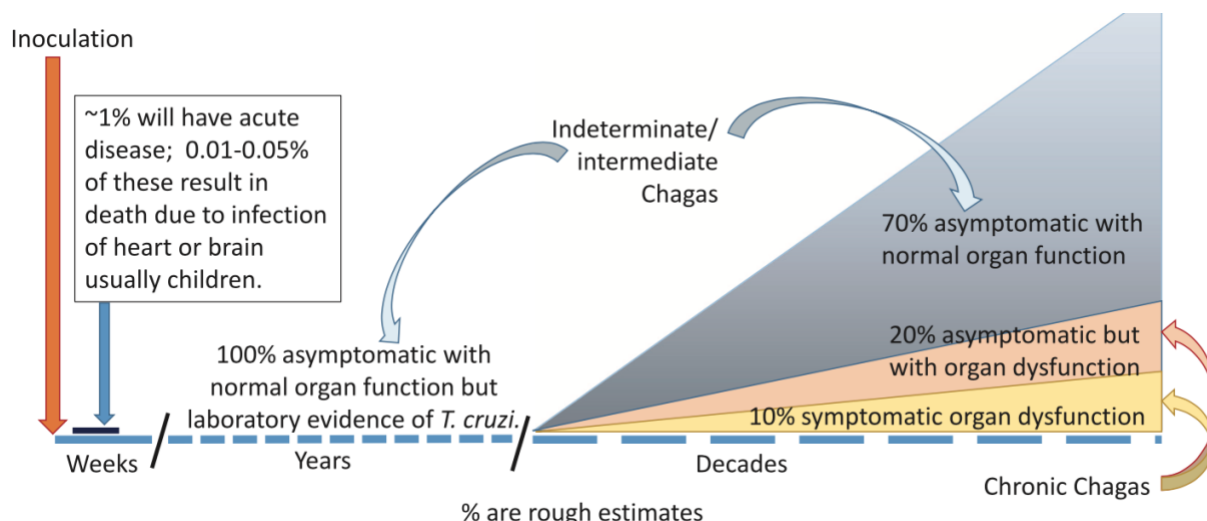


1.2 Fases de la enfermedad

Como se mencionó previamente, la enfermedad evoluciona en dos fases muy marcadas; aguda y crónica. La fase aguda suele ser subclínica. La mayoría de los casos agudos son asintomáticos, duran de 6 a 12 semanas y ocurren en la infancia [29]. Cuando se presentan los síntomas, se incluyen los siguientes: inflamación con ulceración en el lugar de la inoculación (chagoma), edema ocular palpebral unilateral (signo de Romaña) estos dos son conocidos como signos patognomónicos de la EC, y otros síntomas incluyen: fiebre, dolor de cabeza, dolor articular y muscular, anorexia, vómitos, diarrea, somnolencia, apatía, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia, edema y convulsiones. Esta fase suele resolverse espontáneamente en dos a cuatro meses; sin embargo, algunos casos agudos (2-6%) pueden conducir a la muerte, que se debe principalmente a miocarditis y meningoencefalitis [30,23]. El diagnóstico clínico de esta fase es difícil debido a los hallazgos clínicos heterogéneos e inespecíficos, lo que sugiere que la mayoría de los casos agudos no se diagnostican, solo se reportan esporádicamente [31,22].

La fase crónica comienza de 2 a 3 meses después de la infección inicial, cuando las manifestaciones clínicas (si están presentes) de la enfermedad aguda se habrán resuelto en prácticamente todos los individuos infectados, incluso si la infección no ha sido tratada con fármacos tripanocidas [32]. Se observan dos formas principales de enfermedad en la fase crónica, una forma indeterminada (también denominada latente) y una forma sintomática [22]. Alrededor del 60% al 70% de estos pacientes tendrán la forma indeterminada de la enfermedad de Chagas crónica, sin presentar síntomas clínicos durante 10 o 30 años o incluso de por vida, pero con la presencia de anticuerpos positivos anti *T. cruzi* en suero [33]. Los pacientes restantes (30%-40%) desarrollarán una forma crónica determinada: cardíaca, digestiva (principalmente megaesófago y megacolon) o cardiodigestiva, generalmente de 10 a 30 años después de la infección inicial [32].

Figura 3. Curso clínico de la infección por *T. cruzi*; recuperado de [34]



1.3 Tratamiento

Actualmente, nifurtimox y benznidazol son los únicos fármacos autorizados con eficacia probada contra la enfermedad de Chagas. Ambos fármacos tienen una actividad significativa durante la fase aguda de la enfermedad, provocando curación parasitológica hasta en un 80% de los pacientes si se tratan de forma inmediata; sin embargo, parece que la eficacia del tratamiento antiparasitario está inversamente relacionada con la cronicidad de la enfermedad [22]. Dichos fármacos están contraindicados en pacientes embarazadas y pacientes que sufren de enfermedades renales o del hígado [35]. El tratamiento con nifurtimox y benznidazol representa una carga económica significativa para poblaciones socialmente vulnerables o con deficiencias en el sistema de salud ya que el tratamiento de benznidazol tiene una duración de 60 días mientras que el tratamiento con nifurtimox consta de entre 60-90 días. (35), (36). Desafortunadamente la búsqueda de nuevos fármacos que puedan reemplazar nifurtimox y benznidazol no ha sido exitosa. Se encuentran fármacos como el ravuconazole y posaconazole que han presentado efectos anti-parasitarios en fases preclínicas pero no rebasan la eficacia del benznidazol. Un fármaco proveniente de la misma familia del nifurtimox y el benznidazol, el fexinidazole, ha mostrado eficacia en el tratamiento de EC en fase indeterminada

concluyendo la fase clínica II [37], sin embargo, aún se deben evaluar ensayos de toxicidad y regímenes que puedan ser más efectivos [38].

1.4 Diagnóstico en fase aguda

1.4.1 Métodos directos

Los métodos directos mencionados anteriormente se deben realizar de manera inmediata después de ocurrida la primoinfección, en cambio el estudio indirecto debe realizarse una vez transcurridos 15 días [39]. Entre esos métodos se encuentra la observación microscópica al fresco que identifica la presencia de tripomastigotes de *T. cruzi*, por observación directa, en una muestra de sangre periférica fresca u otro fluido [39]. El método de gota gruesa permite la concentración de la muestra de sangre, el procedimiento consiste en colocar 3 a 4 gotas de sangre sin anticoagulante en un portaobjeto, las que luego se desfibrinan para posteriormente teñirse y ser observadas al microscopio óptico [39]. El método de concentración: MicroStrout es un examen microscópico de la fracción leucoplaquetaria de la sangre total a partir de un capilar de microhematocrito llenado con sangre del paciente, en búsqueda de las formas tripomastigotes de *T. cruzi* [39]. El xenodiagnóstico es la búsqueda de formas tripomastigotes de *T. cruzi* en deyecciones de triatomíneos que han sido alimentados con sangre de pacientes o si es necesario, hacer cultivos sanguíneos [39]. Posteriormente se examinan las heces y la orina de los insectos, uno por uno a los 30 y 60 días en busca de formas tripomastigotes en movimiento. Estas técnicas presentan ciertas limitaciones en términos de sensibilidad (~ 80-90%, incluso hasta menos y de 50% a 70% en crónica en condiciones óptimas) ya que esta depende directamente de la carga parasitaria del paciente y de las habilidades de quién esté realizando la prueba [39]. En la tabla 2 podemos observar las diferencias entre estas pruebas.

Tabla 2. Esquema comparativo de los métodos de diagnóstico directo en fase aguda [39,40,41,42,43].

Método diagnóstico	Sensibilidad	Beneficios	Inconvenientes
Observación directa	34-85%	-Simplicidad operativa -Bajo costo -Ejecución rápida	-Puede ser confundida con <i>T. rangeli</i> , un tripanosoma no patógeno para el hombre. <i>-Presenta un riesgo para el analista</i>
Gota gruesa	<75%	- Útil cuando la parasitemia es mayor. -Metodología con menor riesgo para el analista	- Se deben realizar por lo menos cuatro preparaciones por paciente.
MicroStrout	85-95%	-Simplicidad operativa -Bajo costo -Útil cuando la parasitemia es menor	-Ejecución y observación lenta
Xenodiagnóstico	95%	- Sensibilidad equiparable a la que proporciona una pCR	-Procedimiento difícil y laborioso. -Tiempo de resultados bastante largo - Para algunos pacientes con parasitemia muy baja, incluso los exámenes repetidos siempre serán negativos

1.4.2 Biosensores

Los biosensores son dispositivos analíticos que combinan elementos de reconocimiento biológico y elementos de transducción [44], basando su funcionamiento en la combinación de un elemento biológico, que reconoce al analito en una variedad de muestras, mientras el transductor físicoquímico traduce el evento de biorreconocimiento en una señal electrónica discreta o continua, que es proporcional a la concentración del analito [45]. De esta forma, se obtiene un aparato integrado autónomo que proporciona una lectura cuantitativa.

Existen diversos elementos de reconocimiento biológico y de transducción, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Ejemplos de elementos de reconocimiento y de transductores que se emplean en la construcción de biosensores [45].

Elemento de reconocimiento		Transductor	
Macromoléculas	- Ácidos nucleicos	Electroquímicos	- Amperométricos
	- Antígenos/anticuerpos		- Potenciométricos
	- Enzimas		- Conductimétricos
			- Impedimétricos
Fragmentos celulares	- Receptores de membrana	Ópticos	- Absorbancia
	- Organelos		- Fluorescencia
	- Otros		- Quimioluminiscencia
			- Índice de refracción
Célula entera	- Tejido	Otros	- Piezoeléctrico
	- Microorganismos		- Calorimétrico

Los biosensores que se han investigado para el diagnóstico de EC se pueden clasificar en electroquímicos y ópticos. Entre los sensores electroquímicos, se pueden encontrar sensores amperométricos e impedimétricos, mientras que en los sensores ópticos solo se encuentran transductores de resonancia de plasmón superficial (SPR) [16].

En la tabla 4 se muestran los biosensores actualmente reportados para diagnosticar la enfermedad de Chagas.

Tabla 4. Tabla comparativa de los biosensores reportados para diagnosticar Chagas.
Se describe el tipo de biosensor así como sus beneficios e inconvenientes

Autor reportado	Tipo de biosensor	Inconvenientes	Beneficios
Pumpin-Ferreira [46]	Amperométrico	- Muy grande y pesado para ser un sistema portable de detección - Posible reactividad cruzada con leishmaniasis	- Método simple y sensible
Pereira <i>et al.</i> [47]	Inmunosensor electroquímico	- Baja sensibilidad	- Alta especificidad
Salinas <i>et al.</i> [48]	Inmunosensor amperométrico	- Tiempo de espera largo (23 min)	- Sensibilidad alta comparado con la prueba de ELISA
Luz <i>et al.</i> [49]	Inmunosensor a base de SPR	- Aparato voluminoso y pesado - Muy costoso	- Alta precisión y sensibilidad
Corina <i>et al</i> [50]	Inmunosensor electroquímico	- No está disponible comercialmente	- Sistema portable - Tiempo para obtener resultados rápido (20 s) - Proceso simple
Regiart <i>et al.</i> [51]	Inmunosensor electroquímico	- Tiempo del ensayo largo (26 min)	- LOD bajo - Diagnostico eficaz en Chagas congénita - Posibilidad para ser portable
Janissen <i>et al.</i> [52]	A base de nanocables		- Alta sensibilidad - LOD alto (~6 fM)
Cordeiro <i>et al</i> [53]	Impedimétrico	- Resultados obtenidos en fase 1	- Buena precisión y reproducibilidad. - Diagnóstico simultáneo de <i>T. cruzi</i> y Leishmaniasis

El interés por el desarrollo de biosensores se debe a sus ventajas comparadas con los métodos convencionales, estas ventajas incluyen la capacidad de trabajar sin un pre-procesado de la muestra, análisis rápido, bajo costo de instrumentación y la confiabilidad de los resultados obtenidos debido a su alta sensibilidad y especificidad habituales. Además, los biosensores ofrecen la posibilidad de realizar ensayos en campo y tienen el potencial de ser utilizados en analizadores automáticos (54), pero a pesar de brindar estas ventajas aún existen retos por cumplir. Una prueba serológica ideal debería ser fácil de realizar en un solo paso, rápida, de bajo costo, no requerir equipo especial o reactivos de refrigeración y debería tener una sensibilidad y especificidad del 100%. Actualmente no existe tal prueba para el diagnóstico de EC [16].

1.5 Pruebas de diagnóstico rápido

En regiones donde las comunidades están en desarrollo, se enfrentan a los altos costos, la habilidad y experiencia requerida para aplicar los métodos de diagnóstico convencionales [55]. De tal manera, estas comunidades dependen de la disponibilidad de Pruebas de Laboratorio en el lugar de Asistencia (POCT) (de las siglas en inglés Point of Care Testing. Afortunadamente las POTCs se encuentran comercialmente disponibles para el diagnóstico de la EC. Varios estudios han demostrado que pueden tener una adecuada sensibilidad y especificidad [56]. El buen empleo de POCTs significaría una mejora en rentabilidad, velocidad, facilidad de uso, pruebas sin equipo, guía de decisiones de tratamiento y mejora de la satisfacción del paciente [57]. Sin embargo, estas pruebas se utilizan como un método de dos pasos, lo que significa que las pruebas positivas se envían para pruebas de diagnóstico adicionales [58].

Un ejemplo serían los ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral (LFIA) los cuales consisten en una muestra líquida que contiene el biomarcador de interés (antígenos, anticuerpos, haptenos e incluso oligonucleótidos) migra a través de la fuerza capilar a través de varias zonas de una membrana porosa, en la cual, los componentes quedan inmovilizados debido al biorreconocimiento específico [57]. Los beneficios que los LFIA provee son la simplicidad, rentabilidad y pueden ser utilizados por personal con poca experiencia. La desventaja de los LFIA es que se emplean con sangre completa y ocasionan reactividad cruzada, por consecuente los esfuerzos para incrementar la sensibilidad terminan por disminuir la especificidad [57]. También se puede utilizar la técnica de Western blot para la detección de antígenos [59] obteniendo una sensibilidad de 95.4% y una especificidad de 100%. Actualmente existen diversas pruebas rápidas para diagnosticar EC que están comercialmente disponibles, en la tabla 5 se encuentran las más populares y en la tabla 6 sus respectivas sensibilidades y especificidades.

Tabla 5. Lista de pruebas de diagnóstico rápido comerciales para la detección serológica de *T. cruzi* (enfermedad de Chagas) recuperado de [60].

No. prueba	Nombre	Fabricante (País)	Formato	Temperatura de almacenamiento (°C)	Tipo de muestra	Volumen de la muestra (micro litros)	Tiempo de lectura (min)	Requiere de material adicional? Ej. pipeta
1	OnSite Chagas Ab Rapid test	CTK Biotech (United States) Orgenics (Israel)	IC/cassette	2–30	WB S/P	40-50 20	15	Si
2	WL Check Chagas	Wiener Lab (Argentina)	IC/cassette	2–30	WB-S/P	40	25-35	Si
3	Chagas Instantest	Silanes (Mexico)	IC/cassette	2–30	S/P	10	15-25	Si
4	<i>Trypanosoma</i> Detect Rapid Test	InBios, Inc. (United States)	IC/strip	2–28	WB S	20 10	10-15	Si
5	Chagas Quick Test	Cypress Diagnostic (Belgium)	IC/strip	2–28	WB S	20 10	10-15	Si
6	Chagas Stat-Pak assay	Chembio (United States)	IC/cassette	8–30	WB S/P	10 5	15	No
7	Immu-Sure Chagas (T. <i>Cruzi</i>)	Millennium Biotech (United States)	IC/cassette	8–30	WB S/P	10 5	5-25	Si
8	SD Chagas Ab Rapid	Standard Diagnostic (Korea)	IC/cassette	1–30	WB-S/P	100	15	Si
9	Simple Chagas WB	Operon (Spain)	IC/cassette	8–25	WB S/P	25 1:15 dilución	10-15	No Si
10	Serodia Chagas	Fujirebio, Inc. (Japan)	Agglutination card	2–8	S/P	25 pre diluido	120	Si

11	ImmunoComb II Chagas Ab	Orgenics (Israel)	IE	2-8	S/P	10	60	Si
----	-------------------------	-------------------	----	-----	-----	----	----	----

IC, ensayo inmunocromatográfico; IE, ensayo inmunoenzimático. WB, sangre completa; S / P, suero o plasma.

Tabla 6. Sensibilidades y especificidades de las pruebas en suero de las marcas de la tabla anterior recuperada de [60].

No. De prueba	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Índice Kappa
1	90.1	91	0.81
2	88.7	97	0.85
3	76.6	79	0.56
4	92.9	94	0.87
5	92.9	93.2	0.86
6	87.2	93.2	0.80
7	10.6	97	0.07
8	90.7	94	0.85
9	84.9	70.7	0.56
10	94.2	94.7	0.89
11	97.2	94	0.91

1.6 Panorama epidemiológico de la enfermedad de Chagas en México

En México, la enfermedad de Chagas es un problema sanitario ya que se estima que 1.1 millones de personas están infectadas (61). México, siendo considerado como zona endémica de la enfermedad de Chagas por la Organización Panamericana de Salud, alberga 8 géneros y 31 especies de triatominos. Las principales especies reportadas en 2015 en México fueron *Triatoma longipennis* (34%), *Triatoma palidipennis* (23%) y *Triatoma dimidata* (29%). Se estima que en México el 96% de las infecciones ocurre de manera vectorial y a pesar de ello, no existe un programa de control vectorial para prevenir la enfermedad de Chagas [22]. Asimismo, los animales domésticos pueden ser parte del ciclo de vida de *T. cruzi*, formándose reservorios que propagan la infección ya que crea una relación entre los animales salvajes, semi domésticos y domésticos [62].

Se describen 18 estados endémicos en México, algunos de ellos Oaxaca, Jalisco, Yucatán, Chiapas, Veracruz, Puebla, Guerrero, Hidalgo y Morelos, los cuales se sitúan

en el sureste del país [30], pero a pesar de ello la mayor prevalencia de la enfermedad se encuentra en el noreste del país [63], la cual ha incrementado año tras año [64].

La migración de zonas rurales a las urbanas ha hecho que *T. cruzi* se transmita a zonas urbanizadas no siendo estados endémicos, a tal punto que más de la mitad de la población infectada por vectores en México ahora se encuentran en zonas urbanas [65], propiciando que se incremente el riesgo de transmisión por transfusión de sangre [66] lo cual está muy poco estudiado [67]. Debido a este panorama en 1994 se realizó un estudio en 18 centros estatales de transfusión de sangre donde se concluyó que 996 de 64 969 donantes resultaron positivo, lo que representa un 1.5% [67]. En base a estos resultados se podría estimar que de 850 000 unidades de sangre que son recolectadas cada año [68], 12 750 podrían haber estado infectados.

Debido a la situación de riesgo, muchos países de América Latina dictaron un tamizaje obligatorio en 1990, pero no fue hasta 2012 que México incluyó el tamizaje serológico en la norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos la cual rige actualmente el tamizaje de *T. cruzi* a donadores de sangre que según el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia epidemiológica (InDRE) los test utilizados para el tamizaje deben contar con al menos un 95% de sensibilidad [69].

Actualmente se estima que aproximadamente el 97% de las infecciones en humanos ocurren mediante vectores triatomíneos, la transmisión por transfusión sanguínea ocupa el segundo lugar [65]. Un estudio más reciente realizado en 2022 analizó ocho bancos de sangre de la ciudad de México indicando que de 515 038 muestras, 1 210 resultaron positivo representando un 0.23%, lo que indica que la enfermedad de Chagas podría estarse transmitiendo en regiones no endémicas como es la ciudad de México (González-Guzmán 2022). Estos resultados podrían demostrar que se necesita reforzar el cumplimiento de tamizaje de las instituciones de salud, lo que implicaría una transparencia en los servicios de salud y programas de monitoreo rigurosos [65].

1.7 Justificación

La enfermedad de Chagas está catalogada como una enfermedad tropical desatendida (ETD), actualmente este tipo de enfermedades están entre las principales infecciones de las personas más pobres del mundo que viven en África, Asia y América Central [1]. Representa una gran amenaza a la salud humana debido a la carencia de controles de vectores, vacuna, estandarización sobre los métodos de diagnóstico utilizados, además de que los tratamientos existentes resultan ser hepatotóxicos y poco eficaces una vez transcurrido un largo tiempo de infección. La enfermedad de Chagas consta de dos fases muy marcadas, la fase aguda y la fase crónica. La fase aguda de la enfermedad suele durar de 8 a 12 semanas y, a menudo, no se diagnostica porque la mayoría de los pacientes son asintomáticos o manifiestan síntomas leves e inespecíficos, como fiebre, malestar general y esplenomegalia [2].

Aunque la patogenia de la enfermedad de Chagas se describió por primera vez hace más de 100 años, sigue siendo una enfermedad en gran medida desatendida con pocos avances diagnósticos, terapéuticos y pronósticos insuficientes [2]. Si bien, existen diferentes métodos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, muchos de los pacientes con esta enfermedad se encuentran en zonas de acceso geográfico reducido y sin servicios básicos como electricidad o agua. Lo anterior se refleja con los pacientes que viven en América Latina, la región más afectada, y los que viven fuera de América Latina los cuales pertenecen en gran medida a una población inmigrante altamente vulnerable, a menudo sin acceso a una atención médica de calidad constante. Para agravar la desigualdad en la atención médica, estos pacientes a menudo son atendidos por proveedores con poco conocimiento de la enfermedad de Chagas [2]. Por tanto, se precisa de atención y de investigación científica para mejorar los métodos de detección, sobre todo respecto al desarrollo de métodos simples, rápidos y eficientes como los biosensores. Por lo que es importante identificar proteínas inmunogénicas para determinar su aplicación como inmunosensor, para la determinación de la enfermedad de Chagas, y su posible uso como vacuna.

1.8 Hipótesis

Dado que se ha comprobado la inmunogenicidad de la enolasa, se propone que proteínas estructuralmente homólogas a esta puedan compartir similitudes en sus regiones y por lo tanto comportarse y ser reconocidas de la misma manera. Por lo tanto, la evaluación de estas proteínas *in silico* demostrará capacidades inmunogénicas para proponerlas como viables para el desarrollo de un biosensor para el diagnóstico y una vacuna para la enfermedad de Chagas.

1.9 Objetivo General

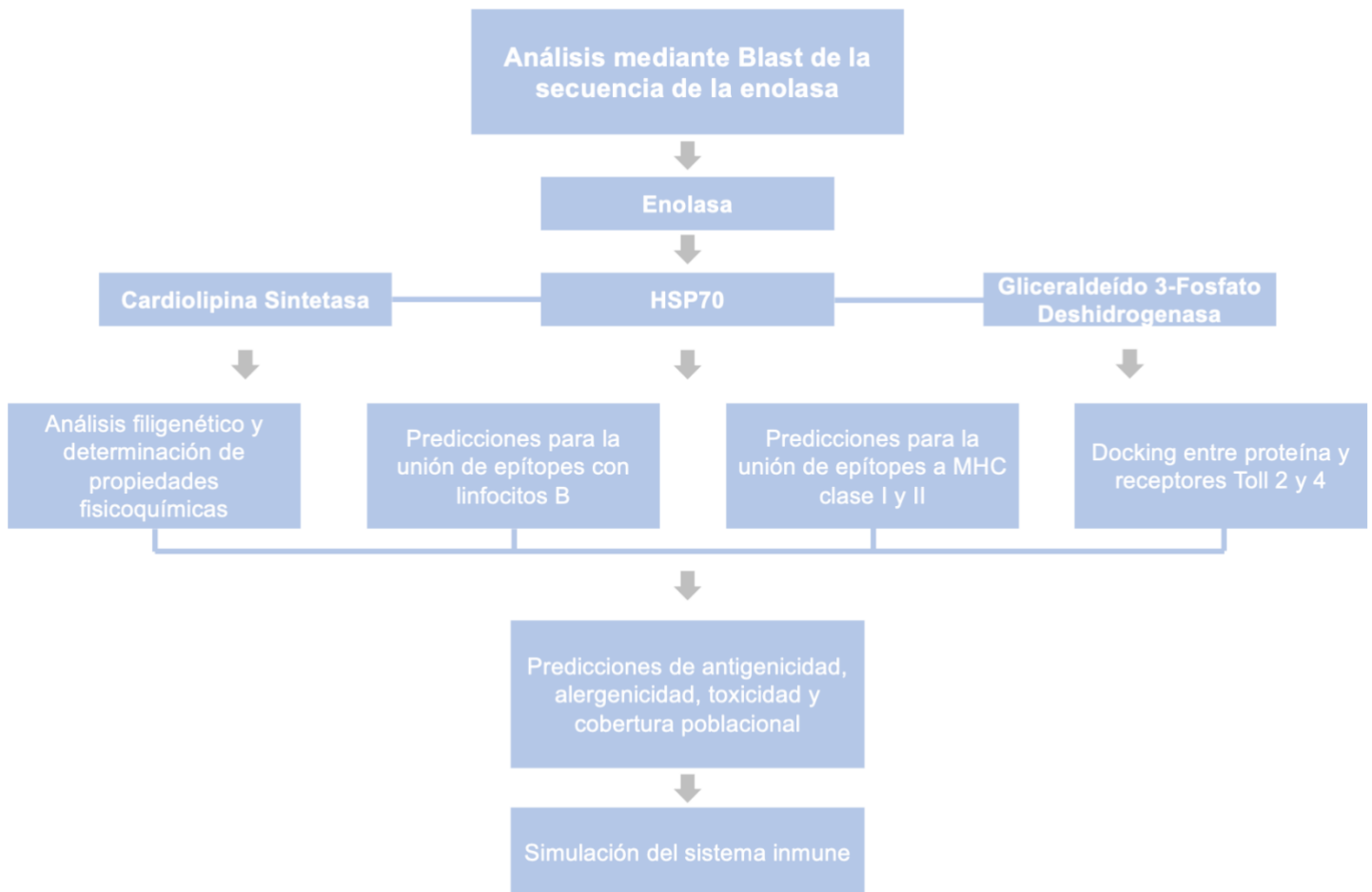
Identificar y evaluar las características inmunogénicas de tres proteínas estructuralmente homólogas a la enolasa mediante herramientas bioinformáticas.

1.10 Objetivos Específicos

- Identificar proteínas estructuralmente homólogas a la enolasa de *Trypanosoma cruzi* mediante herramientas bioinformáticas.
- Realizar un análisis filogenético para determinar la relación entre las proteínas mediante el algoritmo neighbor-joining.
- Determinar las características fisicoquímicas de las proteínas usando métodos bioinformáticos.
- Realizar un modelamiento estructural de las proteínas para localizar los principales epítopes predictivos para la activación de linfocitos B y T.
- Analizar las posibles interacciones entre las proteínas identificadas y los receptores asociados a membrana (tipo Toll) mediante Docking molecular.
- Realizar predicciones de antigenicidad, alergenicidad y toxicidad.
- Identificar las respuestas inmunes humorales y celulares activadas por las proteínas estructuralmente homólogas a la enolasa mediante predicciones *in silico*.

2. Materiales y métodos

2.1 Diseño experimental



2.2 Determinación de proteínas con alta homología a la enolasa

A partir de la secuencia de la enolasa de *T. cruzi*, con un número de acceso a GenBank: KAF8293506.1; 4G7F en PDB y con una longitud de 429 aminoácidos, se realizó una búsqueda de secuencias con alta similitud (megablast) en NCBI. Se seleccionaron tres proteínas con alto porcentaje de identidad. Una vez obtenidas las secuencias de estas proteínas se analizaron. Dichas proteínas son cardiolipina sintetasa con un número de acceso V5BFX7 en UniProt, HSP70 con un número de acceso Q4DTM9 en UniProt y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa Q4DMG2 en UniProt.

2.3 Modelado y análisis filogenético.

A partir de las secuencias previamente obtenidas, se accedió a Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) para obtener una estructura de la cardiolipina sintetasa en formato PDB. La proteína HSP70 y la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa se obtuvieron de AlphaFold (<https://alphafold.com/>) y la enolasa cuenta con la estructura reportada en la literatura así que se obtuvo directamente en NCBI. A través de las secuencias se construyó un árbol filogenético con el software MEGA 11 ([Downloads \(megasoftware.net\)](http://www.megasoftware.net)) para determinar la relación filogenética de estas proteínas.

2.4 Determinación de Propiedades Fisicoquímicas y Propiedades Inmunogénicas

Para determinar las propiedades fisicoquímicas se utilizó el servidor ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) y para predecir la topología DeepTMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>). Para determinar las propiedades inmunogénicas de las proteínas a través de la predicción de epítopes, se usaron los servidores: BepiPred 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/BepiPred-2.0/>) para la predicción de epítopes para células B y se utilizó el servidor IEDB (<https://www.iedb.org/>) para determinar la inmunogenicidad de los epítopes con los MHC clase I y II.

2.5 Docking Molecular

Para analizar la interacción entre la proteína modelada y los receptores asociados a membrana, Toll-like Receptors (TLR's) 2 (PDB ID: 2Z7X) y 4 (PDB ID: 4G89) se realizaron estudios de Docking molecular mediante la plataforma Clus Pro, en los cuales, se seleccionó el modelo con mejor puntuación. Una vez obtenido el modelo en formato PDB, se analizaron las interacciones mediante PDB sum obteniendo una mejor visualización del complejo proteína-receptor. Asimismo, se utilizó el mismo archivo en la plataforma PRODIGY, con el cual se obtuvo la energía libre de Gibbs o afinidad entre el receptor y la proteína modelada.

2.6 Predicciones de Antigenicidad, Alergenicidad, Toxicidad y Análisis de Cobertura de Población

Por medio de la plataforma Vaxijen 2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>) se obtuvieron predicciones de antígenos protectores, para la predicción de alergenidad se utilizó AllerTOP 2.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>) y para toxicidad se utilizó ToxinPred2 (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred2/index.html>). Se usó la herramienta de cobertura de población de IEDB para analizar la cobertura en diferentes regiones. Adicionalmente se utilizó Vaxign 2.0 y C-ImmSim para determinar la viabilidad de las proteínas como inmunógenos para su desarrollo como biosensor y vacuna.

3. Resultados

3.1 Secuencias de proteínas obtenidas

A partir de la secuencia de la proteína enolasa, el alineamiento mediante BLAST en NCBI demostró tres proteínas con alta homología, la cardiolipina sintetasa con número de

acceso V5BFX7 en UniProt, HSP70 con número de acceso Q4DTM9 en UniProt y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, Q4DMG2 en UniProt, las tres pertenecientes a *Trypanosoma cruzi*. La cardiolipina cuenta con 639 aminoácidos en su secuencia, HSP70 con 654 aminoácidos y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa con 338 aminoácidos.

3.2 Predicción de estructura tridimensional

El software Swiss-Model realizó una predicción de la cardiolipina sintetasa como se muestra en la figura 4, Mientras que en AlphaFold2 se obtuvo el modelo de HSP70 presentado en la Figura 5, cuyas confianzas están presentadas en el esquema y de igual manera en Alpha Fold 2 se obtuvo la estructura terciaria de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (figura 6).

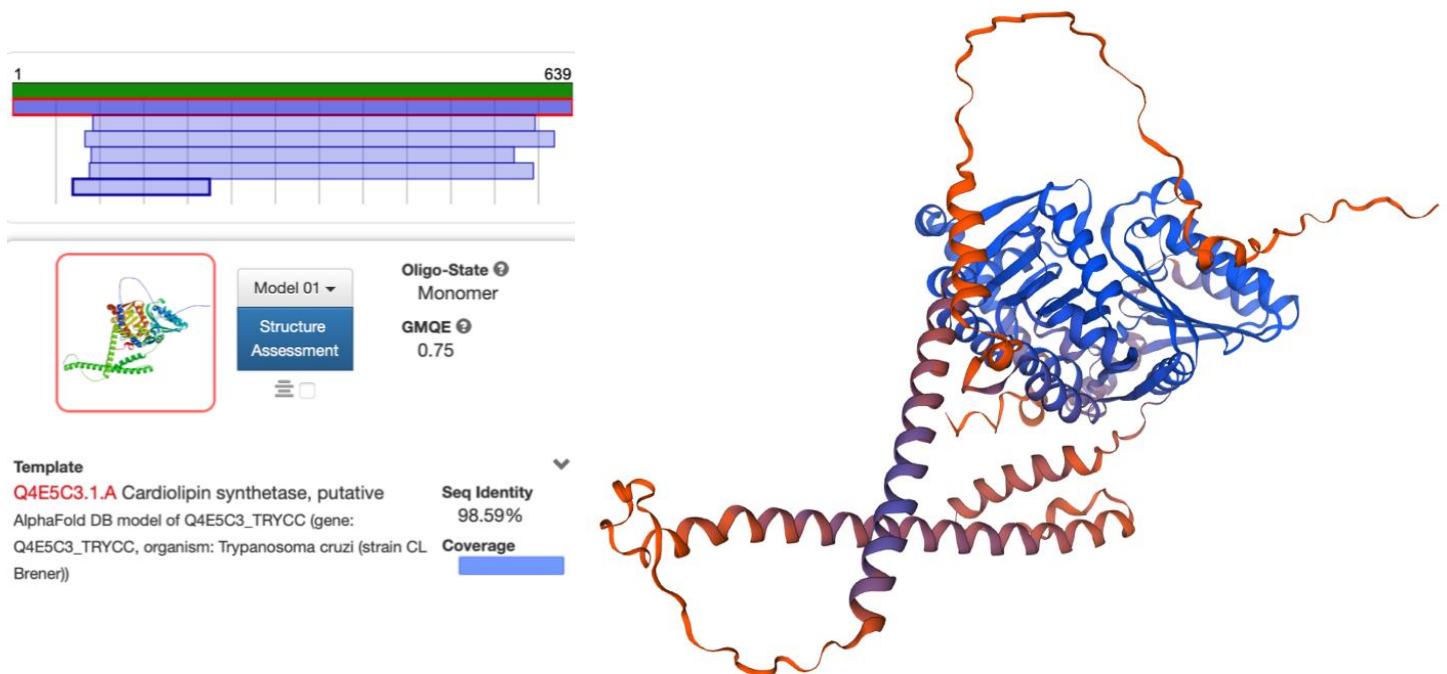


Figura 4. Formato PDB de la cardiolipina sintetasa modelada por SwissModel.

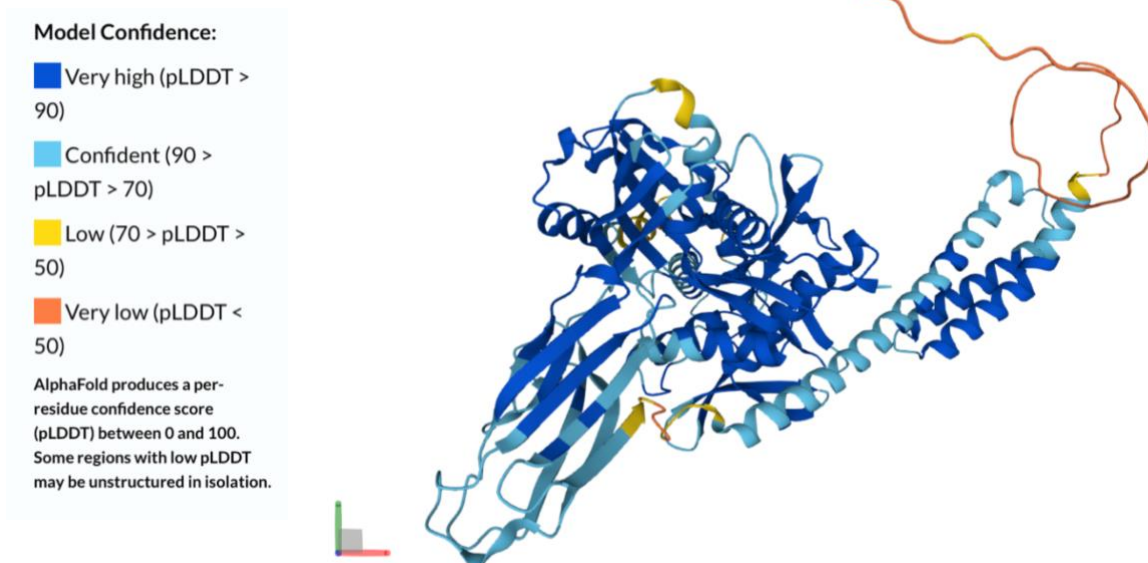


Figura 5. Formato PDB de HSP70 modelada por Alpha Fold2.

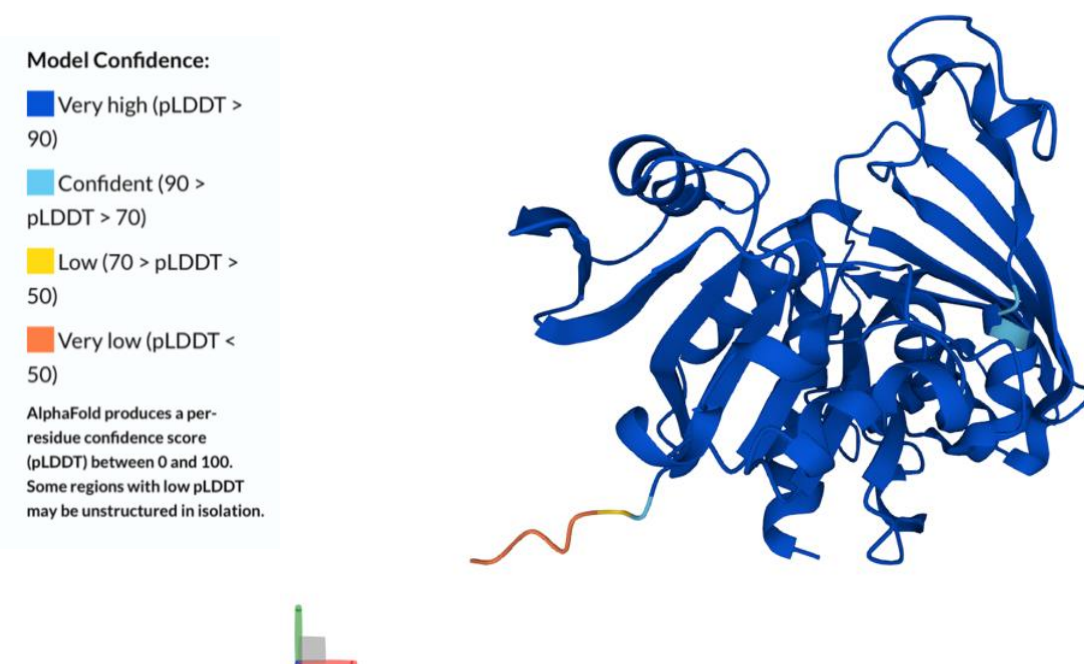


Figura 6. Formato PDB de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa modelado por Alpha Fold 2.

3.3 Análisis Filogenético de Proteínas

Mediante el software MEGA X se obtuvo un análisis filogenético para determinar la relación que tienen estas proteínas. En el árbol construido se observa que enolasa y cardiolipina parten de el mismo nodo indicando que divergieron a partir de un ancestro en común, HSP70 se encuentra en un nodo previo a enolasa y la G3FD se mantiene en una rama cuyo nodo es el ancestro en común de las cuatro proteínas, este análisis nos confirma el porqué de la homología estructural entre estas proteínas. El árbol filogenético se encuentra en la figura 7.

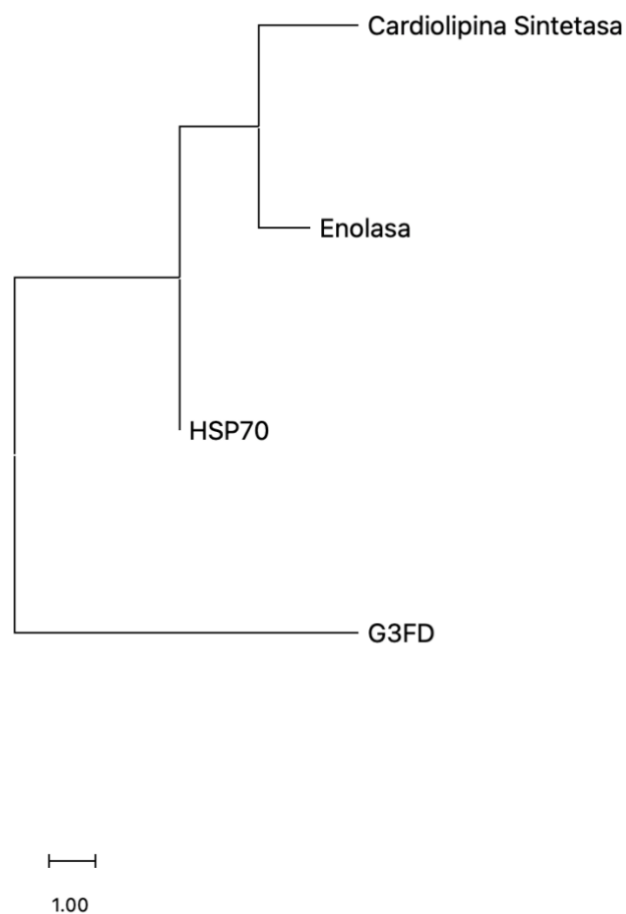


Figura 7. Árbol Filogenético obtenido mediante MEGA11.

3.4 Propiedades Fisicoquímicas

Para obtener las propiedades fisicoquímicas de las tres proteínas se utilizó el servidor ProtParam cuyos datos se ven presentados en la Tabla 7. ProtParam es una herramienta que permite el cálculo de diversos parámetros físicos y químicos tales como peso molecular, horas de vida media en diversos organismos y su estabilidad.

Tabla 7. Valores obtenidos a través de la plataforma ProtParam.

	Valor			
Parámetro	Cardiolipina Sintetasa	HSP70	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	Enolasa
Número de aminoácidos	639	654	338	429
Peso Molecular (Da)	74032.09	70931.24	36306.67	46443.96
Punto Isoeléctrico teórico	9.77	5.79	8.28	5.92
Tiempo estimado de vida	30 horas en reticulocitos mamíferos in vitro >20 horas en levaduras in vivo >10 horas en <i>E. coli</i> in vivo	30 horas en reticulocitos mamíferos in vitro >20 horas en levaduras in vivo >10 horas en <i>E. coli</i> in vivo	30 horas en reticulocitos mamíferos in vitro >20 horas en levaduras in vivo >10 horas en <i>E. coli</i> in vivo	30 horas en reticulocitos mamíferos in vitro >20 horas en levaduras in vivo >10 horas en <i>E. coli</i> in vivo
Índice de inestabilidad (Ideal <40)	45.98 (Inestable)	40.51 (Inestable)	20.26 (Estable)	38.72 (Estable)
Índice alifático	76.31	77.55	87.99	85.55
Gran promedio de hidropaticidad (GRAVY)	-0.543	-0.440	-0.092	-0.245

Solubilidad (>0.5 expresión soluble)	0.397	0.822	0.892	0.919
--------------------------------------	-------	-------	-------	-------

Para determinar la topología de las proteínas se utilizó la plataforma DeepTMHMM. De esta manera se obtuvo una predicción de la posición de las proteínas en la célula.

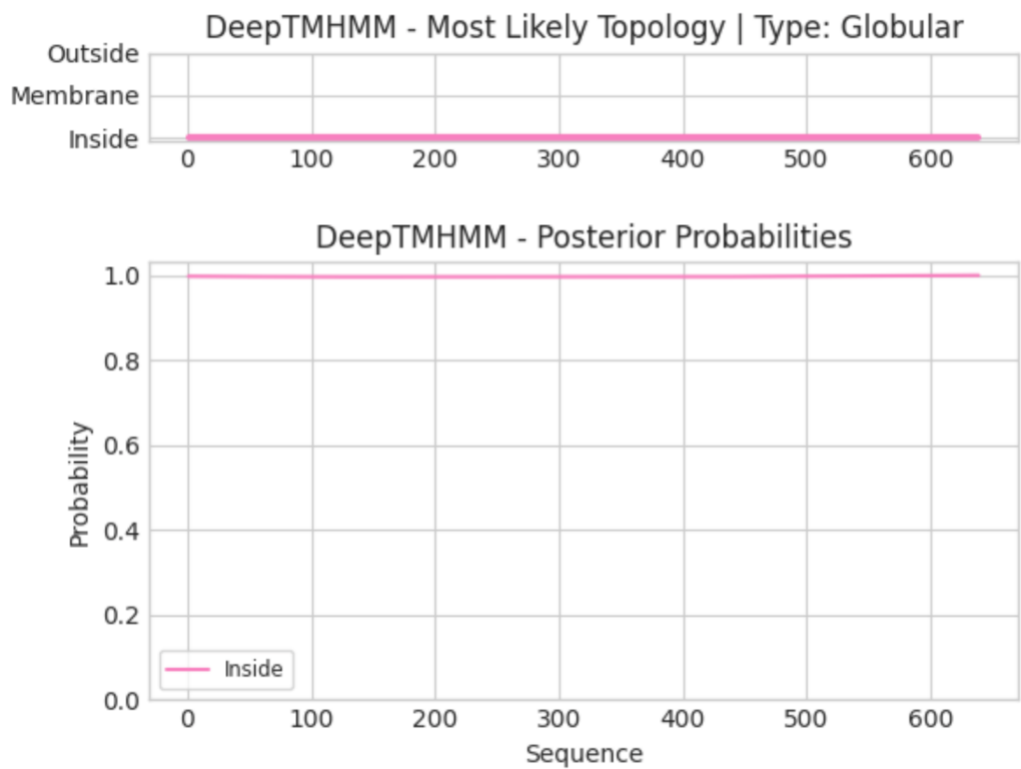


Figura 8. Predicción topológica de la cardiolipina sintetasa mediante la plataforma DeepTMHMM.

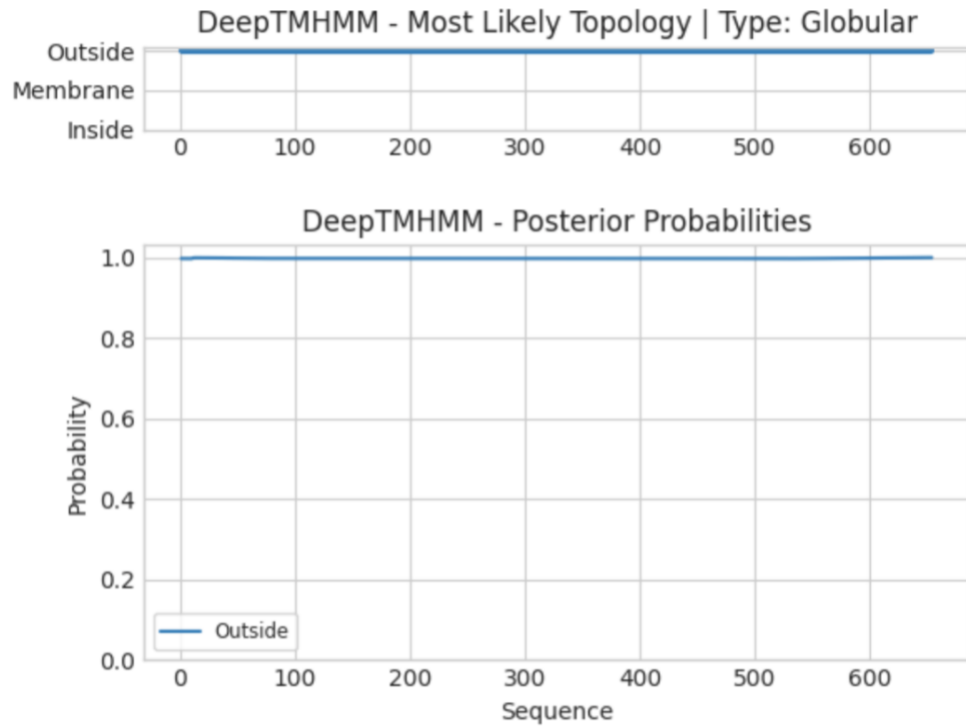


Figura 9. Predicción topológica de HSP70 mediante DeepTMHMM.

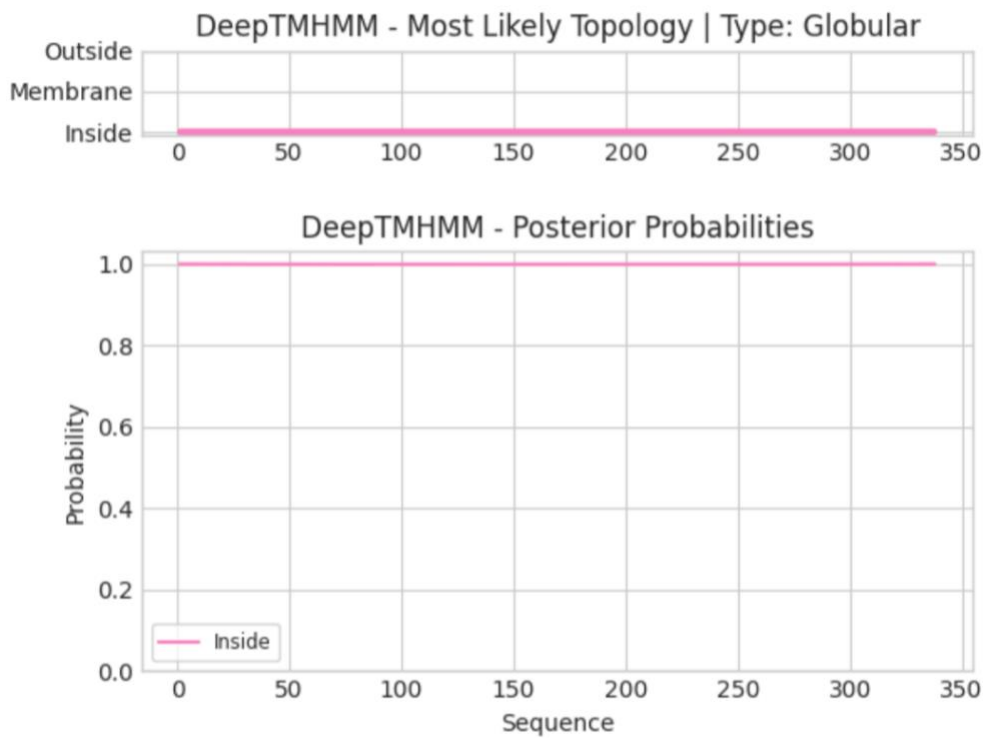


Figura 10. Predicción topológica de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa mediante DeepTMHMM.

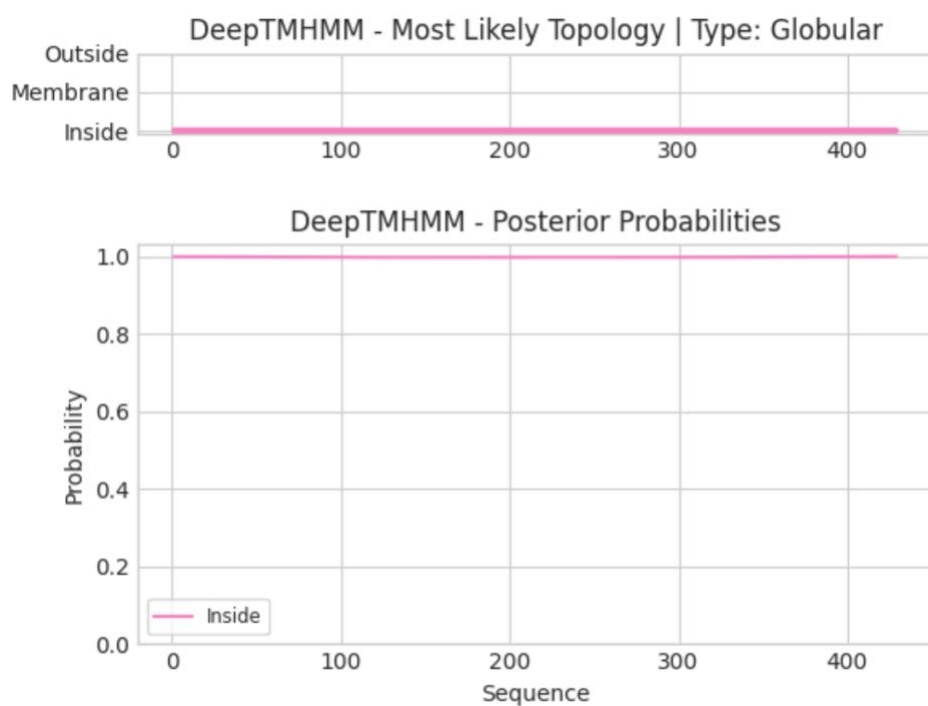


Figura 11. Predicción topológica de la enolasa mediante DeepTMHMM

Tabla 8. Predicciones topológicas de las proteínas mediante DeepTMHMM.

	Cardiolipina sintetasa	HSP70	Gliceraldehído 3-Fosfato	Enolasa
Posición	Dentro de la membrana	Fuera de la membrana	Dentro de la membrana	Dentro de la membrana

3.5 Propiedades Inmunogénicas

Para determinar los posibles epítopes para linfocitos B, se realizaron predicciones en la plataforma BepiPred las cuales mostraron regiones con alta probabilidad de ser reconocidos por anticuerpos (Tabla 9, 10, 11 y 12). Una vez teniendo esta información se recurrió a Chimera para tener una mejor visualización de los posibles epítopes encontrados en las proteínas resaltando dichas regiones (Figura 12, 13, 14 y 15).

Tabla 9. Predicciones de epítopes para células B de la cardiolipina sintetasa.

Cardiolipina Sintetasa	
Epítopes para Linfocitos B	Número (aa)
EYCGRSQGGTG	11
YEYKGD	6
LKDLQTSIEVKYEEYQRRS	19
FRTFWDADLSSKV	13

Tabla 10. Predicciones de epítopes para células B para HSP70.

HSP70	
Epítopes para Linfocitos B	Número (aa)
ANDQGN	6
GRKFSDPVVQSDMKHWPF	18
KRKNKGKDLTTSQRALRR	18
FRQRGLPGKP	10
LTGGKSKQTEGL	12
RNTTIPTKKS	10
EGERAMTKDCHLLGT	15

Tabla 11. Predicciones de epítopes para células B del gliceraldehído 3-fosfato

Gliceraldehído 3-fosfato	
Epítopes para Linfocitos B	Número (aa)
STHGRYGG	8
HDPANLKWN	9
LTDETARKHIQ	11
TQKTVGGPSQKDWRGGRG	18

Tabla 12. Predicciones de epítopes para células B de la enolasa.

Enolasa	
Epítopes para Linfocitos B	Número (aa)
DDDKRRYLKGK	11
KHAGNA	6
KQLAET	6



Figura 12. Estructura de la cardiolipina sintetasa mostrando cuatro epítopes para células B representados en la tabla 9.



Figura 13. Estructura de HSP70 mostrando 7 epítopes para células B representados en la tabla 10.

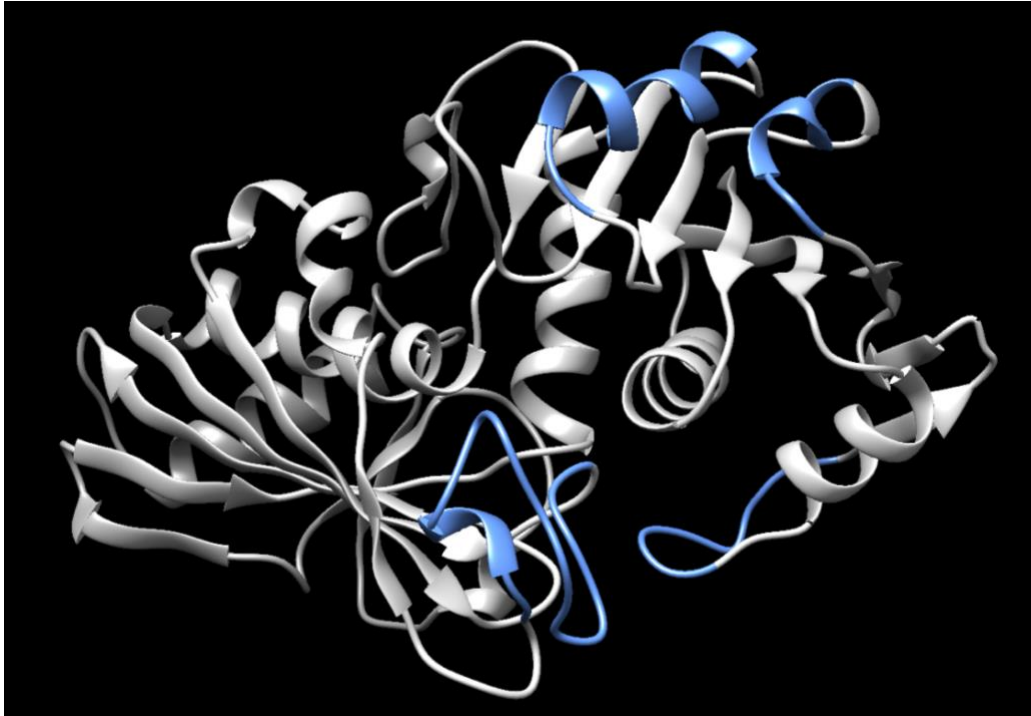


Figura 14. Estructura de la G3FD mostrando cuatro epítopes para células B, representados en la tabla 11.

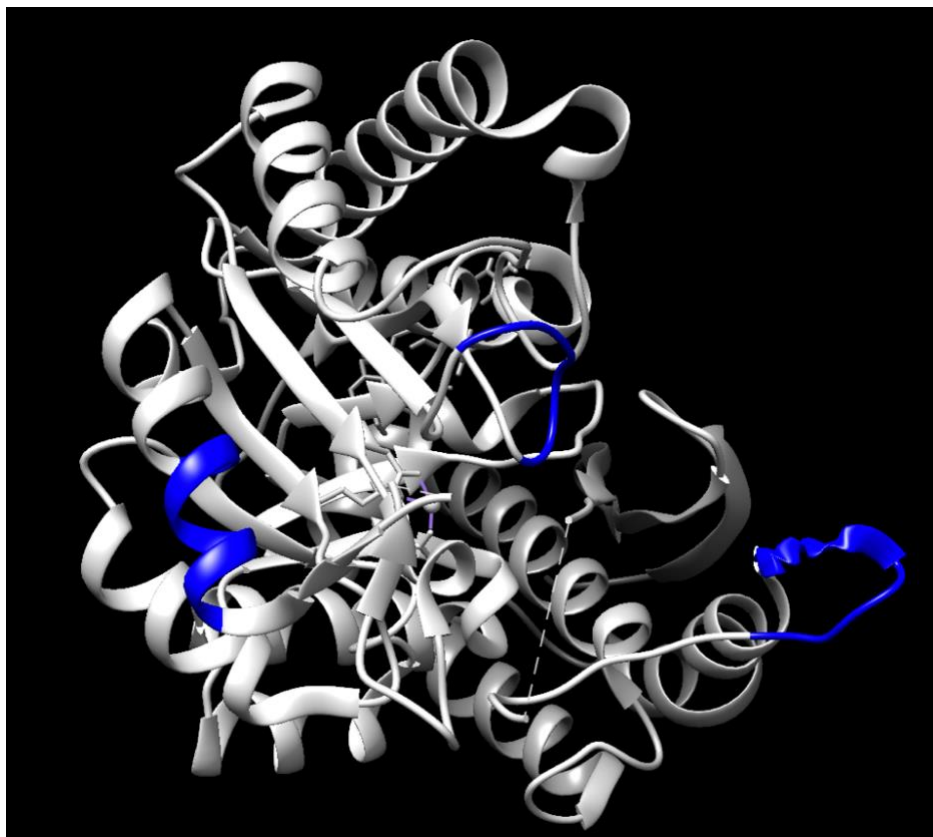


Figura 15. Estructura de la enolasa mostrando epítopes para células B, representados en la tabla 12.

Para determinar epítopes en MHCI y MHCII se utilizó la plataforma Vaxign 2.0, el cual arrojó un mapeo de epítopes mostrados en la tabla 13.

Cardiolipina sintetasa								
Epítopes para MHCI								
Allele	Start	End	Length	Peptide	Score	Percentile	Rank	
HLA-A*03:01	407	415	9	RLAERPLSK	0.991852	0.01		
HLA-B*57:01	264	273	10	KAPKPWQWSW	0.991682	0.01		
HLA-A*03:01	19	28	10	RLLPPPLREK	0.991116	0.01		
HLA-B*57:01	539	547	9	KTVVVDSIW	0.99108	0.01		
HLA-B*58:01	539	547	9	KTVVVDSIW	0.99096	0.01		
HLA-B*44:02	595	603	9	EEYQRRSFW	0.976833	0.01		
HLA-A*02:03	582	590	9	FLKDLQTSI	0.976573	0.01		
HLA-B*57:01	600	609	10	RSFWLRFTSW	0.973536	0.04		
HLA-B*35:01	422	430	9	DPVPGAEY	0.9733	0.01		
HLA-B*44:03	595	603	9	EEYQRRSFW	0.97232	0.01		
HLA-B*44:02	116	124	9	DEAKRSVLW	0.971772	0.01		
HLA-B*44:03	116	124	9	DEAKRSVLW	0.969141	0.01		
HLA-A*03:01	406	415	10	RRLAERPLSK	0.963233	0.01		

Cardiolipina sintetasa								
Epítopes para MHCII								
Allele	Start	End	Length	Core_Peptide	Peptide	Score	Rank	
HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02	38	52	15	SSGVELRES	NNNSSGVELRESANK	0.8886	0.01	
HLA-DRB1*09:01	169	183	15	LKQSGANVI	IDRLKQSGANVIEHR	0.8999	0.02	
HLA-DRB1*09:01	531	545	15	IMHAKTVVV	KGDQIMHAKTVVVDS	0.8926	0.03	
HLA-DRB1*09:01	532	546	15	IMHAKTVVV	GDQIMHAKTVVVDSI	0.8751	0.04	
HLA-DRB1*09:01	168	182	15	LKQSGANVI	LIDRLKQSGANVIEH	0.8787	0.04	
HLA-DRB1*15:01	524	538	15	IYEEKGDQI	GVRIYEEKGDQIMHA	0.9491	0.04	
HLA-DRB1*13:02	202	216	15	IRNHRKILI	SPAIRNHRKILIVDD	0.8198	0.05	
HLA-DRB1*13:02	470	484	15	YLPHRKLLR	TTPYYLPHRKLLRAI	0.8305	0.05	
HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02	37	51	15	SSGVELRES	INNNSSGVELRESAN	0.8545	0.05	

Tabla 13. Epítopes predichos para MHC-I y II de la cardiolipina sintetasa reportados por IEDB.

HSP70

Predicción de epítopes para MHCI						
Allele	Start	End	Length	Peptide	Score	Percentile_Rank
HLA-B*15:01	127	135	9	KMKEIAESY	0.990988	0.01
HLA-B*58:01	576	584	9	SAVEEALQW	0.983745	0.01
HLA-B*15:01	60	68	9	AMNPTNTVF	0.981385	0.01
HLA-B*57:01	576	584	9	SAVEEALQW	0.96832	0.04
HLA-B*57:01	82	90	9	VVQSDMKHW	0.967176	0.04
HLA-B*35:01	176	184	9	EPTAAAIAY	0.965144	0.02
HLA-B*58:01	575	584	10	TSAVEEALQW	0.959924	0.03
HLA-A*68:01	119	127	9	EVSSMVL SK	0.956021	0.03
HLA-A*68:01	164	172	9	TIAGMEVLR	0.950054	0.03
HLA-B*57:01	575	584	10	TSAVEEALQW	0.946752	0.06
HLA-A*68:02	1	9	9	MTYEGAIGI	0.945383	0.01
HLA-A*02:06	213	221	9	TIDGGIFEV	0.945009	0.02
HLA-A*24:02	374	382	9	AYGAAVQAF	0.939715	0.01
HLA-B*58:01	82	90	9	VVQSDMKHW	0.936139	0.04

HSP70

Predicción de epítopes para MCHII							
Allele	Start	End	Length	Core Peptide	Peptide	Score	Rank
HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02	556	570	15	NVAGKIEEA	TVNEPNVAGKIEEAD	0.879	0.01
HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02	559	573	15	NVAGKIEEA	EPNVAGKIEEADKNT	0.8899	0.01
HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02	557	571	15	NVAGKIEEA	VNEPNVAGKIEEADK	0.9235	0.01
HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02	558	572	15	NVAGKIEEA	NEPNVAGKIEEADKN	0.9331	0.01
HLA-DRB3*02:02	56	70	15	VAMNPTNTV	KNQVAMNPTNTVFDA	0.9609	0.01
HLA-DRB3*01:01	363	377	15	INPDEAVAY	LNKSINPDEAVAYGA	0.9633	0.01
HLA-DRB3*01:01	364	378	15	INPDEAVAY	NKSINPDEAVAYGAA	0.9681	0.01
HLA-DRB3*02:02	55	69	15	VAMNPTNTV	AKNQVAMNPTNTVFD	0.9412	0.02
HLA-DRB1*15:01	441	455	15	IQVFEGERA	GVHIQVFEGERAMTK	0.9627	0.03
HLA-DRB4*01:01	23	37	15	VEIIANDQG	NERVEIIANDQGNRT	0.9388	0.04

Tabla 14. Epítopes predichos para MHC-I y II de la HSP70 reportados por IEDB.

Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa						
Predicción de epítopes para MCHI						
Allele	Start	End	Length	Peptide	Score	Percentile_Rank
HLA-B*44:03	82	91	10	SEHDPANLKW	0.996065	0.01
HLA-B*44:02	82	91	10	SEHDPANLKW	0.994818	0.01
HLA-A*02:03	306	314	9	SLNDHFAKL	0.98769	0.01
HLA-A*02:01	306	314	9	SLNDHFAKL	0.954186	0.02
HLA-B*44:03	272	280	9	GELKGILGY	0.951388	0.02
HLA-B*51:01	239	247	9	VPTPNVSVV	0.951363	0.01
HLA-A*31:01	223	231	9	KVIPALNGR	0.951202	0.01
HLA-A*68:01	22	30	9	MVFRAAQHR	0.949389	0.03
HLA-A*01:01	41	49	9	LLDADY MAY	0.945999	0.02
HLA-A*03:01	190	198	9	KTVGGPSQK	0.943655	0.02

Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa							
Predicción de epítopes para MCHII							
Allele	Start	End	Length	Core_Peptide	Peptide	Score	Rank
HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02	32	46	15	IVGINDLLD	DIEIVGINDLLLDADY	0.0667	0.01
HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02	31	45	15	IVGINDLLD	NDIEIVGINDLLDAD	0.0701	0.01
HLA-DQA1*01:01/DQB1*05:01	32	46	15	IVGINDLLD	DIEIVGINDLLLDADY	0.1154	0.01
HLA-DQA1*01:01/DQB1*05:01	31	45	15	IVGINDLLD	NDIEIVGINDLLDAD	0.1077	0.03
HLA-DRB1*13:02	68	82	15	LVVNGKKIR	EGALVVNGKKIRVTS	0.83	0.05
HLA-DPA1*01:03/DPB1*04:01	163	177	15	IIHEKFGIV	PLAKIIHEKFGIVEG	0.7954	0.07
HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02	30	44	15	IVGINDLLD	RNDIEIVGINDLLDA	0.046	0.09
HLA-DRB1*13:02	67	81	15	LVVNGKKIR	REGALVVNGKKIRVT	0.7968	0.09
HLA-DRB1*04:05	32	46	15	IVGINDLLD	DIEIVGINDLLLDADY	0.9563	0.1
HLA-DPA1*01:03/DPB1*04:01	164	178	15	IIHEKFGIV	LAKIIHEKFGIVEGL	0.7409	0.11
HLA-DRB1*04:05	31	45	15	IVGINDLLD	NDIEIVGINDLLDAD	0.9553	0.11

Tabla 15. Epítopes predichos para MHC-I y II de la Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa reportados por IEDB.

Enolasa						
Predicción de epítopes para MCHI						
Allele	Start	End	Length	Peptide	Score	Percentile_Rank
HLA-B*57:01	259	268	10	LTFKSPEATW	0.993554	0.01
HLA-B*40:01	20	28	9	VEVEVTTEL	0.99273	0.01
HLA-B*58:01	259	268	10	LTFKSPEATW	0.98646	0.01
HLA-A*68:01	1	9	9	MTIQKVHGR	0.978636	0.01
HLA-B*44:03	415	423	9	EELGAHAKF	0.973367	0.01
HLA-A*02:06	380	388	9	YIADLVVGL	0.957252	0.02
HLA-A*68:01	23	32	10	EVTTELGVFR	0.956515	0.03
HLA-B*15:01	179	187	9	ALRMGAEVY	0.955118	0.01
HLA-A*02:01	224	232	9	ILMEAIEQA	0.95438	0.02
HLA-A*26:01	276	285	10	ETYAKWVSEY	0.951265	0.01
HLA-A*03:01	72	80	9	VLAPALVGK	0.95078	0.02
HLA-A*02:01	380	388	9	YIADLVVGL	0.947045	0.02

Enolasa								
Predicción de epítopes para MCHII								
Allele	Start	End	Length	Core_Peptide	Peptide	Score	Rank	
HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02	284	298	15	IVSLEDPYD	EYPIVSLEDPYDQDD	0.0708	0.01	
HLA-DQA1*01:01/DQB1*05:01	284	298	15	IVSLEDPYD	EYPIVSLEDPYDQDD	0.1472	0.01	
HLA-DRB5*01:01	183	197	15	YHSLKSIK	GAEVYHSLKSIKKK	0.9266	0.01	
HLA-DRB5*01:01	184	198	15	YHSLKSIK	AEVYHSLKSIKKKY	0.9276	0.01	
HLA-DQA1*01:01/DQB1*05:01	283	297	15	IVSLEDPYD	SEYPIVSLEDPYDQD	0.1078	0.03	
HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02	283	297	15	IVSLEDPYD	SEYPIVSLEDPYDQD	0.0517	0.05	
HLA-DRB5*01:01	182	196	15	YHSLKSIK	MGAEVYHSLKSIKK	0.8748	0.05	
HLA-DRB5*01:01	185	199	15	YHSLKSIK	EVYHSLKSIKKKYG	0.8632	0.06	
HLA-DRB1*04:01	195	209	15	YGQDAVNVG	KKKYGQDAVNVGDEG	0.9571	0.06	

Tabla 16. Epítopes predichos para MHC-I y II de la enolasa reportados por IEDB.

3.6 Docking Molecular

Se realizó un Docking molecular a cada proteína modelada y los TLR's 2 y 4. Para todas las proteínas se utilizó la plataforma ClusPro 2.0. Los resultados arrojaron modelos con posibles interacciones entre el ligando y el receptor, de los cuales, se eligió el mejor candidato acorde a su Docking score (Tabla 13). Una vez obtenidos las interacciones se descargaron en formato PDB y se visualizaron en UCSF Chimera (Figura 16-31). Posteriormente se enviaron al servidor PRODIGY la cual brindó valores tales como energía libre de Gibbs (ΔG) y la constante de disociación (K_d) a 25 °C.

Docking Score (Clus Pro)					
Energía	Receptor (PDB)	Cardiolipina sintetasa	HSP70	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	Enolasa
Centro	TLR 2 (2Z7X)	-1211.4	-713.7	-742.8	-710.2
Más baja		-1273.4	-922.0	-919.2	-710.2

Centro	TLR4 (4G8A)	-1400.7	-1060.9	-897.6	-712.4
Más baja		-1479.9	-1363.2	-937.8	-712.4

Tabla 17. Valores obtenidos por el Docking molecular (Clus Pro).

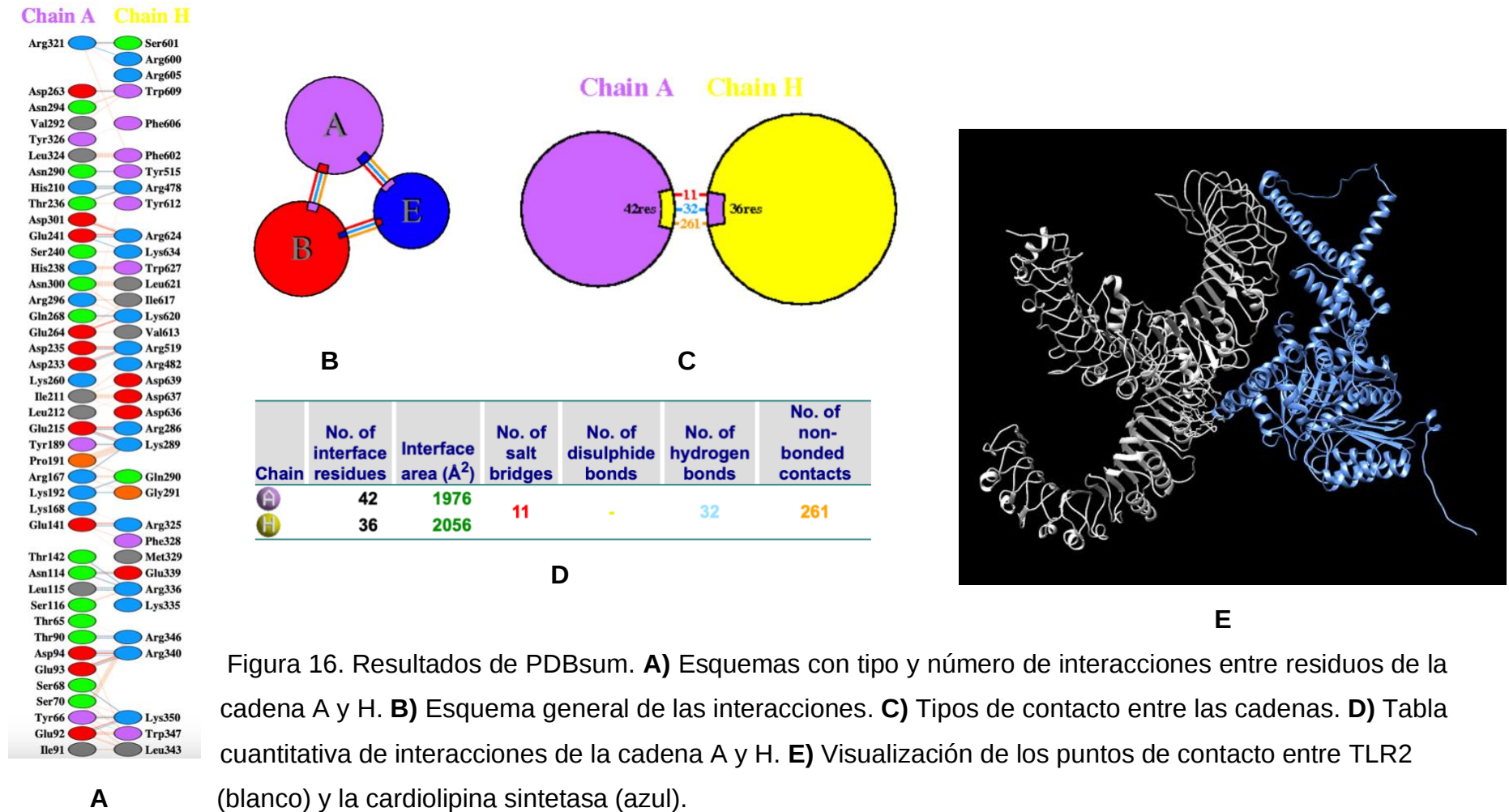
Prodigy					
	Energía de afinidad ΔG (kcal/mol)	Cardiolipina sintetasa	HSP70	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	Enolasa
Energía de afinidad ΔG (kcal/mol)	TLR 2 (2Z7X)	-21.4	-17.9	-17.0	-16.8
	TLR4 (4G8A)	-21.5	-19.8	-15.9	-20.7
Constante de disociación K_d (M) 25°C	TLR 2 (2Z7X)	2.2E-16	7.9E-14	3.4E-13	5E-13
	TLR4 (4G8A)	-1.7E-16	2.8E-15	2.3E-12	6.6E-16

Tabla 18. Valores obtenidos por la plataforma PRODIGY.

3.6.1 Cardiolipina Sintetasa

3.6.1.1 Cardiolipina Sintetasa/Toll2

Key: Salt bridges Disulphide bonds Hydrogen bonds Non-bonded contacts



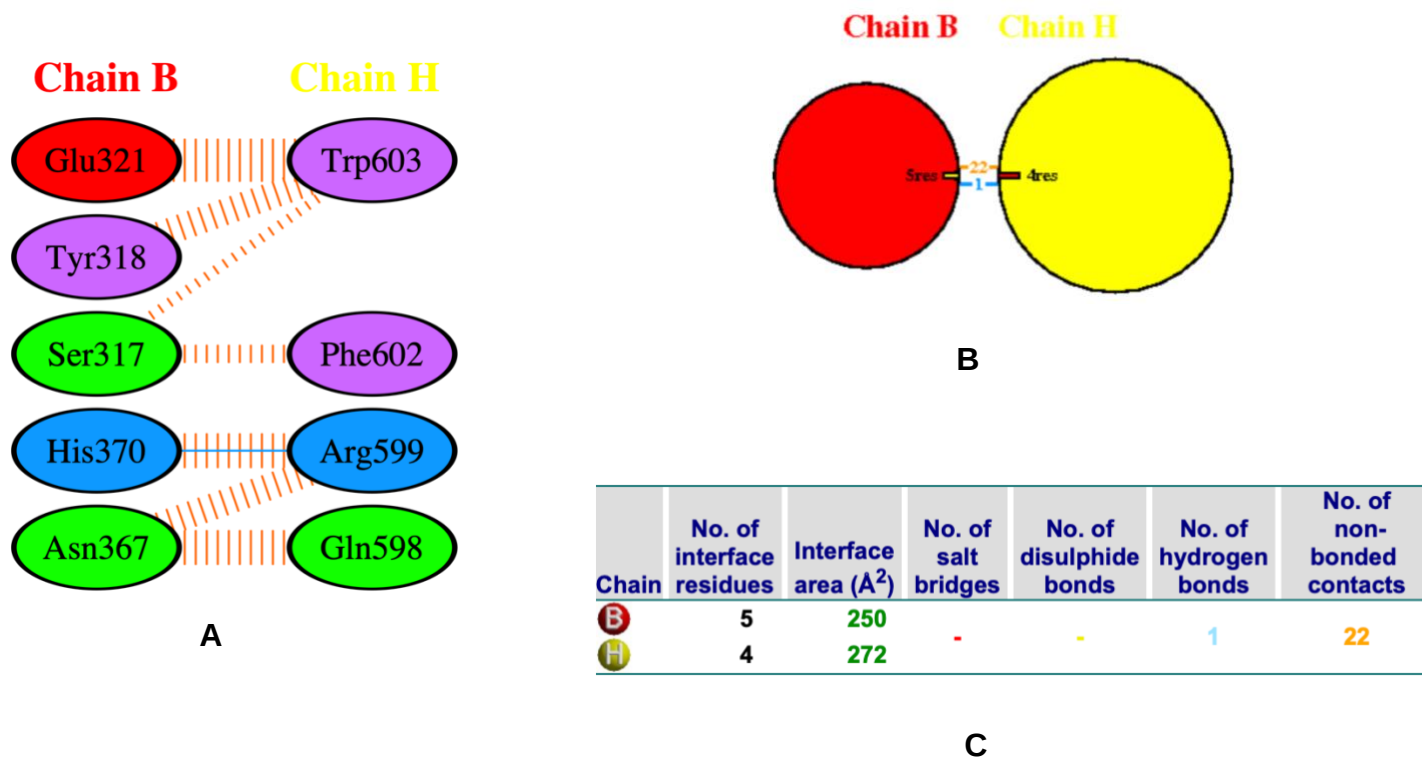


Figura 17. Resultados de PDBsum **A)** Esquema con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena B y H. **B)** Tipos de contacto entre las cadenas. **C)** Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena B y H.

3.6.1.2 Cardiolipina Sintetasa/Toll4

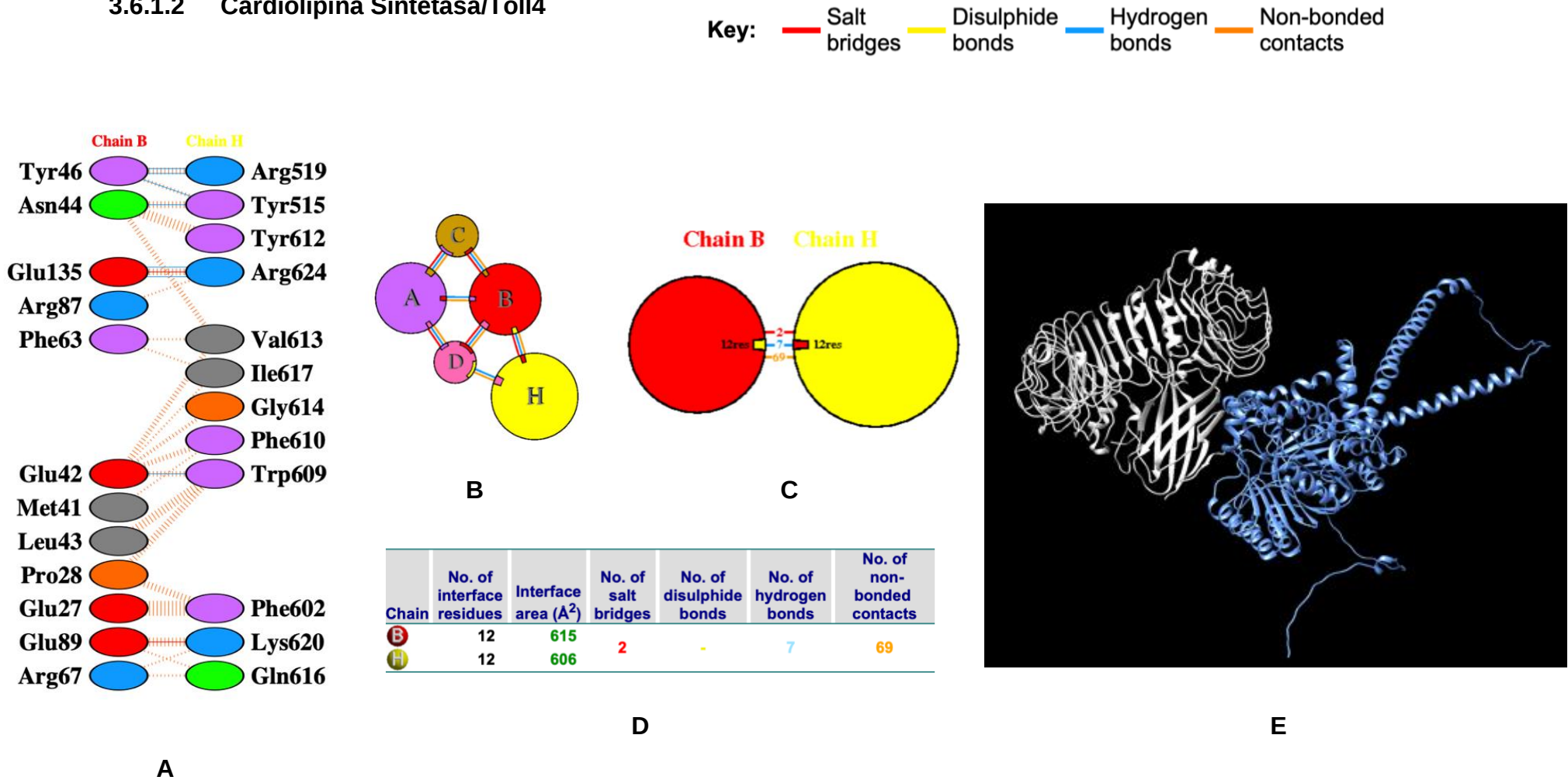
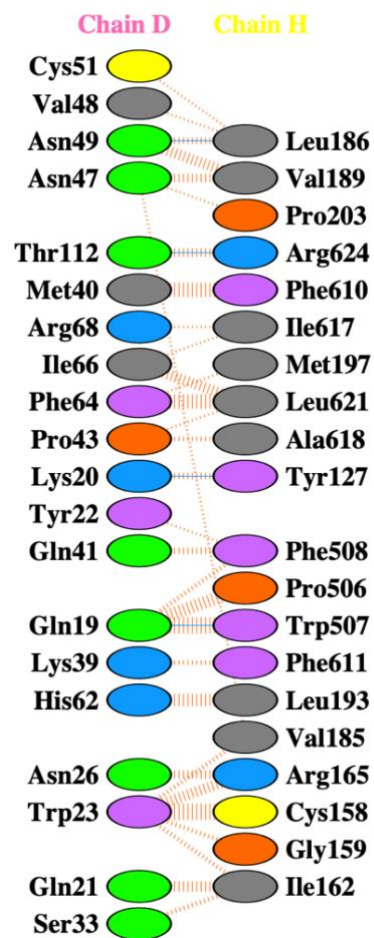
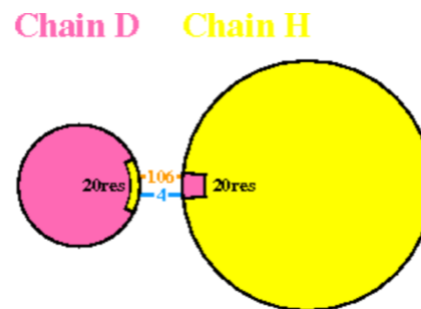


Figura 18. Resultados de PDBsum. **A)** Esquemas con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena B y H. **B)** Esquema general de las interacciones. **C)** Tipos de contacto entre las cadenas. **D)** Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena B y H. **E)** Visualización de los puntos de contacto entre TLR4 (blanco) y la cardiolipina sintetasa (azul).



A



B

Chain	No. of interface residues	Interface area (Å ²)	No. of salt bridges	No. of disulphide bonds	No. of hydrogen bonds	No. of non-bonded contacts
D	20	1222	-	-	4	106
H	20	1166	-	-	4	106

C

Figura 19. Resultados de PDBsum **A)** Esquema con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena D y H. **B)** Tipos de contacto entre las cadenas. **C)** Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena D y H.

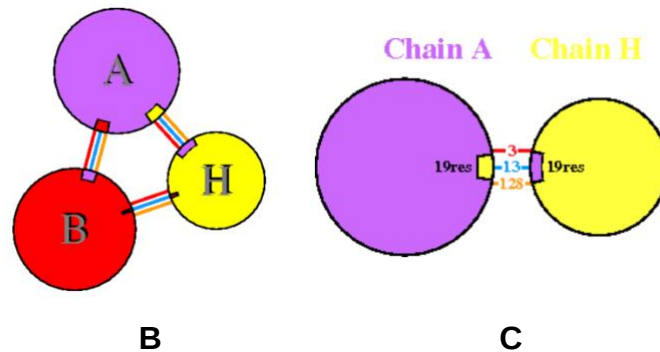
3.6.2 HSP70

3.6.2.1 HSP70/Toll2

Key: — Salt bridges — Disulphide bonds — Hydrogen bonds — Non-bonded contacts

Chain A	Chain H
Glu190	Trp200
Lys164	Arg204
Leu212	Arg201
Glu215	Pro212
Ile211	Met235
His210	Met179
Thr236	Thr180
His238	Phe237
	Gly234
Glu264	Lys313
Asp235	Leu178
Thr262	
Asn290	Glu176
Pro320	Arg252
Gly291	Phe311
	Leu253
Arg321	Glu254
	His310
Leu324	Asn308
Val292	
Asn294	
Tyr326	Leu307

A

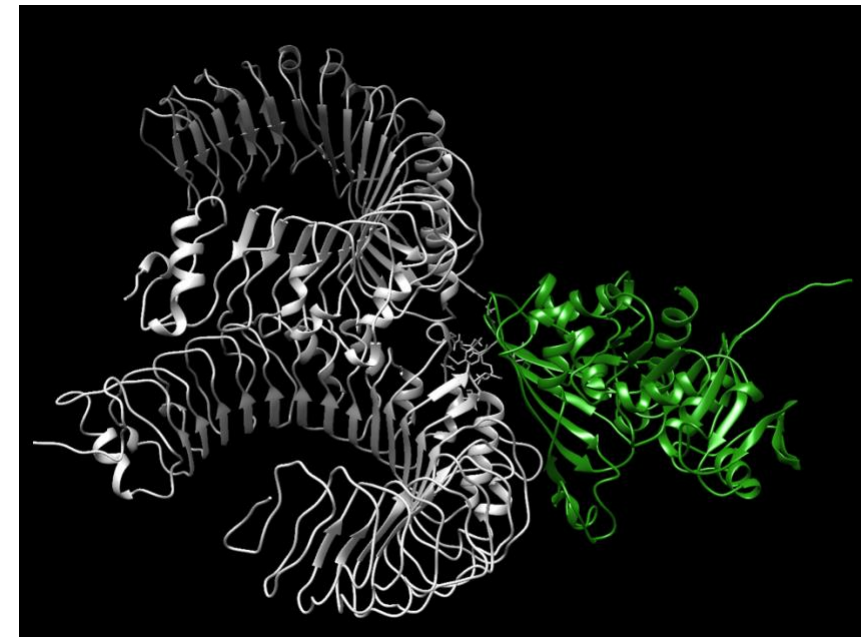


B

C

Chain	No. of interface residues	Interface area (Å ²)	No. of salt bridges	No. of disulphide bonds	No. of hydrogen bonds	No. of non-bonded contacts
A	19	1088	3	-	13	128
H	19	1057				

D



E

Figura 20. Resultados de PDBsum. **A)** Esquemas con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena A y H. **B)** Esquema general de las interacciones. **C)** Tipos de contacto entre las cadenas. **D)** Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena A y H. **E)** Visualización de los puntos de contacto entre TLR2 (blanco) y HSP70 (verde).

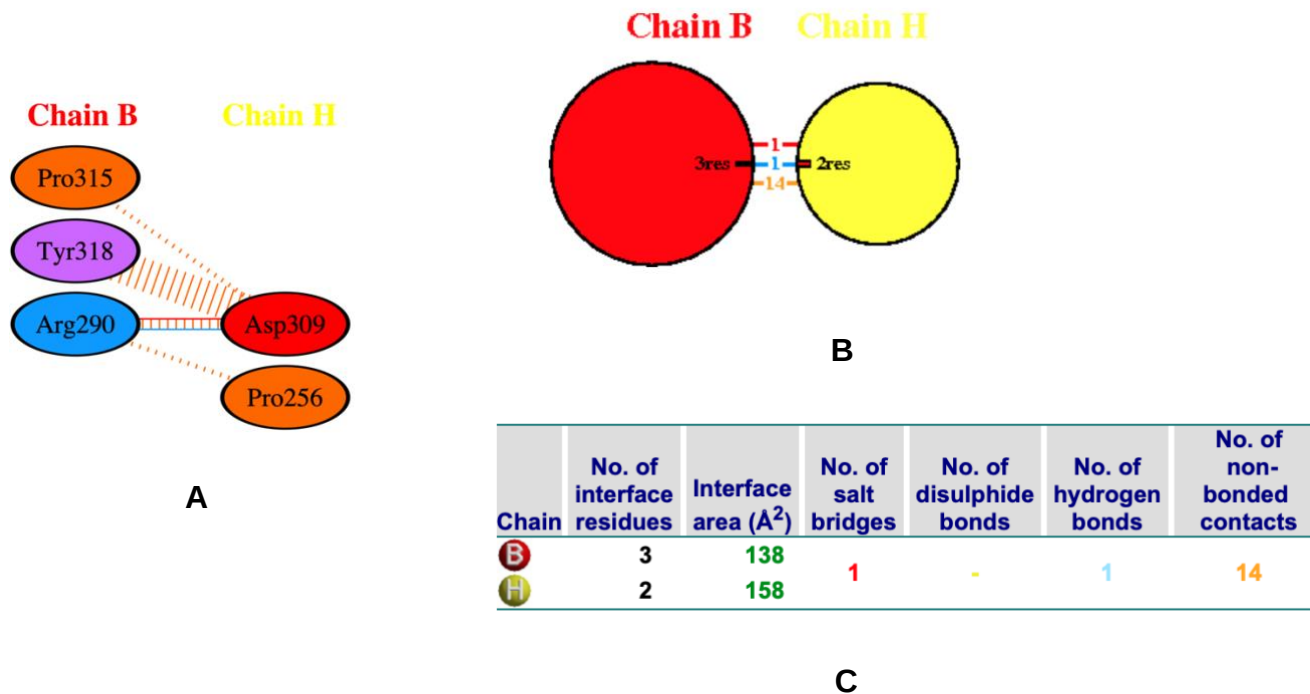


Figura 21. Resultados de PDBsum **A)** Esquema con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena D y H. **B)** Tipos de contacto entre las cadenas. **C)** Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena B y H.

3.5.2.2 HSP70/Toll4

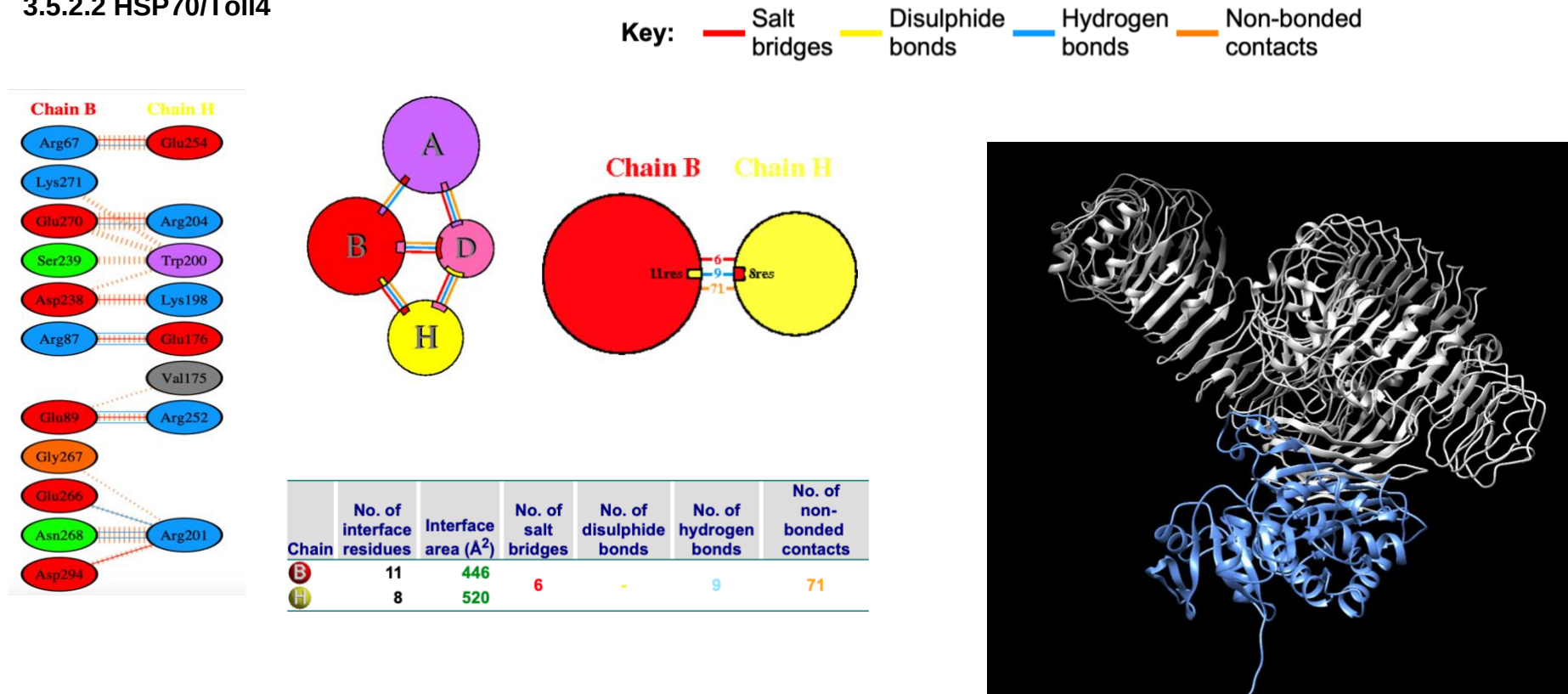
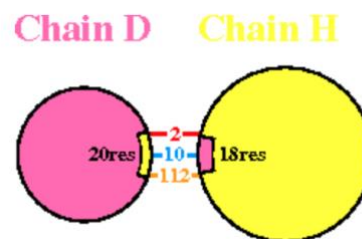
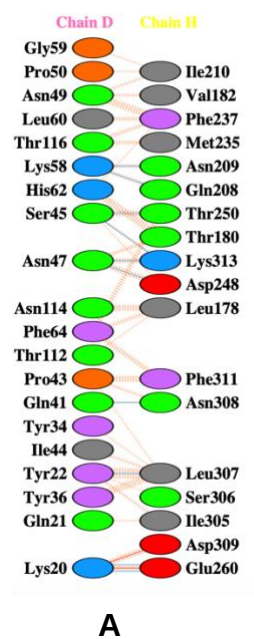


Figura 22. Resultados de PDBsum. **A)** Esquemas con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena B y H. **B)** Esquema general de las interacciones. **C)** Tipos de contacto entre las cadenas. **D)** Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena B y H. **E)** Visualización de los puntos de contacto entre TLR4 (blanco) y HSP70 (azul).



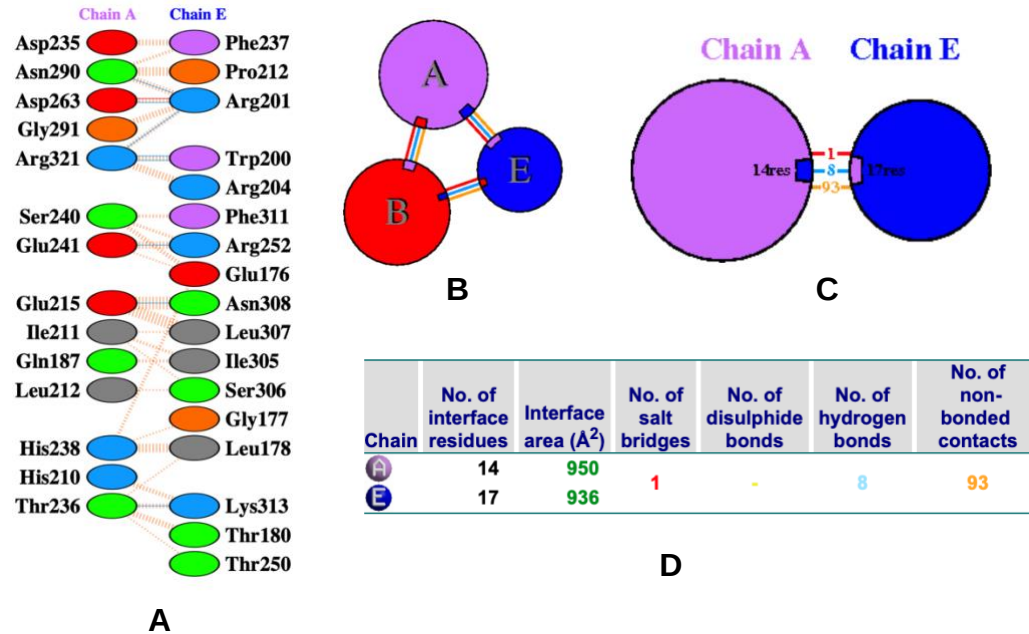
Chain	No. of interface residues	Interface area (Å ²)	No. of salt bridges	No. of disulphide bonds	No. of hydrogen bonds	No. of non-bonded contacts
D	20	971	2	-	10	112
H	18	988	2	-	10	112

C

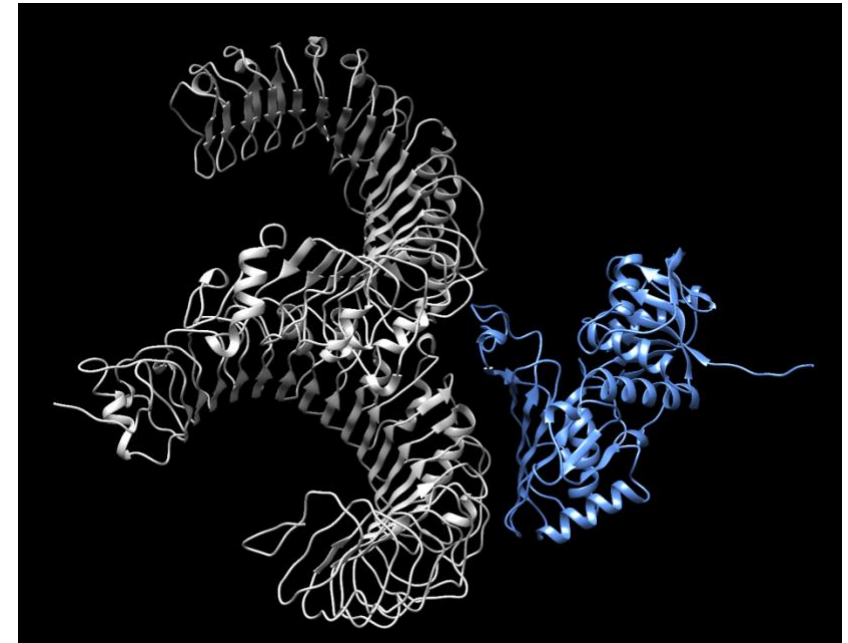
Figura 23. Resultados de PDBsum **A)** Esquema con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena D y H. **B)** Tipos de contacto entre las cadenas. **C)** Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena D y H.

3.6.3 Gliceráldehído 3-fosfato Deshidrogenasa

3.6.3.1 Gliceráldehído 3-fosfato Deshidrogenasa/Toll2



Key: — Salt bridges — Disulphide bonds — Hydrogen bonds — Non-bonded contacts



E

Figura 24. Resultados de PDBsum. **A)** Esquemas con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena A y D. **B)** Esquema general de las interacciones. **C)** Tipos de contacto entre las cadenas. **D)** Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena A y D. **E)** Visualización de los puntos de contacto entre TLR2 (blanco) y la gliceráldehído 3-fosfato deshidrogenasa (azul).

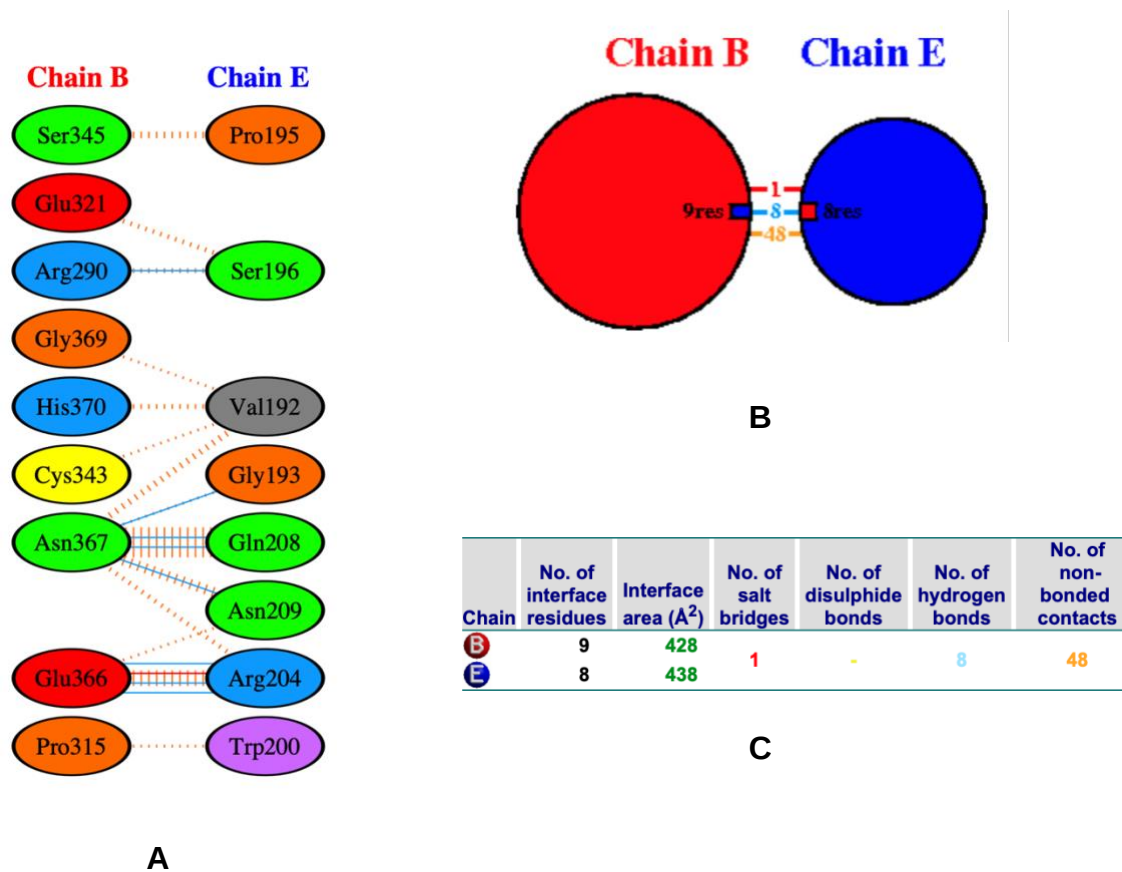


Figura 25. Resultados de PDBsum **A)** Esquema con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena B y D. **B)** Tipos de contacto entre las cadenas. **C)** Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena B y D

3.6.3.2 Gliceraldehído 3-fosfato Deshidrogenasa/Toll4

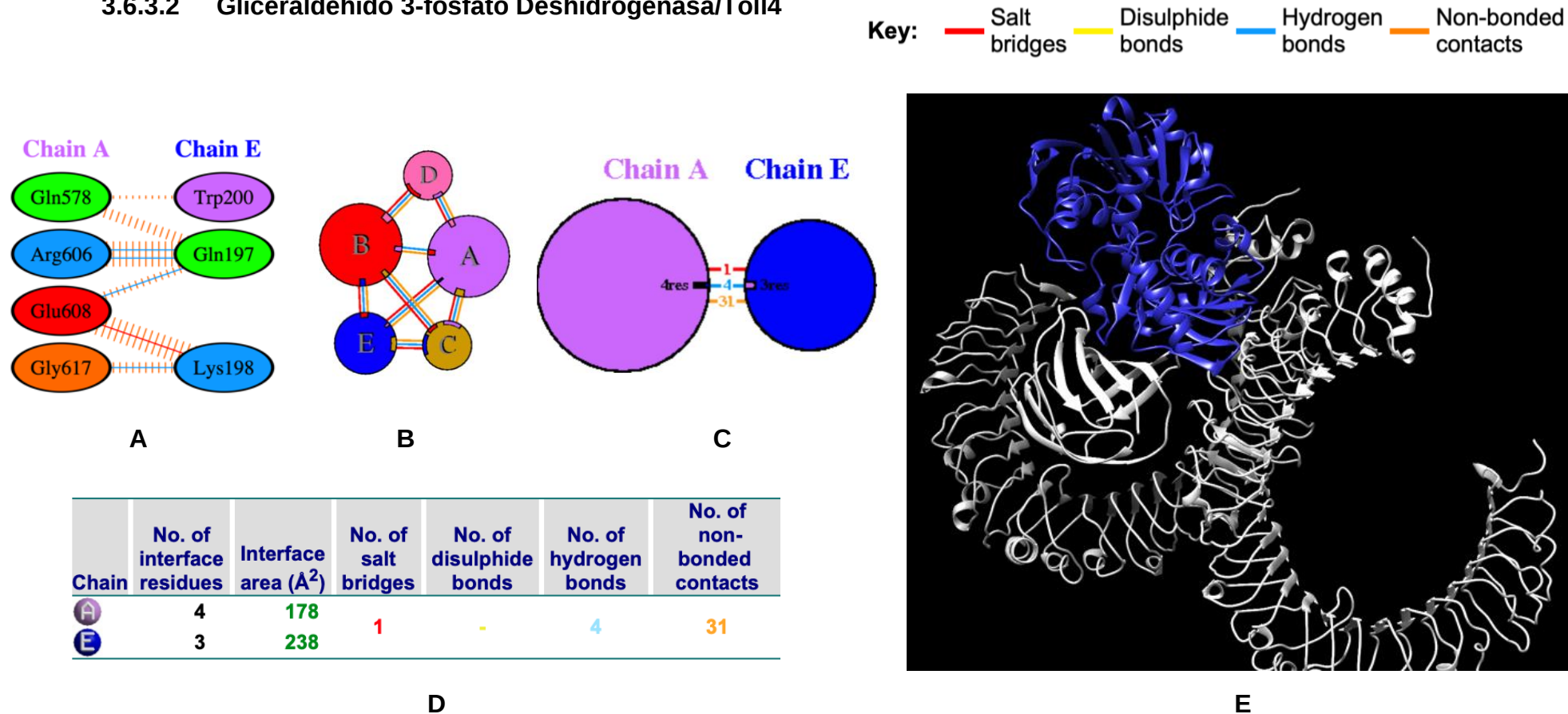
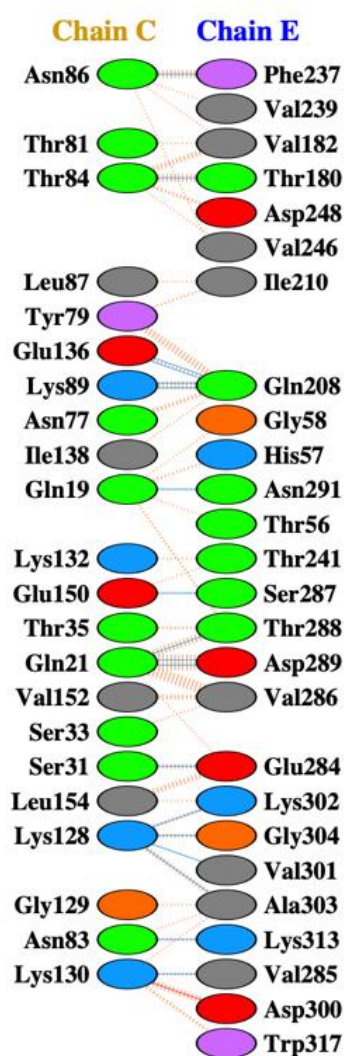
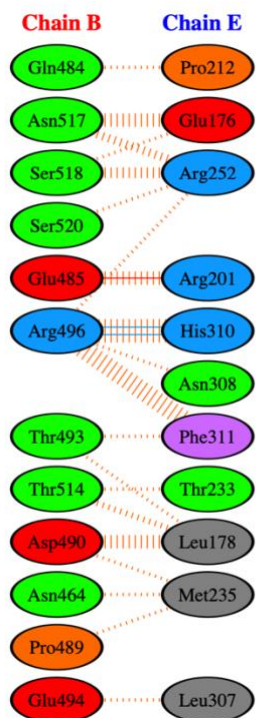


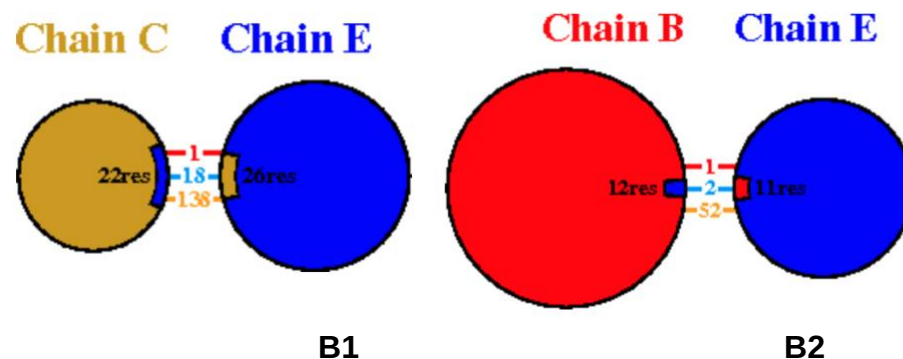
Figura 26. Resultados de PDBsum. **A)** Esquemas con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena A y D. **B)** Esquema general de las interacciones. **C)** Tipos de contacto entre las cadenas. **D)** Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena A y D. **E)** Visualización de los puntos de contacto entre TLR4 (blanco) y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (azul).



A1



A2



Chain	No. of interface residues	Interface area (Å ²)	No. of salt bridges	No. of disulphide bonds	No. of hydrogen bonds	No. of non-bonded contacts
C	22	1213	1	-	18	138
E	26	1091				

C1

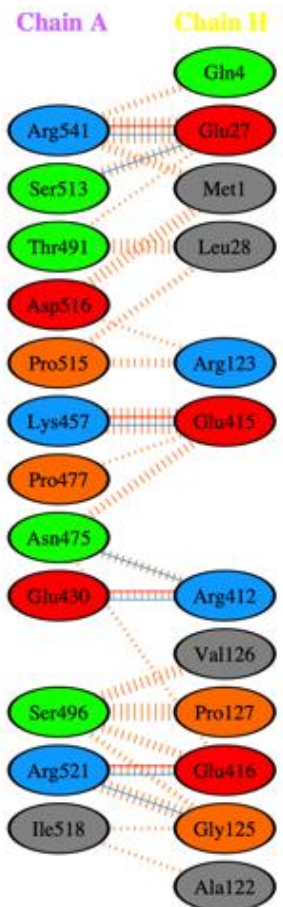
Chain	No. of interface residues	Interface area (Å ²)	No. of salt bridges	No. of disulphide bonds	No. of hydrogen bonds	No. of non-bonded contacts
B	12	545	1	-	2	52
E	11	568				

C2

Figura 27. Resultados de PDBsum. **A1) y A2** Esquema con tipo y número de interacciones entre de las cadenas C-E Y B-E. **B) y B2)** Tipos de contacto entre las cadenas. **C1 y C2)** Tabla cuantitativa interacciones de la cadena de dichas cadenas.

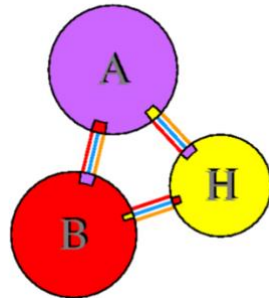
3.6.4 Enolasa

3.6.4.1 Enolasa/Toll2

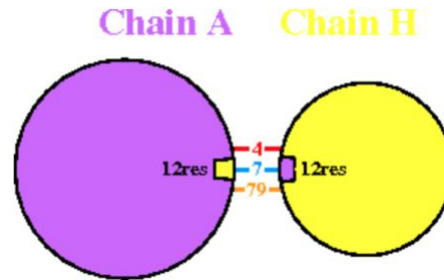


A.

Key: — Salt bridges — Disulphide bonds — Hydrogen bonds — Non-bonded contacts



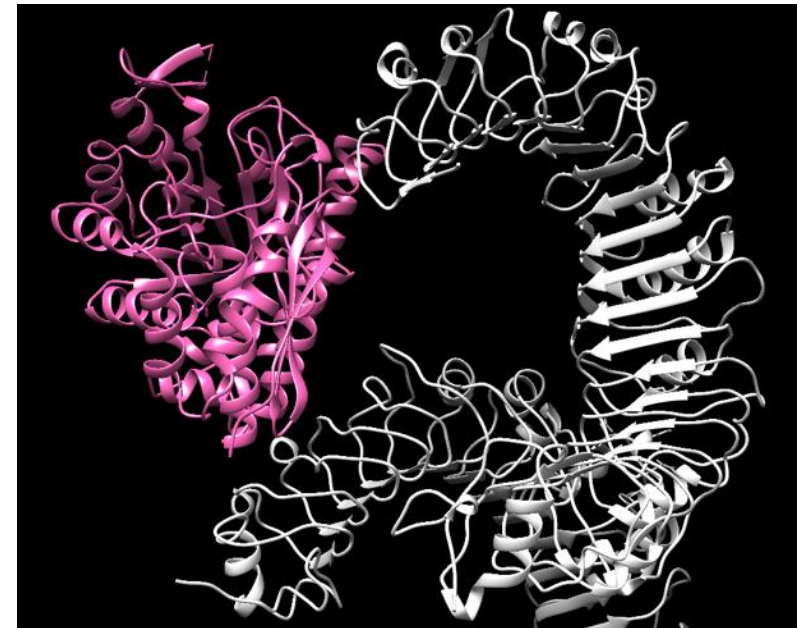
B



C

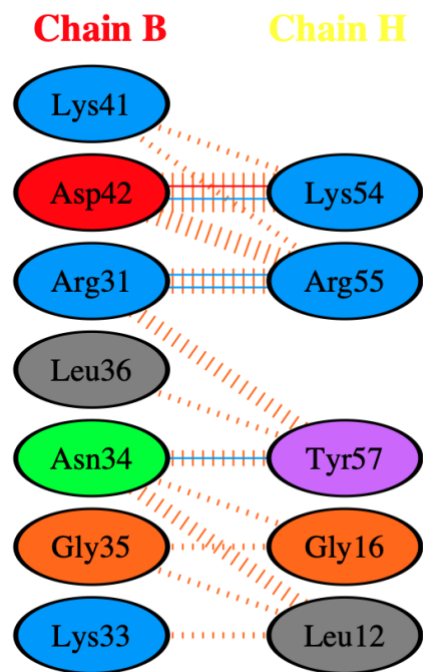
Chain	No. of interface residues	Interface area (Å ²)	No. of salt bridges	No. of disulphide bonds	No. of hydrogen bonds	No. of non-bonded contacts
A	12	724	4	-	7	79
H	12	710	4	-	7	79

D

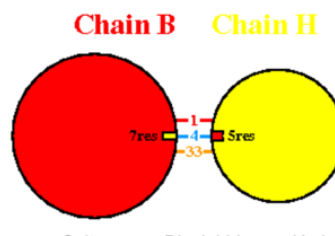


E

Figura 28. Resultados de PDBsum. **A)** Esquemas con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena A y D. **B)** Esquema general de las interacciones. **C)** Tipos de contacto entre las cadenas. **D)** Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena A y D. **E)** Visualización de los puntos de contacto entre TLR2 (blanco) y la enolasa (rosa).



A



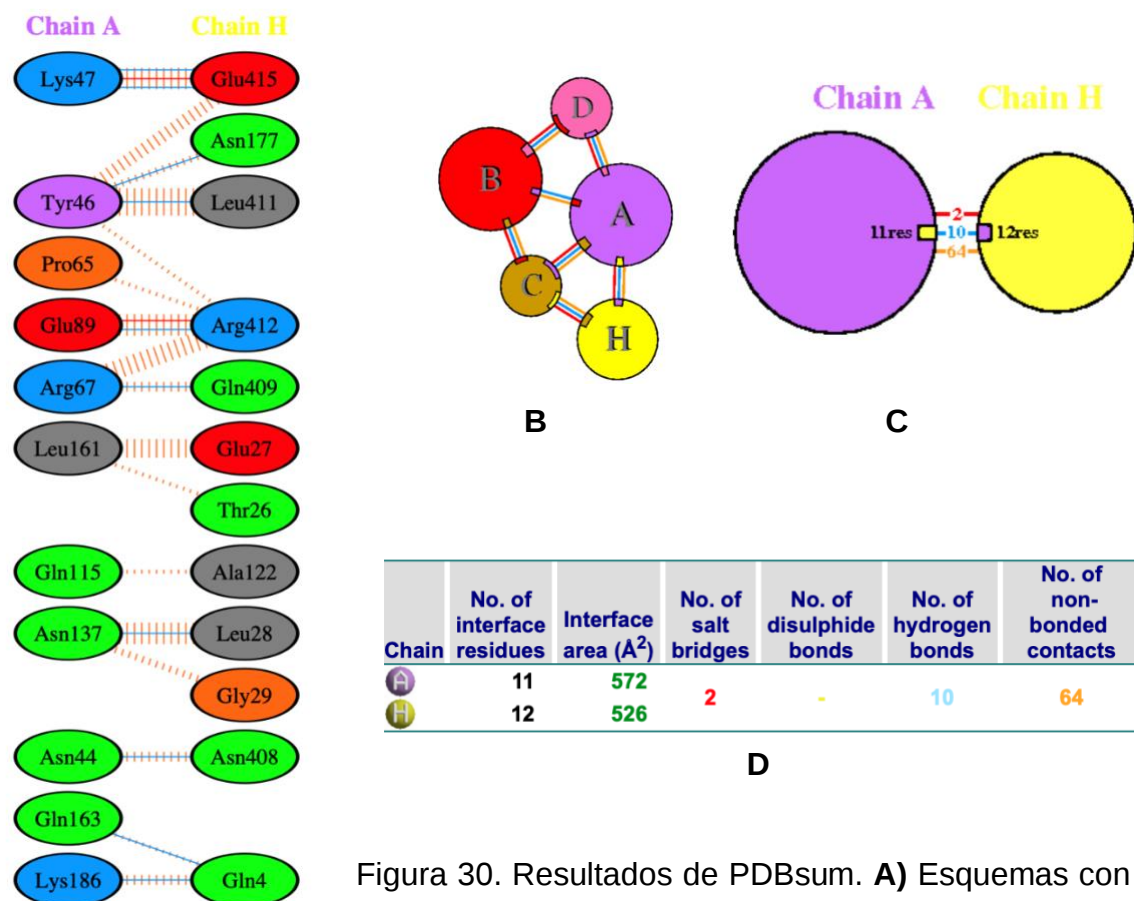
B

Chain	No. of interface residues	Interface area (Å ²)	No. of salt bridges	No. of disulphide bonds	No. of hydrogen bonds	No. of non-bonded contacts
B	7	346	1	-	4	33
H	5	357	1	-	4	33

C

Figura 29. Resultados de PDBsum **A)** Esquema con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena B y H. **B)** Tipos de interacciones entre las cadenas B y H. **C)** Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena B y H.

3.6.4.2 Enolasa/Toll4

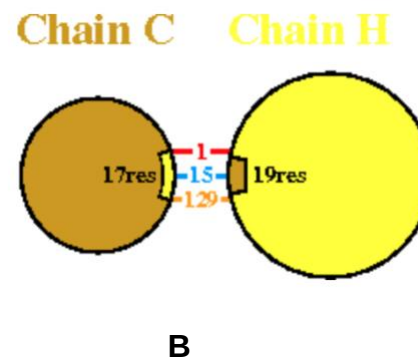
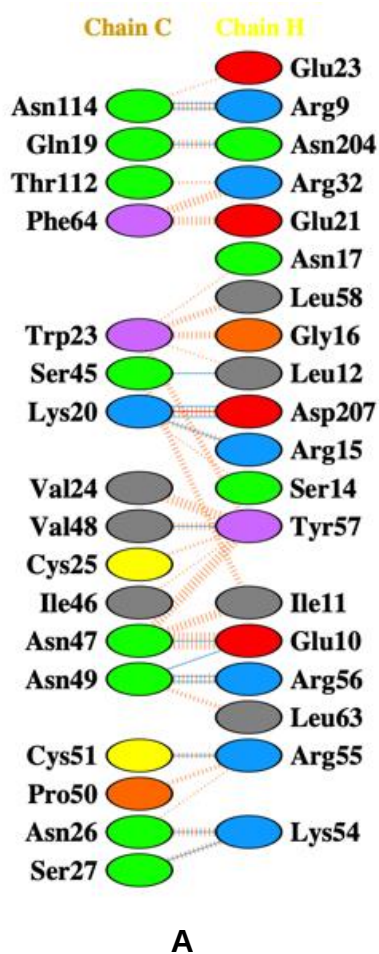


A



E

Figura 30. Resultados de PDBsum. **A)** Esquemas con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena A y H. **B)** Esquema general de las interacciones. **C)** Tipos de contacto entre las cadenas. **D)** Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena A y H. **E)** Visualización de los puntos de contacto entre TLR4 (blanco) y la enolasa (rosa).



Chain	No. of interface residues	Interface area (Å ²)	No. of salt bridges	No. of disulphide bonds	No. of hydrogen bonds	No. of non-bonded contacts
C	17	896	1	-	15	129
H	19	861				

C

Figura 31. Resultados de PDBsum **A)** Esquema con tipo y número de interacciones entre residuos de la cadena C y H. **B)** Tipos de interacciones entre las cadenas C y H. **C)** Tabla cuantitativa de interacciones de la cadena C y H.

3.7 Alergenicidad, Toxicidad y Cobertura de Población

Debido a que en distintas poblaciones una inmunización implica una reacción alérgica. Para determinar el carácter alérgico de las proteínas, se utilizó el servidor AllerTOP 2.0, para determinar la toxicidad se utilizó ToxinPred 2.0, y para su desarrollo como vacuna se utilizó Vaxign.

Plataforma	Propiedades	Cardiolipina Sintetasa	HSP70	Gliceraldehíd o 3-fosfato deshidrogenasa	Enolasa
Vaxijen 2.0	Antigenicidad Protectora	Antígeno	Antígeno	Antígeno	No antígeno
	Score	0.5088 Threshold 0.5	0.5194 Threshold 0.5	0.5774 Threshold 0.5	0.4025 Threshold 0.5
AllerTOP 2.0	Alergenicidad	No alergen	No alergen	No alergen	Alergeno
ToxinPred 2.0	Toxicidad	No tóxico	No Tóxico	No Tóxico	No tóxico
	ML-Score	0.29	0.25	0.17	0.31
Vaxign	Vaxign-ML Score	92.5	97.2	91.0	90.6
	Localización	Membrana citoplasmática (Prob.=0.79)	Citoplasmática (Prob.=1.00)	Citoplasmática (Prob.=1.00)	Citoplasmática (Prob.=1.00)
	Probabilidad de adhesina (>0.51)	0.099	0.402	0.546	0.215
	Hélices transmembrana	0	0	0	0

Tabla 19. Esquema comparativo de diversas propiedades utilizando diferentes plataformas para el diseño vacunal.

Con la finalidad de evaluar la cobertura específica a nivel poblacional, se utilizó el programa Vaxign 2.0, el cual realizó un análisis de protección virtual con base a los HLA's de referencia en cada país o región. La información es porcentual y su relación radica en su color. En las figuras 32-35, se observa de manera general, el alto nivel de cobertura que generaría cada una de estas proteínas de manera específica al usarse como inmunógenos en la población de Latinoamérica a excepción de la población canadiense, también se observan altos porcentajes de cobertura en la población europea, así como en población asiática.

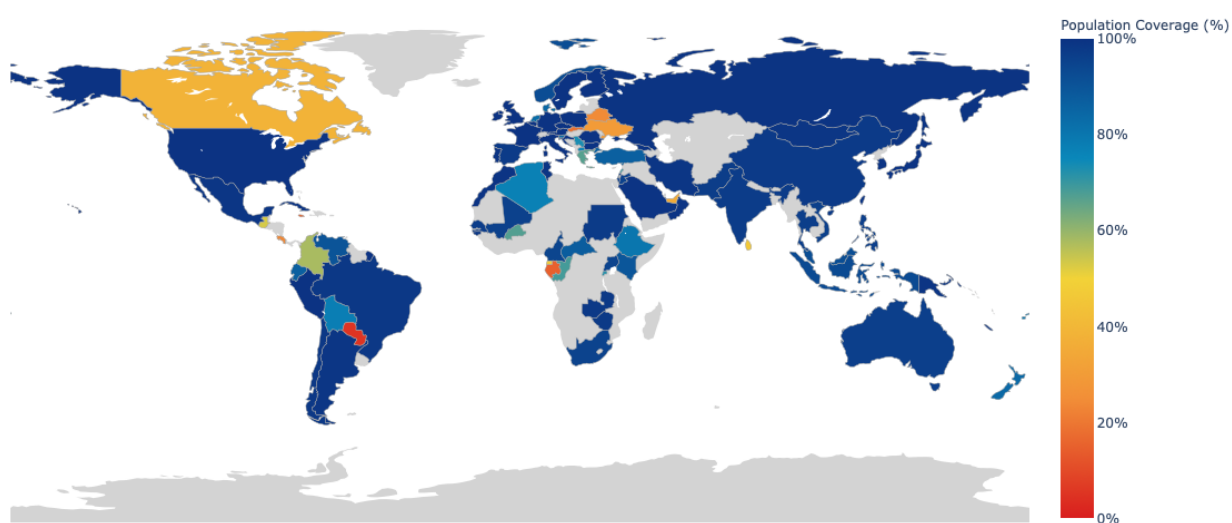


Figura 32. Mapa de cobertura virtual de la cardiolipina sintética en base a los HLA's de cada región.

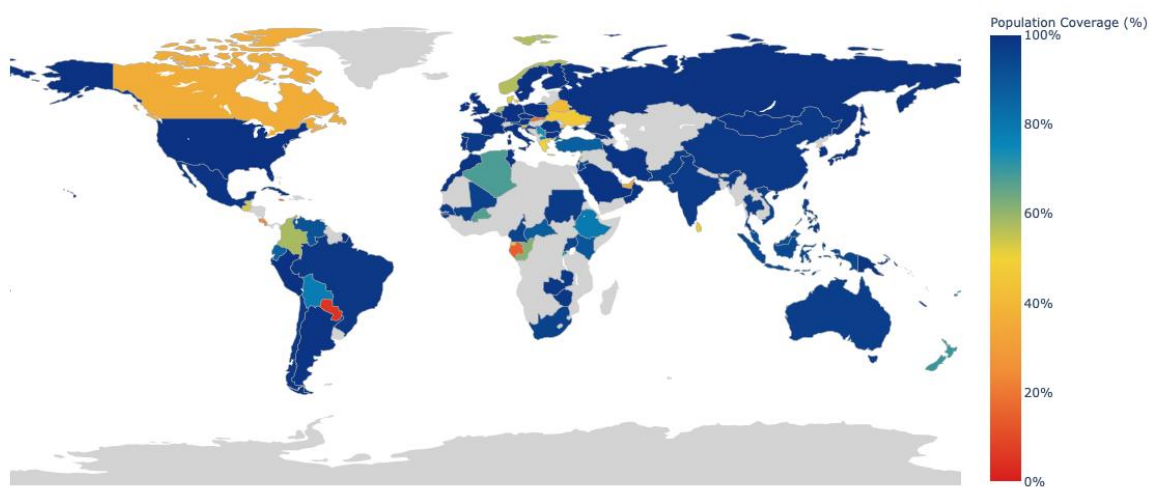


Figura 33. Mapa de cobertura virtual de la HSP70 en base a los HLA's de cada región.

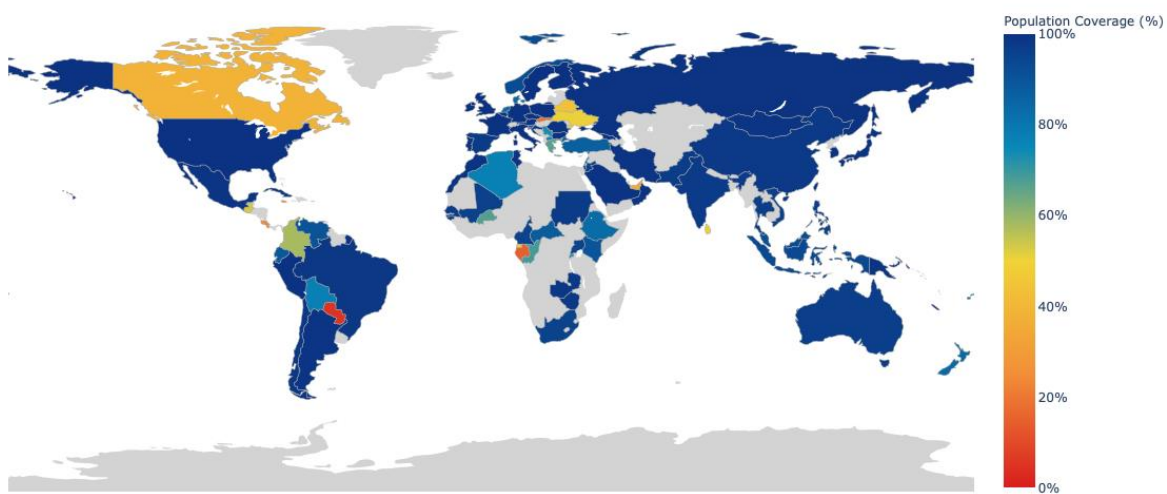


Figura 34. Mapa de cobertura virtual de la G3FD en base a los HLA's de cada región.

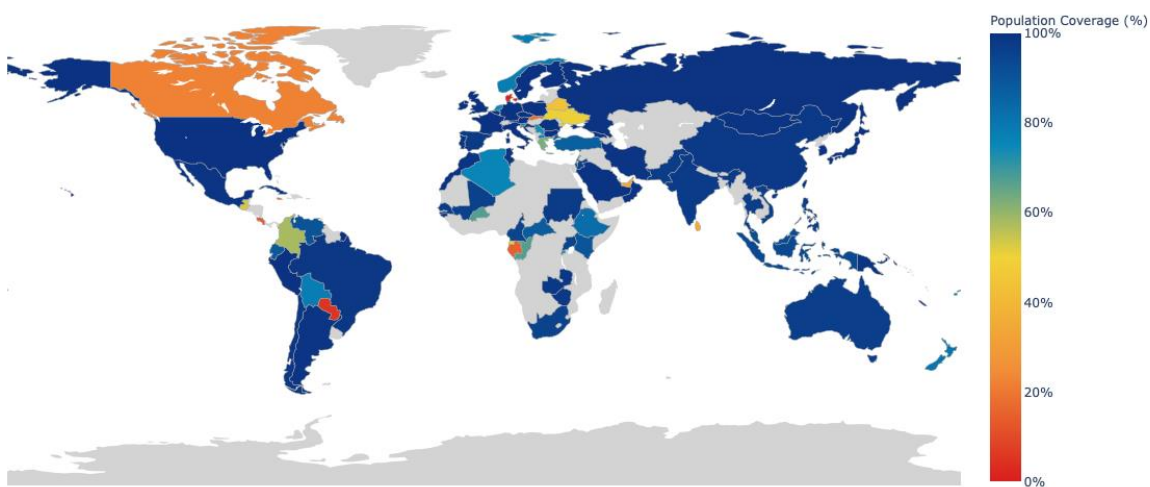


Figura 35. Mapa de cobertura virtual de la enolasa en base a los HLA's de cada región.

3.8C-ImmSim

Las tres proteínas se subieron al servidor C-ImmSim para determinar el perfil *in silico* del modelo. Para esto se utilizaron dos modelos, uno con solo una inmunización y otro modelo con tres inmunizaciones (1 día, 100 días y 200 días) con un total de 3000 días.

3.8.1. Cardiolipina Sintetasa (1 inmunización)

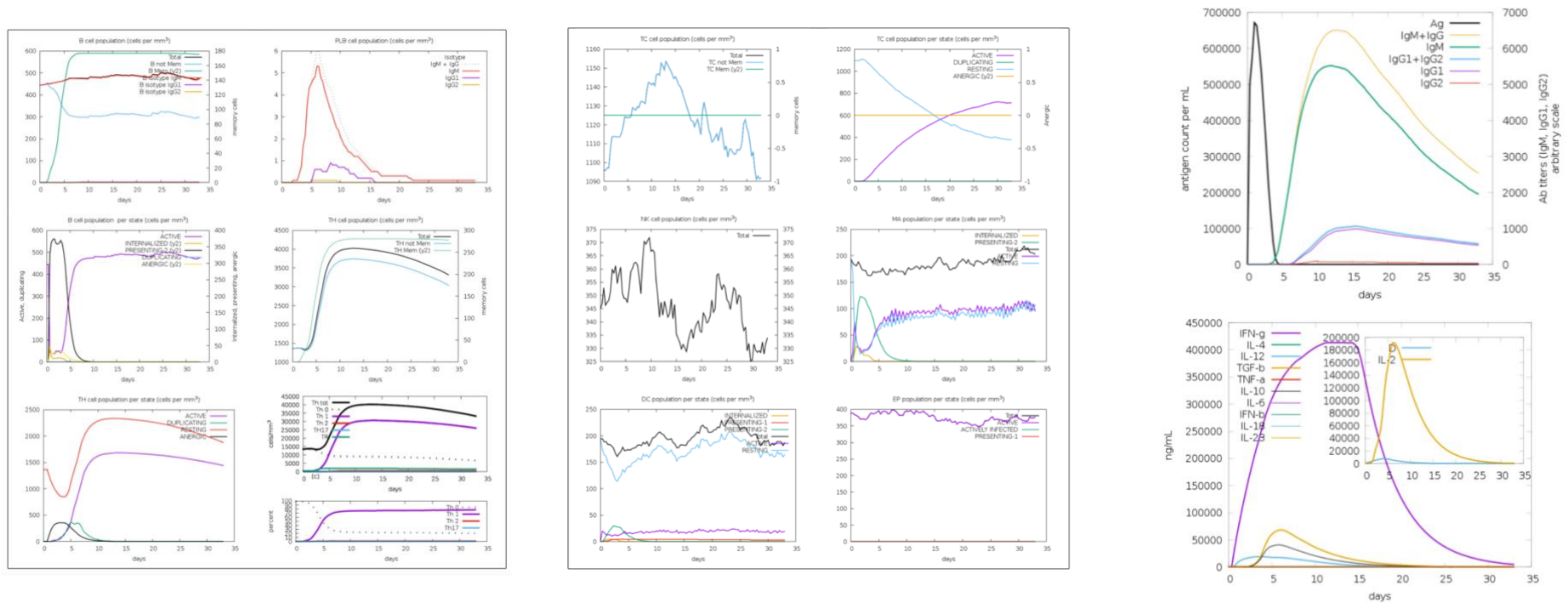


Figura 36. Esquema de conteo de células y de inmunoglobulinas con una dosis durante 35 días (leyendas y símbolos arriba).

3.8.2. Cardiolipina Sintetasa (3 inmunizaciones)

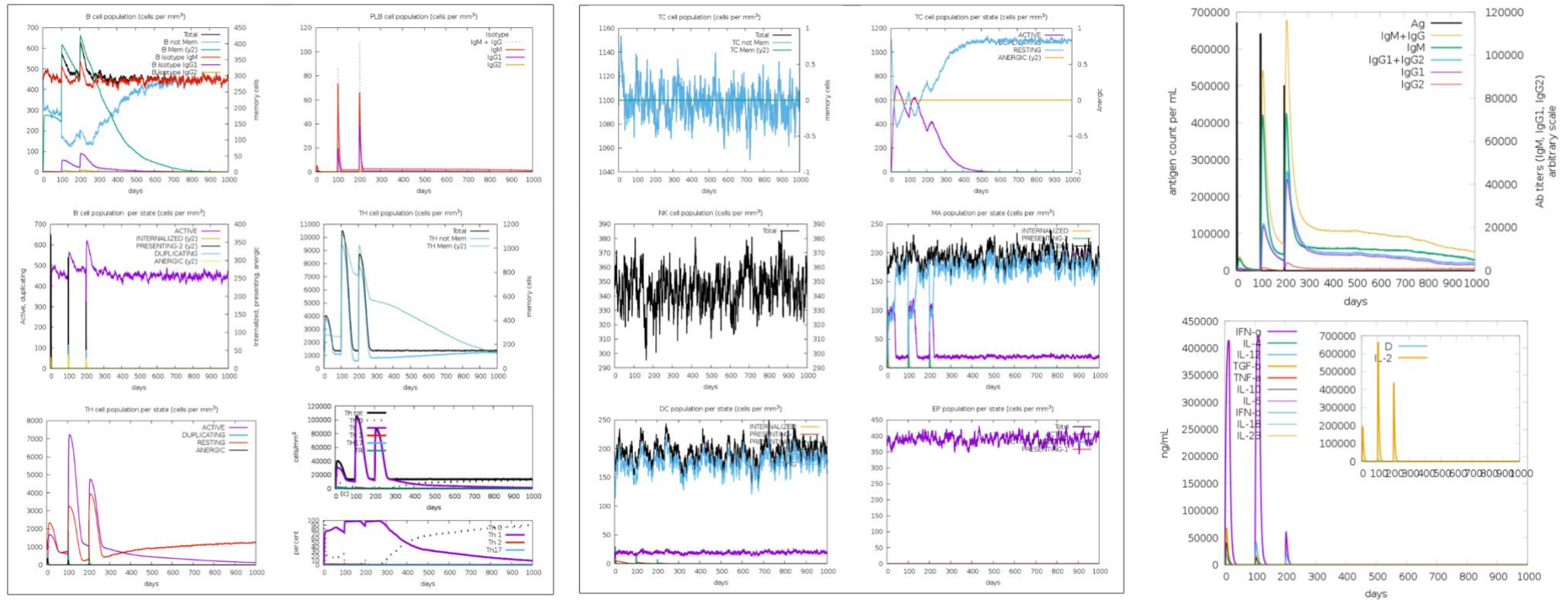


Figura 37. Esquema de conteo de células y de inmunoglobulinas con tres dosis durante 1000 días (leyendas y símbolos arriba).

3.8.3. HSP70 (1 inmunización)

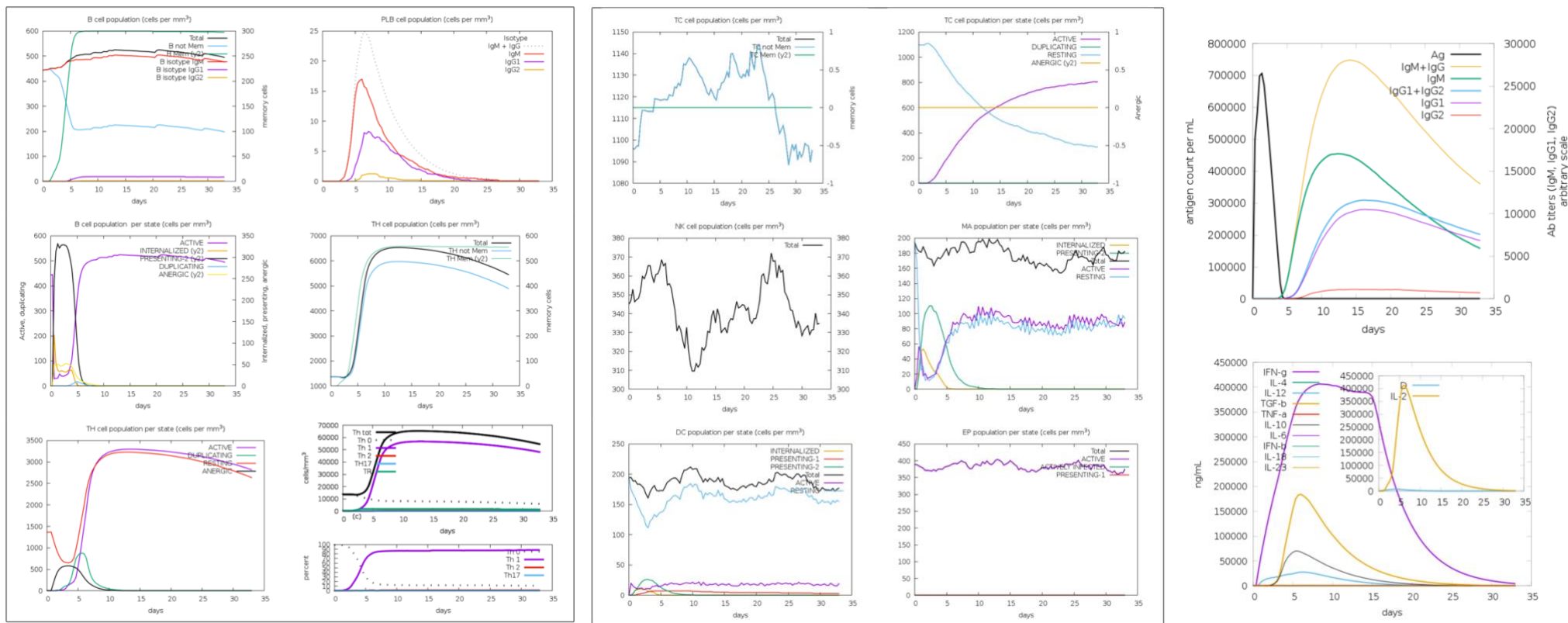


Figura 38. Esquema de conteo de células y de inmunoglobulinas con una dosis durante 35 días (leyendas y símbolos arriba).

3.8.4. HSP70 (3 inmunizaciones)

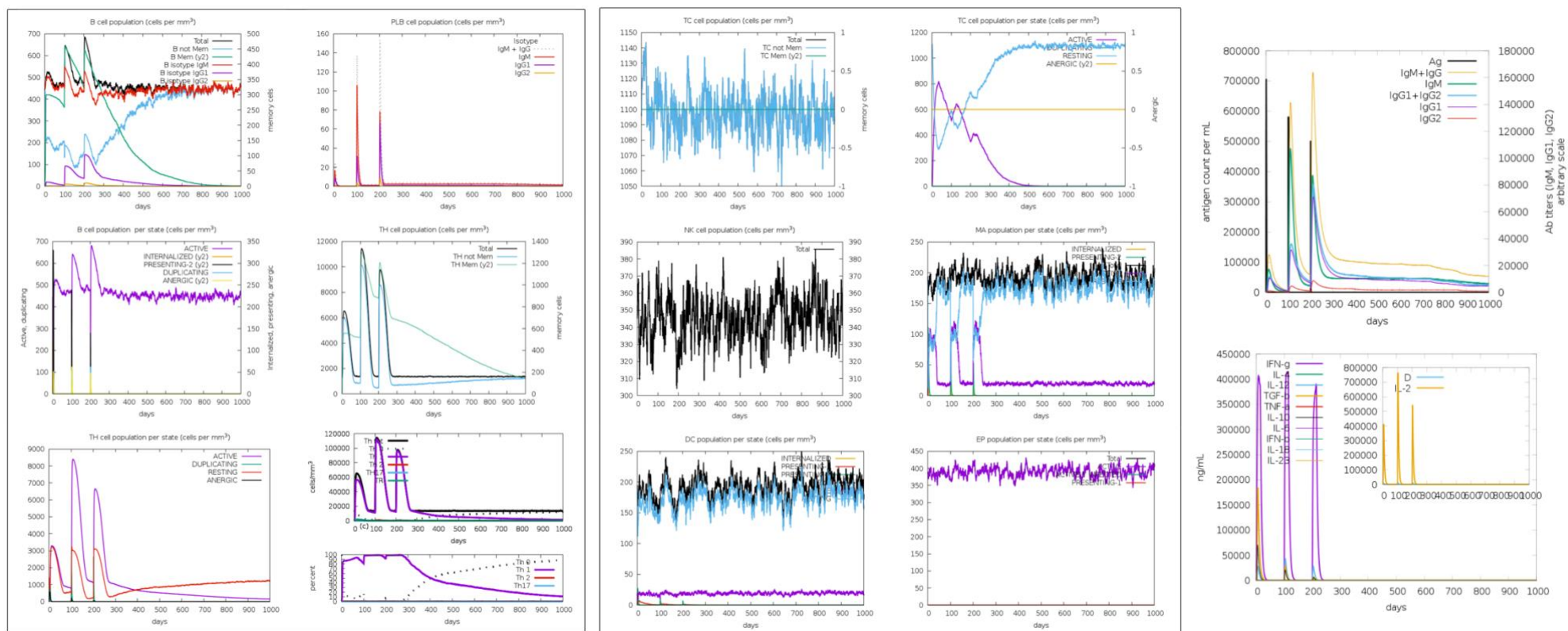


Figura 39. Esquema de conteo de células y de inmunoglobulinas con tres dosis durante 1000 días (leyendas y símbolos arriba).

3.8.5. Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa (1 inmunización)

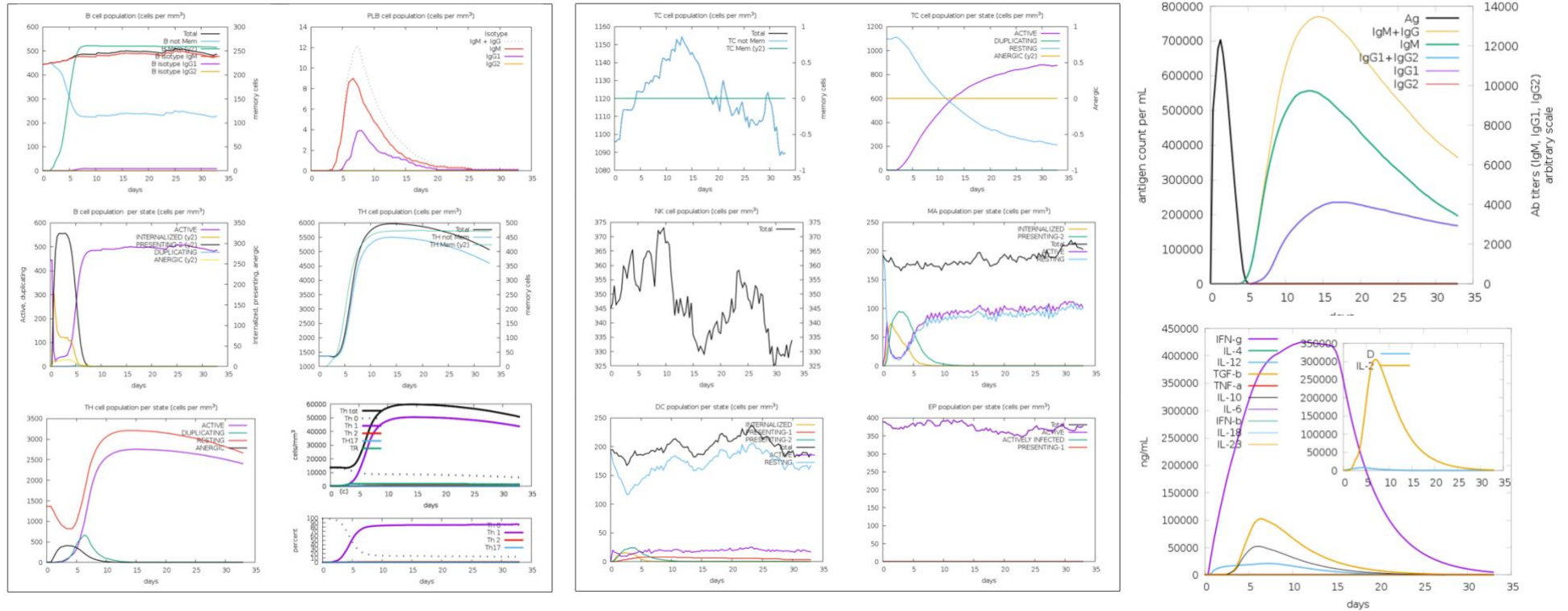


Figura 40. Esquema de conteo de células, de inmunoglobulinas y de citoquinas activadas por una dosis durante 35 días (leyendas y símbolos arriba).

3.8.6. Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa (3 inmunizaciones)

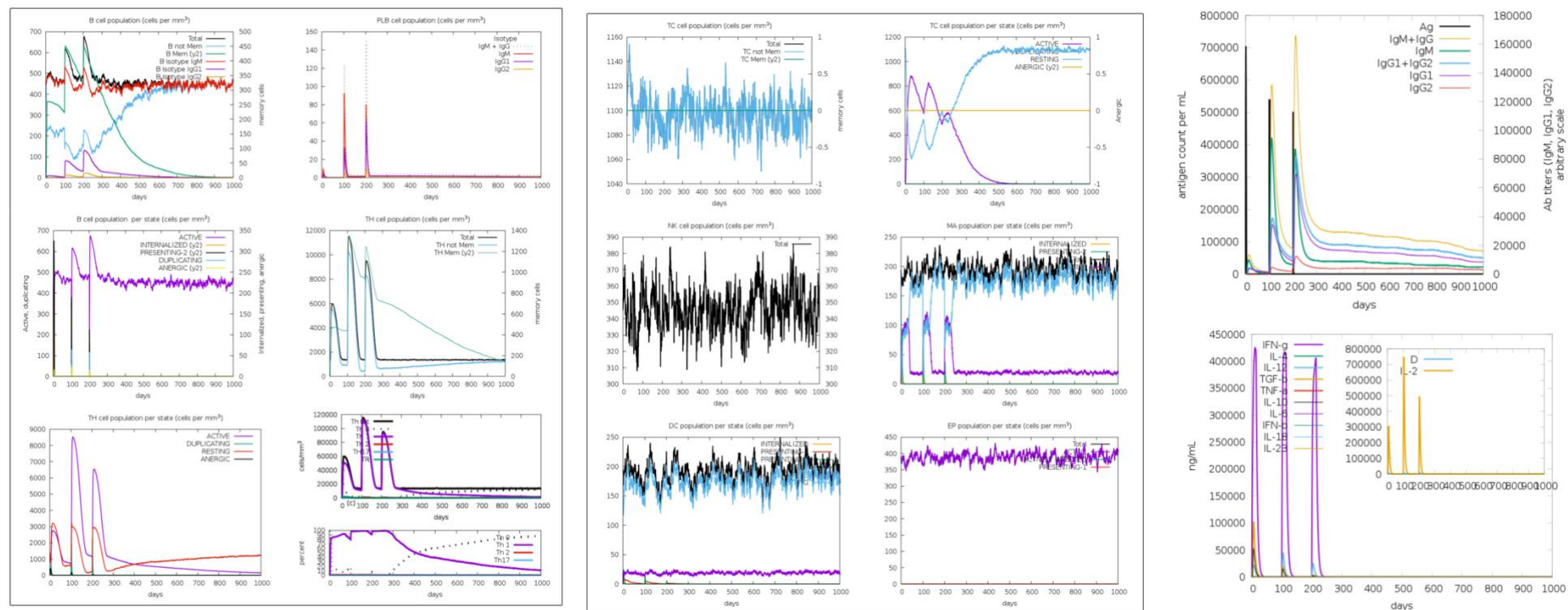


Figura 41. Esquema de conteo de células, inmunoglobulinas y de citoquinas activadas por tres dosis durante 1000 días (leyendas y símbolos arriba).

3.8.7. Enolasa (1 inmunización)



Figura 42. Esquema de conteo de células, inmunoglobulinas y citoquinas activadas por una dosis durante 35 días (leyendas y símbolos arriba).

3.8.8. Enolasa (3 inmunizaciones)

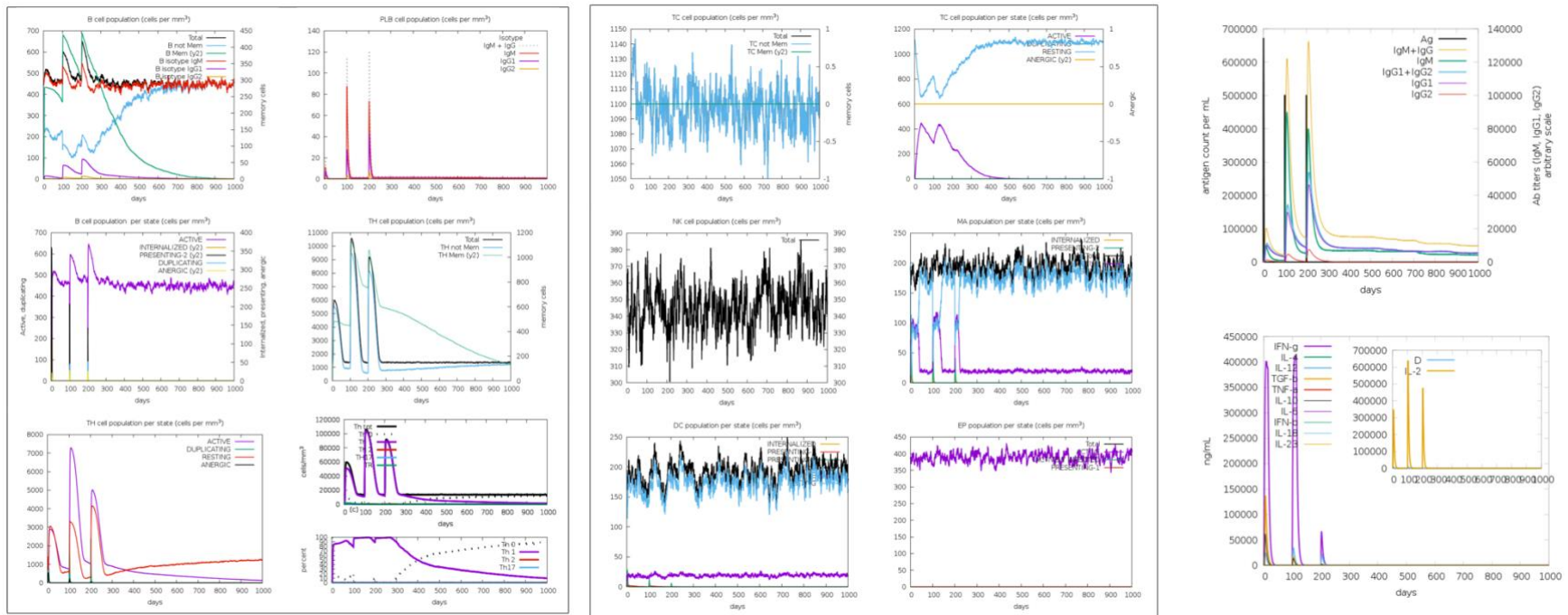


Figura 43. Esquema de conteo de células, inmunoglobulinas y citoquinas activadas por tres dosis durante 1000 días (leyendas y símbolos arriba).

3.9 Propuesta para el desarrollo de un biosensor de diagnóstico oportuno

Este trabajo fue realizado con el propósito de proponer nuevos antígenos que permitan el desarrollo de un inmunoensayo de flujo lateral (FL) para el diagnóstico oportuno de la enfermedad de Chagas. En este sentido las proteínas estudiadas en este proyecto tienen el potencial para ser inmovilizadas, de manera independiente, en la línea de sensado del IFL (Figura 44). De tal manera que el principio de detección será el siguiente: En la almohadilla de muestra se deposita la sangre que contiene el anticuerpo, la muestra empezará a correr hasta llegar a la almohadilla de conjugado donde se encontrarán etiquetas de nanopartículas de látex u oro modificadas con anticuerpos específicos de enlace. Una vez que se realice la interacción antígeno anticuerpo conjugado, la muestra seguirá migrando a la línea de sensado, en donde se encuentra inmovilizada la proteína cardiolipina sintetasa, la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa o la HSP70. Si el antígeno está presente, las etiquetas de conjugado establecerán interacción con los anticuerpos de detección de la línea de sensado. Si esto pasa se observará color en la línea del sensado, indicativo de la presencia de anticuerpos y por ende de la enfermedad de Chagas. En la línea de control, son inmovilizados anticuerpos complementarios, principalmente IgG (ratón, cabra, o conejo) que tendrán la función de indicar que los flujos laterales son efectivos, y que los anticuerpos están activos. La almohadilla absorbente ayudará a retirar exceso de muestra y previene que se regrese. De esta forma se propone la realización de IFLs con cada una de las proteínas evaluadas en esta tesis.

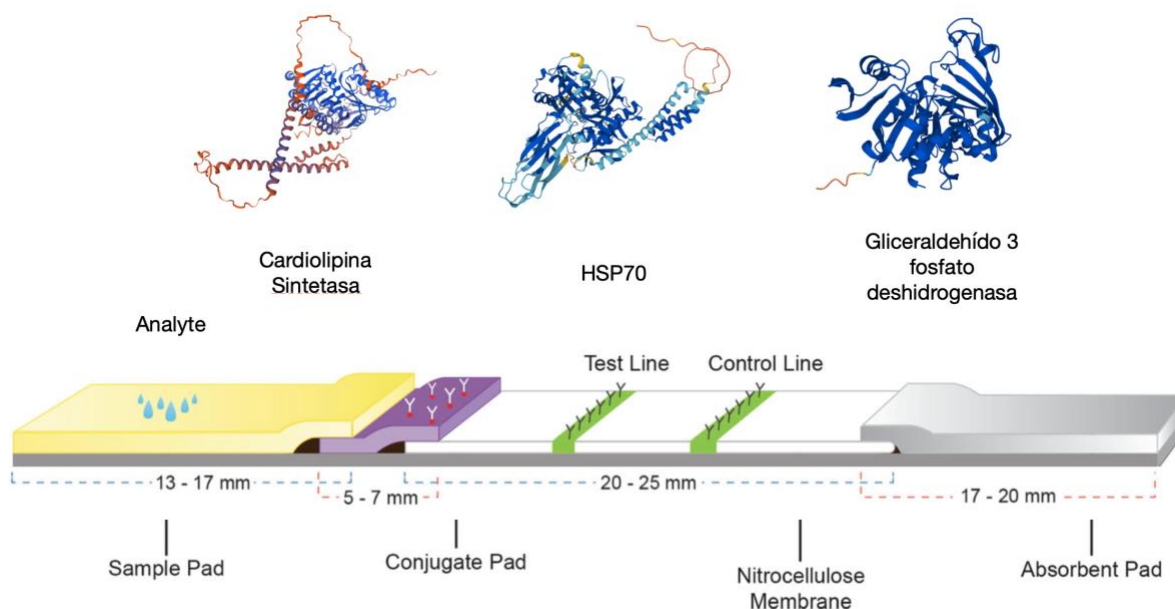


Figura 44. Esquema general del biosensor con las nuevas proteínas

4. Discusión de resultados

La vacunología reversa a diferencia de la vacunología tradicional nos permite identificar antígenos a través de herramientas bioinformáticas, los cuales nos permiten reducir costos y tiempo que se tomaría utilizando los métodos tradicionales [71].

Partiendo de la secuencia de la enolasa, a partir de NCBI se obtuvieron tres proteínas con alta homología de aminoácidos, posteriormente se utilizó las plataformas SWISS-MODEL y Alpha Fold 2 para modelar una estructura tridimensional de las proteínas. La enolasa ya cuenta con una estructura terciaria en PDB por lo que no fue necesario el modelaje, solo fue recuperado. Swiss-Model, un servicio dedicado al modelado de acuerdo con la homología de la proteína, mientras que Alpha Fold2 es un sistema de inteligencia artificial que utiliza redes neuronales en conjunto con la homología para construir un modelo 3D de la estructura terciaria de las proteínas. Las proteínas modeladas por Alpha Fold 2 (Figura 5-6) mostraron regiones construidas asertivamente,

con escasas regiones de confiancias bajas, mientras que la cardiolipina sintetasa, modelada por SWISS-MODEL, si presentó ligeramente más regiones con confiancias bajas, pero en general es un buen modelo.

Continuando con la Figura 7, el análisis filogenético hecho por MEGA11 arrojó que la cardiolipina sintetasa es la más cercana filogenéticamente a la enolasa de las tres proteínas, compartiendo un ancestro que en algún momento sufrió de una especiación. La gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa se posiciona en un lugar más alejado en el árbol, indicando otro linaje distinto al de las otras tres proteínas y por lo tanto la más lejana filogenéticamente. La HSP70, enolasa y cardiolipina sintetasa comparten un ancestro en común, aunque en un momento sufrió de un evento de especiación y la HSP70 crea un linaje completamente separado de las otras dos proteínas, tal y como se puede observar.

Para poder determinar la dificultad y la viabilidad de expresar y purificar las proteínas deseadas se utilizó la plataforma ProtParam la cual computa parámetros que pueden ser predichos con la secuencia de la proteína. La cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC) es una técnica específica de alta capacidad utilizada para la purificación de proteínas [72]. A pesar de ser una técnica ampliamente usada existen diversos factores que alteran la recuperación, el rendimiento y la pureza de la técnica. Uno de los factores que afecta la retención de las columnas es el tamaño de las proteínas ya que un estudio [73] sugiere que las proteínas de pequeño a mediano tamaño (~50 kDa) logran una mayor retención en columnas que proteínas de mayor tamaño, resultando en una mejor recuperación. Otro estudio corroboró lo antes mencionado [74] el cual reportó mejores purificaciones con proteínas en un rango de 10 a 60 kDa, por lo que sugiere la necesidad de proponer nuevos métodos de purificación para incrementar la producción de pequeñas y grandes proteínas, <10kDa y >50kDa respectivamente.

Teniendo en cuenta esto se puede deducir que la cardiolipina sintetasa teóricamente tendría más dificultad en su purificación, por su tamaño (74.03 kDa) tendría una débil adherencia a los complejos de níquel, ya que solo una pequeña región (los 6 tags de

histidina) interaccionaría con la proteína, resultando en un rendimiento poco competitivo. De igual manera la HSP70 sufre del mismo problema debido a su similitud en su peso molecular (70.9 kDa). De ahí sigue la enolasa que reporta un peso óptimo para un buen rendimiento en purificación IMAC. Por último, la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa reporta el peso más ligero de las tres (36.30 kDa) garantizando teóricamente su adherencia en los complejos de la resina, potenciando una recuperación competitiva. Cabe mencionar que existen otras variables como el tamaño y la forma de la proteína que afectan la adherencia a la resina.

El poder purificar grandes cantidades de proteína de gran pureza aún es un desafío que enfrenta la genómica estructural y la proteómica [75]. A pesar de que el punto isoelectrico de la proteína es un aspecto importante bioquímicamente, la relación entre el punto isoelectrico (pI) de la proteína y una purificación exitosa todavía no ha sido descrita [74]. Sin embargo, en el mismo estudio se analizó su posible relación en donde la tasa general de éxito de purificación disminuyó linealmente a medida que el pI de la proteína blanco aumentaba en *E. coli* Rosetta, siendo 743 purificaciones que se realizaron para la prueba. El estudio reportó un 23% en la tasa de éxito en la purificación para proteínas con pI básicos arriba de 9. Adicionalmente es útil conocer el punto isoelectrico de las proteínas blanco para saber en qué condiciones se realizará la purificación (usualmente pH 7-8) ya que, si la proteína llega a su punto isoelectrico, esta podría precipitar y formar cuerpos agregados. Por esta razón se suele evitar realizar IMAC en los puntos isoelectricos de las proteínas, pero usualmente no es un problema y no debería afectar el procedimiento. Teniendo en cuenta esta información se predice que la cardiolipina podría tener problemas de rendimiento según el estudio citado previamente, ya que presenta un pI de 9.77, mientras que las proteínas restantes dados sus pI (5.79 del HSP70, 8.28 del G3FD, y 5.92 de la enolasa) no tendrían este problema. Cabe recalcar que el pI de la G3FD se encuentra en un rango cercano en el que se realiza IMAC, por lo que se tiene que tener cuidado al momento de construir las condiciones de la columna.

Las cuatro proteínas presentaron varias horas de vida media en distintos organismos lo que representaría una buena integridad por los tiempos mencionados. Se considera que

una proteína es estable en un tubo de ensayo si el valor del índice de inestabilidad es mayor a 40, si es inferior se estima que es inestable [76;77]. Según el índice de inestabilidad predicho, la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa es la proteína más estable con una puntuación de 20.26, de ahí sigue la enolasa con un valor de 38.72, cercano a los 40. La HSP70 se considera inestable por su valor de 40.51, rebasando ligeramente el límite. Por último, la cardiolipina sintetasa obtuvo un valor de 45.98 considerándose también inestable. El índice alifático es definido como el volumen relativo que ocupa las cadenas alifáticas de la proteína, el cuál puede ser un factor para incrementar la termoestabilidad de proteínas globulares [78]. Todas las proteínas tienen un buen índice alifático, lo que se traduce en una buena estabilidad a altas temperaturas. Respecto al GRAVY, esta se define como el valor promedio de hidropatía de un péptido o proteína. Las proteínas con valores GRAVY negativos son hidrofílicas y los valores positivos significan que son hidrofóbicas [79], entonces de acuerdo con los valores obtenidos las cuatro proteínas son de carácter hidrofílico.

La solubilidad proteica es un aspecto que puede afectar la producción de proteínas, la solubilidad insuficiente es una de variables más comunes en el fracaso de este tipo de procesos [80]. A pesar de que la relación entre la secuencia aminoacídica y su solubilidad está pobremente descrita, estudios recientes indican que los aminoácidos cargados en la superficie de la proteína son elementos intrínsecos clave para su solubilidad [80]. Por esta razón se optó por utilizar SoluProt, una herramienta basada en la secuencia aminoacídica para la predicción de solubilidad en *E. coli* como vector de expresión. La HSP70, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y la enolasa reportaron valores solubles, siendo la cardiolipina sintetasa la única que reportó un valor menor a 0.5, sugiriendo una proteína de carácter insoluble. Como se mencionó anteriormente, la relación entre su secuencia y su solubilidad aún es pobremente entendida, razón por la cual la precisión de SoluProt (58.5%) es comparablemente baja respecto a otras herramientas bioinformáticas, pero alta respecto a las herramientas de solubilidad, por lo que estos datos no deberían describirse como definitivos, sino como una guía.

Se utilizó Deep THMMMP la cual es una herramienta de predicción topológica para la proteína. Las proteínas presentaron topologías variables siendo la HSP70 la única que se encuentra fuera de la membrana. Las proteínas expresadas en el citoplasma tienden a acumularse y por ende sufrir degradaciones por proteasas, adicionalmente tienden a formar cuerpos de inclusión presentándose en su forma inactiva [81]. Diferente a lo anterior, las proteínas secretadas en el periplasma o en el medio de cultivo incrementa la solubilidad de dicha proteína y su estabilidad debido a que la proteína está totalmente diluida y con un riesgo menor a proteólisis [82]. Adicionalmente, debido al ambiente oxidativo del medio periplásmico, se promueve el correcto plegamiento de las proteínas, en consecuencia, una mayor actividad biológica [81]. Por lo que según esta predicción la integridad de la proteína podría estar más asegurada ya que las proteínas restantes residen dentro de la membrana. Las proteínas HSP70, gliceraldehído 3-fosfato y la enolasa entran en la categoría de proteínas moonlighting, las cuales son definidas como proteínas multifuncionales en la que una cadena polipeptídica se le atribuye más de una función fisiológicamente, bioquímicamente o biofísicamente hablando [83], por lo que se pueden secretar en la superficie celular, realizando una función diferente en el citosol.

El mapeo de epítopes lineales para células B realizado por IEDB arrojó cuatro posibles epítopes para la cardiolipina sintetasa, siete para la HSP70, cuatro para la gliceraldehído 3-fosfato y tres para la enolasa, lo que indica que todas las proteínas pueden ser reconocidos por anticuerpos, estimulando una respuesta inmune adaptativa. Utilizar estas herramientas para identificar epítopes lineales promueve un diseño y desarrollo vacunal más barato [84]. Adicionalmente se utilizó USF Chimera para poder visualizar la predicción en su forma tridimensional (Figura 12-15). Para determinar los posibles epítopes para MHCI y MHCII se utilizó la misma plataforma donde se obtuvieron muchos candidatos de los cuáles se seleccionaron los que reportaron un mejor puntaje. El rango percentil indica la afinidad del epítope, mientras más pequeño sea el puntaje porcentual, mayor será la afinidad, por lo que se seleccionaron los epítopes con menor rango percentil. Cabe mencionar que debido a que los métodos para determinar epítopes para MHCII son más complicados que los que se utilizan para predecir epítopes para MHCI, tienden a ser menos exactos y por ende un puntaje más bajo, por lo que se debe tener

un mayor cuidado al momento de seleccionar epítopes para MHCII. El mapa de cobertura poblacional arrojó que las cuatro proteínas cubren con los HLA's de la población Latinoamérica, arrojando porcentajes de casi 100%.

Una vez identificados los posibles epítopes T y B se utilizó la plataforma ClusPro, la cual, desde 2004 ha sido el mejor servidor automático en el desafío CAPRI (Critical Assessment of Predicted Interactions), el cual es un constante monitoreo de calidad de los métodos de Docking [85]. Adicionalmente la plataforma fue utilizada en muchos diseños de vacunas contra SARS-COV2 [86, 87, 88]. Cluspro arrojó muchos modelos, de los cuáles se eligieron los mejores candidatos de acuerdo con su energía más baja. La energía calculada por PIPER (el programa de Docking utilizado en Cluspro) no se relaciona directamente con la afinidad de unión. Sin embargo, las regiones bajas en energía tienden a generar clústeres de estructuras acopladas y el tamaño del clúster es proporcional a su probabilidad. Por esta razón el panorama energético determina indirectamente la conformación más probable del complejo [89]. El Docking entre las proteínas y los TLR2/TLR4 mostró fuertes interacciones, sugiriendo una posible activación del sistema inmune innato. Se utilizó la plataforma PRODIGY para obtener valores como la energía libre de GIBBS, la cual determina si hay una unión existente entre la proteína y el receptor. Teniendo en cuenta que un valor menor a -18, se considera una buena interacción, hasta -4 una unión intermedia y un valor más positivo de eso una unión débil, la energía libre de GIBBS arrojó una buena unión en todas las proteínas, siendo la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa la proteína con una unión más débil. Se obtuvo la constante de disociación, la cual evalúa el orden de la solidez de las interacciones. Mientras más pequeño sea el valor, mayor será la afinidad de unión del ligante con su diana y viceversa, por lo que los valores obtenidos por la plataforma sugieren una afinidad a los receptores por parte de las proteínas. Para determinar dichas interacciones entre las proteínas y los Toll2/4 se utilizó la plataforma PDB sum el cual nos brinda detalles del tipo de interacciones que existen, entre las cuales podemos observar puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y electrostáticas en todas las proteínas (Figura 16-27).

Existen diferentes tipos de antígenos, entre ellos se encuentra el término antígenos protectores, los cuáles son los únicos que son capaces de estimular una inmunidad protectora contra patógenos [90]. Este tipo de antígenos logran estimular una respuesta inmune adaptativa específica y mejorada posterior a la exposición del patógeno o a los organismos relacionados, por esta razón es que son de suma importancia en el diseño de vacunas [91]. Se utilizó la plataforma VaxiJen 2.0 para realizar un mapeo *in silico* para corroborar si estas proteínas podrían catalogarse como dicho término, por lo que todas obtuvieron un valor positivo, menos la enolasa. Para evaluar la alergenicidad se utilizó AllerTop 2.0, prediciendo únicamente como alérgeno a la enolasa. Adicionalmente se utilizó ToxinPred2 para evaluar la toxicidad de las proteínas sugiriendo que el carácter de las mismas es no tóxicas. Se utilizó Vaxign para determinar ciertos parámetros como su localización, probabilidad de adhesina y hélices transmembranales. La única diferencia entre las predicciones de Deep TMHMM y Vaxign es que la cardiolipina sintetasa la predice en la región transmembranal de la célula, mientras que las otras las considera citoplasmáticas con una probabilidad de 79% para la cardiolipina sintetasa y de 100% para las proteínas restantes. Actualmente los diseños vacunales y las vacunas que están en revisión utilizan las adhesinas como agente inmunizante [92] por esta razón es una propiedad evaluada al momento de diseñar vacunas. Desafortunadamente la predicción arrojó una probabilidad de adhesinas insuficiente para todas las proteínas menos para la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, el cual, obtuvo un valor mayor al promedio. Las proteínas que se encuentran en la región transmembranal de la célula suelen utilizar hélices transmembranales para adherirse a la membrana, entonces cuando la proteína es expresada en otro vector que no es el original, esta puede cambiar su estructura drásticamente debido a que membrana donde se expresa también es diferente [93]. La misma plataforma no predijo hélices transmembranales para estas proteínas, sugiriendo que no habría cambios estructurales al momento de la expresión. Estas últimas propiedades se pueden observar en la Tabla 15. Sin embargo, en el caso de la enolasa y la Gliceraldehído-3-Fosfatodeshidrogenasa ya fue reportada evidencia experimental, la cual indica su presencia en la membrana o superficie de diferentes organismos como son bacterias, hongos, levaduras y parásitos [94, 95].

Con la finalidad de determinar la posible inmunogenicidad se utilizó la plataforma C-IMMSIMM, un servidor capaz de simular o predecir la respuesta inmune del humano ante un posible inmunógeno. Entre estos tipos de respuestas se pueden encontrar las humorales, celulares, así como varias moléculas generadas como anticuerpos y citocinas. La respuesta inmune innata y la adquirida mediada por células están directamente ligadas a la resistencia del hospedero a la infección protozoaria, adicionalmente las células B y anticuerpos también se encuentran relacionados con procesos de eliminación protozoaria y supervivencia del hospedero [96]. Además, las células B pueden modular directamente las células dendríticas y células T, y por ende, influir en la inmunidad adaptativa [97]. Como se puede observar en las figuras 36-43 hubo distintos tipos de estimulación inmunogénica en las primeras dosis, incrementándose esta respuesta con una segunda y tercera dosis, sugiriendo que es posible que se requieran refuerzos para obtener la respuesta inmune deseada. El modelo obtenido sugiere una posible activación de células B en todas las proteínas, específicamente de memoria y de isotipo IgM. El isotipo IgG reportó una ligera estimulación en todas las proteínas menos en la cardiolipina sintetasa. De igual manera se reportaron estados activos, internalizados y presentadores en las células B. La mayor diferencia reside en que la cardiolipina sintetasa presenta una menor cantidad de células en estado de internalización comparado con las otras proteínas. En el apartado de las células T helper (Th), el modelo reportó una posible activación de memoria y no de memoria para todas las proteínas, siendo la HSP70 la que reportó el mayor número de activación de memoria y la cardiolipina sintetasa la menor. Se registró una posible activación de Th0 y Th2 en todas las proteínas y una casi inapreciable activación de TR. De igual manera se registró una posible activación de células citotóxicas en todas las proteínas, sin memoria en sus estados de descanso, anérgicos y activos. La enolasa reportó una menor activación en su estado activo, comparado con las otras proteínas. La HSP70 y la G3FD reportaron el mayor número de células citotóxicas en su estado activo, ligeramente mayor al que reportó la cardiolipina sintetasa. Asimismo, se reporta actividad de células Natural Killer en todas las proteínas. En el caso de las células MA se registró una activación en su estado activo, presentador e internalizador en todas las proteínas.

Las células dendríticas son altamente eficientes presentando antígenos, al momento de reconocer uno de estos forman complejos MHC-péptido, migran desde los sitios de adquisición de antígenos a órganos linfoides secundarios y finalmente interactúan físicamente y estimulan a los linfocitos T [98]. Se registró una leve activación de células dendríticas en su estado activo y presentador en todas las proteínas. Ante una infección de *T. cruzi* los anticuerpos son responsables de la supervivencia en animales susceptibles en la fase aguda, y del mantenimiento de la parasitemia de la fase crónica [99]. A pesar de ser los responsables de eliminar los tripanosomas, estudios recientes sugieren que el tiempo de supervivencia de ratones infectados no se relaciona con su capacidad de producir anticuerpos específicos [100]. Los modelos en todas las proteínas, en una primera inmunización, reportan producción de anticuerpos IgM e IgG, específicamente IgG1 con una casi inapreciable activación de IgG2 solo en la HSP70 y Cardiolipina Sintetasa. Durante las tres inmunizaciones se puede observar un alto crecimiento en la producción de anticuerpo, lo que sugeriría una protección de al menos tres años como se muestra en las figuras 37, 39, 41 y 43. Los modelos reportaron una posible activación de IFN- γ , TGF- β , IL 10 e IL 18 en todas las proteínas de manera muy similar. IFN- γ es una citocina secretada principalmente por células T activas y Natural killer (NK), puede inducir la activación de macrófagos, median la inmunidad antiviral y antibacteriana, mejoran la presentación de antígenos, organizan la activación del sistema inmune innato, coordinan la interacción linfocito-endotelio, regulan el equilibrio Th1/Th2, controlan la proliferación celular y apoptosis [101]. La familia de citocinas TGF- β es ubicua, multifuncional y esencial para la supervivencia ya que tienen roles importantes en crecimiento, desarrollo, inflamación y en la inmunidad del hospedero [102]. El modelo clásico de IL-10 en una infección es que regula un equilibrio oscilante entre la inmunidad efectiva y la inmunopatología, limitando simultáneamente el daño tisular mediado por el sistema inmunológico y perjudicando el control de patógenos. La interleucina-18 (IL-18) es una potente citocina proinflamatoria implicada en la defensa del hospedero contra las infecciones y regula la respuesta inmune innata y adquirida [103]. Las citocinas tienen un papel importante durante la infección de *Trypanosoma cruzi* como la regulación de hematopoyesis, la linfopoyesis y afectan la función de todos los tipos de células involucradas en la respuesta inmune [104]. El interferón gamma (IFN- γ) se encuentra

involucrado como linfocina protectora contra *T. cruzi* y los macrófagos activados por IFN- γ dan como resultado la liberación de metabolitos reactivos del oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO) [104]. Por otro lado, la interleucina 4 (IL-4), la interleucina 10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) son capaces de regular negativamente el control intracelular de la infección por *T. cruzi* mediante IFN- γ activado. Macrófagos, para inhibir la liberación de NO y regular negativamente la actividad del subconjunto de células TH1 (productoras de IFN- γ) [104].

4. Conclusiones

En el presente trabajo se describen las características inmunológicas y fisicoquímicas de la cardiolipina sintetasa, la HSP70 y la GAPDH en comparación con la enolasa con el propósito de reportar nuevos antígenos para su uso futuro como prueba diagnóstica o como inmunógeno contra la enfermedad de Chagas. Con la nueva tecnología de usar la vacunología en reversa se reportaron las propiedades fisicoquímicas de cada proteína con el fin de contemplar los futuros desafíos que presentaría su expresión y purificación. Se describieron epítopes para células B y para MHC I y II, y el Docking molecular con receptores Toll2/4 reportaron una buena afinidad con varios puentes de hidrógeno y diversas interacciones. El diseño vacunal presentó resultados preliminares para una futura profundización en el diseño de estas proteínas. Los mapas de cobertura poblacional reportaron un alcance mayor al 95% para diversas poblaciones, especialmente para la latinoamericana. Las simulaciones sugirieron una activación de células, inmunoglobulinas y citocinas importantes involucradas en la protección contra la enfermedad de Chagas. Los presentes resultados abren la oportunidad para iniciar con estudios posteriores con el objetivo de validar sus propiedades *in vivo* y desarrollar un biosensor para el diagnóstico oportuno, así como la propuesta de una vacuna.

Perspectivas

- Diseño de plásmidos y de un protocolo de purificación para las diversas proteínas.
- Evaluar las propiedades inmunogénicas de las proteínas en el modelo murino, así como su uso vacunal.
- Diseñar un biosensor con las proteínas propuestas y evaluarlo para el diagnóstico en la fase aguda de la enfermedad de Chagas.

Bibliografía

1. Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD, Savioli L. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med*. 2007 Sep 6;357(10):1018-27. doi: 10.1056/NEJMr064142. PMID: 17804846.
2. Nunes MCP, Beaton A, Acquatella H, et al. Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Vol 138*.; 2018. doi:10.1161/CIR.0000000000000599
3. Lobo DA, Velayudhan R, Chatterjee P, Kohli H, Hotez PJ. The neglected tropical diseases of India and South Asia: review of their prevalence, distribution, and control or elimination. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Oct;5(10):e1222. doi: 10.1371/journal.pntd.0001222. Epub 2011 Oct 25. PMID: 22039553; PMCID: PMC3201909.
4. Afonso AM, Ebell MH, Tarleton RL (2012) A Systematic Review of High Quality Diagnostic Tests for Chagas Disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 6(11): e1881. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001881>
5. OMS. La enfermedad de Chagas tripanosomiasis americana. *Med Colon*. 1955;26(2):146-161.
6. Medeiros CA, Silva MBA, Oliveira ALS, Alves SMM, Barros MDNDDS, Cavalcanti MDGAM, Oliveira GMA, Carrazzone CFV, Oliveira WA Jr, Medeiros ZM. Mapping the morbidity and mortality of Chagas disease in an endemic area in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2022 Feb 2;64:e5. doi: 10.1590/S1678-9946202264005. PMID: 35137899; PMCID: PMC8815854.
7. Mills RM. Chagas Disease: Epidemiology and Barriers to Treatment. *Am J Med*. 2020;133(11):1262-1265. doi:https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.05.022
8. Gómez-Ochoa SA, Rojas LZ, Echeverría LE, Muka T, Franco OH. Global, Regional, and National Trends of Chagas Disease from 1990 to 2019: Comprehensive Analysis of the Global Burden of Disease Study. *Glob Heart*. 2022 Aug 24;17(1):59. doi: 10.5334/gh.1150. PMID: 36051318; PMCID: PMC9414802.
9. Bern C, Montgomery SP. An Estimate of the Burden of Chagas Disease in the United States. *Clin Infect Dis*. 2009;49(5):e52-e54. doi:10.1086/605091

10. Requena-Méndez A, Aldasoro E, de Lazzari E, Sicuri E, Brown M, et al. (2015) Prevalence of Chagas Disease in Latin-American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9(2): e0003540. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003540>
11. Nunes MCP, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, Ribeiro AL. Chagas Disease: An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(9):767-776. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>
12. Abuhab A, Trindade E, Aulicino GB, Fujii S, Bocchi EA, Bacal F. Chagas' cardiomyopathy: The economic burden of an expensive and neglected disease. *Int J Cardiol.* 2013;168(3):2375-2380. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.01.262>
13. Castillo-Riquelme M, Guhl F, Turriago B, Pinto N, Rosas F, et al. (2008) The Costs of Preventing and Treating Chagas Disease in Colombia. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2(11): e336. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000336>
14. Volta BJ, Perrone AE, Rivero R, Scollo K, Bustos PL, Bua J. Some limitations for early diagnosis of congenital chagas infection by PCR. *Pediatrics.* 2018;141(April):S451-S455. doi:10.1542/peds.2016-3719
15. Diez M, Favaloro L, Bertolotti A, et al. Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas' disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation. *Am J Transplant.* 2007;7(6):1633-1640. doi:10.1111/j.1600-6143.2007.01820.x
16. Rocha-Gaso MI, Villarreal-Gómez LJ, Beyssen D, Sarry F, Reyna MA, Ibarra-Cerdeña CN. Biosensors to diagnose Chagas disease: A brief review. *Sensors (Switzerland).* 2017;17(11):1-12. doi:10.3390/s17112629
17. Qvarnstrom Y, Schijman AG, Veron V, Aznar C, Steurer F, da Silva AJ. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(7). doi:10.1371/journal.pntd.0001689
18. Santos FLN, De Souza WV, Da Silva Barros M, Nakazawa M, Krieger MA, De Miranda Gomes Y. Chronic Chagas disease diagnosis: A comparative performance of commercial enzyme immunoassay tests. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;94(5):1034-1039. doi:10.4269/ajtmh.15-0820

19. Cordeiro TAR, Martins HR, Franco DL, et al. Impedimetric immunosensor for rapid and simultaneous detection of chagas and visceral leishmaniasis for point of care diagnosis. *Biosens Bioelectron.* 2020;169(June). doi:10.1016/j.bios.2020.112573
20. Moncayo, Á. & Silveira, A., C., (2009). Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(Suppl. 1), 17-30. <https://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000900005>
21. Guhl F, Pinto N, Aguilera G. Sylvatic triatominae: a new challenge in vector control transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(suppl 1):71–75.
22. Carabarin-Lima A, González-Vázquez MC, Rodríguez-Morales O, et al. Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update. *Acta Trop.* 2013;127(2):126-135. doi:10.1016/j.actatropica.2013.04.007
23. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* 2010;375(9723):1388-1402. doi:10.1016/S0140-6736(10)60061-X
24. Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet.* 2018;391(10115):82-94. doi:10.1016/S0140-6736(17)31612-4
25. Rassi A, Rassi A Jr, Rassi SG, et al. Doença de Chagas. In: Lopes AC, ed. *Tratado de clínica médica*, 2nd edn. São Paulo: Editora Roca, 2009: 4123–34
26. Brener Z. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1971; 13: 171–78.
27. Tyler KM, Engman DM. The life-cycle of *Trypanosoma cruzi*. In: Tyler KM, Miles MA, eds. *American trypanosomiasis. World class parasites: vol 7.* Boston, MA: Kluwer Academic Publishers, 2003: 1–11.
28. Nunes MCP, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, Ribeiro AL. Chagas Disease: An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(9):767-776. doi:https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046
29. Carod-Artal FJ, Gascon J. Chagas disease and stroke. *Lancet Neurol.* 2010 May;9(5):533-42. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70042-9. PMID: 20398860.
30. Dumonteil, E., 1999. Update on Chagas' disease in Mexico. *Salud Pública Mex.* 41, 322–327

31. Coll-Cárdenas R, Espinoza-Gómez F, Maldonado-Rodríguez A, Reyes-López PA, Huerta-Viera M, Rojas-Larios F. Active transmission of human chagas disease in Colima Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004 Jun;99(4):363-8. doi: 10.1590/s0074-02762004000400004. Epub 2004 Aug 13. PMID: 15322624.
32. Rassi A Jr, Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi SG, Rassi AG, Rassi GG, Hasslocher-Moreno A, Sousa AS, Scanavacca MI. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med*. 2006 Aug 24;355(8):799-808. doi: 10.1056/NEJMoa053241. PMID: 16928995.
33. Rassi A, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin North Am*. 2012;26(2):275-291. doi:10.1016/j.idc.2012.03.002
34. Guarner J. Chagas disease as example of a reemerging parasite. *Semin Diagn Pathol*. 2019;36(3):164-169. doi:10.1053/j.semdp.2019.04.008
35. Forsyth CJ, Hernandez S, Olmedo W, Abuhamidah A, Traina MI, Sanchez DR, Soverow J, Meymandi SK. Safety Profile of Nifurtimox for Treatment of Chagas Disease in the United States. *Clin Infect Dis*. 2016 Oct 15;63(8):1056-1062. doi: 10.1093/cid/ciw477. Epub 2016 Jul 17. PMID: 27432838; PMCID: PMC5036918.
36. Crespillo-Andújar C, Chamorro-Tojeiro S, Norman F, Monge-Maillo B, López-Vélez R, Pérez-Molina JA. Toxicity of nifurtimox as second-line treatment after benznidazole intolerance in patients with chronic Chagas disease: when available options fail. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(12):1344.e1-1344.e4. doi:https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.06.006
37. Choudhury SD. Nano-Medicines a Hope for Chagas Disease! *Front Mol Biosci*. 2021;8(June):1-13. doi:10.3389/fmolb.2021.655435
38. Sposito, P. A., Mazzeti, A. L., De Oliveira Faria, C., Urbina, J. A., Pound-Lana, G., Bahia, M. T., et al. (2017). Ravuconazole self-emulsifying delivery system: in vitro activity against *Trypanosoma cruzi* amastigotes and in vivo toxicity. *Int. J.*
39. Apt B, Werner, Heitmann G, Ingrid, Jercic L, M. Isabel, Jofré M, Leonor, Muñoz C. del V, Patricia, Noemí H, Isabel, San Martín V, Ana M, Sapunar P, Jorge, Torres H, Marisa, & Zulantay A, Inés. (2008). Guías clínicas de la enfermedad de Chagas 2006: Parte V. Diagnóstico de laboratorio. *Revista chilena de infectología*, 25(5), 378-383. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182008000500012>

40. Organización Panamericana de la Salud [PAHO]. *Guía Para El Diagnóstico y El Tratamiento de La Enfermedad de Chagas*. Vol 12.; 2018. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/49653?localeattribute=en%0Awww.paho.org>
41. Manuel Santamaría O, Pilar B, Ignacio J M. Educación continuada en el laboratorio clínico. *Enfermedades Hepáticas Autoinmunes*. 2007;7(Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada):44-52.
42. CENAPRECE. Manual de procedimientos para la Enfermedad de Chagas en México. *Secr Salud*. Published online 2019:1-109. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/447946/Manual_de_Procedimientos_para_la_Enfermedad_de_Chagas_en_Mexico.pdf
43. Suárez C, Nolder D, García-Mingo A, Moore DA, Chiodini PL. Diagnosis and Clinical Management of Chagas Disease: An Increasing Challenge in Non-Endemic Areas. *Res Rep Trop Med*. 2022;Volume 13(June):25-40. doi:10.2147/rrtm.s278135
44. Hammond JL, Formisano N, Estrela P, Carrara S, Tkac J. Electrochemical biosensors and nanobiosensors. *Essays Biochem*. 2016 Jun 30;60(1):69-80. doi: 10.1042/EBC20150008. PMID: 27365037; PMCID: PMC4986461.
45. Monteiro T, Almeida MG. Electrochemical Enzyme Biosensors Revisited: Old Solutions for New Problems. *Crit Rev Anal Chem*. 2019;49(1):44-66. doi:10.1080/10408347.2018.1461552
46. Gadelha AA, Vercosa AF, Lorena VM, Nakazawa M, Carvalho AB, Souza WV, Ferreira AG, Silva ED, Krieger MA, Goldenberg S, Gomes YM, 2003. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA with conventional ELISA and the haemagglutination test. *VoxSang*85: 165–170.
47. Gomes YM, Pereira VR, Nakazawa M, Rosa DS, Barros MD, Ferreira AG, Silva ED, Ogatta SF, Krieger MA, Goldenberg S, 2001. Serodiagnosis of chronic Chagas infection by using EIE- Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 497–501
48. Salinas, E.; Torriero, A.; Battaglini, F.; Sanz, M.; Olisina, R.; Raba, J. Continuous-flow/stopped-flow system for enzyme immunoassay using a rotating bioreactor: Determination of Chagas disease. *Biosens. Bioelectron*. 2005, 21, 313–321. [CrossRef] [PubMed]
49. Luz, J.G.G.; Souto, D.E.P.; Machado-Assis, G.F.; de Lana, M.; Kubota, L.T.; Luz, R.C.S.; Damos, F.S.; Martins, H.R. Development and Evaluation of a SPR-based

Immunosensor for Detection of Anti-Trypanosoma cruzi Antibodies in Human Serum. *Sens. Actuators B Chem.* 2015, 212, 287–296.

50. Cortina, M.E.; Melli, L.J.; Roberti, M.; Mass, M.; Longinotti, G.; Tropea, S.; Lloret, P.; Serantes, D.A.R.; Salomón, F.; Lloret, M.; et al. Electrochemical magnetic microbeads-based biosensor for point-of-care serodiagnosis of infectious diseases. *Biosens. Bioelectron.* 2016, 80, 24–33
51. Regiart, M.; Pereira, S.V.; Bertolino, F.A.; Garcia, C.D.; Raba, J.; Aranda, P.R. An electrochemical immunosensor for anti-T. cruzi IgM antibodies, a biomarker for congenital Chagas disease, using a screen-printed electrode modified with gold nanoparticles and functionalized with shed acute phase antigen. *Microchim. Acta* 2016, 183, 1203–1210
52. Janissen, R.; Sahoo, P.K.; Santos, C.A.; da Silva, A.M.; von Zuben, A.A.G.; Souto, D.E.P.; Costa, A.D.T.; Celedon, P.; Zanchin, N.I.T.; Almeida, D.B.; et al. InP Nanowire Biosensor with Tailored Biofunctionalization: Ultrasensitive and Highly Selective Disease Biomarker Detection. *Nano Lett.* 2017, 17, 5938–5949.
53. T.A. Cordeiro, M.V. Gonçalves, D.L. Franco, A.B. Reis, H.R. Martins, L.F. Ferreira, Label-free electrochemical impedance immunosensor based on modified screen- printed gold electrodes for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis, *Talanta* 195 (2019) 327–332.
54. Belluzo MS, Ribone MÉ, Camussone C, Marcipar IS, Lagier CM. Favorably orienting recombinant proteins to develop amperometric biosensors to diagnose Chagas' disease. *Anal Biochem.* 2011;408(1):86-94. doi:10.1016/j.ab.2010.09.002
55. Balouz V, Agüero F, Buscaglia CA. Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps. *Adv Parasitol.* 2017;97:1-45. doi:10.1016/bs.apar.2016.10.001
56. Egüez KE, Alonso-Padilla J, Terán C, et al. Rapid diagnostic tests duo as alternative to conventional serological assays for conclusive Chagas disease diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(4):1-11. doi:10.1371/journal.pntd.0005501
57. Momčilović S, Cantacessi C, Arsić-Arsenijević V, Otranto D, Tasić-Otašević S. Rapid diagnosis of parasitic diseases: current scenario and future needs. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25(3):290-309. doi:10.1016/j.cmi.2018.04.028

58. Forsyth CJ, Manne-Goehler J, Bern C, Whitman J, Hochberg NS, Edwards M, Marcus R, Beatty NL, Castro-Sesquen YE, Coyle C, Stigler Granados P, Hamer D, Maguire JH, Gilman RH, Meymandi S. Recommendations for Screening and Diagnosis of Chagas Disease in the United States. *J Infect Dis.* 2022 May 4;225(9):1601-1610. doi: 10.1093/infdis/jiab513. PMID: 34623435; PMCID: PMC9071346.
59. Escalante H, Jara C, Davelois K, Iglesias M, Benites A, Espinoza R. Western blot technique standardization for specific diagnosis of chagas disease using excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2014;31(4):644-651.
60. Sánchez-Camargo CL, Albajar-Viñas P, Wilkins PP, et al. Comparative evaluation of 11 commercialized rapid diagnostic tests for detecting *Trypanosoma cruzi* antibodies in serum banks in areas of endemicity and nonendemicity. *J Clin Microbiol.* 2014;52(7):2506-2512. doi:10.1128/JCM.00144-14
61. Attaran A. Chagas' disease in Mexico. *Lancet.* 2006;368(9549):1768. doi:10.1016/S0140-6736(06)69730-4
62. Levy MZ, Tustin A, Castillo-Neyra R, Mabud TS, Levy K, Barbu CM, Quispe-Machaca VR, Ancca-Juarez J, Borrini-Mayori K, Naquira-Velarde C, Ostfeld RS; Chagas Disease Working Group in Arequipa. Bottlenecks in domestic animal populations can facilitate the emergence of *Trypanosoma cruzi*, the aetiological agent of Chagas disease. *Proc Biol Sci.* 2015 Jul 7;282(1810):20142807. doi: 10.1098/rspb.2014.2807. PMID: 26085582; PMCID: PMC4590463.
63. Manne JM, Snively CS, Ramsey JM, Salgado MO, Bärnighausen T, Reich MR. Barriers to Treatment Access for Chagas Disease in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(10). doi:10.1371/journal.pntd.0002488
64. Galaviz-Silva, L., Molina-Garza, D.P., Gonzalez-Santos, M.A., Mercado-Hernandez, R., Gonzalez-Galaviz, J.R., Rosales-Encina, J.L., et al., 2009. Update on seroprevalence of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies among blood donors in northeast Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81, 404–406.
65. Sánchez-González G, Figueroa-Lara A, Elizondo-Cano M, et al. Cost-Effectiveness of Blood Donation Screening for *Trypanosoma cruzi* in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(3):22-23. doi:10.1371/journal.pntd.0004528
66. Monteón-Padilla VM, Hernández-Becerril N, Guzmán-Bracho C, Rosales-Encina JL, Reyes-López PA. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and blood

- banking in Mexico City: seroprevalence and its potential transfusional transmission risk. *Arch Med Res.* 1999 Sep-Oct;30(5):393-8. doi: 10.1016/s0188-4409(99)00062-4. PMID: 10596460.
67. Guzmán Bracho C, García García L, Floriani Verdugo J, et al. Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión de sangre en México. *Rev Panam Salud Pública.* 1998;4(2):94-99. doi:10.1590/s1020-49891998000800004
 68. Camargo ME. Fluorescent antibody test for serodiagnosis. Technical modification employing preserved culture forms of *T. cruzi* in slide test. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1966
 69. NORMA Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012
 70. González-Guzmán S, González-Cano P, Bagu ET, Vázquez-Vega S, Martínez-Salazar M, Juárez-Montiel M, Gutiérrez-Hoya A, Crescencio-Trujillo JA, Sánchez-Montes S, Fernández-Figueroa E, Contreras-López EA, Guerra-Márquez Á, Arroyo-Anduiza CI, Ángeles-Márquez LE, Rodríguez-Trejo E, Bekker-Méndez C, Guerra-Castillo FX, Regalado-Santiago C, Tesoro-Cruz E, Oviedo N, Victoria-Jardón AM, Bautista-Olvera J, García-Ramírez P, Vázquez-Meraz JE, Contreras-Lozano MC, Castillo-Flores VS, Guevara-Reyes R, Girón-Sánchez AR, Arenas-Luis HD, Pecero-Hidalgo MJ, Ríos-Antonio E, Ramírez-Pereda N, Martínez-Mora A, Paredes-Cervantes V. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* in Eight Blood Banks in Mexico. *Arch Med Res.* 2022 Sep;53(6):625-633. doi: 10.1016/j.arcmed.2022.08.007. Epub 2022 Sep 13. PMID: 36109203.
 71. Alejandro DH. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES INMUNOGÉNICAS DE LA ENOLASA CONSENSO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*, MEDIANTE UN ABORDAJE BIOINFORMÁTICO PARA SU USO COMO VACUNA. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.2021.
<https://hdl.handle.net/20.500.12371/16057>
 72. Riguro V, Clifford R, Dawley M, et al. Immobilized metal affinity chromatography optimization for poly-histidine tagged proteins. *J Chromatogr A.* 2020;1629:461505. doi:10.1016/j.chroma.2020.461505
 73. Tovar CN, Odunuga OO. Size of Protein is a Major Factor that Affects Retention on Preparative IMAC Columns. *Protein J.* 2019;38(1):76-82. doi:10.1007/s10930-018-9803-9
 74. Jeon WB. Retrospective analyses of the bottleneck in purification of eukaryotic proteins from *Escherichia coli* as affected by molecular weight, cysteine content

- and isoelectric point. *Physiol Behav.* 2018;176(5):139-148. doi:10.4049/jimmunol.1801473.The
75. Lesley, S. A. (2001). High-throughput proteomics: Protein expression and purification in the postgenomic world. *Protein Expr. Purif.* 22, 159–164.
 76. E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, M. R. Wilkins, R. D. Appel, and A. Bairoch, "Protein identification and analysis tools on the ExPASy server," in *The Proteomics Protocols Handbook*, pp. 571–607, Springer, 2005.
 77. Guruprasad K, Reddy BVB and Pandit MW (1990). "Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence." *Protein Eng.*, 4, 155 – 161
 78. Ikai A. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *J Biochem.* 1980 Dec;88(6):1895-8. PMID: 7462208.
 79. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* 1982;157(1):105-132. doi:https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0
 80. Hon J, Marusiak M, Martinek T, et al. SoluProt: prediction of soluble protein expression in *Escherichia coli* . *Bioinformatics.* 2021;37(1):23-28. doi:10.1093/bioinformatics/btaa1102
 81. Kleiner-Grote GRM, Risse JM, Friehs K. Secretion of recombinant proteins from *E. coli*. *Eng Life Sci.* 2018;18(8):532-550. doi:10.1002/elsc.201700200
 82. Billen B, Vincke C, Hansen R, et al. Cytoplasmic versus periplasmic expression of site-specifically and bioorthogonally functionalized nanobodies using expressed protein ligation. *Protein Expr Purif.* 2017;133:25-34. doi:10.1016/j.pep.2017.02.009
 83. Jeffery CJ. Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci.* 1999;24(1):8-11.
 84. Galanis KA, Nastou KC, Papandreou NC, Petichakis GN, Pigis DG, Iconomidou VA. Linear B-cell epitope prediction for in silico vaccine design: A performance review of methods available via command-line interface. *Int J Mol Sci.* 2021;22(6):1-19. doi:10.3390/ijms22063210
 85. Kozakov D, Hallc DR, Xiab B, et al. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. ClusPro web Serv protein-protein docking. 2017;12(2)(1):255-278. doi:10.1038/nprot.2016.169.The

86. Yazdani Z, Rafiei A, Yazdani M, Valadan R. Design an efficient multi-epitope peptide vaccine candidate against SARS-CoV-2: An in silico analysis. *Infect Drug Resist.* 2020;13:3007-3022. doi:10.2147/IDR.S264573
87. Bhattacharya M, Ranjan A, Patra P, Ghosh P, Chakraborty C. A SARS-CoV-2 vaccine candidate: In-silico cloning and validation. 2020;(January).
88. Khairkhah N, Aghasadeghi MR, Namvar A, Bolhassani A. Design of novel multiepitope constructs-based peptide vaccine against the structural S, N and M proteins of human COVID-19 using immunoinformatics analysis. *PLoS One.* 2020;15(10 October):1-28. doi:10.1371/journal.pone.0240577
89. Kozakov D, Hall DR, Xia B, Porter KA, Padhorny D, Yueh C, Beglov D, Vajda S. The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nat Protoc.* 2017 Feb;12(2):255-278. doi: 10.1038/nprot.2016.169. Epub 2017 Jan 12. PMID: 28079879; PMCID: PMC5540229.
90. Doytchinova, I.A., Flower, D.R. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics* 8, 4 (2007). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4>
91. Rahman MS, Rahman MK, Saha S, Kaykobad M, Rahman MS. Antigenic: An improved prediction model of protective antigens. *Artif Intell Med.* 2019;94:28-41. doi:<https://doi.org/10.1016/j.artmed.2018.12.010>
92. Sachdeva G, Kumar K, Jain P, Ramachandran S. SPAAN: A software program for prediction of adhesins and adhesin-like proteins using neural networks. *Bioinformatics.* 2005;21(4):483-491. doi:10.1093/bioinformatics/bti028
93. Tusnády GE, Simon I. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics.* 2001;17(9):849-850. doi:10.1093/bioinformatics/17.9.849
94. Arce-Fonseca M, González-Vázquez MC, Rodríguez-Morales O, Graullera-Rivera V, Aranda-Fraustro A, Reyes PA, Carabarin-Lima A, Rosales-Encina JL. Recombinant Enolase of *Trypanosoma cruzi* as a Novel Vaccine Candidate against Chagas Disease in a Mouse Model of Acute Infection. *J Immunol Res.* 2018 May 7;2018:8964085. doi: 10.1155/2018/8964085. PMID: 29854848; PMCID: PMC5964559.
95. Osorio-Aguilar, Y.; Gonzalez-Vazquez, M.C.; Hernandez-Ceron, D.E.; Lozano-Zarain, P.; Martinez-Laguna, Y.; Gonzalez-Bonilla, C.R.; Rocha-Gracia, R.d.C.; Carabarin-Lima, A. Structural Characterization of *Haemophilus influenzae* Enolase

and Its Interaction with Human Plasminogen by In Silico and In Vitro Assays. *Pathogens* 2021, 10, 1614. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121614>

96. Amezcua Vesely MC, Bermejo DA, Montes CL, Acosta-Rodríguez E V., Gruppi A. B-cell response during protozoan parasite infections. *J Parasitol Res.* 2012;2012. doi:10.1155/2012/362131
97. Youinou P. B cell conducts the lymphocyte orchestra. *J Autoimmun.* 2007;28(2-3):143-151. doi:10.1016/j.jaut.2007.02.011
98. Théry C, Amigorena S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 2001 Feb;13(1):45-51. doi: 10.1016/s0952-7915(00)00180-1. PMID: 11154916.
99. Umekita LF, Takehara HA, Mota I. Role of the antibody Fc in the immune clearance of *Trypanosoma cruzi*. *Immunol Lett.* 1988 Jan;17(1):85-9. doi: 10.1016/0165-2478(88)90106-x. PMID: 3127336.
100. Engwerda CR, Ng SS, Bunn PT. The regulation of CD4+ T cell responses during protozoan infections. *Front Immunol.* 2014;5(OCT):1-9. doi:10.3389/fimmu.2014.00498
101. Tau G, Rothman P. Biologic functions of the IFN-gamma receptors. *Allergy.* 1999 Dec;54(12):1233-51. doi: 10.1034/j.1398-9995.1999.00099.x. PMID: 10688427; PMCID: PMC4154595.
102. Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol.* 1998 Mar;30(3):293-8. doi: 10.1016/s1357-2725(97)00128-3. PMID: 9611771.
103. Redpath SA, Fonseca NM, Perona-Wright G. Protection and pathology during parasite infection: IL-10 strikes the balance. *Parasite Immunol.* 2014;36(6):233-252. doi:10.1111/pim.12113
104. Laucella SA, Rottenberg ME, de Titto EH. Papel de las citoquinas en la resistencia y patología durante la infección con *Trypanosoma cruzi* [Role of cytokines in resistance and pathology in *Trypanosoma cruzi* infection]. *Rev Argent Microbiol.* 1996 Apr-Jun;28(2):99-109. Spanish. PMID: 8768488.

Anexos

Secuencia de proteínas

Cardiolipina Sintetasa V5BFX7 UniProt

MPTSGCKFRVALQRLNIERLLPPPLREKRGGNTVGRINNNSGVELRESANKDFKDVC
STVGNGARGVYCNGLSFHVRWDRIQRKLAVLGRVSNNGNTVVPYRDSAEAFRVMWKA
VDEAKRSVLWQTYICKDDRIGQMTVEKIAAAQRRGCQCELLYDCGGNITGRRRLIDRL
KQSGANVIEHRPVLHHVLPYLFGGMKWERSPAIRNHRKILIVDDKIGFCGGLNIGNEYC
GRSQGGTGRFRDTHCSVVGPAVAHLREAYEDTKAPKPWQWSWTRWRKIASTTMAR
RYKQGRNATDDLGPMTKSVQQRGKLYLQQQMERAEKRVRFMERIRWKRQQRERLE
LFMRWYPKKAALLPQNLVHVDVEDGTFKPTERAVIDTGASTVMKQRMHYRMRALN
RAKAALERRLAERPLSKAPLSADPVPGAEEYGKIRSNATQIICCNPHTRDWSIPYAFW
QVSQKAHRRLWVTPPYLPHRKLLRAILYAARRGVDVRILAGSNCTTDPWFMWHASN
YITERLLAAGVRIYEYKGDQIMHAKTVVDSIWCSVGSYNWDMMSNKNMEVCLCHLG
YEMAREMEGHFLKDLQTSIEVKYEEYQRRSFWLRFTSWFFYVGLQIAEKLTFRTFWDA
DLSSKVDDLD

HSP70 Q4DTM9 UniProt

MTYEGAIGIDLGTTYSCVGWQNERVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQV
AMNPTNTVFDKRLIGRKFSDPVVQSDMKHWPVKVITKGDDKPIQVQFRGETKTFNP
EEVSSMVL SKMKEIAESYL GKQVKKAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGMEVLRIINE
PTAAAIAYGLDKVEDGKERNVLIFDLGGGTDFVTLLTIDGGIFEVKATNGDTHLGGEDF
DNRLVSHLTDEFKRKNKGKDLTTSQRALRRLRTACERAKRTLSSAAQATIEIDALFRQG
LPGKPSLAPASRSSAATSSEGLTLPVERVLQDAKMDKRAVHDVVLVGGSTRIPKVMQ
LVSDFFGGKELNKSINPDEAVAYGA AVQAFILTGGKSKQTEGLLLLDVTPLTLGIETAGG
VMTSLIKRNTTIPTKKSQIFSTYADNQPGVHIQVFEGERAMTKDCHLLGTDFDLSGIPPAP
RGVPQIEVTFDL DANGILNVSAEEKGTGKR NQIVITNDKGRLSKADIERMVSEAAKYE
QDKEQRERIDAKNGLENYAFSMKNTVNEPNVAGKIEEADKNTITSAVEEALQWLNNNQ
EASKEEYEHQKELNLCPTIMTKMYQGMGAGGGMPGMPGMPGMPGMPGGANPS
SSSGPKVEEVD

Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa Q4DMG2 UniProt

MTEGKKLTIKIGINGFGRIGRMVFRAAQHRNDIEIVGINDLLDADY MAYMLKYDSTHGRY
GGMVEVREGALVVNGKKIRVTSEHDPANLKWNEVGAVVVVESTGLFLTDETARKHIQA
GAKKVMTGPPKDDTPMFVMGVNNTMYKGQEIVSNASCTTNCLAPLAKIIHEKFGIVE
GLMTTVHATTATQKTVGGPSQKDWRGGRGAAQNIVPSATGAAKAVGKVIPALNGRLT
GMAFRVPTPNVSVVDLTARLERPATYEQICAAIKAASEGELKGILGYTEDEVVSTDMNG
VALTSVFDVKAGISLNDHFAKLAPWYDNETGYSHKVLDLVAYISAH