



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Identificación y evaluación de péptidos antigénicos, y de
antígenos locales de epimastigotes y tripomastigotes de
Trypanosoma cruzi, con potencial uso diagnóstico”**

TESIS

Que presenta:

M. en C. Anahi Pérez Galicia

Para obtener el grado de Doctora en Ciencias
En la especialidad de Biomedicina Molecular

Directores de tesis:

Dra. Rebeca Georgina Manning Cela

Dr. César Israel Lugo Caballero

ASESORES

Directora de tesis:

Dra. Rebeca Georgina Manning Cela

Co-tutor:

Dr. César Lugo Caballero

Asesores internos:

Dra. María Teresa Estrada García

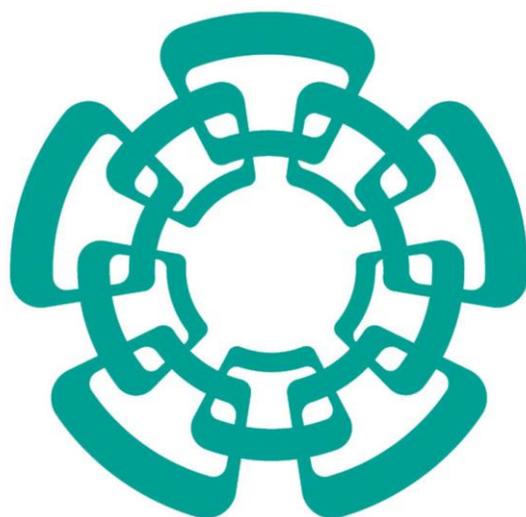
Dra. Leticia Cedillo Barrón

Dr. Vianney Ortiz Navarrete

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Asesor externo:

Dr. Santiago Martínez Calvillo



Cinvestav

Este trabajo se realizó en el departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Rebeca Manning Cela.



CONAHCYT

CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS

Durante el desarrollo de este trabajo, la sustentante fue becada por el Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnologías (CONAHCyT) a través de la beca con número de registro (CVU/Becario): 710452.

DEDICATORIA

Agradezco primero a Dios y dedico esta tesis a mi abuelita, quien a pesar de todo me acompaño estos años.

A mis padres, que no han dejado de confiar en mí, respetando mis decisiones, brindándome su amor, paciencia y apoyo incondicional.

A mi familia y amigos por todo su cariño.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a **Dios** y a mi **familia** que siempre han creído en mí.

Al **CINVESTAV** y a **CONAHCyT** que en conjunto nos permiten y apoyan para realizar estudios de excelencia.

Agradezco a la **Dra. Rebeca Georgina Manning Cela** y al **Dr. Cesar Lugo Caballero**, quienes aceptaron ser mis directores de tesis y me brindaron el apoyo, orientación y enseñanzas todos estos años.

Agradezco a todos y cada uno de los integrantes de mi **comité** y a los profesores del **departamento de biomedicina molecular**, que ayudaron a que el proyecto fuera mejor con cada una de sus observaciones.

A mis **compañeros de laboratorio** de quienes aprendí y adquirí nuevas ideas.

Y a todos los que conforman el departamento de Biomedicina molecular y Cinvestav, ya que conté con la convivencia y buenos momentos con cada una de las personas que tuve el gusto de conocer a lo largo de mi doctorado.

CONTENIDO

ASESORES.....	I
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS	V
CONTENIDO.....	VI
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABLAS.....	XI
ABREVIATURAS.....	XII
RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Enfermedad de Chagas	1
1.1.1 Características generales	1
1.1.2 Epidemiología	2
1.1.3 Epidemiología en Oaxaca	3
1.1.4 Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	5
1.1.5 Diagnóstico de ECh	7
1.1.6 Características y genoma de <i>T. cruzi</i>	8
1.1.7 Caracterización de cepas de <i>T. cruzi</i>	9
1.1.8 Caracterización de las cepas <i>T. cruzi</i> en México	12
1.1.9 Variabilidad biológica de las cepas de <i>T. cruzi</i>	14
1.1.10 Variabilidad antigénica de las cepas de <i>T. cruzi</i>	15
1.2 Antecedentes Directos	18
1.2.1 Identificación de Ag de <i>T. cruzi</i>	18
1.2.2 Resultados previos	19
1.3 Justificación	23
1.4 Hipótesis	23
1.5 Objetivos.....	23
1.5.1 Objetivo general.....	23

1.5.2 Objetivos particulares	23
2. METODOLOGÍA.....	25
2.1 Estrategia experimental.....	25
2.2 Materiales y Métodos.....	26
2.2.1 Cultivos celulares	26
2.2.2 Parásitos.....	26
2.2.3 Sueros Humanos	27
2.2.4 Análisis bioinformático de secuencias proteicas candidato	28
2.2.5 Identificación de epítomos antigénicos de las proteínas candidato por análisis <i>in silico</i> para el diseño de péptidos antigénicos.	28
2.2.6 Búsqueda de péptidos antigénicos a <i>T. cruzi</i> reportados en la literatura.....	31
2.2.7 Extracción de proteínas totales	32
2.2.8 Cuantificación de proteínas	33
2.2.9 Electroforesis en gel SDS-PAGE.....	33
2.2.10 Ensayo de ELISA	34
2.2.11 Análisis estadístico	35
3. RESULTADOS	37
3.1 Identificación y evaluación de péptidos antigénicos a partir de proteínas antigénicas de cepas de <i>T. cruzi</i> locales y péptidos reportados en la literatura, con sueros caracterizados positivos y negativos al parásito provenientes de zonas endémicas de ECh en México.....	37
3.1.1 Análisis <i>in silico</i> de las características moleculares y biológicas de las secuencias candidato de <i>T. cruzi</i>	37
3.1.2 Identificación de epítomos antigénicos de las proteínas candidato, por análisis <i>in silico</i> para el diseño de péptidos antigénicos	42
3.1.3 Búsqueda, selección y evaluación de péptidos antigénicos a <i>T. cruzi</i> reportados en la literatura	52
3.1.4 Estandarización de las condiciones para los ensayos de ELISA.....	55
3.1.5 Evaluación de los péptidos antigénicos identificados en este trabajo mediante la técnica de ELISA, con sueros caracterizados positivos y negativos al parásito de diferentes zonas endémicas de la ECh en México	59
3.2 Evaluación de extractos totales de epimastigotes y tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> , con sueros caracterizados positivos y negativos al parásito provenientes de diferentes zonas endémicas de la ECh en México	76

3.2.1 Determinación el mejor método (físico y químico) para la obtención de extractos totales de proteínas de epimastigotes y tripomastigotes de las 15 cepas es estudio.....	76
3.2.2 Estandarización de las condiciones para los ensayos de ELISA con extractos totales de proteínas de epimastigotes y tripomastigotes, usando sueros caracterizados positivos y negativos a <i>T. cruzi</i> provenientes de las mismas zonas endémicas de la ECh en México que las cepas de parásito.....	79
3.2.3 Evaluación de extractos totales de proteínas de epimastigotes y tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> mediante la técnica de ELISA, con sueros caracterizados positivos y negativos al parásito provenientes de diferentes zonas endémicas de la ECh México	81
3.3 Regionalización del grado de seropositividad a <i>T. cruzi</i> de los datos del InDRE, extractos totales de proteínas de epimastigotes y tripomastigotes locales, y péptidos en estudio.....	85
4. DISCUSIÓN	89
5. CONCLUSIONES.....	97
6. PERSPECTIVAS.....	98
7. REFERENCIAS.....	99
8. APÉNDICES.....	121
Apéndice 1. Péptidos antigénicos candidatos que cumplen con todos los criterios durante en análisis <i>in silico</i>	121
8. ANEXOS	123
Artículos publicados:	123
Premios.....	123

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN EL HUMANO.....	2
FIGURA 2. CICLO DE VIDA DE <i>T. CRUZI</i>	6
FIGURA 3. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA APROXIMADA DE <i>T. CRUZI</i>	10
FIGURA 4. DISTRIBUCIÓN DE LA DIFERENTES DTU DE <i>T. CRUZI</i> EN MÉXICO.	14
FIGURA 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL.	25
FIGURA 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA PREDICCIÓN DE PÉPTIDOS <i>IN SILICO</i>	30
FIGURA 7. ALINEACIÓN DE SECUENCIA DE LA PROTEÍNA Q4CXJ6 Y LA SECUENCIA HOMOLOGA OBTENIDA POR SWISS-MODEL .	43
FIGURA 8. ALINEACIÓN DE SECUENCIA DE LA PROTEÍNA Q4E2M9 Y LA SECUENCIA HOMOLOGA OBTENIDA POR SWISS-MODEL	44
FIGURA 9. PREDICCIÓN DE EPÍTOPOS DISCONTINUOS MEDIANTE DISCOToPE Y ELLIPRO DE LA PROTEÍNA 6 (Q4CXJ6).....	45
FIGURA 10. PREDICCIÓN DE EPÍTOPOS DISCONTINUOS MEDIANTE DISCOToPE Y ELLIPRO DE LA PROTEÍNA 15 (Q4E2M9).....	45
FIGURA 11. IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIGÉNICOS	48
FIGURA 12. SELECCIÓN DE PÉPTIDOS CANDIDATO A TRAVÉS DE UN DIAGRAMA DE VENN.	49
FIGURA 13 LOCALIZACIÓN DEL PÉPTIDO VTKPLRPVEDMPFAKDL EN LA PROTEÍNA 6..	51
FIGURA 14. LOCALIZACIÓN DEL PÉPTIDO TVHLNESNAAPANTSMVA EN LA PROTEÍNA 15..	51
FIGURA 15 TITULACIÓN DE ANTICUERPO SECUNDARIO PARA PÉPTIDOS REPORTADOS EN LA LITERATURA	57
FIGURA 16 TITULACIÓN DE ANTICUERPO SECUNDARIO PARA PEP2 Y TcE.	58
FIGURA 17. ESTABLECIMIENTO DE CONCENTRACIÓN DEL ANTÍGENO Y DILUCIÓN DEL SUERO PARA PÉPTIDOS PEP2 Y TcE.	59
FIGURA 18 ANÁLISIS DE PÉPTIDOS CANDIDATOS (1-28), LOS PÉPTIDOS REPORTADOS EN LA LITERATURA (PEP2, TcE, TcD) Y UN PÉPTIDO NO RELACIONADO DENV1.....	60
FIGURA 19 ANÁLISIS DE PÉPTIDOS IDENTIFICADOS EN DÚOS.	62
FIGURA 20 ANÁLISIS DE LOS PÉPTIDOS 11, 14 Y 21 DE MANERA INDIVIDUAL Y EN COMBINACIÓN EN DÚO Y TRIO.	63
FIGURA 21 ANÁLISIS LOS PÉPTIDOS PEP2, TcE Y TcD TANTO DE MANERA INDIVIDUAL COMO EN TRIO, Y EN SU COMBINACIÓN CON LOS PÉPTIDOS IDENTIFICADOS 11, 14 Y 21.	64
FIGURA 22 SUEROS PROPORCIONADOS POR EL INDRE.....	66
FIGURA 23 ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS SUEROS POR ESTADO	67
FIGURA 24 ANÁLISIS DEL RECONOCIMIENTO DE PÉPTIDOS CANDIDATOS 1, 8, 11, 14, 17, 19, 21 Y 26 CON SUEROS POSITIVOS Y NEGATIVOS A <i>T. CRUZI</i> PROVENIENTES DE DIFERENTES ZONAS ENDÉMICAS DE LA ECH EN MÉXICO..	69
FIGURA 25 ANÁLISIS DE LOS PÉPTIDOS CANDIDATOS 1, 8, 11, 14, 17, 19, 21 Y 26 MEDIANTE CURVAS ROC.	70
FIGURA 26 ANÁLISIS DEL RECONOCIMIENTO PEP2 CON SUEROS POSITIVOS Y NEGATIVOS A <i>T. CRUZI</i> PROVENIENTES DE OTRAS ZONAS ENDÉMICAS DE MÉXICO.....	71
FIGURA 27 ANÁLISIS DEL RECONOCIMIENTO TcE CON SUEROS POSITIVOS Y NEGATIVOS A <i>T. CRUZI</i> PROVENIENTES DE OTRAS ZONAS ENDÉMICAS DE MÉXICO.....	72
FIGURA 28 ANÁLISIS DEL RECONOCIMIENTO TcD CON SUEROS POSITIVOS Y NEGATIVOS A <i>T. CRUZI</i> PROVENIENTES DE OTRAS ZONAS ENDÉMICAS DE MÉXICO.....	73

FIGURA 29 ANÁLISIS DEL RECONOCIMIENTO DENV1 CON SUEROS POSITIVOS Y NEGATIVOS A <i>T. CRUZI</i> PROVENIENTES DE OTRAS ZONAS ENDÉMICAS DE MÉXICO	74
FIGURA 30 ANÁLISIS DE LOS PÉPTIDOS REPORTADOS MEDIANTE CURVAS ROC	75
FIGURA 31 ANÁLISIS DE LOS MÉTODOS DE LISIS PARA OBTENCIÓN DE EXTRACTO TOTAL DE PROTEÍNAS	77
FIGURA 32 EXTRACTOS TOTALES DE PROTEÍNAS DE EPIMASTIGOTES Y TRIPOMASTIGOTES DE LAS CEPAS LOCALES DE MÉXICO	78
FIGURA 33 TITULACIÓN DE AB SECUNDARIO PARA EXTRACTO TOTAL DE EPIMASTIGOTES Y TRIPOMASTIGOTES	80
FIGURA 34 ESTABLECIMIENTO DE CONCENTRACIÓN DEL ANTÍGENO Y DILUCIÓN DEL SUERO PARA EXTRACTO TOTAL DE EPIMASTIGOTES Y TRIPOMASTIGOTES	81
FIGURA 35 COMPARACIÓN DE RECONOCIMIENTO DE EXTRACTOS TOTALES DE PROTEÍNAS DE EPIMASTIGOTES Y TRIPOMASTIGOTES DE LAS DIFERENTES CEPAS LOCALES DE <i>T. CRUZI</i>	82
FIGURA 36 ANÁLISIS DEL RECONOCIMIENTO DEL EXTRACTO TOTAL DE EPIMASTIGOTES CON SUEROS POSITIVOS Y NEGATIVOS A <i>T. CRUZI</i> PROVENIENTES DE OTRAS ZONAS ENDÉMICAS DE MÉXICO	83
FIGURA 37 ANÁLISIS DEL RECONOCIMIENTO DEL EXTRACTO TOTAL DE TRIPOMASTIGOTES CON SUEROS POSITIVOS Y NEGATIVOS A <i>T. CRUZI</i> PROVENIENTES DE OTRAS ZONAS ENDÉMICAS DE MÉXICO	84
FIGURA 38 ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS TOTALES DE PROTEÍNAS MEDIANTE CURVAS ROC	85
FIGURA 39 REGIONALIZACIÓN DEL GRADO DE SEROPOSITIVIDAD A <i>T. CRUZI</i> A TRAVÉS DE SU RECONOCIMIENTO CON LOS DIFERENTES ANTÍGENOS	87
FIGURA 40 REGIONALIZACIÓN DEL GRADO DE SERONEGATIVIDAD A <i>T. CRUZI</i> A TRAVÉS DE SU RECONOCIMIENTO CON LOS DIFERENTES ANTÍGENOS	88

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DE LOS DIFERENTES DTUs EN RELACIÓN CON SU TAMAÑO DE GENOMA.....	12
TABLA 2. CEPAS ORIGINARIAS DE OAXACA UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO.....	26
TABLA 3. CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIAS DE LAS PROTEÍNAS CANDIDATO DE <i>T. CRUZI</i>	39
TABLA 4. MODELADO HOMOLÓGICO DE ESTRUCTURAS 3D DE LAS 23 PROTEÍNAS.	42
TABLA 5. ALELOS MÁS FRECUENTES EN POBLACIÓN MEXICANA.	47
TABLA 6. PÉPTIDOS CANDIDATOS SELECCIONADOS CON LOS SCORES MÁS ALTOS.....	50
TABLA 7. PÉPTIDOS ANTIGÉNICOS IDENTIFICADOS MEDIANTE EN ANÁLISIS DE LA LITERATURA	52
TABLA 8. PÉPTIDOS SELECCIONADOS REPORTADOS EN LA LITERATURA.	54
TABLA 9. INFORMACIÓN GENERAL DE LOS SUEROS UTILIZADOS.	55
TABLA 10. CINCUENTA PÉPTIDOS CANDIDATOS IDENTIFICADOS MEDIANTE ANÁLISIS <i>IN SILICO</i>	121

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
Ab	Anticuerpos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNk	Ácido desoxirribonucleico del cinetoplasto
Ag	Antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
ARNg	Ácido ribonucleico guía
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
DTU	Unidades de tipificación Discretas
E	Especificidad
ECh	Enfermedad de Chagas
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (siglas en inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>).
ETE	Extracto total de epimastigotes
ETT	Extracto total de tripomastigotes
GMQE	Estimación de la calidad del modelo global
HAI	Hemaglutinación Indirecta
IEDB	Base de datos de epítomos inmunitarios (por su nombre en inglés <i>Immune Epitope Database</i>)
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
kb	Kilobases
Lc	Linfocito
LIT	Medio de cultivo de infusión de hígado triptosa fresco
MASP	Proteína de superficie asociada a mucina

Mbp	Mega pares de bases
MHC I	Molécula de clase I del complejo principal de histocompatibilidad
MHC II	Molécula de clase II del complejo principal de histocompatibilidad
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud (siglas en inglés WHO, <i>World Health Organization</i>)
OPS	Organización Panamericana de la Salud (siglas en inglés PAHO, <i>Pan American Health Organization</i>)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (siglas en inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
QMEANDisCo Global	Calidad con base en los potenciales estadísticos de fuerza y puntuación de distancias globales
qPCR	PCR cuantitativa o en tiempo real
RFLP	Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción
RNLSP	Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública
S	Sensibilidad (%)
SSA	Secretaría de Salud
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Tc	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TSSA	Trypomastigote Small Surface Antigen
UABJO	Universidad Autónoma Benito Juárez Oaxaca

RESUMEN

La enfermedad de Chagas (ECh) es endémica de Latinoamérica, siendo México el país con el mayor número de infectados. Su agente causal, *Trypanosoma cruzi*, muestra variabilidad genética entre sus cepas, con diferencias antigénicas y geográficas. Se ha reportado que el uso de antígenos de cepas de distinto origen geográfico al de los sueros de individuos infectados, conlleva a una inmunodetección ineficiente. Esto es importante en México, donde circula el linaje TcI con baja carga parasitaria y anticuerpos, lo que dificulta aún más el diagnóstico. En este trabajo, utilizando herramientas *in silico*, se identificaron 28 péptidos antigénicos de cepas locales de *T. cruzi*. Estos péptidos fueron evaluados por ensayos de ELISA junto con tres péptidos antigénicos reportados en la literatura y extractos totales de proteínas de epimastigotes y tripomastigotes de cepas locales, con el objetivo de contribuir en el repertorio de antígenos útiles para el diagnóstico serológico de la ECh. Para ello se utilizaron sueros caracterizados positivos y negativos al parásito provenientes de las mismas y diferentes zonas endémicas de México, que las cepas del parásito. Los resultados mostraron que varios de los péptidos locales identificados fueron reconocidos, aunque con baja eficiencia y por un número muy limitado de sueros positivos a *T. cruzi* provenientes de Oaxaca, pero no por sueros de otras zonas de México. Por el contrario, los péptidos reportados TcE (S 80%, E 86%, índice kappa 0.717 y AUC 0.9503) y PEP2 (S 53.3%, E 86%, índice kappa 0.435 y AUC 0.8919) mostraron una alta sensibilidad (S) y especificidad (E) con los sueros positivos de todas las diferentes zonas endémicas del país. De manera relevante los extractos epimastigotes (S 100%, E 98%, índice kappa 0.984 y AUC 0.9982) y tripomastigotes (S 94.6%, E 98%, índice kappa 0.919 y AUC 0.9932) de cepas locales fueron reconocidos de manera muy eficiente por los sueros positivos de todas las diferentes zonas endémicas de México. En conclusión, este estudio contribuye al diagnóstico serológico de la ECh al identificar nuevos antígenos de *T. cruzi* reconocidos por sueros positivos de México. Por su buen desempeño y fácil obtención en cultivo, los extractos totales de proteínas de epimastigotes, son una alternativa prometedora como antígeno para la detección de anticuerpos. Se

requieren más estudios para validar clínicamente y en estudios seroepidemiológicos en población abierta, las herramientas propuestas.

ABSTRACT

Chagas disease (CD) is endemic to Latin America, with Mexico reporting the highest number of infected individuals. Its causal agent, *Trypanosoma cruzi*, shows genetic variability among strains, with antigenic and geographic differences. This is important in Mexico, where the TcI lineage circulates with low parasitic load and antibodies, which further complicates diagnosis. In this work, using in silico tools, 28 antigenic peptides from local *T. cruzi* strains were identified. These peptides were evaluated by ELISA assays along with three antigenic peptides reported in literature and total protein extracts of epimastigotes and trypomastigotes from local strains, with the aim of contributing to the antigen repertoire useful for the serological diagnosis of CD. For this, sera characterized as positive and negative to the parasite from the same and different endemic areas of Mexico from where the parasitic strains originated, were used. The results showed that several of the identified local peptides were recognized, although with low efficiency and by a very limited number of *T. cruzi* positive sera from Oaxaca, but not by sera from other areas of Mexico. In contrast, the reported peptides TcE (Se 80%, Sp 86%, kappa index 0.717 and AUC 0.9503) and PEP2 (S 53.3%, Sp 86%, kappa index 0.435 and AUC 0.8919) showed high sensitivity (Se) and specificity (Sp) with positive sera from all different endemic areas of the country. Notably, total protein extracts of epimastigote (Se 100%, Sp 98%, kappa index 0.984 and AUC 0.9982) and trypomastigote (Se 94.6%, Sp 98%, kappa index 0.919 and AUC 0.9932) from local strains were very efficiently recognized by positive sera from all different endemic areas of Mexico. In conclusion, this study contributes to the serological diagnosis of CD by identifying new *T. cruzi* antigens recognized by positive sera from Mexico. Due to their good performance and easy obtainment in culture, total protein extracts from epimastigotes are a promising alternative as an antigen for antibody detection. More studies are needed to validate the proposed tools in clinical and seroepidemiological studies in open populations.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedad de Chagas

1.1.1 Características generales

La enfermedad de Chagas (ECh) también llamada Tripanosomiasis americana, es una enfermedad tropical potencialmente mortal, causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido al humano y otros mamíferos, principalmente por vectores triatominos. Estos insectos, varían según la zona geográfica y presentan un ciclo selvático y otro doméstico como resultado de su adaptación a la vivienda humana. Durante su ciclo doméstico, se han observado a los triatominos principalmente en zonas rurales y marginadas en donde predominan casas de paredes de barro, adobe y techos de paja, materiales que facilitan su presencia y el consecuente contacto con el ser humano (Chagas, 1909; Pereira Nunes et al., 2013; Yamagata & Nakagawa, 2006). No obstante, existen otras formas de transmisión menos frecuentes como es la transfusión sanguínea, la materno-fetal, la vía oral y por accidentes de laboratorio (**Figura 1**) (World Health Organization (WHO), 2019).

La ECh presenta dos fases: 1) la fase aguda que presenta síntomas inespecíficos o datos patognomónicos del sitio de la picadura como el Chagoma de inoculación (induración, indolora con eritema o un tono violáceo) o el Signo de Romaña (edema palpebral unilateral, cuando la picadura es en párpado) (Pérez-Molina & Molina, 2018; Rojo-Medina et al., 2018; Salazar-Schettino et al., 2016), y 2) la fase crónica que se divide en una etapa crónica asintomática o indeterminada y una etapa crónica sintomática (**Figura 1**) (Lidani et al., 2017; Molina et al., 2016).

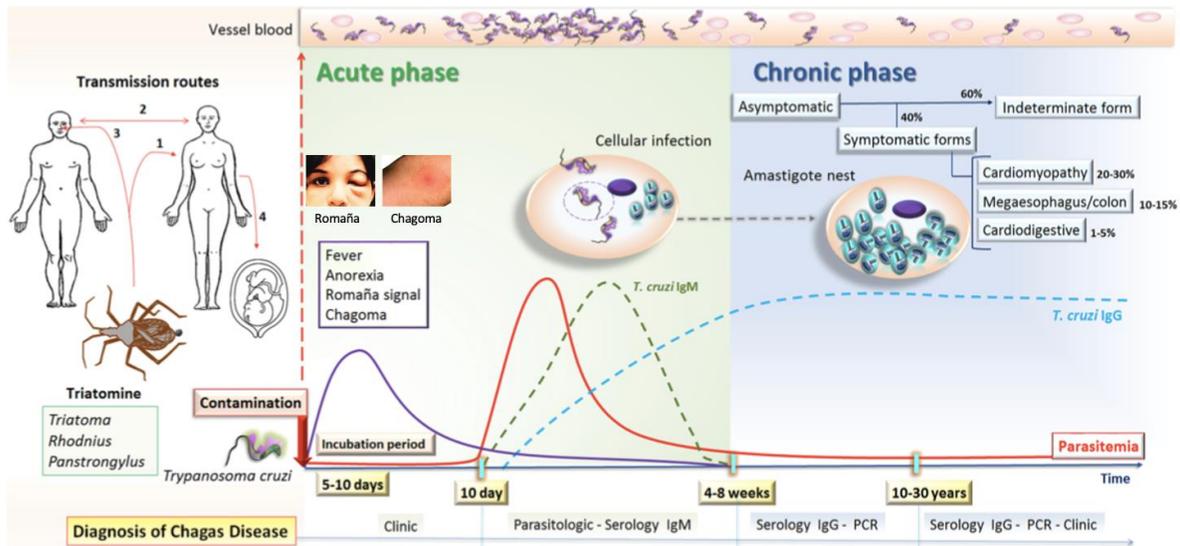


Figura 1. Historia Natural de la Enfermedad de Chagas en el humano. Rutas de transmisión: 1) vectorial, 2) transfusión sanguínea o trasplante de órganos, 3) oral, 4) ruta congénita. Fase aguda (recuadro verde), período de incubación de 5-10 días con síntomas inespecíficos (fiebre o febrícula, fatiga, mialgias, artralgias y hepatomegalia o esplenomegalia) o patognomónicos como el Chagoma de inoculación o el Signo de Romaña. Entre los 10 días a 8 semanas la parasitemia en sangre y los niveles de Ab anti-*T. cruzi* de tipo IgM están elevadas. Fase crónica (recuadro azul), desde las 8 semanas hasta 30 años; con 60% de los casos asintomáticos, 40% con manifestaciones clínicas como cardiomiopatía (20-30%), megaesófago o megacolon (10-15%) y cardiodigestivas (1-5%), en donde la parasitemia es baja y los niveles de Ab anti-*T. cruzi* de tipo IgG están elevadas (Modificado de Lidani et al, 2017).

1.1.2 Epidemiología

La ECh es una enfermedad endémica de Latinoamérica que afecta a 21 países tropicales de Latinoamérica, entre ellos México. No obstante, gracias a la migración de individuos infectados la infección se ha extendido a través de la transmisión congénita y por transfusión con sangre infectada a zonas no endémicas distribuyéndose a Europa, Asia y Oceanía, convirtiendo a la ECh en un problema global que afecta a nivel mundial entre 6 y 8 millones de personas infectadas por este parásito (Lidani et al., 2019; Salud, 2015). En Latinoamérica, la cronicidad de esta enfermedad representa una carga económica para el sector salud con una pérdida estimada de 752,000 días laborables por muertes prematuras, lo cual se traduce en una baja de productividad de 1.2 billones de dólares. A nivel mundial, los costos por atención médica representan una pérdida anual global de \$7.2 billones de dólares americanos por año (Arnal et al., 2019; Conteh et al., 2010; Pérez-Molina & Molina, 2018).

En México, una revisión sistemática y el meta-análisis de encuestas epidemiológicas reportadas del 2006 al 2017, indica que la seroprevalencia promedio a *T. cruzi* en nuestro país es de 3.38% (IC 95% 2.59-4.16) y un estimado de aproximadamente 4.06 millones de infectados con *T. cruzi* en México. También, en este mismo análisis reportaron una seroprevalencia promedio de 2.21% en mujeres embarazadas y aproximadamente 3193 casos de infección congénita anual, considerando que hay aproximadamente 50,675 nacimientos en mujeres embarazadas infectadas con *T. cruzi*. Finalmente, también estimaron una seroprevalencia de 1.51% en menores de 18 años, lo que indica que existe una transmisión activa de *T. cruzi* (Arnal et al., 2019).

1.1.3 Epidemiología en Oaxaca

Oaxaca es reconocido como un estado altamente endémico de la ECh y en donde está presente el mayor número de diferentes especies de triatominos en México. Es uno de los estados más meridionales de México, localizado a 17° latitud norte y 96° longitud oeste. Presenta una población total de 3,967,889 personas, de las cuales el 23.2% radica en localidades de 1 a 499 habitantes, que generalmente corresponde a zonas rurales y de difícil acceso, por lo que es el 3er estado con mayor marginación en el país (Consejo Nacional de Población (CONAPO), 2015; Coordinación General del Comité Estatal de Planeación para el Desarrollo de Oaxaca, 2017b, 2017a). Como se dijo anteriormente, estas condiciones pueden facilitar el contacto de los triatominos con el humano en las zonas endémicas. Oaxaca es uno de los estados con mayor riqueza de especies de triatóminos en México, encontrándose del género *Triatoma* a *T. barberi*, *T. bolivari*, *T. dimidiata*, *T. gerstaeckeri*, *T. nitida*, *T. pallidipennis*, *T. phyllosoma*, *T. picturata*, y del género *Meccus* a *M. longipennis*, *M. mazzottii* y *Rhodnius prolixus* (Benítez-Alva et al., 2012; Cruz-Reyes & Pickering-López, 2006; Ramsey et al., 2015; Secretaría de Salud (SSA), 2019; Tay et al., 1986), los cuales se han identificado en el ciclo doméstico, peri-doméstico y silvestre (Ramsey et al., 2015; Tay et al., 1986). Históricamente Oaxaca ha sido un lugar importante para el estudio de la ECh. En 1940 Mazzotti descubrió los 2 primeros casos de la ECh en Tejomulco. Con base

en reportes de casos agudos y crónicos, así como estudios entomológicos, Oaxaca se consideró como el primer estado endémico de la ECh en la república mexicana (R. Goldsmith et al., 1972, 1979; R. S. Goldsmith et al., 1985; Mazzotti, 1940; Moreno López et al., 2001; Tay et al., 1986). Tay y colaboradores en 1979, realizaron una minuciosa revisión de Chagas en México, identificando a Oaxaca como un estado con alto número de casos (Tay et al., 1979). En cuanto a datos clínicos, en 1965 Biagi y Arce registraron 2 casos con miocardiopatías crónicas por Chagas, siendo los primeros casos reportados en nuestro país (Biagi & Gómez-Arce, 1965). En 1982 Tay y colaboradores reportaron el primer caso de megasigmoides y posteriormente en 1984 se registró el primer caso de megaesófago secundario a *Trypanosoma cruzi* en una mujer residente del estado de Oaxaca (Salazar-Schettino et al., 1984; Velasco-Castrejón & Trujillo, 1990). Cabe mencionar que Oaxaca ha sido considerado por varios estudios, un estado con alta prevalencia de infección por *T. cruzi* a lo largo del tiempo (Arnal et al., 2019; Ibáñez-Cervantes et al., 2019; Tay et al., 1979, 1986; Velasco-Castrejon et al., 1992). En 1971 se realizó unas de las primeras encuestas serológicas en donadores de sangre, analizándose 5 regiones de Oaxaca y registrando la siguiente seroprevalencia para *T. cruzi*: Zona I (Puerto escondido y alrededores) con 29%, Zona II (Tehuantepec y alrededores) 0%, Zona III (Mixteca alta) 2.6%, Zona IV (Ixtlán) 0% y Zona V (Valle) 1.3% (R. Goldsmith et al., 1972). Durante 1971-1973 se obtuvieron muestras de 238 personas de una comunidad rural en Oaxaca, reportando una seroprevalencia del 5% en menores de 16 años y del 67% en adultos. Posteriormente en 1981 se registró una disminución en la seroprevalencia, observándose 0.7% en niños y 33% en adultos en la misma localidad, sugiriendo que posiblemente esta disminución era debida al uso de insecticidas utilizados para el control del vector de malaria (R. Goldsmith et al., 1979; R. S. Goldsmith et al., 1985). También, otro estudio efectuado en 60 comunidades de Oaxaca a 4023 residentes mostró una seroprevalencia de 16.3% en el estado, de los cuales 2012 eran niños de 0-12 años con una seroprevalencia de 1.9% (R. Goldsmith et al., 1979). En Santiago Yosotiche, Oaxaca; se estudiaron a 308 de los 375 habitantes de la población, encontrando 78 (25.3%) personas seropositivas para la *T. cruzi*

(Cortés et al., 1985). En otro trabajo, Moreno y colaboradores en el 2001 analizaron a 540 pacientes cardiopatas originarios de la zona de Tehuantepec, de los cuales 13 tenían miocardiopatía dilatada con anticuerpos anti *T. cruzi* (Moreno López et al., 2001). De manera reciente, se calculó una seroprevalencia promedio a la infección por *T. cruzi* en Oaxaca de 4.41% estimada en una revisión sistemática y meta-análisis de encuestas epidemiológicas de 11 años (Arnal et al., 2019). En el 2017 se reportó que Oaxaca tiene una incidencia de 2.4 infectados con *T. cruzi* por cada 100 mil habitantes, mostrando además una transmisión activa de la infección (Rojo-Medina et al., 2018). En el boletín epidemiológico de México en el 2022, se registraron 844 casos de ECh a nivel nacional, de los cuales 43 casos (5%) corresponden a Oaxaca (Dirección General de Epidemiología, 2022). Finalmente, se ha registrado una mortalidad por ECh del 2000 al 2016 de 487 defunciones (274 hombre y 213 mujeres) en 18 entidades mexicanas, predominando los provenientes del estado de Oaxaca, seguido de Guerrero y Veracruz (Secretaría de Salud (SSA), 2019).

1.1.4 Ciclo de vida de *T. cruzi*

Para cumplir su ciclo de vida, *T. cruzi* necesita de un vector invertebrado (triatómino hematófago) y un hospedero vertebrado definitivo que incluye al humano, perro, gato, roedor, primate, etc. Tiene 4 formas de desarrollo en su ciclo de vida (**Figura 2**), de las cuales dos están presentes en el insecto vector (epimastigote y tripomastigote metacíclico) y dos en el hospedero mamífero (amastigote y tripomastigote sanguíneo). El epimastigote, se encuentra en el intestino medio del triatómino, mide entre 16 a 18 μm con forma de huso y es la forma replicativa del parásito en el vector. El tripomastigote metacíclico, presente en las heces del vector, tiene una forma de “S” o de “C”, mide de 18 a 21 μm de largo, tiene un flagelo que le permite el movimiento y es una fase que no presenta capacidad replicativa, pero si infectiva para el mamífero. El tripomastigote sanguíneo, morfológicamente es similar al tripomastigote metacíclico, pero se localiza en la sangre del hospedero, siendo no replicativo e infectivo para el insecto vector. Finalmente, el amastigote, es la forma intracelular del parásito en el mamífero encontrándose en células

mesenquimales como miocitos y enterocitos, con una forma esférica de 2 a 4 μ m y con capacidad replicativa (Secretaría de Salud, 2015) mediante una fisión binaria longitudinal (Pérez-Molina & Molina, 2018; Rassi & Marin-Neto, 2010; Secretaría de Salud, 2015).

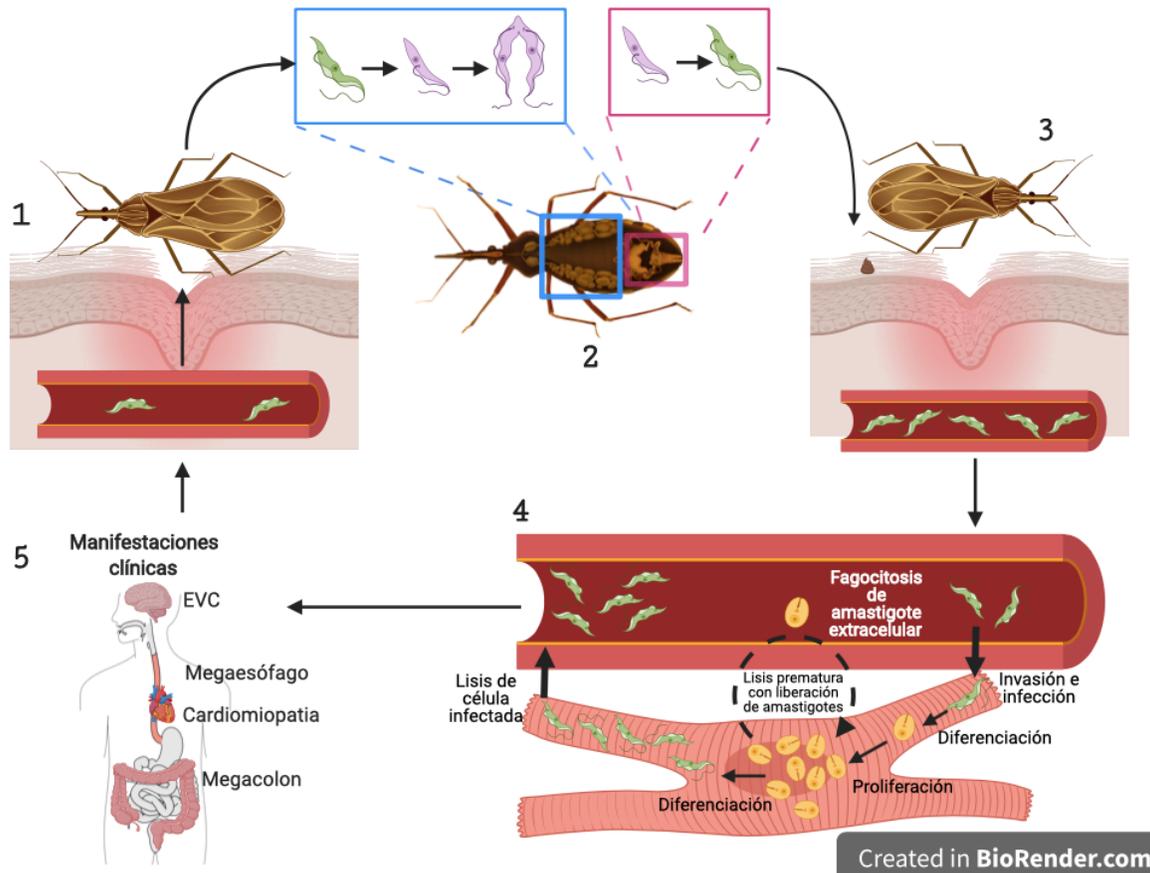


Figura 2. Ciclo de vida de *T. cruzi*. (1) El triatominos vector se infecta con tripomastigotes sanguíneos durante la ingesta sanguínea de un mamífero infectado. (2) Los tripomastigotes se transforman a epimastigotes para replicarse (Recuadro azul) y en la porción más distal del intestino, desprendiéndose posteriormente de las células intestinales para transformándose en tripomastigotes metacíclicos (Recuadro rosa) que son la fase infectiva para el hospedero. (3) Cuando el triatominos hematófago defeca después de la ingesta sanguínea libera los tripomastigotes metacíclicos junto con las heces cerca de la herida de la picadura, entrando el parásito a torrente sanguíneo por autoinoculación tras la rascadura. (4) El tripomastigote metacíclico invade e infecta las células de origen mesenquimal, intestinales y cardíacas, transformándose en amastigotes para iniciar su replicación por fisión binaria. Los amastigotes se transforman entonces en tripomastigotes sanguíneos, siendo liberados en el torrente sanguíneo infectando nuevas células y propagando así la infección. (5) La lisis de células infectadas provocan las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Los tripomastigotes sanguíneos pueden ser ingeridos por un triatominos durante la ingesta sanguínea iniciando un nuevo ciclo de vida del parásito (Pérez-Molina & Molina, 2018; Rassi & Marin-Neto, 2010; Secretaría de Salud, 2015). Elaboración propia de la figura mediante BioRender.

1.1.5 Diagnóstico de ECh

Para realizar el diagnóstico de *T. cruzi* se deben considerar los datos clínicos, epidemiológicos y de laboratorio. En la fase aguda, especialmente entre los 7 a 15 días de iniciado el cuadro clínico, se presentan altos niveles de parásitos en sangre, por lo que su identificación es a través de la búsqueda de tripomastigotes en sangre por diferentes métodos como; el xenodiagnóstico, la observación microscópica en fresco y el hemocultivo. Estas pruebas presentan una sensibilidad y especificidad variable, tiempos de respuesta variables, que en algunos casos puede llegar a ser prolongado (xenodiagnóstico y hemocultivo) y solo pueden ser realizados por personal capacitado (De Marchi et al., 2011; Panamerican Health Organization, 2018; Secretaría de Salud (SSA), 2019). Durante la fase crónica el diagnóstico se complica debido a la presencia de una carga parasitaria baja e intermitente, por lo cual se recurren a pruebas serológicas para la identificación de Ab IgG anti-*T. cruzi* con pruebas como el Inmuno Ensayo Enzimático (ELISA), la Hemaglutinación Indirecta (HAI) o la Inmunofluorescencia indirecta (IFI). El protocolo de diagnóstico requiere del uso de dos técnicas con diferente principio: una prueba con elevada sensibilidad (por ejemplo, ELISA con Ag totales) y otra con elevada especificidad (por ejemplo, ELISA con Ag recombinantes). En el caso de las pruebas de ELISA utilizando extractos crudos o recombinante y el HAI, se puede llegar a obtener una certeza diagnóstica del 95 al 98%. En caso de presentar resultados discordantes en las dos pruebas anteriores, se debe realizar una tercera prueba como por ejemplo una IFI, que en caso de repetirse la discordancia se debe realizar el procedimiento completo con una nueva muestra. Una problemática importante que se presenta es que la reactividad de una sola prueba serológica no se considera un diagnóstico definitivo y el uso de múltiples pruebas aumenta considerablemente el costo del diagnóstico (Gomes et al., 2009; López-Monteon et al., 2019; Panamerican Health Organization, 2018; Rubio-Ortiz et al., 2020; Secretaría de Salud (SSA), 2019). En México, la Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014 es la que se sigue para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector, en donde está considerado el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (Secretaría de Salud (SSA), 2014). Para confirmar casos agudos y crónicos el

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) es el Laboratorio Nacional de Referencia en el cual se aplica un algoritmo de pruebas parasitológicas básicas y tres pruebas serológicas, considerando además criterios clínicos y epidemiológicos (Secretaría de Salud (SSA), 2019).

1.1.6 Características y genoma de *T. cruzi*

T. cruzi es un protozoo unicelular polimórfico flagelado que pertenece al subfilo *Mastigophora*, orden *Kinetoplastida* y familia *Trypanosomatidae*. Sus 4 formas de desarrollo presentan una superficie celular, flagelo, núcleo y citoesqueleto. El citoplasma contiene organelos como el complejo mitocondria-cinetoplasto, glicosomas, calcisomas, inclusiones lipídicas, entre otros; siendo el complejo mitocondria-cinetoplasto el que contiene una parte del ADN de *T. cruzi* que le confiere el nombre de kinetoplástidos, al igual que a los otros miembros de la familia como *T. brucei* y *Leishmania* (W. De Souza, 2009; D. E. Teixeira et al., 2012).

En el 2005 se describió el genoma de *T. cruzi* de la cepa CL Brener, que presenta un genoma diploide de 22,570 proteínas codificadas por genes, de los cuales 12,570 representan pares alélicos, con más del 50% de secuencias repetidas (Cano et al., 1995; El-Sayed et al., 2005). El material genético del *T. cruzi* se encuentra localizado en su mayoría (75%-80%) dentro del núcleo conformado por los cromosomas, parcialmente condensados durante la división celular. Del 20 al 25% del ADN restante, como se dijo anteriormente, se encuentra localizado en el cinetoplasto denominándosele ADN-k localizado al interior de la única mitocondria, cerca del corpúsculo basal que contiene una densa red de dos tipos de ADN en formas circulares, los maxicírculos y los minicírculos (W. De Souza et al., 2017; R. T. Souza et al., 2011). Los maxicírculos, son unas pocas docenas de ADN circular de 20 a 40kb según la especie, equivalente al ADN mitocondrial en otros eucariontes, los cuales codifican para productos genéticos mitocondriales como son ARNt (ácido ribonucleico de transferencia) y para subunidades del complejo de la cadena respiratoria (Berná et al., 2019; Lukes et al., 2002; Westenberger et al., 2006). Los minicírculos son en un número de miles, con un tamaño que va de 0.5 a 10 kb dependiendo de la especie y cuya población es heterogénea variando rápidamente

a causa de mutaciones puntuales (Lukes et al., 2002; Riou & Delain, 1969; Ryan et al., 1982). Codifican a los ARN guías (ARNg), que participan en un proceso post-transcripcional llamado edición de los ARNm que es necesario para su maduración y que sean funcionales para codificar diversas proteínas (Berná et al., 2019; Lukes et al., 2002; Westenberger et al., 2006).

Por su parte, la expresión del ADN nuclear produce pre-ARNm policistrónicos; es decir, se co-transcriben varios genes en el mismo RNA mediante la ARN polimerasa II, que por un procesamiento de *trans-splicing* en su extremo 5' y poliadenilación en su extremo 3' se generan los ARNm maduros funcionales. De este modo todos los ARNm presentan en su extremo 5' una secuencia líder o miniexón idéntica. Por lo tanto, la expresión genética de *T. cruzi* al igual que de los otros tripanosomátidos se regula a nivel post-transcripcional (El-Sayed et al., 2005; Gómez Gutiérrez & Monteón Padilla, 2008).

1.1.7 Caracterización de cepas de *T. cruzi*

Las cepas de *T. cruzi* presentan una gran variabilidad genética, por lo que su estructura poblacional ha sido un punto importante de investigación, presentando diversas clasificaciones de sus subgrupos a lo largo del tiempo. En un principio, gracias a análisis electroforético de isoenzimas se clasificaron en Zimodemas (Z1, Z2 y Z3) (Guzmán-Marín et al., 1999), posteriormente se clasificaron con base en el polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción del ADN-k (RFLP, por sus siglas en inglés). Otra clasificación que se realizó fue por su capacidad de producir lesiones y por su virulencia, clasificándose en Biodemas I, II y III (Andrade & Magalhães, 1997; Zingales et al., 2012). Más adelante, la clasificación se realizó de acuerdo con marcadores genéticos como el análisis de microsatélites, de polimorfismos de la secuencia del miniexon y del ADNr 24s, utilizando técnicas como RFLP, análisis de ADN polimórfico y amplificando al azar (RAPD por sus siglas en inglés), así como por ensayos de reacción en cadena de la polimerasa de baja astringencia con oligonucleótidos específicos (LSSP- PCR, por sus siglas en inglés). Estos análisis establecieron en aquel entonces a 2 linajes principales: *T. cruzi* I (TcI) y *T. cruzi* II (TcII). Otra clasificación, consideraba a los dos grupos de

cepas con el nombre Unidades Discretas de Tipificación (DTU, por sus siglas en inglés) en DTU I y DTU II. El DTU I se subdividía a su vez en cuatro haplotipos de a-d y el DTU II se subdividía en cinco sublinajes de IIa-IIe. Pudiendo observar la gran diversidad de cepas y sus diferentes características, posteriormente las cepas del parásito se clasificaron en 6 grupos de TcI-TcVI. Mas recientemente, dado que existían diversas clasificaciones de las cepas de *T. cruzi*, en el año 2009 un comité de expertos propuso un consenso para su clasificación, agrupándolas en 6 DTU: de TcI a TcVI, con el objetivo de mejorar su comparación y la comunicación entre la comunidad científica (Brenière et al., 2016; Jiménez et al., 2019; Zingales et al., 2012), mostrando además que las cepas tenían una diferente distribución geográfica en Latinoamérica (**Figura 3**). Por último, se ha añadido un nuevo DTU llamado Tc Bat, el cual se aisló en murciélagos del centro y sureste de Brasil (Marcili et al., 2009) y que posteriormente se encontró en un niño de 5 años en Colombia (Ramírez et al., 2014), considerándose recientemente como un séptimo DTU (Zingales, 2018).

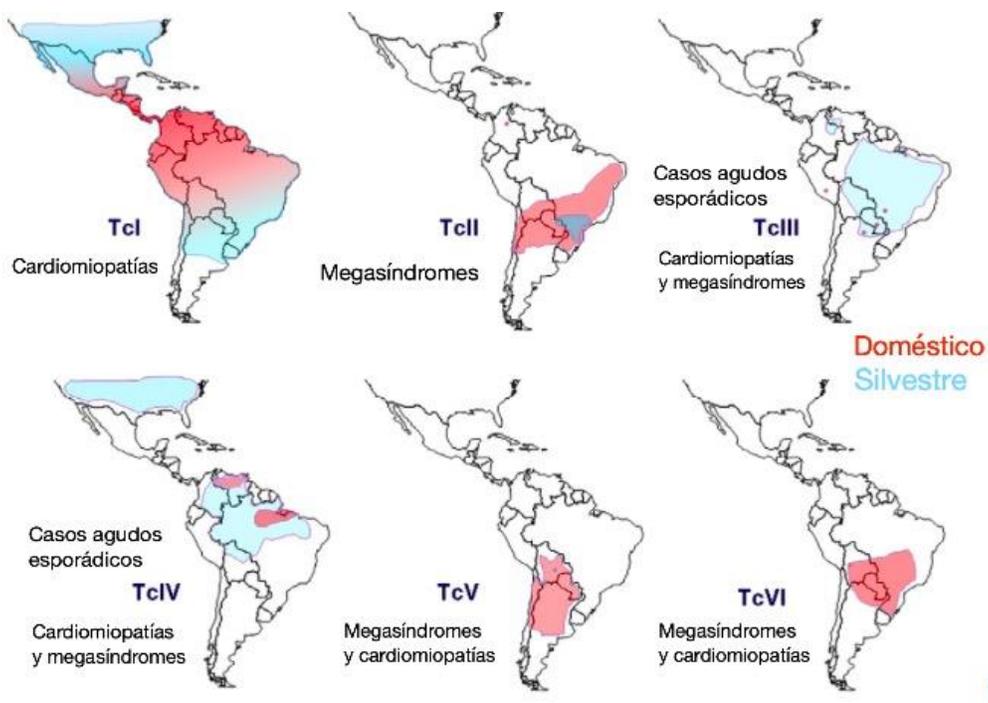


Figura 3. Distribución geográfica aproximada de *T. cruzi*. Ciclo doméstico (rojo) y silvestre (azul), y manifestaciones clínicas por DTU. Modificada de(Guhl, 2013, 2017; Jiménez et al., 2019; Zingales et al., 2012).

La variabilidad genética de *T. cruzi* se observa no solo entre los DTU, sino también entre las diferentes cepas de un mismo DTU. Se ha determinado que el tamaño del genoma puede variar en un 48% entre los DTUs lo que equivale hasta 73 Mpb de diferencia, cayendo estas variaciones en secuencias de ADN repetidas y no codificantes (Briones et al., 1999; Henriksson et al., 1997; Pedroso et al., 2003; R. T. Souza et al., 2011; Vargas et al., 2004). Se ha reportado por análisis de microespectrofluorometría (Dvorak et al., 1982), electroforesis en gel de campo pulsado (Branche et al., 2006; Brisse et al., 2003; Henriksson et al., 1997, 2002; Pedroso et al., 2003; Simões-Barbosa et al., 1999; R. T. Souza et al., 2011; Vargas et al., 2004), citometría de flujo (Dvorak et al., 1982; Franzén et al., 2012; Lewis et al., 2009; Panzera et al., 2007) y análisis de cariotipo (Galindo et al., 2007; Myler, 1993; Reis-Cunha et al., 2015; A. R. L. Teixeira et al., 1994; Triana et al., 2006) que en promedio, el tamaño del genoma más pequeño corresponde a las cepas TcI (Lewis et al., 2009). Estas diferencias en el contenido de ADN muestran la plasticidad genómica del parásito generando una diversidad fenotípica entre sus cepas (Zingales, 2018). Haciendo un análisis del genoma de las cepas que han sido secuenciadas y publicadas en la base de datos de TritrypDB (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/>), encontramos claras variaciones en el tamaño de los genomas haploides de diferentes DTUs, así como dentro del mismo DTU. Cabe mencionar que algunos de estos genomas no han sido secuenciados a totalidad aún, por lo que no se cuenta con sus secuencias completas. Encontramos que el tamaño del genoma de las cepas TcI son en promedio más pequeñas que las de las cepas TcVI y también se observan diferentes tamaños de genomas entre cepas del mismo DTU, como se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Características genéticas de los diferentes DTUs en relación con su tamaño de genoma.			
Cepa	DTU	Tamaño del Genoma Haploide (Mpb)	Genes
Dm28c 2018	TcI	53.27	19112
Sylvio X10 / 1	TcI	41.38	20684
Y C6	TcII	47.22	17713
Brasil A4	TcIII	45.56	18779
CL Brener Esmeraldo-like	TcVI	65.03	21192
CL Brener no similar a Esmeraldo	TcVI	65.03	22212
TCC	TcVI	87.06	29302
Cepa marinkellei B7	TcVI	38.65	10282
Elaborado en este trabajo a partir de la página https://tritrypdb.org/tritrypdb/ Datos actualizados hasta el 2020. Nota: Se debe tener en cuenta que algunos de los genomas arriba reportados corresponden a genomas aún no completos.			

De manera interesante, recientemente se publicó un análisis filogenético de diversas cepas de *T. cruzi*, en donde se mostró que estas se agrupan de acuerdo con la región endémica de origen, apoyando la propuesta de que las cepas del parásito tienen una distribución geográfica diferencial (Polonio et al., 2021).

1.1.8 Caracterización de las cepas *T. cruzi* en México

Existen pocos reportes sobre la caracterización de las cepas del parásito en nuestro país. En un primer estudio se identificó la heterogeneidad biológica de las cepas de *T. cruzi* que circulan en México (López-Olmos et al., 1998). También, se ha llevado a cabo su caracterización bioquímica o enzimática, en donde se mostró que las cepas presentes en la república mexicana tienen una homogeneidad relativa (Galván et al., 1983; López-Olmos et al., 1998). Posteriormente, basándose en los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) que se encuentran asociados con el espaciador intergénico del ARNr, las cepas provenientes de Jalisco, Morelos, Zacatecas, Oaxaca y Yucatán mostraron una heterogeneidad genética (Zavala-Castro et al., 1992). Con respecto a su

clasificación, durante muchos años se identificó únicamente a cepas TcI en los aislados del parásito, reportándose como el único linaje presente en México (Bosseno et al., 2002; Sánchez-Guillén, Bernabé, et al., 2006). Posteriormente, cuando se llevó a cabo la genotipificación de cepas en muestras de heces de triatóminos tanto del ámbito silvestre como domiciliario, en donde se encontró que además de TcI, también estaban presentes los otros DTUs (TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI) (Bosseno et al., 2002; Gómez-Hernández et al., 2011; Ibáñez-Cervantes et al., 2013; López-Cancino et al., 2015; Martínez et al., 2013; Ramos-Ligonio et al., 2012; Ruíz-Sánchez et al., 2005; Sánchez-Guillén, Bernabé, et al., 2006). Como se muestra en la **Figura 4**, con los datos de la literatura y los obtenidos en nuestro laboratorio en trabajos previos, nuestro grupo elaboró un mapa de su distribución de los diferentes DTUs en nuestro país, en donde se observa que el 77.51% corresponde a cepas TcI, seguido con un 7.86% de TcII, 5.69% de TcVI, 3.79% de TcV, 3.25% de TcIV y 1.90% de TcIII (Martínez-Cuevas, 2018), mostrando que aun cuando los 6 DTUs están presentes en nuestro país, el DTU TcI es el genotipo predominante. Es importante mencionar que los individuos infectados con las cepas TcI, se caracterizan por presentar bajos niveles de parasitemia en sangre y bajos títulos de Ab en comparación con los infectados con los otros DTU, lo cual dificulta el diagnóstico de la enfermedad en los lugares en donde están presentes o predominan las cepas con ese DTU (Bosseno et al., 2002; Coura et al., 2013; World Health Organization, 2007).

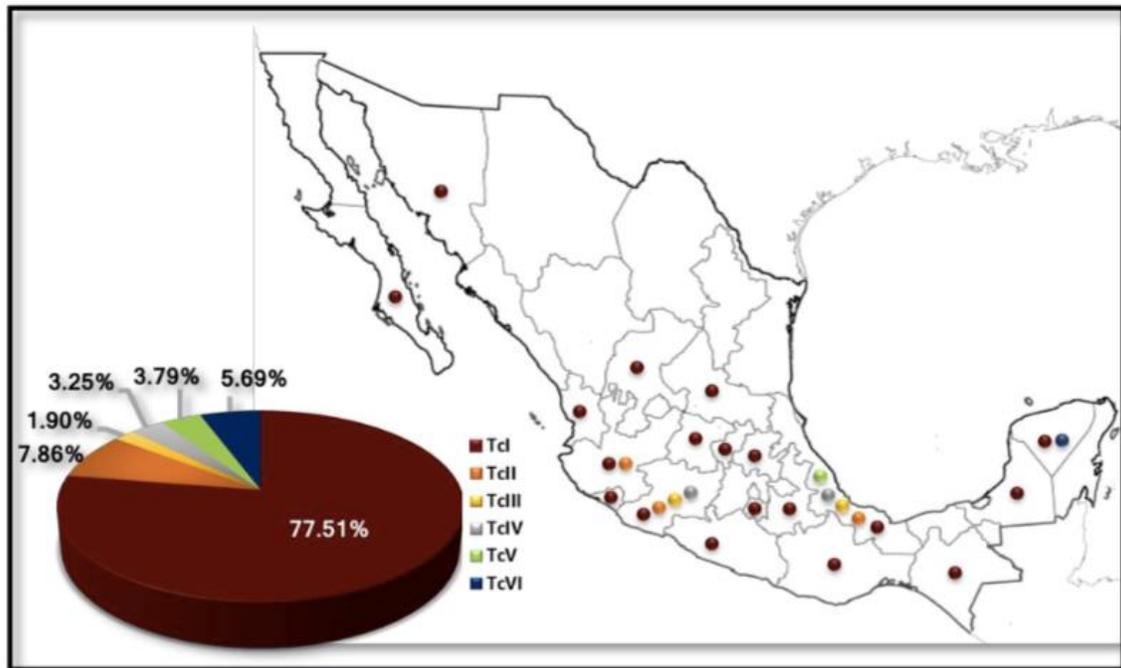


Figura 4. Distribución de la diferentes DTU de *T. cruzi* en México. En México se reporta la presencia de los seis DTU, siendo TcI el más distribuido y predominante a lo largo del territorio nacional, mientras que el resto de los DTU's se han encontrado hasta el momento en la zona centro y sureste del país (Martínez-Cuevas, 2018).

1.1.9 Variabilidad biológica de las cepas de *T. cruzi*

La heterogeneidad de las cepas de *T. cruzi*, como resultado de su variabilidad genética, se refleja en la diversidad de sus características biológicas, moleculares, y antigénicas, así como en las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad (Añez et al., 2004; Araújo & Berne, 2013; Carneiro et al., 1991; Fernandes et al., 1997; Jiménez et al., 2019; Meza et al., 2014; Morel et al., 1980; Ruiz-Garcia et al., 2000; Souto et al., 1996; Telleria & Tibayrenc, 2017; Zingales et al., 2012). Por ejemplo, se ha reportado que algunas cepas producen más alteraciones y daño a órganos en comparación con otras y/o que presentan diferente resistencia al tratamiento con benznidazol, aun cuando éstas pertenezcan al mismo DTU (Espinoza et al., 2010; Guzmán-Marín et al., 1999; Jiménez et al., 2019; Lidani et al., 2017; V. Monteón et al., 2009; Moure et al., 2016; Pinto et al., 1998; Sánchez-Guillén, Bernabé, et al., 2006; Sánchez-Guillén, López-Colombo, et al., 2006; Zingales, 2018). Se ha propuesto que además del parásito, las características propias del hospedero como son la edad, la genética y su sistema inmune pudieran

también estar implicados en la generación de las diferentes formas clínicas de la ECh (De Fuentes-Vicente et al., 2019; Zingales, 2018). Por otro lado, se ha mostrado que las condiciones geo-climáticas como son la temperatura, elevación y precipitación por mencionar algunas, determinan la distribución del insecto vector y por lo tanto la transmisión vectorial del parásito, así como la consecuente distribución de los DTUs del parásito y su eco-epidemiología (**Figura 3**) (Ihle-Soto et al., 2019; Zingales et al., 2012).

1.1.10 Variabilidad antigénica de las cepas de *T. cruzi*

La variabilidad genética de las cepas del parásito, también se refleja en su diferente perfil antigénico, ya que presentan en su superficie antígenos que son codificados por familias multigénicas altamente polimórficas, como las proteínas de superficie trans-sialidasas, MASP y mucinas (Buscaglia et al., 2006; Campo et al., 2004; Cerqueira et al., 2008; Di Noia et al., 1998; Pitcovsky et al., 2002).

Se ha propuesto que esta variabilidad antigénica de las cepas, en la detección de sueros positivos y negativos a *T. cruzi*, se relaciona con la alta discordancia que presentan las pruebas serológicas comerciales. En este sentido, se ha planteado que son tres los factores que influyen en estos resultados discordantes: 1) La variabilidad genética, biológica y antigénica de las cepas del parásito, 2) La distribución geográfica diferencial de las cepas de *T. cruzi* y 3) Las diferencias entre poblaciones humanas respecto a la respuesta inmune (Moure et al., 2016; Truyens et al., 2021; Zingales, 2018). En cuanto a las diferencias entre la respuesta inmune de las poblaciones humana, se ha reportado una menor producción de anticuerpos en muestras sanguíneas de mujeres embarazadas originarias de México en comparación con sueros de Argentina y Honduras (Truyens et al., 2021; World Health Organization, 2007). Estas diferencias eco-epidemiológicas que se presentan en la ECh, secundarias a la constitución del hospedero; así como, el genotipo, variabilidad biológica, molecular y antigénica del parásito, han mostrado la necesidad de utilizar pruebas serológicas con antígenos nativos; es decir, el uso preferente de antígenos de cepas locales que permitan un mejor reconocimiento antigénico (Bongertz & Dvorak, 1983; Di Noia et al., 2002; Gutierrez et al., 2004;

Miles et al., 1981; Moure et al., 2016; Truyens et al., 2021; World Health Organization, 2007; Zingales, 2018; Zingales et al., 2009, 2012). No obstante, la mayoría de las pruebas comerciales utilizan extractos totales, antígenos recombinantes o péptidos de proteínas obtenidos de cepas circulantes en Sur América, las cuales son antigénicamente diferentes de las cepas presentes en México, obteniéndose una baja especificidad y sensibilidad en las pruebas serológicas (Ballesteros Rodea et al., 2018; Barfield et al., 2011).

Se han reportado ensayos serológicos utilizando antígenos de cepas aisladas de diferentes países endémicos, encontrándose un mejor reconocimiento cuando se usan sueros de individuos infectados de las mismas zonas (World Health Organization, 2007). Por ejemplo, en muestras de Brasil y Panamá, donde se aplicaron diferentes pruebas comerciales (Chagas III, ELISACruzi, Chagatek, Chagatest y Pathozyme) se observaron diferencias en el reconocimiento (Caballero E. et al., 2019; Caballero et al., 2007). En otro estudio, evaluaron 11 test comerciales distintos, en laboratorios de referencia de 8 países diferentes. Las pruebas fueron realizadas con sueros positivos y negativos a *T. cruzi* provenientes de diferentes zonas endémicas y no endémicas, encontrando diferencias significativas en los niveles de sensibilidad y especificidad, que se relacionó con la distinta capacidad antigénica de las cepas presentes en las diferentes regiones (Sánchez-Camargo et al., 2014). La importancia del uso de antígenos autóctonos se ha reportado incluso en países no endémicos. Por ejemplo, en un estudio retrospectivo realizado en migrantes latinoamericanos con la ECh que habían vivido en Europa por más de 4 años, se identificó una serodiscordancia en las pruebas de ELISA (Moure et al., 2016). En apoyo a los reportes anteriores, en un artículo publicado recientemente, analizaron el origen filogenético de varias cepas del parásito de donde provienen los antígenos utilizados en diferentes kits comerciales de diagnóstico. En este trabajo los resultados mostraron una distancia filogenética en las cepas que circulan en México y Estados Unidos con respecto a las cepas de otros países endémicos de Sudamérica, así como una escasa conservación de antígenos entre las distintos DTUs del parásito con relación a su distribución geográfica diferencial, lo que

podiera explicar el rendimiento limitado de las pruebas serológicas (Majeau et al., 2021).

En México también se han observado resultados similares. Por ejemplo, en un trabajo realizado en el estado de Puebla, se obtuvo una mejor detección de la infección con *T. cruzi* cuando se utilizaron extractos totales de proteínas proveniente de cepas aisladas de la misma comunidad que cuando se utilizaron estuches comerciales (Chagatest Wiener Laboratories Group, Rosario, Argentina) conteniendo antígenos (Ag) de cepas del parásito de otros países endémicos (Pérez-Fuentes et al., 1998). Resultados similares fueron obtenidos por Sánchez-Guillen y colaboradores en el 2001, quienes observaron un mejor reconocimiento en muestras serológicas de individuos mexicanos infectados con el parásito, al utilizar Ag de cepas autóctonas que cuando usaron Ag de cepas de Argentina (Sánchez et al., 2001). También, Gúzman-Gómez y colaboradores en el 2015 evaluaron sueros de individuos infectados con *T. cruzi* de zonas endémicas del estado de Veracruz, utilizando tres pruebas de ELISA comerciales conteniendo Ag de cepas de otros países endémicos y dos pruebas caseras con Ag del parásito locales. Los resultados mostraron una capacidad muy limitada para detectar la infección por *T. cruzi* con las pruebas comerciales en comparación con las pruebas caseras (Guzmán-Gómez et al., 2015). Por su parte, Bucio y colaboradores en 1999, llegaron a la misma conclusión que los trabajos anteriores, cuando utilizaron como Ag proteínas totales de cepas de 3 diferentes estados de México (Querétaro, Morelos y Yucatán) y sueros de individuos infectados de Argentina y México, evidenciando además que el estadio de desarrollo del parásito (tripomastigotes, epimastigotes o amastigote) es también importante para el reconocimiento (Bucio et al., 1999). En este sentido, la mayoría las pruebas comerciales utilizan proteínas de epimastigotes (estadio presente en el insecto vector) por su fácil obtención en el laboratorio y porque comparte proteínas con los tripomastigotes. Siendo pocas las pruebas serológicas comerciales que utilizan antígenos de amastigotes y tripomastigotes (estadios presentes en el mamífero), por su difícil obtención en el laboratorio (Almeida et al., 1997; Bucio et al., 1999).

Los resultados anteriores han mostrado la necesidad de llevar a cabo el aislamiento y caracterización de cepas del parásito que circulan en diferentes regiones endémicas de la ECh. Esto no solo es indispensable para entender la eco-epidemiología de la enfermedad en las diferentes zonas endémicas, sino también para poder identificar y caracterizar antígenos de *T. cruzi* locales que permitan una mejor detección serológica de los sueros positivos al parásito, provenientes de las mismas zonas.

1.2 Antecedentes Directos

1.2.1 Identificación de antígenos de *T. cruzi*

Las pruebas serológicas con Ag provenientes del lisado total del parásito presentan una alta sensibilidad, pero baja especificidad en regiones co-endémicas de Leishmaniosis o infecciones por *T. rangeli* (Araujo, 1986; Chiller et al., 1990; Godsel et al., 1995; Malchiodi et al., 1994; Vexenat et al., 1996).

Los Ag utilizados para las pruebas serológicas son determinantes para obtener una buena sensibilidad y especificidad. Como se mencionó anteriormente, los Ag que más se han utilizado son extractos crudos de epimastigotes sonicados (Cervantes-Landín et al., 2014; V. M. Monteón et al., 1989; Pérez-Fuentes et al., 1998), proteínas extraídas de epimastigotes (Morgado et al., 1989; Partel & Rossi, 1998; Solana et al., 1995), epimastigotes completos fijados (Antas et al., 2000; Berrizbietia et al., 2004; Carbonetto et al., 1989), amastigotes fijados y sonicados (Araujo & Guptill, 1984; Matsumoto et al., 1993; Pan & McMahon-Pratt, 1989), proteínas recombinantes (Almeida et al., 1997; Saez-Alquézar et al., 2000; Umezawa & Franco Da Silveira, 1999), antígenos excretados o secretados de epimastigotes (Ag ESEA) (Berrizbeitia, 2013; Umezawa et al., 1996) y tripomastigotes (Ag TESA), presentando estos últimos una mejor sensibilidad y especificidad en pruebas de ELISA y *Western blot* (Berrizbeitia et al., 2006; Berrizbietia et al., 2004; Nagarkatti et al., 2014; Umezawa et al., 1996, 2001, 2009). También, se han utilizado péptidos sintéticos con éxito (Carmona et al., 2012, 2015; De Oliveira Mendes et al., 2013; Elisei et al., 2018; Mucci et al., 2017). Como se mencionó anteriormente, se ha

propuesto que el uso de antígenos de epimastigotes no es el más adecuado ya que es el estadio de desarrollo presente en el insecto vector y comparte algunas de sus proteínas con los otros estadios, pero su amplio uso se debe a que es la forma de fácil cultivo en el laboratorio. Los tripomastigotes sanguíneos generan una respuesta inmunitaria más específica y en consecuencia disminuye los falsos positivos y reacciones cruzadas en la identificación (Aznar et al., 1997; Berrizbeitia, 2013; López-Monteon et al., 2019; Rubio-Ortiz et al., 2020). Se ha reportado, como es esperado, que la realización de las pruebas de ELISA con tripomastigotes presenta una mayor especificidad y en ocasiones mayor sensibilidad que cuando se utilizan epimastigotes; sin embargo, su uso es restringido por el alto costo y dificultad técnica en su obtención en el laboratorio (Almeida et al., 1997; Berrizbietia et al., 2004).

Los antecedentes previamente mencionados, han mostrado la necesidad de identificar y caracterizar, proteínas antigénicas utilizando cepas autóctonas de cada país endémico. En México, solo se cuenta con una prueba serológica desarrollada con antígenos de cepas mexicanas a partir de un extracto total de epimastigotes, mostrando una buena sensibilidad, pero bajos niveles de especificidad. Por lo que, es necesario identificar y caracterizar antígenos de tripomastigotes de cepas del parásito presentes en la República Mexicana, que sean capaces de reconocer con buena sensibilidad y especificidad sueros reactivos a *T. cruzi* de nuestro país. Esto contribuiría en la generación de una plataforma de antígenos autóctonos útiles para el desarrollo futuro de pruebas serológicas con una alta sensibilidad, y el uso de antígenos recombinantes autóctonos que pudieran mejorar la especificidad de las pruebas.

1.2.2 Resultados previos

En México son pocos los aislados del parásito que han sido obtenidos, y solo en algunos casos se cuenta con su caracterización parcial. Por lo tanto, a fin de contar con cepas de *T. cruzi* presentes en zonas endémicas de la ECh en México, en un trabajo previo, nuestro grupo de investigación aisló y caracterizó biológica,

molecular y antigénicamente 15 cepas de *T. cruzi* (Martínez-Cuevas, 2018). Como modelo de estudio los triatomíneos fueron colectados en Oaxaca, ya que en México es un estado altamente endémico de la ECh, tiene el mayor número de especies diferentes de triatomíneos y circulan diferentes DTUs de *T. cruzi* (Martínez-Cuevas, 2018). Por lo tanto, consideramos que las cepas del parásito aisladas provenientes de Oaxaca podrían ser representativas de aquellas que circulan en las diferentes zonas endémicas de la ECh en la República Mexicana. Las cepas aisladas mostraron una heterogeneidad molecular (TcI, TcII y TcV) y biológica (metacicloogénesis, diferenciación extracelular e infectividad en un modelo celular y de ratón). Además, por ensayos de *Western Blot* se determinó que los extractos totales de proteínas de tripomastigotes de los aislados, tienen un perfil antigénico diferente con sueros reactivos a *T. cruzi* provenientes de las mismas zonas que los aislados, indicando su variabilidad antigénica. Ensayos de inmunoprecipitación de extractos totales de proteínas de epimastigotes o tripomastigotes de los aislados con una mezcla de sueros reactivos y no reactivos (control) a *T. cruzi*, ligados a espectrometría de masas y secuenciación masiva, se identificaron las proteínas antigénicas. En epimastigotes se identificó un total de 68 proteínas, que después de aplicar los criterios de selección, quedaron 64 proteínas, de las cuales se identificaron *in silico* 721 epítomos antigénicos. Al analizar estas secuencias en la base de datos de NCBI, se determinó que los epítomos predichos poseían más del 80% de similitud con otros tripanosomátidos, o con otros microorganismos, indicativo de una alta probabilidad de mostrar reacción cruzada. Estos resultados con epimastigotes, indicaron que las proteínas y péptidos antigénicos de epimastigotes identificados pueden ser buenos antígenos en cuanto a sensibilidad, pero probablemente en cuanto a especificidad. En el caso de tripomastigotes, se identificaron 432 proteínas antigénicas y 8170 epítomos. De este total se seleccionaron los mejores candidatos, utilizando los siguientes criterios: 1) Proteínas que tuvieran un valor de predicción de epítomos mayor a 0.90, que no tuvieran alta homología con otros tripanosomátidos, microorganismos u otros eucariontes, y que se encontrarán en al menos dos, de los tres experimentos independientes realizados. Con estos criterios se identificaron a 4 candidatos: una

proteína de ensamblaje de la cubierta de clatrina (Q4CRX2), una proteasa de superficie (Q4CPF0), y dos proteínas no caracterizadas (Q4DJ00 y Q4DX97). 2) Proteínas con un valor de predicción de epítomos de 0.95-0.98 y una localización en membrana plasmática o que fueran secretadas, identificándose a 11 candidatos: TcMUCII (Q4E046 y Q4D4I2), dos MASP (*mucin associated surface protein*; Q4E2A9 y Q4E4W8), una transialidasa (Q4D9H3), una ubiquitin ligasa (Q4D7V1), una lipasa (Q4CQ28), una Subunidad de oligosacariltransferasa (Q4D2C9), una alpha-1,2-Manosidasa (Q4DC56), una NADH-citocromo b5 reductasa (Q4DYC3) y una proteína no caracterizada (Q4CY87). 3) Proteínas con un valor de predicción de epítomos de 0.95-0.98 y que se encontraron en los 3 experimentos independientes realizados, identificando a 7 candidatos: espermidina (Q4CXJ6), un inhibidor de ribonucleasa (Q4DLI2), una proteína de transporte de la familia Sec1 (Q4E2E3), una proteína de ensamblaje de la cubierta de clatrina (Q4CRX2), una proteína de choque térmico HSP-70 (Q4CL09), una proteína de interacción con Hsc-70 (Q4DAT6), y una metalopeptidasa de zinc (Q4E5H7). Y 4) Proteínas que tuvieran antígenos que han sido probados experimentalmente y reportados en la literatura, identificando a dos candidatos más: (Q4DCW0/Proteína no caracterizada y Q4E2M9/Glucosa-6-fosfato isomerasa).

Para el análisis de estos candidatos es importante considerar las diferentes alternativas para su estudio, tomando en cuenta las ventajas y desventajas que ofrecen cada una de éstas. Por ejemplo, el uso de péptidos sintéticos que tienen la ventaja de producirse fácilmente en grandes cantidades y con buena pureza, además de que se ha visto que son útiles para aumentar la especificidad en los ensayos serológicos. Es importante evaluar a estos péptidos de manera individual como en combinaciones, considerando que se ha reportado que es mejor el uso de mezclas de antígenos para obtener una buena sensibilidad y especificidad (Da Silveira et al., 2001; Houghton et al., 1999). Sin embargo, los péptidos sintéticos también presentan inconvenientes, como el hecho de que se degradan fácilmente por enzimas proteolíticas y que solo se pueden sintetizar de un tamaño corto menor de 30 aa. Además, de que no cuentan con modificaciones postraduccionales que

podieran ser importantes para su reconocimiento por el sistema inmune y carecen de la estructura secundaria que tendrían cuando están presentes en la molécula completa, otro factor importante para su reconocimiento (Groß et al., 2016; Mucci et al., 2017; Peralta et al., 1994; Ucar et al., 2019). Otra alternativa, es el uso de proteínas recombinantes, que tienen como ventaja el poderse obtener de manera relativamente rápida, sencilla y de bajo costo en el laboratorio. No obstante, se puede presentar un bajo rendimiento en su obtención y pueden presentar dificultad en su purificación cuando son proteínas de alto peso molecular o tóxicas, pudiendo también contener contaminantes con proteasas del sistema bacteriano en donde se obtienen (Guevara-Hernández et al., 2013; Lara, 2011; Rosano & Ceccarelli, 2014). Otro método para considerar y que se ha utilizado con frecuencia, es el uso de extractos totales de epimastigotes, que han mostrado buenos niveles de sensibilidad, útiles en pruebas de tamizaje. Pero que, al ser el estadio presente en el insecto vector se ha visto que no siempre arrojan buenos niveles de especificidad en los ensayos, proponiéndose que el uso de extractos totales de tripomastigotes sería una mejor alternativa por ser el estadio presente en el hospedero mamífero (Aznar et al., 1997; Berrizbeitia, 2013; López-Monteon et al., 2019; Rubio-Ortiz et al., 2020).

1.3 Justificación

La heterogeneidad de las cepas de *T. cruzi*, como resultado de su variabilidad genética, se refleja en la diversidad de sus características biológicas, moleculares, patológicas y antigénicas, así como en una distribución geográfica diferencial.

Evidencias experimentales muestran que el uso de antígenos de cepas de distinto origen geográfico a los sueros de individuos infectados, se refleja en una inmunodetección ineficiente. Esto es particularmente evidente en zonas como México, donde predomina el linaje TcI que se caracteriza por presentar bajos niveles de parasitemia y de anticuerpos.

Por ello, es necesario identificar antígenos de cepas locales del parásito, que contribuyan en la generación de una plataforma de antígenos útiles, para una mejor inmunodetección de la infección por *T. cruzi*.

1.4 Hipótesis

Antígenos de cepas de *T. cruzi* aisladas de zonas endémicas de México, son reconocidos con buena sensibilidad y especificidad por sueros caracterizados positivos a *T. cruzi*, provenientes de diferentes zonas endémicas a la ECh de México, usando sueros negativos como control.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Identificar y evaluar péptidos antigénicos locales y reportados en la literatura, así como antígenos locales de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*, en su reconocimiento de sueros caracterizados positivos y negativos al parásito provenientes de diferentes zonas endémicas a la ECh de México.

1.5.2 Objetivos particulares

1. Identificar y evaluar péptidos antigénicos locales y reportados en la literatura, con sueros caracterizados positivos y negativos al parásito provenientes de diferentes zonas endémicas de ECh en México.

- Analizar *in silico* las características moleculares y biológicas de las secuencias de las proteínas antigénicas locales candidato: Q4DJ00, Q4DX97, Q4CY87, Q4DCW0, Q4E046, Q4D4I2, Q4E2A9 Q4E4W8, Q4CRX2, Q4CPF0, Q4D9H3, Q4D7V1, Q4CQ28, Q4D2C9, Q4DC56, Q4DYC3, Q4CXJ6, Q4DLI2, Q4E2E3, Q4CL09, Q4DAT6, Q4E5H7 y Q4E2M9.
- Identificar los epítomos antigénicos de las proteínas candidato antes mencionadas, en las plataformas IEDB, Bepipred-2.0, NETMHCpan 4.1 y NETMHCIIpan 4.0.
- Buscar, seleccionar y evaluar péptidos antigénicos a *T. cruzi* reportados en la literatura.
- Estandarizar las condiciones para los ensayos de ELISA.
- Evaluar los péptidos antigénicos locales y reportados en la literatura mediante la técnica de ELISA, con sueros caracterizados positivos y negativos al parásito de diferentes zonas endémicas de la ECh en México.

2. Evaluar extractos totales de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* de 15 cepas locales, con sueros caracterizados positivos y negativos al parásito de zonas endémicas de la ECh en México.

- Determinar el mejor método (físico y químico) para la obtención de extractos totales de proteínas de epimastigotes y tripomastigotes de las 15 cepas locales en estudio (CI1, CI2, CI3, CI4, NM1, NM2, NM3, NM4, NM5, SC1, SC2, SC3, SC4, TE1, SS3).
- Estandarizar las condiciones para los ensayos de ELISA.
- Evaluar los extractos totales de proteínas de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* mediante la técnica de ELISA, con sueros caracterizados positivos y negativos al parásito de diferentes zonas endémicas de la ECh en México.

2. METODOLOGÍA

2.1 Estrategia experimental

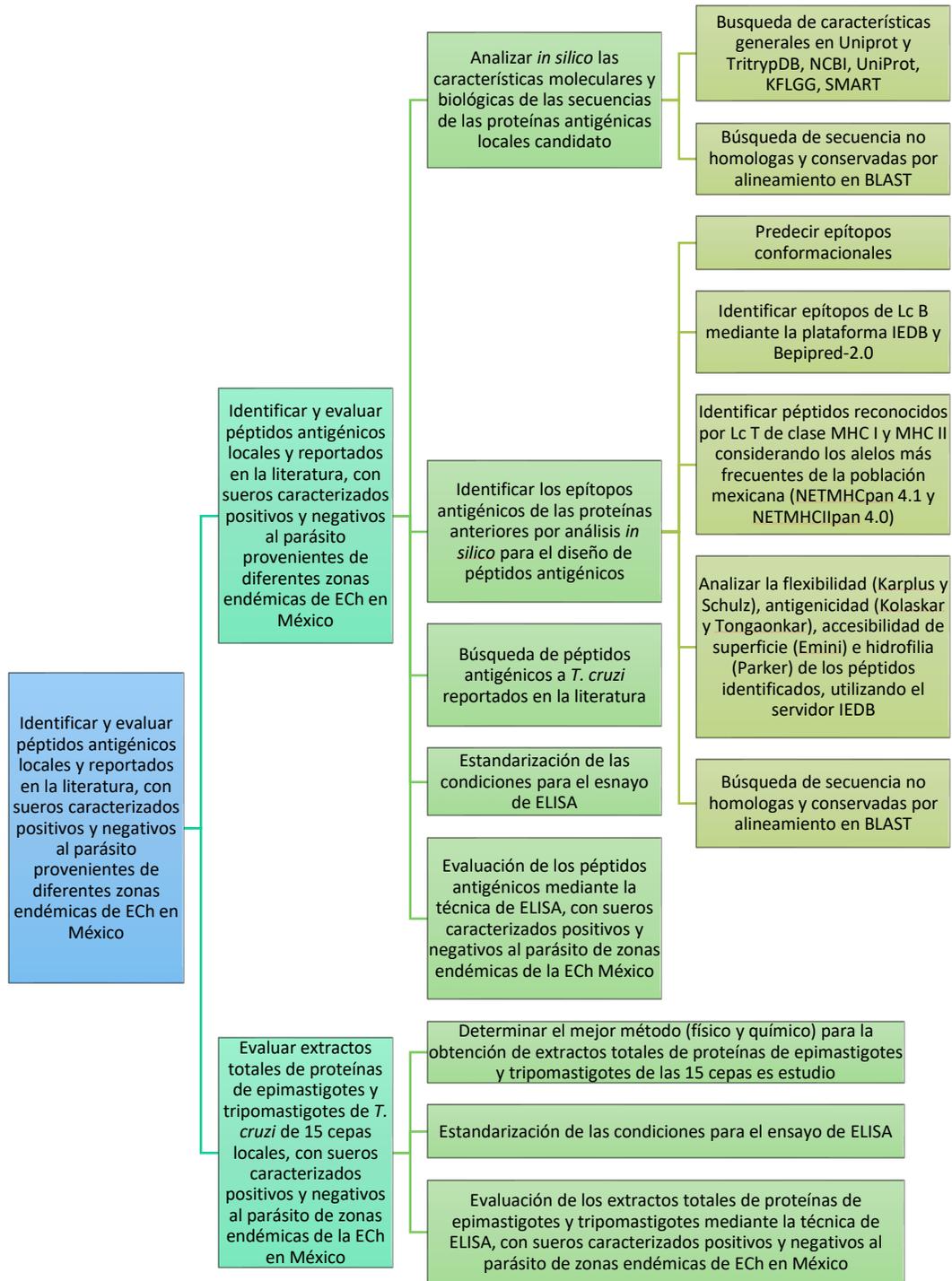


Figura 5. Estrategia experimental general. Diseñada de acuerdo con los objetivos particulares planteados en esta investigación.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Cultivos celulares

En el cultivo celular, las células eucarióticas nucleadas aisladas de un organismo vivo son mantenidas en un medio con condiciones controladas que promueven el crecimiento y diferenciación a tripomastigotes (Lynn, 2009).

Se utilizaron células 3T3-NIH (NIH/3T3 CRL-1658), que es una línea celular de fibroblastos de crecimiento adherente, que se aisló de un embrión NIH/Swiss de ratón (ATCC - American Type Culture Collection, 2003). Estas células deben mantenerse en buen estado metabólico en medio DMEM (Gibco® 12800082) complementado con SFB (Suero Fetal Bovino) (Gibco® 16000-044) al 10%, penicilina (10000UI) - estreptomycin (10mg) (Sigma P4333). Realizando resiembra de 3-4 días con una razón de pase de 1/5.

2.2.2 Parásitos

Los experimentos fueron realizados con parásitos de *T. cruzi* en sus formas de epimastigote mantenidos en medio LIT, y tripomastigote y amastigote derivados de cultivo celular, de las cepas aisladas en nuestro laboratorio en trabajos previos, originarias de Oaxaca (**Tabla 2**).

Cepa	Región de Oaxaca	DTU
CI1	Istmo	Tcl
CI2	Istmo	Tcl
CI3	Istmo	Tcl y TcV
CI4	Istmo	Tcl y TcV
NM1	Sierra Sur	Tcl
NM2	Sierra Sur	Tcl
NM3	Sierra Sur	Tcl
NM4	Sierra Sur	Tcl
NM5	Sierra Sur	Tcl y TcII
SC1	Istmo	Tcl y TcV
SC2	Istmo	Tcl y TcV
SC3	Istmo	TcV
SC4	Istmo	TcV
TE1	Istmo	Tcl
SS3	Valles Centrales	Tcl
CL Brener	Brasil	TcVI

El mantenimiento de cultivos de epimastigotes se realizó mediante re-siembra a una razón de pase 1:5 a partir de 0.5mL de cultivos stock en 4.5mL de medio de Infusión de hígado triptosa fresco (LIT, por sus siglas en inglés) ($C_6H_{12}O_6$ 11mM, KCl 5.36mM, NaCl 60mM, Na_2HPO_4 29mM, Infusión de hígado, Triptosa) complementado con SFB (Gibco® 16000-044) al 10%, penicilina (10000UI) - estreptomycin (10mg) al 5% y 0.1mg/mL de hemina (Sigma-Aldrich® H9039) y mantenidos en incubación a 28°C (Zingales et al., 1997).

Para obtener tripomastigotes derivados de cultivo, se realizó una infección primaria de células 3T3-NIH. Esta, se inició con un inóculo de 1×10^7 de epimastigotes de cada una de las cepas en estudio en una caja T-25cm² (Corning 430639) con células 3T3-NIH a una confluencia del 70%. La infección se realizó en medio DMEM (Gibco® 12800082) complementado al 2% con SFB y penicilina (10000UI) - estreptomycin (10mg) al 5% (Sigma P4333) durante 24 horas. Después de este tiempo se eliminaron los parásitos y se agregó medio con 2% de suero, reemplazándolo cada 2 días. La recolección de tripomastigotes liberados al medio extracelular se realizó a partir del día 7. Estos tripomastigotes obtenidos de la infección primaria, se utilizaron para infecciones secundarias con un inóculo inicial de 3×10^6 tripomastigotes en una caja T-75 cm²⁰ (Corning 431464U) con células 3T3-NIH a una confluencia del 70% con medio DMEM complementado al 2% de SFB y penicilina (10000UI) - estreptomycin (10mg) al 5% (Sigma P 333), siguiendo el mismo protocolo de la infección primaria. Los tripomastigotes y amastigotes liberados al medio extracelular fueron recolectados diariamente y se cuantificaron en cámara de Neubauer. Los parásitos (1×10^9) de cada cepa se utilizaron para obtener los extractos totales de proteínas.

2.2.3 Sueros Humanos

La obtención de sueros humanos caracterizados positivos y negativos a *T. cruzi* fueron proporcionados por el banco de sangre estatal de Oaxaca y el laboratorio de *T. cruzi* de la facultad de química de la UABJO (Universidad Autónoma Benito Juárez Oaxaca). Estos sueros fueron determinados como positivos y negativos en

el laboratorio estatal correspondientes, utilizando pruebas comerciales y caseras estandarizadas validadas en el InDRE. También, se obtuvieron sueros de otras zonas endémicas de México donados por el InDRE, los cuales fueron previamente caracterizados como positivos y negativos.

2.2.4 Análisis bioinformático de secuencias proteicas candidato

El análisis *in silico* de las proteínas en estudio, se basa en la búsqueda de características generales de cada proteína en las siguientes bases de datos:

- Para determinar el tipo de proteína, número de aminoácidos (aa), peso molecular y posible función biológica se utilizó UniProt (<https://www.uniprot.org>), KEGG (<https://bit.ly/2Ynlme7>) y TriTrypDB (<https://bit.ly/2nsT3gv>).
- Para realizar búsqueda de secuencias ortólogas TriTrypDB (<https://bit.ly/2nsT3gv>).
- Se reforzó la evidencia de una posible función biológica establecida de acuerdo con la presencia de dominios Pfam en las proteínas de estudio, analizadas con la base de datos Pfam-EMBL-EBI (<https://bit.ly/2muNbTS>).
- Posibles modificaciones postraduccionales a través de la herramienta ScanProsite tool (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>).
- La información referente al gen codificante para cada proteína se obtuvo en la base GenBank (<https://bit.ly/2wdx7l>).

2.2.5 Identificación de epítomos antigénicos de las proteínas candidato por análisis *in silico* para el diseño de péptidos antigénicos.

Para la identificación de péptidos, se consideró que biológicamente los epítomos conformacionales son los que se reconocen en su mayoría por el sistema inmune, por lo cual se realizó en análisis *in silico* de las 23 proteínas candidato para la realización de un modelado por homología de las estructuras proteicas en 3D mediante el programa *Swiss-Model*, seleccionando aquellas moléculas que tuvieran una cobertura de la secuencia objetivo-alta y un porcentaje de identidad mayor del 90%. De este modo se corroboró que la estimación de la calidad global del modelo fuese (GMQE) mayor a 0.9 y una estimación de la calidad con base en los

potenciales estadísticos de fuerza y puntuación de distancias (QMEANDisCo Global) arriba de 0.8. Posteriormente se realizó el refinamiento de los modelos estructurales y la validación mediante los programas ModRefiner y SAVES v6.0 (Adiyaman & McGuffin, 2019; Waterhouse et al., 2018).

De las proteínas que se obtuvo las estructuras proteicas 3D en formato PDB con las características antes mencionadas, se analizaron sus secuencias por medio del programa DiscoTope (<http://tools.iedb.org/discotope/>) que permite la predicción de epítomos a partir de la estructura proteica, incorporando cálculos de superficies accesibles a los solventes y las distancias de contacto como posibles epítomos para los linfocitos B (Lc B) a lo largo de la secuencia proteica. También se analizaron las secuencias con el programa ElliPro (<http://tools.iedb.org/ellipro/>), el cual realiza la predicción de epítomos basado en la protuberancia estructural, es decir predice epítomos basados en la accesibilidad y flexibilidad (Kringelum et al., 2012; Ponomarenko et al., 2008).

En aquellas secuencias proteicas con las cuales no se contó con el cristal para realizar el modelado de homología de la secuencia de la proteína, se realizó la predicción de epítomos de Lc B mediante las bases de datos BepiPred-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) e IEDB (por su nombre en inglés Immune Epitope Database) utilizando la página <http://tools.iedb.org/bcell/>. La especificidad de epítomos se evaluó mediante BepiPRed 2.0 / IEDB seleccionándose aquellos que tuvieran una probabilidad de epítomo mayor de 0.5, como punto de corte por presentar una buena sensibilidad y especificidad (Jespersen et al., 2017).

Para la predicción de péptidos antigénicos *in silico* a partir de las secuencias proteicas candidato, implementamos la una estrategia *in silico* descrita en la **Figura 6**. Esta estrategia es poco común, pero ha tenido éxito en otros grupos de investigación en estudios con microorganismos intracelulares. Se ha observado que cuando se incluye este tipo de predicción el porcentaje de éxito es mayor (Dzul-Rosado et al., 2020).

Para en análisis de epítomos en Lc B se utilizaron los siguientes programas:

- Identificamos los epítomos de Lc B mediante las bases de datos Bepipred-2.0. y IEDB, con los criterios previamente mencionados (Jespersen et al., 2017).

Para la predicción de los péptidos reconocidos por linfocitos T (Lc T) se utilizaron los siguientes programas:

- Se predicen los péptidos, considerando la molécula de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC I) con la plataforma NetMHCpan 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/>) de las secuencias en estudio, considerando los alelos más frecuentes de la población mexicana.
- Se predicen los péptidos, considerando la molécula de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC II) con la plataforma NetMHCIIpan 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/>) de las secuencias en estudio, considerando los alelos más frecuentes de la población mexicana.

Seleccionando aquellos que presentaran nivel de unión alto en la predicción y que fueran presentadas por MHC I y MHC II (Reynisson et al., 2021).

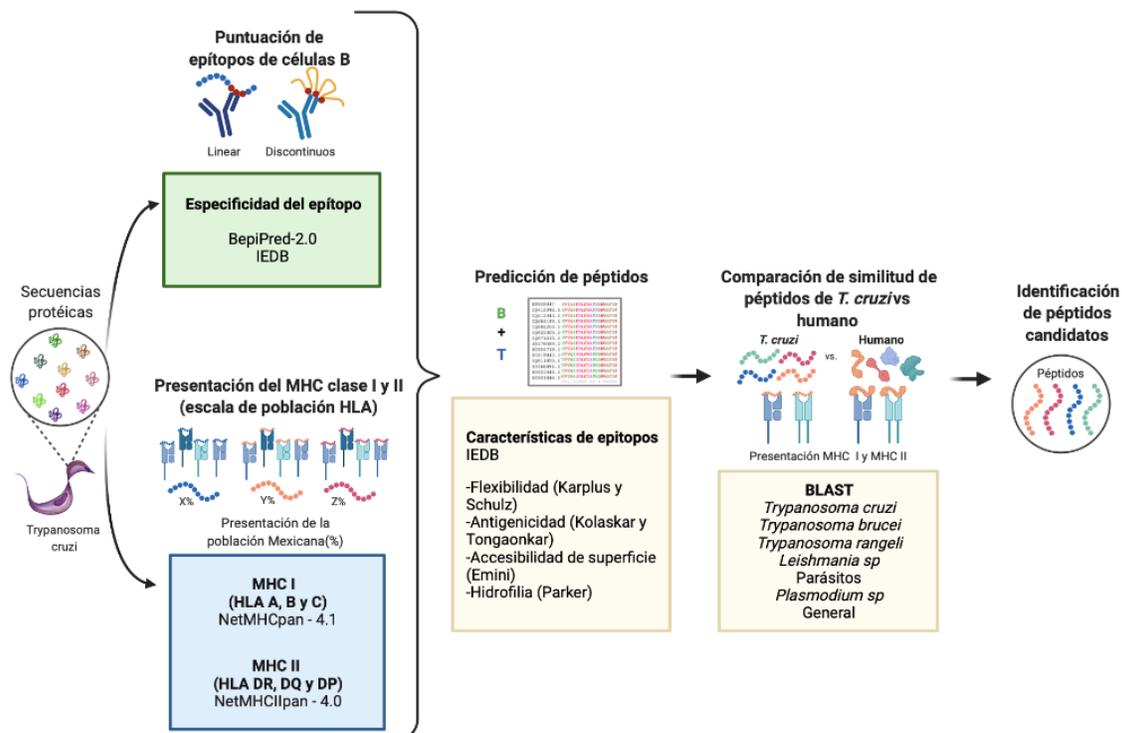


Figura 6. Estrategia experimental para predicción de péptidos *in silico*. Se muestra el orden en análisis *in silico* de las secuencias proteicas y los programas utilizados para identificar los péptidos candidatos.

Aquellos péptidos que fueron identificados en los análisis de Lc B y Lc T se les analizaron las características de flexibilidad (Karplus y Schulz), antigenicidad (Kolaskar y Tongaonkar), accesibilidad de superficie (Emini) e hidrofilia (Parker) de los péptidos identificados, utilizando la base de datos de epítomos inmunes IEDB (<http://tools.iedb.org/bcell/>). Se seleccionaron los péptidos que presentaran un valor cercano a 1 de flexibilidad (Karplus y Schulz), la cual indica que su estructura puede adaptarse cuando se une a un ligando (Karplus & Schulz, 1985). Un valor de 1 en accesibilidad a superficie (Emini), que indica una mayor probabilidad de ser encontrado en la superficie (Emini et al., 1985) Para valorar la hidrofiliidad (Parker) se seleccionaron aquellas secuencias que presentaran un valor positivo (Parker et al., 1986). Y finalmente la antigenicidad (Kolaskar y Tongaonkar) que es la capacidad de una molécula para unirse a moléculas generadas por el sistema inmunológico, considerándose los péptidos con valores mayores a 1 (Kolaskar & Tongaonkar, 1990).

Finalmente se realizó el alineamiento las secuencias peptídicas mediante BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), en busca de secuencias no homólogas (especificidad) con otros microorganismos de la familia *Trypanosomatidae* (taxid:5654), *Trypanosoma* (taxid:5690), *Parasitaceae* (taxid:2092), *Plasmodium* (taxid:5820) y otros microorganismos en general. Además, se buscaron las secuencias conservadas (sensibilidad) entre las diferentes cepas de *T. cruzi*, utilizando en el programa a *Trypanosoma cruzi* (taxid:5693) como secuencia molde. Se seleccionaron aquellos péptidos que presentaron un *e-value* cercano a 0 (1e-05 a 0.1) con secuencias de *T. cruzi*, lo que significa su alta homología con secuencias de este parásito. Mientras que se eliminaron los péptidos que tenían un *e-value* cercano a 0 (1e-05 a 0.1) con secuencias de otros microorganismos diferentes a *T. cruzi*, para evitar reacciones cruzadas.

2.2.6 Búsqueda de péptidos antigénicos a *T. cruzi* reportados en la literatura

Se realizó la búsqueda para resumir los péptidos reportados en la literatura, mediante la búsqueda en PubMed utilizando las palabras clave “peptide” AND

“*cruzi*” AND “diagnostic” AND “ELISA” en donde se obtuvieron 41 resultados de los cuales se excluyeron aquellos que no estaban relacionados con la ECh o que estuvieran enfocados a creación de vacunas. También, se eliminaron los artículos duplicados y artículos irrelevantes mediante el análisis de los títulos / resúmenes y textos completos, en donde se evaluarán los péptidos con sueros positivos y negativos a *T. cruzi*. Después de esta depuración, se mantuvieron al final 8 artículos comprendidos entre los años 1994 a 2013, en donde se reportaban 28 péptidos antigénicos identificados de diferentes países de Latinoamérica (Burns et al., 1992; Camussone et al., 2009; De Oliveira Mendes et al., 2013; Hernández-Marín et al., 2003; Houghton et al., 1999, 2000; Kaplan et al., 1997; Peralta et al., 1994).

2.2.7 Extracción de proteínas totales

Se realizó la lisis de los parásitos empastillados mediante dos métodos: 1) el método químico con el uso de detergentes como SDS (Research organics 9010L) y Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich, 74385), los cuales solubilizan los lípidos y proteínas membranales mediante la producción de poros que eventualmente causarán ruptura celular. Además, ambos detergentes generan desnaturalización y ruptura de complejos proteicos. Y 2) método físico a través del congelamiento y descongelamiento de la muestra (Brown & Audet, 2008; Lever et al., 2015).

Se obtuvieron extractos totales de epimastigotes en fase logarítmica y tripomastigotes derivados de cultivo celular para comparar ambos métodos de lisis y su combinación.

1) A partir de 1×10^9 parásitos se realizó la centrifugación de los parásitos a 6000 rpm por 15 min. Se retiró el sobrenadante y se conservó la pastilla, lavándola 3 veces con 1 ml PBS1 Dulbecco 1x a 6000 rpm x 10 min. Posteriormente se resuspendió la pastilla en 300 μ l de PBS Dulbecco 1x más 100 μ l de buffer de lisis A (con 50mM Tris-HCl pH 7.8, 1% -Nonidet 40 (NP-40) (Sigma-Aldrich, 74385), 5mM EDTA (Sigma E9884), 1% SDS (Research organics 9010L) mas 100 μ l de *complete protease inhibitor cocktail* (Roche Ref. 11873580001) al 50X y PMSF 1mM y se incubó 20 min a 4°C.

2) La lisis celular mediante congelamiento en nitrógeno líquido y descongelamiento en baño maría a 37°C, se realizó por cuatro ciclos. Para lo cual se parte de un tubo eppendorf con 1×10^9 tripomastigotes de cada cepa se les agregó 25ul de Inhibidores de proteasa 1x Complete-EDTA free (Roche Ref. 11873580001) y 475 ul de PBS. Posteriormente cada tubo de las diferentes cepas, se sometieron a 4 ciclos de congelamiento y descongelamiento.

3) Se realizó la combinación de ambos métodos utilizando primero el primer procedimiento, seguido de cuatro ciclos de congelación descongelación.

2.2.8 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas de los extractos totales se realizó utilizando el kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™ 23225), el cual combina la reacción de Biuret, que consta de la reducción del ion Cu^{2+} a Cu^+ al formar un complejo con los enlaces peptídicos en medio alcalino y cuya detección colorimétrica fué utilizando ácido bicinconínico (BCA, por sus siglas en inglés) (McClatchey, 2002). Para el análisis, se utilizó una curva estándar realizada con BSA (seroalbúmina bovina) (Sigma-Aldrich A2153), siguiendo las instrucciones del fabricante. De la concentración obtenida para cada cepa se tomaron concentraciones iguales obteniéndose el pool de extracto total de todas las cepas, para su posterior uso en los ensayos de ELISA.

2.2.9 Electroforesis en gel SDS-PAGE

La electroforesis permite la separación de las proteínas dentro de un gel, mediante la acción del campo magnético permitiendo la separación de éstas formando bandas de acuerdo con su peso molecular (Montalvo and Lugo, 2016).

Los extractos totales de proteínas totales de los parásitos se mezclaron 1:3 con buffer de muestra 3x (Tris 200 mM ph 6.8, SDS 6%, glicerol 30%, Ditiotreititol 150 mM y una 0.002% de azul de bromofenol) y se calentaron a ebullición durante 10 minutos. Una vez que las muestras fueron desnaturalizadas se cargaron y corrieron en geles de poliacrilamida en cámaras mini-protean III Cell (Bio-Rad, 165-3301),

utilizando un gel separador al 10% y un gel concentrador al 5% con buffer desnaturante (glicina 0.19 M, Tris-OH 24.92 mM, SDS 3.5 mM) a 80 vols y 400 mA durante 2 horas. Los geles de poliacrilamida fueron teñidos con azul de Coomassie para la visualización de las proteínas y la imagen fue capturada utilizando el software DNR Bio Imaging system.

2.2.10 Ensayo de ELISA

El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) detecta y cuantifica antígenos específicos presentes en una muestra mediante su inmovilización en una fase sólida para su posterior reconocimiento por un anticuerpo primario específico, el cual a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario conjugado a una enzima capaz de producir una señal colorimétrica, por la adición de su sustrato. Siendo dicha señal proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra (Konstantinou, 2017; Shah & Maghsoudlou, 2016).

Mediante la técnica de ELISA se evaluaron los péptidos sintéticos predichos *in silico* en este trabajo, los péptidos reportados en la literatura, y los extractos totales de epimastigotes y tripomastigotes. Para ello, se utilizaron sueros caracterizados positivos y negativos a *T. cruzi* previamente caracterizados provenientes de Oaxaca y otros estados de la república mexicana.

La estandarización del ensayo de ELISA se realizó con extracto total de proteínas de epimastigotes de la CL Brener, la cual es una cepa de referencia de fácil obtención, estableciendo las condiciones en placas de alta adherencia, bloqueo con BSA. Se sensibilizó las placas de 96 pozos de alta adherencia Corning 3590 con 50ul/ pozo de extracto total de proteínas (5ug/ml) con tapón de carbonato-bicarbonato (Na_2CO_3 16mM, NaHCO_3 34mM, pH 9.6), a 4°C toda la noche, envueltas en aluminio. Al día siguiente se realizaron 2 lavados con 250ul PBS 1X (NaCl 4g, KH_2PO_4 0.1g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.189g, KCl 0.1g, 500ml agua Mili Q) Tween 0.1% (Sigma-Aldrich P7949) y se procedió al bloqueo de las placas con 100ul/pozo de PBS 1X-Tween 20 al 0.1% y BSA 5% (Sigma-Aldrich A2153), durante una hora en agitación a temperatura ambiente manteniendo siempre cubierto con aluminio

las placas. Posteriormente se realizaron 4 lavados con 250 ul/ pozo de PBS Tween 0.1% y se coló 50 ul/pozo del Ab primario (suero) a una dilución 1:200 con PBS 1X-Tween 20 al 0.1% y BSA 3%, durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 4 lavados con 250 ul/ pozo PBS Tween 0.1% y se colocaron en cada pozo 50ul Ab 2rio anti-humano IgG peroxidado (Anti-IgG humana (específica de Fc): anticuerpo contra peroxidasa producido en cabra) (Sigma-Aldrich A0170) a dilución 1:20,000 con PBS 1X-Tween 20 al 0.1% y BSA 3%, dejando interactuar durante una hora en agitación a temperatura ambiente. Se lavaron las placas nuevamente 4 veces con 250 ul/pozo de PBS Tween 0.1% y finalmente se colocaron 50 ul en cada pozo de solución reveladora OPD (600ul de Buffer de citratos al 10x compuesto de $C_6H_8O_7$ 4.37g con $Na_3C_6H_5O_7$ 33.04g en 100ml de agua mili Q con pH5.6, más 8mg de OPD, 5400ul de agua mili Q y 50 ul de H_2O_2 para cada placa), incubándose las muestras 15 minutos a 37°C en oscuridad. La reacción fue detenida con solución de ácido sulfúrico 2N y leída a 490 nm con el equipo VMax® Kinetic microplate reader (ELISA).

Para el análisis de los péptidos mediante el ensayo de ELISA se utilizó el mismo protocolo, únicamente cambiando la dilución del suero a 1:50 y la dilución del anticuerpo secundario a 1:5,000; la concentración utilizada del péptido fue 5ug/ml. El análisis de concentración del antígeno, y la titulación del anticuerpo primario y secundario se describe en resultados.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se muestra en todos los casos el promedio de los resultados \pm SEM (Error Estándar de la Media).

2.2.11 Análisis estadístico

A partir de la información obtenida de la evaluación de los sueros por el ensayo de ELISA, se realizó el análisis estadístico y generación de graficas en el programa GraphPad Prism 8. En éstas, se obtuvo la media y desviación estándar para establecer los valores de corte, los cuales fueron calculados a partir del promedio de los sueros negativos \pm dos desviaciones estándar. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se muestra en todos los casos el promedio de los resultados \pm SEM (Error Estándar de la Media). Para analizar la concordancia de

los resultados en comparación con la caracterización de los sueros como positivos y negativos, se realizó el cálculo de la sensibilidad ($\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}}$) y el cálculo de especificidad ($\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos}}$). Además, mediante curvas ROC (por sus siglas en inglés: receiver operating characteristic), se evaluó la capacidad discriminativa de una prueba diagnóstica, al igual que con el índice Kappa, el cual se calculó mediante la herramienta de Graphpad (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1/>).

Todos los esquemas fueron diseñados y elaborados en este trabajo utilizando BioRender y las imágenes de su repertorio.

3. RESULTADOS

3.1 Identificación y evaluación de péptidos antigénicos a partir de proteínas antigénicas de cepas de *T. cruzi* locales y péptidos reportados en la literatura, con sueros caracterizados positivos y negativos al parásito provenientes de zonas endémicas de ECh en México.

3.1.1 Análisis *in silico* de las características moleculares y biológicas de las secuencias candidato de *T. cruzi*.

Para identificar si las secuencias en estudio obtenidas en el trabajo previo (Martínez-Cuevas, 2018) son buenos candidatos, se analizaron *in silico* sus secuencias, determinando el número de nucleótidos y aminoácidos, componente celular al que pertenecen, tipo de proteína, función biológica, expresión en los diferentes estadios de desarrollo del parásito (epimastigote, amastigote o tripomastigote), homología con secuencias en otros tripanosomátidos, parásitos y otros microorganismos, y presencia de secuencias conservadas, cuyos hallazgos se resumen en la **Tabla 3**. Las 23 secuencias candidato (Q4DJ00, Q4DX97, Q4CY87, Q4DCW0, Q4E046, Q4D4I2, Q4E2A9 Q4E4W8, Q4CRX2, Q4CPF0, Q4D9H3, Q4D7V1, Q4CQ28, Q4D2C9, Q4DC56, Q4DYC3, Q4CXJ6, Q4DLI2, Q4E2E3, Q4CL09, Q4DAT6, Q4E5H7 y Q4E2M9) presentan de 563 a 12,378 nucleótidos y entre 188 a 4,125 aminoácidos. Sus pesos moleculares predichos oscilan entre 20,413 a 457,001 KDa. Se identificaron 8 proteínas citoplasmáticas, 7 proteínas extracelulares, 4 proteínas de membrana plasmática, 3 proteínas nucleares y una proteína mitocondrial. Únicamente las proteínas Q4DC56 y Q4D9H3 se encuentran en la forma de tripomastigote de manera exclusiva y el resto de las proteínas están presentes en las 3 formas de desarrollo del parásito (amastigote, epimastigote y tripomastigote). El análisis de homología de las secuencias con otras secuencias ortólogas presentes en otros tripanosomátidos (*Leishmania* sp., *Trypanosoma rangeli* y *Trypanosoma brucei*), otros parásitos y organismos en general, se llevó a cabo mediante la alineación de las secuencias en BLAST. Este análisis permitió la categorización de las secuencias, en aquellas con: 1) baja identidad, con otros tripanosomátidos cuando tenía un porcentaje de identidad <70% y una cobertura

<0.8 (Q4DJ00, Q4DX97, Q4CY87, Q4DCW0, Q4E2A9, Q4CRX2, Q4CPF0, Q4D9H3, Q4D7V1, Q4CQ28, Q4D2C9, Q4DC56, Q4DYC3, Q4CXJ6, Q4DLI2, Q4E2E3, Q4CL09, Q4DAT6, Q4E5H7 y Q4E2M9), 2) mediana identidad, cuando presentaban un porcentaje de identidad de 70 a 90% y una cobertura de 0.8 a 0.9 (Q4CL09), y 3) alta identidad, en aquellas con porcentaje de identidad >90% y una cobertura >0.9, que como se esperaba no se encontró ninguna secuencia (Martínez-Cuevas, 2018). Finalmente, las secuencias Q4D4I2, Q4E046 y Q4E4W8 no presentaron ortólogos. Por lo tanto, estos resultados muestran que ninguna de las secuencias en estudio tiene alta homología con las secuencias de otros microorganismos diferentes a *T. cruzi*, lo cual apoyaría la posibilidad de que no existiera una reacción cruzada en los ensayos serológicos. En el caso de las secuencias que mostraron mediana (una secuencia) o baja (20 secuencias) homología, este análisis nos permitirá analizar las secuencias con dicha homología y evitarlas en la selección de los péptidos que identifiquemos más adelante.

Tabla 3. Características de las secuencias de las proteínas candidato de *T. cruzi*.

ID	Código de acceso de la proteína	Gen codificante	No. de nucleótidos	No. de a.a.	Peso molecular (KDa)	Tipo de proteína	Función biológica	Forma			Ortólogos en otros trypanosomatidos, parásitos y otros microorganismos	Porcentaje de identidad		
								E	A	T		BI	MI	AI
Proteínas citoplasmáticas														
6	Q4CXJ6	Tc00.1047053510337.40	891	296	33.09	Espermidina sintasa, putativa	Metabolismo de a.a.				Si			
12	Q4DAT6	Tc00.1047053510143.24	1,389	462	48.092	Proteína de interacción con Hsc-70	Unión ATP				Si			
13	Q4CRX2	Tc00.1047053503449.30	1,503	500	55.378	Proteína de ensamblaje de capa de clatrina, supuesta	Unión de 1-fosfatidilinositol, Fijación de clatrina				Si			
14	Q4E5H7	Tc00.1047053511277.170	1,695	564	61.969	Metalopeptidasa de zinc dependiente de ATP, supuesta	Actividad de metaloendopeptidasa, ATP vinculante				Si			
15	Q4E2M9	Tc00.1047053510889.221	1,827	608	68.329	Actividad glucosa 6 fosfato isomerasa	Gluconeogénesis y proceso glicolítico				Si			
17	Q4E2E3	Tc00.1047053509979.60	1,884	627	69.209	Sec1 proteína de transporte familiar, putativo	Acoplamiento de vesículas involucradas en exocitosis				Si			
18	Q4DLI2	Tc00.1047053508637.150	1,944	647	72.874	Inhibidor de ribonucleasa L, putativo	Unión de ATP				Si			
21	Q4DCW0	Tc00.1047053506407.30	2,433	810	91.964	Metiltransferasa, putativa	Sin caracterizar				Si			

Tabla 3. Características de las secuencias de las proteínas candidato de *T. cruzi* (Continuación)

ID	Código de la proteína	Gen codificante	No. de nucleótidos	No. de a.a.	Peso molecular (KDa)	Tipo de proteína	Función biológica	Forma			Ortólogos en otros trypanosomatidos, parásitos y otros microorganismos	Porcentaje de identidad		
								E	A	T		BI	MI	AI
Proteínas extracelulares														
2	Q4D4I2	Tc00.1047053508745.40	693	230	23.559	Mucina putativa	Mucina TcMUCII				No			
3	Q4E046	Tc00.1047053506501.40	693	231	24.034	Mucina putativa	Mucina TcMUCII				No			
4	Q4E4W8	Tc00.1047053511255.670	780	259	26.54	Proteína de superficie asociada a mucina (MASP)	Sistema del complemento				No			
5	Q4DYC3	Tc00.1047053511817.40	867	288	32.096	NADH citocromo B5 reductasa	Cataliza la reducción de Fe (III)				Si			
10	Q4E2A9	Tc00.1047053511603.300	1,083	360	37.847	Proteína de superficie asociada a mucina (MASP)	Sistema del complemento				Si			
11	Q4CQ28	Tc00.1047053510681.30	1,047	348	38.999	Lipasa, putativa	Metabolismo de triglicéridos				Si			
16	Q4DC56	Tc00.1047053508317.80	1,890	629	68.854	α -1,2-manosidasa	Unión a calcio, Hidrólisis de enlaces glucosídicos				Si			
Proteínas mitocondriales														
1	Q4CL09	Tc00.1047053432677.20	563	188	20.413	Proteína de choque térmico de 70KDa, putativo.	Respuesta al estrés.				Si			

Tabla 3. Características de las secuencias de las proteínas candidato de <i>T. cruzi</i> (Continuación)														
ID	Código de la proteína	Gen codificante	No. de nucleótidos	No. de a.a.	Peso molecular (KDa)	Tipo de proteína	Función biológica	Forma			Ortólogos en otros trypanosomatidos, parásitos y otros microorganismos	Porcentaje de identidad		
								E	A	T		BI	MI	AI
Proteínas en membrana plasmática														
19	Q4D9H3	Tc00.1047053508717.60	2,358	785	86.137	Trans-sialidasa, putativo	Actividad de exo-alfa-sialidasa				Si			
20	Q4D2C9	Tc00.1047053505163.80	2,397	798	90.585	Subunidad de oligosacaril transferasa, putativa	Glicosilación proteica				Si			
22	Q4CY87	Tc00.1047053510001.20	2,466	821	93.072	Metalopeptidasa de zinc dependiente de ATP, supuesta	Transporte transmembral				Si			
23	Q4D7V1	Tc00.1047053508971.50	12,378	4,125	457.001	Ubiquitin ligasa	Actividad catalítica				Si			
Proteínas nucleares														
7	Q4CPF0	Tc00.1047053509483.10	971	322	35.881	Peptidasa similar a la leishmanolisina	Actividad de metaloendopeptidasa, Adhesión celular				Si			
8	Q4DX97	Tc00.1047053506945.10	973	323	36.15	Calmodulina, putativo	Proteína no caracterizada				Si			
9	Q4DJ00	Tc00.1047053511287.110	1,014	337	37.657	Tc38, putativa	Proteína no caracterizada				Si			
<p>a.a: Aminoácidos, Kda: Kilo dalton, E: Epimastigote, A: Amastigote, T: Tripomastigote. BI: Presenta ortólogos con Bajo porcentaje de identidad, MI: Presenta ortólogos con Medio porcentaje de Identidad, AI: Presenta ortólogos con Alto porcentaje de Identidad. En gris se marcan las casillas que cumplen el criterio evaluado.</p>														

3.1.2 Identificación de epítomos antigénicos de las proteínas candidato, por análisis *in silico* para el diseño de péptidos antigénicos

Para identificar los péptidos antigénicos de las proteínas candidato, se llevó a cabo primero la identificación de epítomos antigénicos de las 23 proteínas candidato (Q4DJ00, Q4DX97, Q4CY87, Q4DCW0, Q4E046, Q4D4I2, Q4E2A9 Q4E4W8, Q4CRX2, Q4CPF0, Q4D9H3, Q4D7V1, Q4CQ28, Q4D2C9, Q4DC56, Q4DYC3, Q4CXJ6, Q4DLI2, Q4E2E3, Q4CL09, Q4DAT6, Q4E5H7 y Q4E2M9). Para ello, se realizó inicialmente el modelado y análisis de las 23 proteínas candidato siguiendo la metodología antes mencionada. Únicamente para la proteína 6 y la proteína 15 se encontró que se contaba con el cristal que permitía hacer el modelado por homología con altos porcentajes de identidad y cobertura con secuencias de *T. cruzi*, como se muestra en la **Tabla 4** (marcado en verde).

ID	Código de acceso de la proteína	Cristal	Número de modelos	Porcentaje de identidad	Cobertura	Organismo
1	Q4CL09	No	1	71.43	Alta	Humano
2	Q4D4I2	No	0			
3	Q4E046	No	1	10.91	Baja	<i>Bacteroides intestinalis</i>
4	Q4E4W8	No	0			
5	Q4DYC3	No	1	38.75	Alta	<i>Physarum policephalum</i>
6	Q4CXJ6	Si	1	98.99	Alta	<i>Trypanosoma cruzi</i>
7	Q4CPF0	No	2	31.92	Media	No especificado
8	Q4DX97	No	11	10	Alta	No especificado
9	Q4DJ00	No	2	28.57	Baja	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
10	Q4E2A9	No	0			
11	Q4CQ28	No	1	31.93	Alta	<i>Gibberella Zeae</i>
12	Q4DAT6	No	1	30.25	Baja	No especificado
13	Q4CRX2	No	1	23.13	Media	No especificado
14	Q4E5H7	No	4	41.5	Alta	Humano
15	Q4E2M9	Si	1	97.86	Alta	<i>Trypanosoma cruzi</i>
16	Q4DC56	No	1	32.63	Media	Ratón
17	Q4E2E3	No	3	27.95	Alta	No especificado
18	Q4DLI2	No	3	65.71	Alta	<i>Mammalian</i>
19	Q4D9H3	No	1	29.84	Alta	<i>Trypanosoma rangeli</i>
20	Q4D2C9	No	6	33.85	Alta	Humano
21	Q4DCW0	No	6	48.63	Alta	<i>Trypanosoma brucei</i>
22	Q4CY87	No	2	12.42	Baja	Fármaco
23	Q4D7V1	No	4	41.18	Baja	No especificado

En verde se muestra las secuencias en que se encontró que se contaba con el cristal que permitía hacer el modelado por homología con altos porcentajes de identidad y cobertura con secuencias de *T. cruzi*.

La proteína 6 (Q4CXJ6) es una espermidina sintetasa, la cual participa en la biogénesis de la espermidina, jugando un papel importante en la supervivencia de la célula estabilizando la estructura del DNA y de las histonas. Esta proteína es un homodímero que presentó un porcentaje de identidad del 98.99% con una cobertura alta con *T. cruzi*, como era esperado. La estimación de la calidad del modelo global (GMQE) fue de 0.94 y la calidad con base en los potenciales estadísticos de fuerza y puntuación de distancias globales (QMEANDisCo Global) fue de 0.89 ± 0.05 . En la **Figura 7** se muestra el resultado del análisis de homología entre la secuencia de nuestra proteína Q4CXJ6 y del homodímero identificado en SWISS-MODEL.

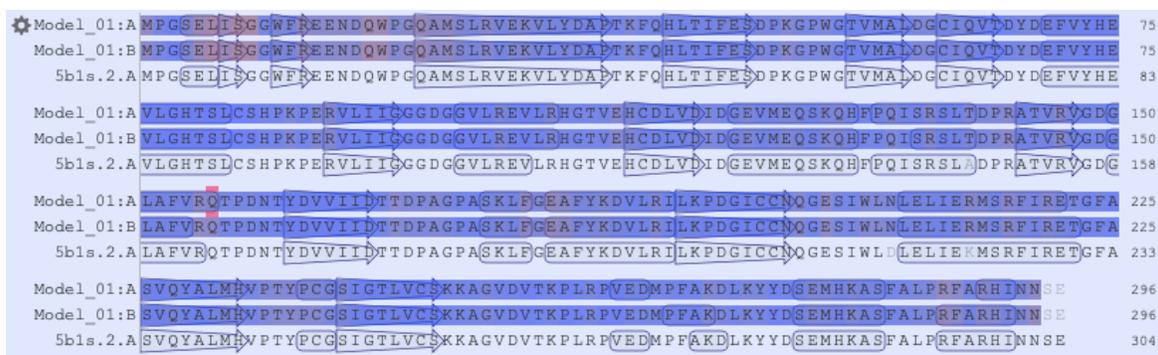


Figura 7. Alineación de secuencia de la proteína Q4CXJ6 y la secuencia homóloga obtenida por SWISS-MODEL. Model 1_01: A corresponde a la cadena A del homodímero de la proteína espermidina sintetasa. Model 1_01: B corresponde a la cadena B del homodímero de la proteína espermidina sintetasa, 5slb.2.A es la secuencia de la proteína candidata Q4CXJ6, identificando en una escala de azul aquellos fragmentos donde las secuencias presentan mayor similitud y en rojo aquellos fragmentos donde las secuencia son diferentes.

La proteína 15 (Q4E2M9) es una glucosa 6 fosfato isomerasa, la cual es una enzima que forma parte de las rutas metabólicas de la glucólisis y gluconeogénesis y constituye un homodímero. Identificamos un porcentaje de identidad del 97.86% con una cobertura alta con *T. cruzi*. La estimación de la calidad del modelo global (GMQE) fue de 0.94 y la calidad con base en los potenciales estadísticos de fuerza y puntuación de distancias globales (QMEANDisCo Global) fue de 0.87 ± 0.05 . En la **Figura 8** se muestra el resultado de la homología entre la secuencia de nuestra proteína Q4E2M9 y del homodímero identificado en SWISS-MODEL.

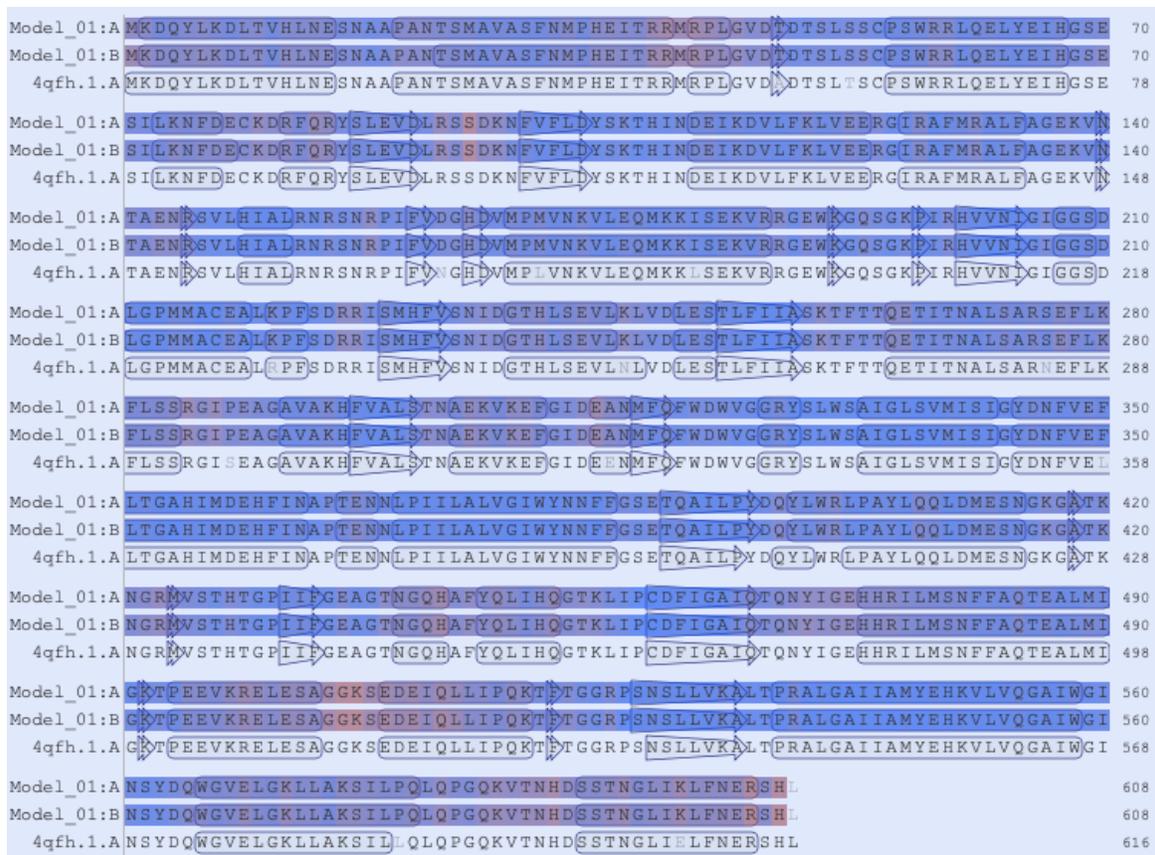


Figura 8. Alineación de secuencia de la proteína Q4E2M9 y la secuencia homóloga obtenida por SWISS-MODEL. Model 1_01: A corresponde a la cadena A del homodímero de la proteína espermidina sintetasa. Model 1_01: B corresponde a la cadena B del homodímero de la proteína espermidina sintetasa, 4qfh.1.A es la secuencia de la proteína candidata Q4CXJ6, identificando en una escala de azul aquellos fragmentos donde las secuencias presentan mayor similitud y en rojo aquellos fragmentos donde las secuencias son diferentes.

Se realizó el análisis de epítomos conformacionales obtenidos con la estructura 3D refinada y validadas de las proteínas 6 y 15, utilizando los programas DiscoTope y ElliPro. Este análisis mostro como resultado para la proteína 6 (Q4CXJ6), la predicción de 3 epítomos discontinuos de 3, 144 y 148 aminoácidos (**Figura 9**).

Predicted Discontinuous Epitope(s):

No.	Residues	Number of residues	Score
1	A:M1, A:P2, A:G3, A:S4, A:E5, A:L6, A:I7, A:S8, A:G9, A:G10, A:W11, A:E15, A:R27, A:V28, A:E29, A:K30, A:V31, A:L32, A:Y33, A:D34, A:K35, A:P36, A:T37, A:K38, A:F39, A:C40, A:H41, A:L42, A:T43, A:I44, A:D48, A:P49, A:K50, A:G51, A:D60, A:G61, A:C83, A:S84, A:H85, A:P86, A:K87, A:P88, A:E89, A:F90, A:G97, A:G99, A:L106, A:F107, A:H108, A:G109, A:T110, A:V111, A:E112, A:H113, A:C114, A:D115, A:I119, A:D120, A:G121, A:E122, A:M124, A:E125, A:Q126, A:K128, A:D129, A:H130, A:F131, A:P132, A:Q133, A:S135, A:S137, A:L138, A:T139, A:D140, A:P141, A:R142, A:A143, A:T144, A:V145, A:R146, A:V147, A:G148, A:D149, A:G150, A:L151, A:A152, A:F153, A:V154, A:R155, A:Q156, A:T157, A:P158, A:D159, A:N160, A:T161, A:Y162, A:D163, A:G181, A:E182, A:A183, A:F184, A:K186, A:D187, A:V188, A:L189, A:R190, A:I191, A:L192, A:K193, A:P194, A:D195, A:G196, A:F218, A:I219, A:R220, A:T222, A:G223, A:F224, A:A225, A:S226, A:S248, A:K249, A:K250, A:A251, A:G252, A:V253, A:D254, A:V255, A:T256, A:K257, A:P258, A:L259, A:R260, A:P261, A:E263, A:D264, A:M265, A:P266, A:F267, A:A268, A:K269, A:D270, A:L271, B:G21	144	0.716
2	A:G21, B:M1, B:P2, B:G3, B:S4, B:E5, B:L6, B:I7, B:S8, B:G9, B:G10, B:W11, B:R27, B:V28, B:E29, B:K30, B:V31, B:L32, B:C33, B:D34, B:E35, B:P36, B:T37, B:K38, B:F39, B:C40, B:H41, B:L42, B:T43, B:I44, B:E46, B:D48, B:P49, B:K50, B:G51, B:G54, B:D60, B:G61, B:C83, B:S84, B:H85, B:P86, B:K87, B:P88, B:E89, B:R90, B:G97, B:G99, B:L106, B:R107, B:H108, B:G109, B:T110, B:V111, B:E112, B:H113, B:C114, B:D115, B:I119, B:D120, B:G121, B:E122, B:M124, B:E125, B:Q126, B:K128, B:Q129, B:H130, B:F131, B:P132, B:Q133, B:I134, B:S135, B:F136, B:S137, B:L138, B:D139, B:D140, B:P141, B:R142, B:A143, B:T144, B:V145, B:R146, B:V147, B:G148, B:D149, B:G150, B:L151, B:A152, B:F153, B:V154, B:R155, B:Q156, B:T157, B:P158, B:D159, B:N160, B:T161, B:Y162, B:D163, B:G181, B:E182, B:A183, B:D187, B:V188, B:D189, B:R190, B:I191, B:L192, B:K193, B:P194, B:D195, B:G196, B:F218, B:I219, B:R220, B:T222, B:G223, B:F224, B:A225, B:S226, B:S248, B:K249, B:K250, B:A251, B:G252, B:V253, B:D254, B:V255, B:T256, B:K257, B:P258, B:L259, B:R260, B:P261, B:V262, B:E263, B:D264, B:M265, B:P266, B:F267, B:A268, B:K269, B:D270, B:L271	148	0.71
3	A:E213, A:R214, A:R217	3	0.599

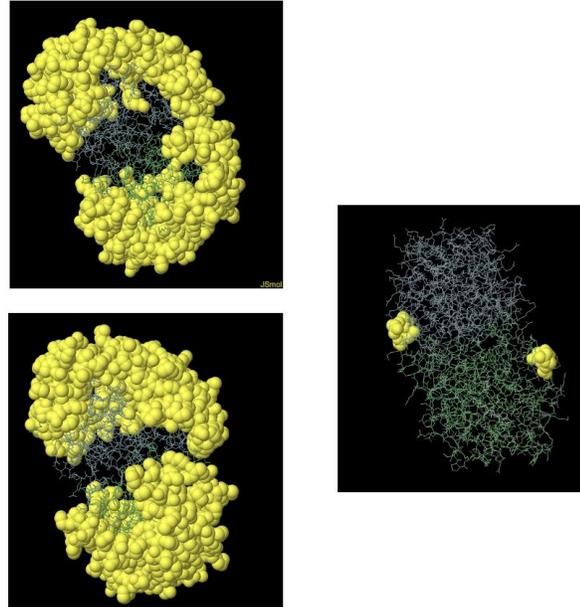


Figura 9. Predicción de epítomos discontinuos mediante DiscoTope y ElliPro de la proteína 6 (Q4CXJ6). En la tabla se muestran los aminoácidos identificados como epítomos discontinuos, así como el número de residuos y el score obtenido en la predicción. Las figuras muestran la localización de los epítomos en el modelo de la estructura proteica.

Por su parte los resultados obtenidos en el análisis de la proteína 15 (Q4E2M9), mostró la predicción de 2 epítomos discontinuos que tienen tamaños de 3 y 626 aminoácidos (Figura 10).

Predicted Discontinuous Epitope(s):

No.	Residues	Number of residues	Score
1	A:G125, A:A128, A:R131	3	0.728
2	A:M1, A:K2, A:D3, A:Q4, A:Y5, A:L6, A:K7, A:D8, A:L9, A:T10, A:V11, A:H12, A:L13, A:N14, A:E15, A:S16, A:N17, A:A18, A:A19, A:P20, A:A21, A:N22, A:T23, A:S24, A:A26, A:V27, A:F30, A:H34, A:G34, A:V35, A:Q36, A:T37, A:D38, A:T39, A:S39, A:L41, A:S42, A:S43, A:C44, A:P45, A:S56, A:R58, A:R59, A:Q61, A:E62, A:L63, A:E65, A:H66, A:H67, A:G68, A:G69, A:E70, A:S71, A:I72, A:L73, A:K74, A:N75, A:F76, A:D77, A:E78, A:C79, A:K80, A:S81, A:R82, A:R83, A:C84, A:H85, A:Y86, A:S87, A:D89, A:L92, A:F93, A:S94, A:S95, A:D96, A:K97, A:N98, A:Y104, A:S105, A:I109, A:N110, A:D111, A:E112, A:H113, A:K114, A:D115, A:V116, A:F118, A:K119, A:L120, A:V121, A:E122, A:E123, A:R124, A:R125, A:A126, A:A127, A:K128, A:A129, A:G130, A:A131, A:G132, A:A133, A:K134, A:N135, A:A136, A:A137, A:A138, A:N139, A:A140, A:T141, A:A142, A:E143, A:N144, A:R145, A:S146, A:V147, A:L148, A:A151, A:R151, A:R152, A:N154, A:R155, A:S156, A:N157, A:R158, A:R159, A:L160, A:F161, A:Y162, A:D163, A:G165, A:G166, A:D168, A:V167, A:M168, A:P169, A:M170, A:V171, A:N172, A:K173, A:V174, A:L175, A:E176, A:Q177, A:M178, A:K179, A:K181, A:S182, A:K184, A:K185, A:R186, A:R187, A:R188, A:R189, A:W190, A:K191, A:G192, A:G193, A:G194, A:G195, A:K196, A:P197, A:I198, A:R199, A:S200, A:D202, A:R207, A:Q208, A:Q209, A:Q210, A:C211, A:K212, A:G213, A:A214, A:S215, A:S216, A:S217, A:A218, A:F219, A:A220, A:A221, A:A222, A:A223, A:A224, A:A225, A:A226, A:A227, A:A228, A:A229, A:A230, A:A231, A:A232, A:A233, A:A234, A:A235, A:A236, A:A237, A:A238, A:A239, A:A240, A:A241, A:A242, A:A243, A:A244, A:A245, A:A246, A:A247, A:A248, A:A249, A:A250, A:A251, A:A252, A:A253, A:A254, A:A255, A:A256, A:A257, A:A258, A:A259, A:A260, A:A261, A:A262, A:A263, A:A264, A:A265, A:A266, A:A267, A:A268, A:A269, A:A270, A:A271, A:A272, A:A273, A:A274, A:A275, A:A276, A:A277, A:A278, A:A279, A:A280, A:A281, A:A282, A:A283, A:A284, A:A285, A:A286, A:A287, A:A288, A:A289, A:A290, A:A291, A:A292, A:A293, A:A294, A:A295, A:A296, A:A297, A:A298, A:A299, A:A300, A:A301, A:A302, A:A303, A:A304, A:A305, A:A306, A:A307, A:A308, A:A310, A:A311, A:A312, A:A313, A:E314, A:A315, A:N316, A:M317, A:F318, A:Q319, A:F320, A:W321, A:W323, A:V324, A:M329, A:G343, A:A344, A:E345, A:V346, A:E348, A:T352, A:A350, A:S356, A:E359, A:A360, A:K362, A:N363, A:A364, A:P365, A:T366, A:E367, A:N368, A:N369, A:T419, A:K420, A:N421, A:G422, A:R423, A:M424, A:L470, A:G471, A:E472, A:R473, A:K482, A:T483, A:P484, A:E485, A:E486, A:V487, A:K488, A:R489, A:E500, A:L501, A:E502, A:K503, A:K504, A:G505, A:K507, A:S508, A:E509, A:D510, A:E511, A:I512, A:C513, A:L514, A:L515, A:S156, A:T520, A:K533, A:R538, A:S577, A:S78, A:L379, A:P380, A:C381, A:L382, A:C383, A:R384, A:R385, A:C386, A:G387, A:V388, A:T389, A:N390, A:H391, A:D392, A:S393, A:S394, A:G397, A:G399, A:K400, A:L601, A:F602, A:N603, A:E604, A:E605, A:K606, A:H607, A:K62, A:D3, A:Y5, A:L6, A:K7, A:D8, A:L9, A:K10, A:K11, A:K12, A:K13, A:K14, A:K15, A:K16, A:K17, A:K18, A:K19, A:K20, A:K21, A:K22, A:K23, A:K24, A:K25, A:K26, A:K27, A:K28, A:K29, A:K30, A:K31, A:K32, A:K33, A:K34, A:K35, A:K36, A:K37, A:K38, A:K39, A:K40, A:K41, A:K42, A:K43, A:K44, A:K45, A:K46, A:K47, A:K48, A:K49, A:K50, A:K51, A:K52, A:K53, A:K54, A:K55, A:K56, A:K57, A:K58, A:K59, A:K60, A:K61, A:K62, A:K63, A:K64, A:K65, A:K66, A:K67, A:K68, A:K69, A:K70, A:K71, A:K72, A:K73, A:K74, A:K75, A:K76, A:K77, A:K78, A:K79, A:K80, A:K81, A:K82, A:K83, A:K84, A:K85, A:K86, A:K87, A:K88, A:K89, A:K90, A:K91, A:K92, A:K93, A:K94, A:K95, A:K96, A:K97, A:K98, A:K99, A:K100, A:K101, A:K102, A:K103, A:K104, A:K105, A:K106, A:K107, A:K108, A:K109, A:K110, A:K111, A:K112, A:K113, A:K114, A:K115, A:K116, A:K117, A:K118, A:K119, A:K120, A:K121, A:K122, A:K123, A:K124, A:K125, A:K126, A:K127, A:K128, A:K129, A:K130, A:K131, A:K132, A:K133, A:K134, A:K135, A:K136, A:K137, A:K138, A:K139, A:K140, A:K141, A:K142, A:K143, A:K144, A:K145, A:K146, A:K147, A:K148, A:K149, A:K150, A:K151, A:K152, A:K153, A:K154, A:K155, A:K156, A:K157, A:K158, A:K159, A:K160, A:K161, A:K162, A:K163, A:K164, A:K165, A:K166, A:K167, A:K168, A:K169, A:K170, A:K171, A:K172, A:K173, A:K174, A:K175, A:K176, A:K177, A:K178, A:K179, A:K180, A:K181, A:K182, A:K183, A:K184, A:K185, A:K186, A:K187, A:K188, A:K189, A:K190, A:K191, A:K192, A:K193, A:K194, A:K195, A:K196, A:K197, A:K198, A:K199, A:K200, A:K201, A:K202, A:K203, A:K204, A:K205, A:K206, A:K207, A:K208, A:K209, A:K210, A:K211, A:K212, A:K213, A:K214, A:K215, A:K216, A:K217, A:K218, A:K219, A:K220, A:K221, A:K222, A:K223, A:K224, A:K225, A:K226, A:K227, A:K228, A:K229, A:K230, A:K231, A:K232, A:K233, A:K234, A:K235, A:K236, A:K237, A:K238, A:K239, A:K240, A:K241, A:K242, A:K243, A:K244, A:K245, A:K246, A:K247, A:K248, A:K249, A:K250, A:K251, A:K252, A:K253, A:K254, A:K255, A:K256, A:K257, A:K258, A:K259, A:K260, A:K261, A:K262, A:K263, A:K264, A:K265, A:K266, A:K267, A:K268, A:K269, A:K270, A:K271, A:K272, A:K273, A:K274, A:K275, A:K276, A:K277, A:K278, A:K279, A:K280, A:K281, A:K282, A:K283, A:K284, A:K285, A:K286, A:K287, A:K288, A:K289, A:K290, A:K291, A:K292, A:K293, A:K294, A:K295, A:K296, A:K297, A:K298, A:K299, A:K300, A:K301, A:K302, A:K303, A:K304, A:K305, A:K306, A:K307, A:K308, A:K309, A:K310, A:K311, A:K312, A:K313, A:K314, A:K315, A:K316, A:K317, A:K318, A:K319, A:K320, A:K321, A:K322, A:K323, A:K324, A:K325, A:K326, A:K327, A:K328, A:K329, A:K330, A:K331, A:K332, A:K333, A:K334, A:K335, A:K336, A:K337, A:K338, A:K339, A:K340, A:K341, A:K342, A:K343, A:K344, A:K345, A:K346, A:K347, A:K348, A:K349, A:K350, A:K351, A:K352, A:K353, A:K354, A:K355, A:K356, A:K357, A:K358, A:K359, A:K360, A:K361, A:K362, A:K363, A:K364, A:K365, A:K366, A:K367, A:K368, A:K369, A:K370, A:K371, A:K372, A:K373, A:K374, A:K375, A:K376, A:K377, A:K378, A:K379, A:K380, A:K381, A:K382, A:K383, A:K384, A:K385, A:K386, A:K387, A:K388, A:K389, A:K390, A:K391, A:K392, A:K393, A:K394, A:K395, A:K396, A:K397, A:K398, A:K399, A:K400, A:K401, A:K402, A:K403, A:K404, A:K405, A:K406, A:K407, A:K408, A:K409, A:K410, A:K411, A:K412, A:K413, A:K414, A:K415, A:K416, A:K417, A:K418, A:K419, A:K420, A:K421, A:K422, A:K423, A:K424, A:K425, A:K426, A:K427, A:K428, A:K429, A:K430, A:K431, A:K432, A:K433, A:K434, A:K435, A:K436, A:K437, A:K438, A:K439, A:K440, A:K441, A:K442, A:K443, A:K444, A:K445, A:K446, A:K447, A:K448, A:K449, A:K450, A:K451, A:K452, A:K453, A:K454, A:K455, A:K456, A:K457, A:K458, A:K459, A:K460, A:K461, A:K462, A:K463, A:K464, A:K465, A:K466, A:K467, A:K468, A:K469, A:K470, A:K471, A:K472, A:K473, A:K474, A:K475, A:K476, A:K477, A:K478, A:K479, A:K480, A:K481, A:K482, A:K483, A:K484, A:K485, A:K486, A:K487, A:K488, A:K489, A:K490, A:K491, A:K492, A:K493, A:K494, A:K495, A:K496, A:K497, A:K498, A:K499, A:K500, A:K501, A:K502, A:K503, A:K504, A:K505, A:K506, A:K507, A:K508, A:K509, A:K510, A:K511, A:K512, A:K513, A:K514, A:K515, A:K516, A:K517, A:K518, A:K519, A:K520, A:K521, A:K522, A:K523, A:K524, A:K525, A:K526, A:K527, A:K528, A:K529, A:K530, A:K531, A:K532, A:K533, A:K534, A:K535, A:K536, A:K537, A:K538, A:K539, A:K540, A:K541, A:K542, A:K543, A:K544, A:K545, A:K546, A:K547, A:K548, A:K549, A:K550, A:K551, A:K552, A:K553, A:K554, A:K555, A:K556, A:K557, A:K558, A:K559, A:K560, A:K561, A:K562, A:K563, A:K564, A:K565, A:K566, A:K567, A:K568, A:K569, A:K570, A:K571, A:K572, A:K573, A:K574, A:K575, A:K576, A:K577, A:K578, A:K579, A:K580, A:K581, A:K582, A:K583, A:K584, A:K585, A:K586, A:K587, A:K588, A:K589, A:K590, A:K591, A:K592, A:K593, A:K594, A:K595, A:K596, A:K597, A:K598, A:K599, A:K600, A:K601, A:K602, A:K603, A:K604, A:K605, A:K606, A:K607	626	0.722

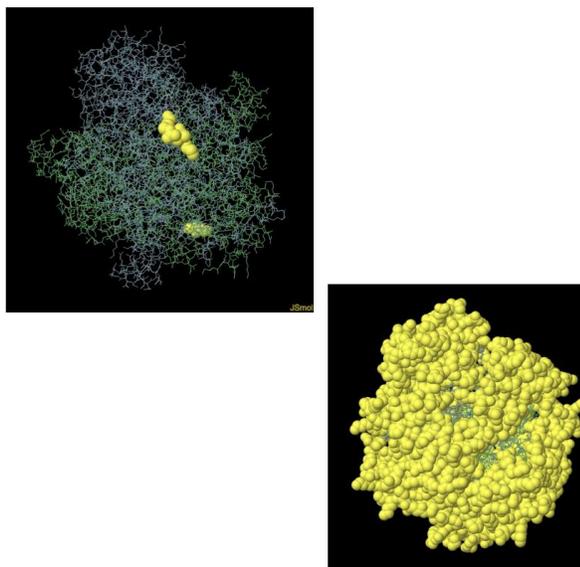


Figura 10. Predicción de epítomos discontinuos mediante DiscoTope y ElliPro de la proteína 15 (Q4E2M9). En la tabla se muestran los aminoácidos identificados como epítomos discontinuos, así como el número de residuos y el score obtenido en la predicción. Las figuras muestran la localización de los epítomos en el modelo de la estructura proteica.

Estos resultados identificaron epítomos o muy cortos (tres aa) o demasiado largos (144, 148 y 626 aa), dificultando la selección del fragmento con las características necesarias para ser reconocidos (Pishesha et al., 2022). Por otro lado, cuando no se cuenta con el cristal de alguna proteína en estudio, se entorpece la realización de su análisis conformacional, como sucedió en 21 de las 23 proteínas candidato, resultando insuficiente este análisis para la identificación de los péptidos necesarios en este estudio.

Por lo tanto, una alternativa factible en estos casos es realizar la identificación de epítomos lineales de Lc B usando Bepipred-2.0 y IEDB. Con este abordaje, al evaluar las secuencias de las 23 proteínas se identificaron 401 péptidos. Posteriormente utilizamos los criterios de selección: 1) Antigenicidad (capacidad de la molécula para unirse a moléculas generadas por el sistema inmunológico), 2) flexibilidad (para que se pueda adaptar y ser reconocidos), 3) hidrofiliidad (para ser usados en fase acuosa) y 4) que estén presentes en la superficie de la molécula (para ser accesibles y fácilmente reconocidos). De los 401 péptidos iniciales, 111 péptidos de 20 proteínas cumplieron los criterios antes mencionados. Además, este análisis arrojó péptidos candidato en un rango de 1 a 309 aa, lo que dificultaba la selección de péptidos de 15 a 18 aa, que son los ideales para el reconocimiento por el sistema inmune. Actualmente no existen algoritmos que permitan el diseño *in silico* de péptidos del tamaño que se necesitaban a partir de los epítomos identificados. Además, de que el elevado número de péptidos que resultarían de cada epítomo de tamaño grande requeriría de estrategias a gran escala que tienen un alto costo y que no están a nuestro alcance. Por lo tanto, optamos por una estrategia no ortodoxa, que permite el diseño *in silico* de péptidos del tamaño deseado a partir de los epítomos identificados y que se ha probado con éxito en otro grupo de investigación con organismos intracelulares (Dzul-Rosado et al., 2020). Por ejemplo, se ha obtenido una eficiencia en el desempeño de péptidos identificados con este algoritmo, en muestras serológicas positivas a *Rickettsia* (95%), *Enrlichia* (95%), Virus Dengue (75%), Chikunguya (75%) y Zika (95%) (comunicación personal).

En esta estrategia se consideran los epítomos lineales obtenido en Lc B más el análisis de Lc T, mediante los servidores NETMCHII pan 4.0, para predecir los péptidos de la clase MHCII considerando los alelos más frecuentes en la población mexicana. Cabe mencionar, que como nuestro objetivo es otro, en este trabajo no realizaremos ensayo de activación de Lc CD4 y CD8.

Para determinar los alelos más frecuentes en la población mexicana se realizó la búsqueda en la literatura sobre los haplotipos de MHC I y MHC II más frecuentes en mexicanos los cuales se muestran en la **Tabla 5** (R. Barquera et al., 2008; R. Barquera & Granados, 2013; R. L. Barquera, 2012; De Leo et al., 1997; González-Quezada et al., 2019; Vargas-Alarcón et al., 2010; Zúñiga et al., 2013), encontrando un artículo donde reportan los alelos DRB1*04, DRB1*16, A*01, A*02 como de riesgo y A*68 y B*39 como alelos de protección en mexicanos con ECh (Cruz-Robles et al., 2004; Villanueva-Lizama et al., 2018). Cabe aclarar que no se encontraron reportes de MHCII DP en población mexicana.

Tabla 5. Alelos más frecuentes en población mexicana.				
MHC II - DR	MHC II - DQ	MHC I - A	MHC I - B	MHC I - C
DRB1*01:01	DQA1*01:01	A*01:01 [#]	B*07:02	C03:04
DRB1*03:01	DQA1*03:01	A*02:01 [#]	B*15:01	C03:05
DRB1*04:01 [#]	DQA1*05:01	A*03:01	B*35:12	C03:06
DRB1*04:02 [#]	DQA1*05:05	A*24:02	B*40:02	C07:02
DRB1*04:04 [#]	DQB1*02:01	A*68:03 [#]	B*39:01 [#]	C15:09
DRB1*04:05 [#]	DQB1*03:01		B*48:01	
DRB1*07:01	DQB1*03:02		B*51:02	
DRB1*08:02	DQB1*04:02			
DRB1*09:01				
DRB1*11:01				
DRB1*13:02				
DRB1*15:01				

[#]Alelos reportados en pacientes chagasicos mexicanos (Cruz-Robles et al., 2004, Villanueva-Lizama et al., 2018)
Fuente: De Leo et al., 1997; Barquera et al., 2008; Vargas-Alarcón et al., 2010; Barquera et al., 2012; Barquera et al., 2013; Zúñiga et al., 2013 González-Quezada et al., 2019

Con esta información se procedió a la predicción de los péptidos de clase MHC I con la plataforma NetMHCpan 4.1 y clase MHC II con la plataforma NetMHCIIpan 4.0 de las secuencias en estudio, considerando los alelos más frecuentes de la población mexicana antes mencionados; seleccionando aquellos péptidos que

tuvieran un nivel de unión alto, analizando los péptidos por MHC II DR, MHC II DQ y MHC I (A, B y C) como se muestra en la **Figura 11**.

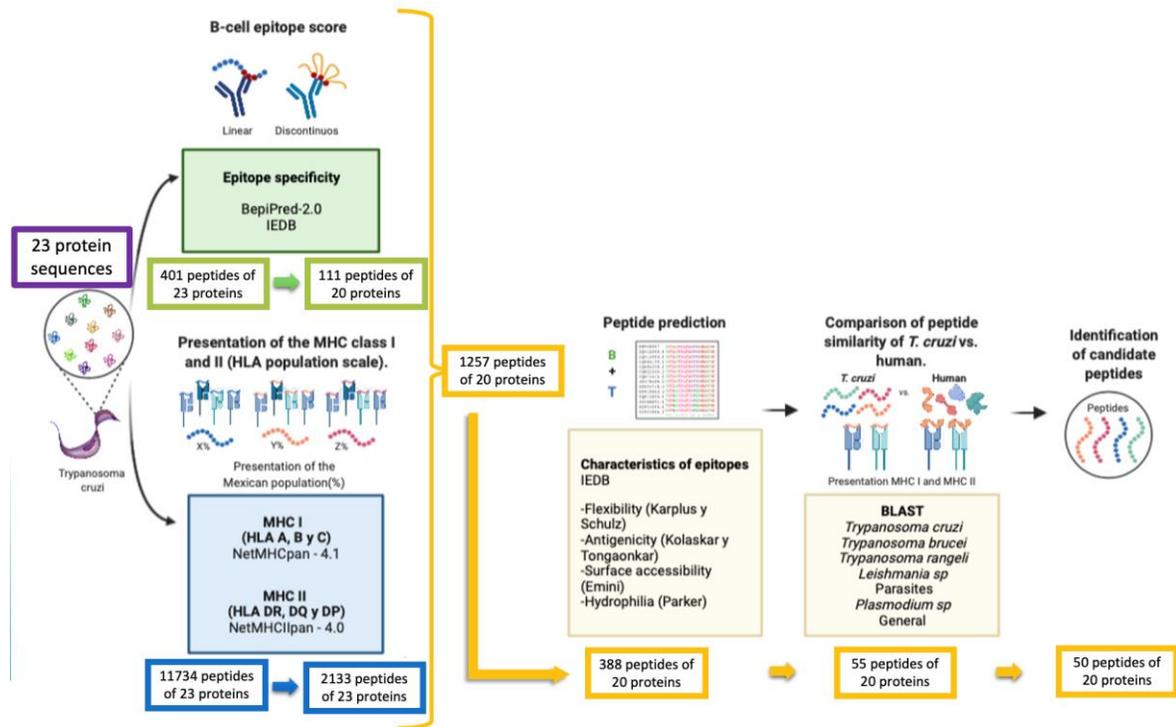


Figura 11. Identificación de péptidos antigénicos. Se muestra la cantidad de péptidos obtenidos de las 23 secuencias proteicas en cada paso del análisis separado en MHC II DR, DQ y MHC I.

Como resultado al aplicar esta estrategia *in silico*, se analizaron las secuencias de las 23 proteínas para la predicción de epítomos en Lc B como se mencionó anteriormente, considerando de 401 péptidos la selección de los 111 péptidos de 20 proteínas que presentan las mejores características.

Posteriormente, se analizaron las 23 secuencias proteicas (Q4DJ00, Q4DX97, Q4CY87, Q4DCW0, Q4E046, Q4D4I2, Q4E2A9 Q4E4W8, Q4CRX2, Q4CPF0, Q4D9H3, Q4D7V1, Q4CQ28, Q4D2C9, Q4DC56, Q4DYC3, Q4CXJ6, Q4DLI2, Q4E2E3, Q4CL09, Q4DAT6, Q4E5H7 y Q4E2M9) para la predicción de péptidos considerando MHC I y MHC II con los alelos más frecuentes en población mexicana. Se identificaron 11,734 péptidos, de los cuales se seleccionaron aquellos que fueran reconocidos por MHC I y MHC II quedándonos con 2,133 péptidos de 23 proteínas.

De estos grupos, se seleccionaron aquellos péptidos que podrían ser reconocidos por Lc B y Lc T quedándonos con 1257 péptidos de 20 proteínas. Se consideraron sus características de flexibilidad, antigenicidad, accesibilidad e hidrofilia, obteniendo 388 péptidos de 20 proteínas. Se analizaron mediante BLAST seleccionando las secuencias no homologas, quedándonos con 55 péptidos de 20 proteínas y seleccionándose al final los 50 péptidos que cumplían con todas las características mencionadas como se muestra en la **Figura 12**.

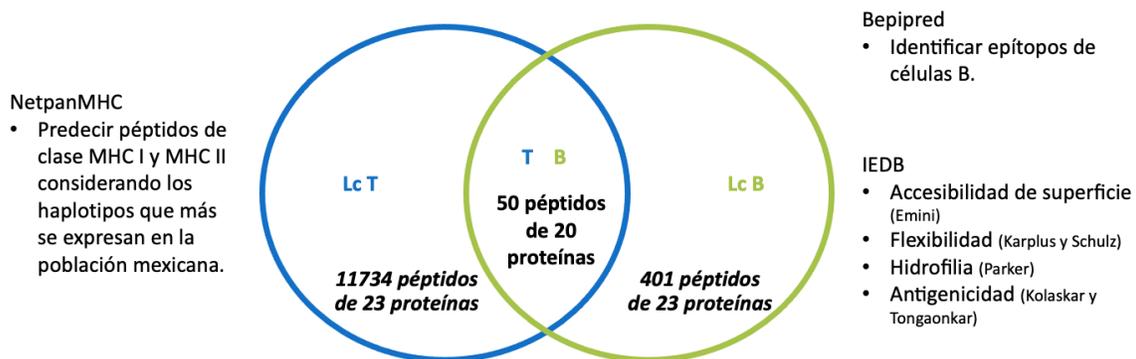


Figura 12. Selección de péptidos candidato a través de un diagrama de Venn. Se realizó el análisis de los péptidos identificados de Lc T (círculo en azul) y Lc B (círculos en verde), de los cuales se seleccionaron aquellos péptidos que podrían ser reconocidos por ambos tipos de linfocitos (Intersección entre azul y verde). Dentro de cada círculo e intersección se muestra el número de péptidos identificados y de cuantas proteínas candidato provienen. Del lado izquierdo del diagrama de Venn, se describen las características utilizadas para la selección de los péptidos reconocidos por Lc T. A la de recha del diagrama de Venn, se describen las características utilizadas para la selección de los péptidos reconocidos por Lc B.

A partir de estos 50 candidatos (**Apéndice 1**), se seleccionaron 28 péptidos de las 23 proteínas (**Tabla 6**) los cuales presentaron los mejores valores en cada característica analizada, para proceder a realizar la comprobación experimental de la inmunogenicidad de estos péptidos con sueros positivos y negativos a *T. cruzi* por el ensayo de ELISA.

Tabla 6. Péptidos candidatos seleccionados con los scores más altos							
ID proteína	Proteína	Posición inicial	Posición final	Péptido	Núcleo	Tamaño	Alelos
3	Q4E046	106	123	SIEEPIEHVKTVTSNEHD	IEHVKTVTS	18	17
4	Q4E4W8	118	133	ASPLPSSSSAASALQG	PSSSSAASA	16	6
4	Q4E4W8	138	154	SPGAAPESVKPPQTDVP	PESVKPPQT	17	5
4	Q4E4W8	194	208	RPAVNATSIPTATQG	VNATSIPTA	15	5
5	Q4DYC3	225	239	KEMIKSVMPPSSAA	IKSVMPPPS	15	4
6	Q4CXJ6	255	271	VTKPLRPVEDMPFAKDL	LRPVEDMPF	17	12
8	Q4DX97	237	253	CSYLGFAFYDTADRAIFD	FAYDTADRA	17	5
9	Q4DJ00	148	164	DTAIVQAVIPPLPEEEL	IVQAVIPPL	17	9
10	Q4E2A9	30	47	AEVVEIPAGGKGAVGSTG	PAGGKGAVG	18	8
11	Q4CQ28	317	331	VAMDYVYQQSRNMRR	YVYQQSRNM	15	6
12	Q4DAT6	78	94	CVLEPVSDDDIAAYDGT	PVSDDDIAA	17	10
12	Q4DAT6	432	449	PGSSPFGAGASAGASAGA	PFGAGASAG	18	6
13	Q4CRX2	450	467	STAATVADGISHTVWGGT	VADGISHTV	18	6
13	Q4CRX2	297	314	QLEDDVRLSSIPREDVTE	VRLSSIPRE	18	7
13	Q4CRX2	378	395	SAPAAESGPAVPSAPADP	AESGPAVPS	18	4
14	Q4E5H7	406	420	GAEYHEYQTNATLLA	YHEYQTNAT	15	2
15	Q4E2M9	10	27	TVHLNESNAAPANTSMAV	LNESNAAPA	18	5
16	Q4DC56	123	137	FRRYARWVEENV SFD	YARWVEENV	15	5
17	Q4E2E3	25	39	VPLTQAGGSPSVSRA	TQAGGSPSV	15	8
18	Q4DLI2	94	109	HRYGPN SFKLHRLPLP	PNSFKLHRL	16	10
19	Q4D9H3	36	51	ESVELFTPGKTSLSDE	FTPGKTSLS	16	7
19	Q4D9H3	707	722	ATRPPQDVSVDRETSS	PQDVSVDRE	16	4
20	Q4D2C9	303	320	RADVPIRSTKALRIRARV	IRSTKALRI	18	5
21	Q4DCW0	408	425	PQVSVSSFAEVTAA PSEF	VSVSSFAEV	18	5
22	Q4CY87	16	33	FSAQRSPASVLEDPLAQQ	PASVLEDPL	18	5
22	Q4CY87	396	410	VAHQNAGDVAIEVKD	QNAGDVAIE	15	7
22	Q4CY87	412	429	PRILVDQSSPHADGHSVL	LVDQSSPHA	18	6
23	Q4D7V1	3935	3952	QETELVPNGGHVAVTNAN	PNGGHVAVT	18	26

Núcleo: Epítipo con potencial reconocimiento de T.

También, se analizó si los péptidos previamente predichos para la proteína 6 (**Figura 13**) y 15 (**Figura 14**), se encontraban estructuralmente accesibles. Este análisis de los modelos de las estructuras 3D, mostró que el péptido VTKPLRPVEDMPFAKDL de la proteína 6 y el péptido TVHLNESNAAPANTSMAV en la proteína 15, se encuentran en la superficie y accesibles para su reconocimiento.

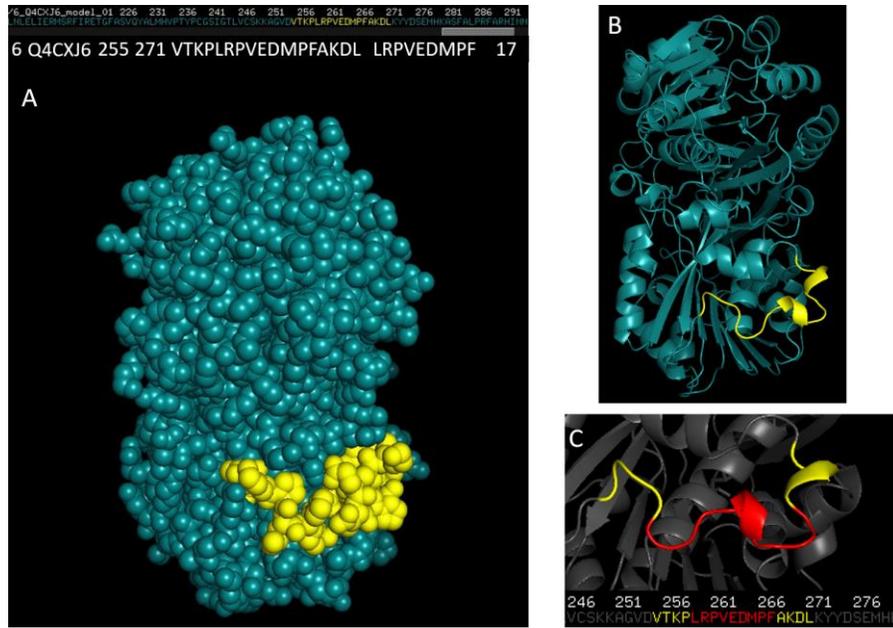


Figura 13 Localización del péptido VTKPLRPVEDMPFAKDL en la proteína 6. A y B) Muestra la localización del péptido VTKPLRPVEDMPFAKDL predicho para la proteína 6 espermidina sintetasa de *T. cruzi*, mostrando que se encuentra en la superficie y accesible para su reconocimiento. C) Se muestra en rojo el núcleo del péptido y en amarillo las secuencias que lo flanquean mostrando que el péptido está en los sitios de unión entre las hélices alfa y beta que corresponden a secuencias flexibles.

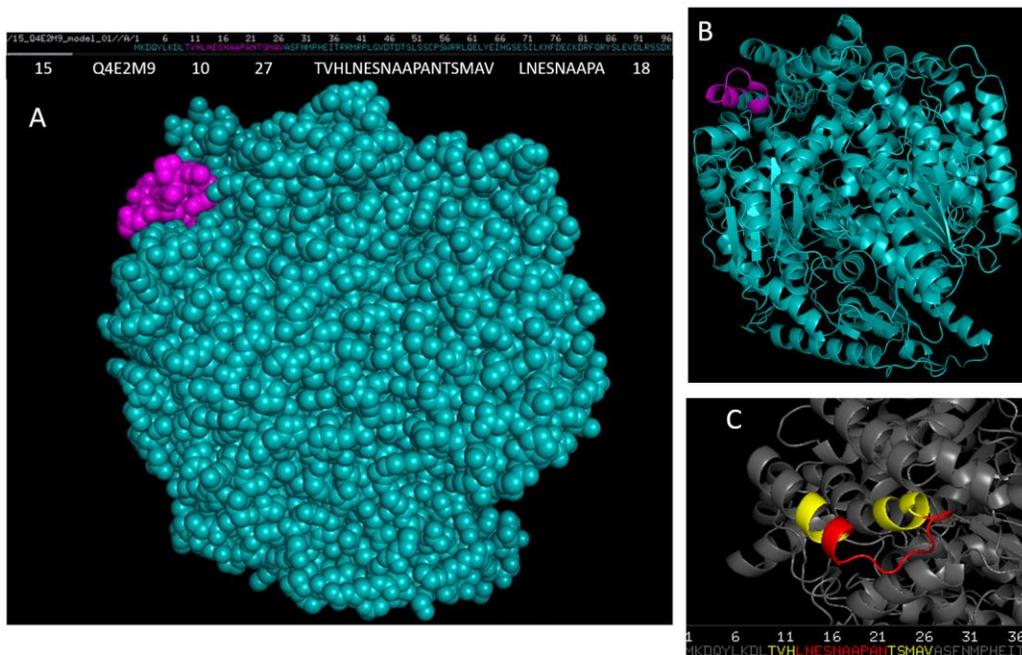


Figura 14. Localización del péptido TVHLNESNAAPANTSMAV en la proteína 15. A y B) Muestra la localización del péptido TVHLNESNAAPANTSMAV predicho para la proteína 15 glucosa 6 fosfato isomerasa de *T. cruzi*, mostrando que se encuentra en la superficie y accesible para su reconocimiento. C) Se muestra en rojo el núcleo del péptido y en amarillo las secuencias que lo flanquean mostrando que el péptido está en los sitios de unión entre las hélices alfa y beta que corresponden a secuencias flexibles.

Estos resultados apoyan la posibilidad de que la estrategia *in silico* utilizada para la identificación, cribado y selección de los péptidos predichos podría tener posibilidades de éxito.

3.1.3 Búsqueda, selección y evaluación de péptidos antigénicos a *T. cruzi* reportados en la literatura

Se realizó la búsqueda de péptidos reportados en la literatura, que mostraran capacidad de reconocimiento con sueros positivos a *T. cruzi*, pero a la fecha no encontramos reportes de péptidos que hubieran sido identificados a partir de antígenos de cepas circulantes en México, ni que hayan sido evaluados con sueros de personas infectadas con el parásito provenientes de población mexicana. Tampoco encontramos ningún reporte en que se evaluaran péptidos identificados a partir de cepas TcI. Se encontraron 28 péptidos que fueron identificados a partir de cepas aisladas en diferentes países endémicos de América del Sur que mostraron niveles variables de sensibilidad y especificidad, al ser evaluados con un diferente número de sueros. Estos péptidos, se identificaron de las cepas CL Brener (Tc VI, originaria de Brasil), Tulahuen (TcVI, originaria de Chile) e Y (Tc II, originaria de Brasil). En la **Tabla 7**, se muestran los péptidos encontrados, los cuales organizamos en tres grupos de acuerdo con el grado de reconocimiento que mostraron a sueros positivos a *T. cruzi* en: 1) con mejor reconocimiento (mayor de 90% de reconocimiento de color verde) en donde se encontraron siete péptidos y dos péptidos quiméricos, 2) regular reconocimiento (amarillo) encontrando seis péptidos y 3) bajo o nulo reconocimiento (rojo) encontrando catorce péptidos.

Tabla 7. Péptidos antigénicos identificados mediante en análisis de la literatura						
Antígeno	Cepa	DTU	Función	Sueros (positivos / negativos / otros organismos)	Mejor reconocimiento	Referencia
Tripeptido PEP-2/TcD/TcE	Tulahuen	TcVI	Tripéptido	239/35/8	99.6% Sensibilidad y 99.33% Especificidad	Houghton et al., 1999
Tetrapeptido (PEP-2/TcD/TcE/Lo1.2)	Tulahuen	TcVI	Tetrapéptido	71/10/80	100% sensibilidad, 92.5% especificidad	Houghton et al., 2000
Péptido 2 (PEP2)	Tulahuen	Tc VI	Proteína de superficie de Tripomastigote	142/81/37	PEP2 91.6%, TCD+PEP2 99.4% Sensibilidad	Peralta et al., 1994

Antígeno TcE	Tulahuen	Tc VI	Proteína ribosomal P	239/35/8	99% Sensibilidad	Houghton et al., 1999
Epítipo TcLo1.2	Tulahuen	Tc VI	Familia trans-sialidasa	239/35/8	99% Sensibilidad	Houghton et al., 1999
Péptido TcD	Tulahuen	Tc VI	Familia trans-sialidasa	120/39/32	96.7% sensibilidad	Burns et al., 1992
Péptido TcD	Tulahuen	Tc VI	Familia trans-sialidasa	142/81/37	93.8% Sensibilidad TCD+PEP2 99.4% Sensibilidad	Peralta et al., 1994
Péptido C6_30	CL Brener	Tc VI	Familia trans-sialidasa	66/24/28	92.70%	De Oliveira et al., 2013
Péptido B2_30_y	CL Brener	Tc VI	Familia trans-sialidasa	66/24/28	92.60%	De Oliveira et al., 2013
Quimera RP1-RP2-RP5	CL Brener, Tulahuen, Y	TcII y TcVI	Quimera	140/164/15	52%	Camussone et al., 2009
Quimera RP1-RP2	CL Brener, Tulahuen	Tc VI	Quimera	140/164/15	25%	Camussone et al., 2009
Péptido 17	CL Brener	Tc VI	SAPA	20/20/17	Mejor inmunoreactividad	Hernández-Marín et al., 2002
Péptido repetitivo 1	CL Brener	Tc VI	Proteína asociada a citoesqueleto	140/164/15	Inmunoreactivo	Camussone et al., 2009
Antígeno B13 o Péptido repetitivo 5	Y	Tc II	Proteína de superficie de Tripomastigote	140/164/15	Inmunoreactivo	Camussone et al., 2009
Péptido repetitivo 2	Tulahuen	Tc VI	Familia trans-sialidasa	140/164/15	Inmunoreactivo	Camussone et al., 2009
Antígeno R13	CL Brener	Tc VI	Péptido de proteína ribosomal P	15/04/2010	R13para cardiopatía Chagasica	Kaplan et al., 1997
Péptido A6_30_col	CL Brener	Tc VI	Familia trans-sialidasa	66/24/28	Reconocimiento de TcI	De Oliveira et al., 2013
Péptido 18	CL Brener	Tc VI	SAPA	20/20/17	Baja inmunoreactividad	Hernández-Marín et al., 2002
Péptido B9_30_cl	CL Brener	Tc VI	Familia trans-sialidasa	66/24/28	Menor reconocimiento	De Oliveira et al., 2013
Péptido H13	CL Brener	Tc VI	Péptido de proteína ribosomal P	15/04/2010	No útil	Kaplan et al., 1997
Péptido R11	CL Brener	Tc VI	Péptido de proteína ribosomal P	15/04/2010	No útil	Kaplan et al., 1997
Péptido IE	CL Brener	Tc VI	Péptido de proteína ribosomal P	15/04/2010	No útil	Kaplan et al., 1997
Péptido C10	CL Brener	Tc VI	Péptido de proteína ribosomal P	15/04/2010	No útil	Kaplan et al., 1997
Péptido C7	CL Brener	Tc VI	Péptido de proteína ribosomal P	15/04/2010	No útil	Kaplan et al., 1997
Péptido P0B	CL Brener	Tc VI	Péptido de proteína ribosomal P	15/04/2010	No útil	Kaplan et al., 1997
Péptido H26R	CL Brener	Tc VI	Péptido de proteína ribosomal P	15/04/2010	No útil	Kaplan et al., 1997
Péptido TMVP	CL Brener	Tc VI	Péptido de proteína ribosomal P	15/04/2010	No útil	Kaplan et al., 1997
Péptido repetitivo 4	CL Brener	Tc VI	Antígeno citoplasmático	140/164/15	No útil	Camussone et al., 2009
Péptido repetitivo 3	Tulahuen	Tc VI	Proteína asociada a microtúbulo	140/164/15	No útil	Camussone et al., 2009

Colores corresponden al nivel de reconocimiento reportados por los autores: Mejor reconocimiento (Mayor de 90% de reconocimiento de color verde), regular reconocimiento (amarillo) y aquellos reportados con bajo o nulo reconocimiento (rojo)

Todos los péptidos fueron analizados, seleccionando a PEP2 (21 aa), TcE (21 aa) y TcD (15 aa) para utilizar en este trabajo, ya que mostraron los mejores niveles de sensibilidad y especificidad en el reconocimiento de sueros positivos a *T. cruzi* (**Tabla 8**). Estos péptidos tuvieron la característica común de ser diseñados a partir de secuencias repetidas de una proteína de superficie de tripomastigotes (PEP2), una proteína ribosomal (TcE) y otra proteína transialidasas de tripomastigotes (TcD), identificadas en todos los casos de la cepa Tulahuen, que como se mencionó anteriormente, pertenece al DTU TcVI y fue aislada en Chile. Estos péptidos se mandaron sintetizar y los evaluamos experimentalmente con sueros caracterizados positivos y negativos a *T. cruzi* provenientes de diferentes zonas endémicas de la ECh en México, como se describe más adelante.

Tabla 8. Péptidos seleccionados reportados en la literatura.			
Péptido	PEP2	TcE	TcD
Secuencia	GDKPSPFQAAAGDKPSPFGQA	KAAIAPAKAAAAPAKAATAPA	AEPKSAEPKSPAEPKSGCG
Tamaño	21 aa	21 aa	15 aa
Características	Sintetizado a partir de una repetición de una proteína de superficie de tripomastigotes.	Sintetizado a partir de unidades de repetición de una proteína ribosomal de tripomastigote de <i>T. cruzi</i>	Sintetizado a partir de unidades de repetición de Transialidasas de la superficie de tripomastigotes.
Cepa (DTU)	Tulahuen (TcVI)	Tulahuen (TcVI)	Tulahuen (TcVI)
Sensibilidad	91.6%	99%	40%
Especificidad	98%	93.8%	97%
Referencia	(Peralta et al., 1994)	(Houghton et al., 1999)	(Burns et al., 1992)

Como control negativo, utilizamos un péptido no relacionado con *T. cruzi*, denominado DENV1 el cual fue donado por el Dr. Cesar Lugo Caballero de la UADY. Este péptido con secuencia: LKATLLAVSGVYPMSIPATLFWYFWQKKKQRS, consta de 33 aa de la posición 1445-1476 de la secuencia proteica de NS2b del virus del Dengue 1. Cabe mencionar que su identificación se realizó siguiendo el mismo protocolo que se ha utilizado en este trabajo de investigación, con muy buenos resultados de reconocimiento de sueros positivos a dengue. Dicho péptido se analizó mediante BLAST para corroborar que no presentara similitud con secuencias de *T. cruzi*, otros tripanosomátidos, otros parásitos y otros organismos

en general. Como era esperado solo se encontró homología con la secuencia del virus del Dengue 1. Como control negativo también se utilizó únicamente PBS, correspondiendo al control sin péptido. Los 28 péptidos candidato y los péptidos reportados en la literatura usados en este trabajo se sintetizaron en Peptide 2.0 Inc (<https://www.peptide2.com/>).

3.1.4 Estandarización de las condiciones para los ensayos de ELISA

3.1.4.1 Sueros caracterizados positivos y negativos utilizados

Para llevar a cabo el análisis de los péptidos antigénicos locales y reportados en la literatura, así como, de los extractos totales de proteínas de las cepas aisladas en Oaxaca, se obtuvieron sueros: 1) de la misma zona endémica de los aislados provenientes del centro estatal de transfusión sanguínea de Oaxaca y del laboratorio de *T. cruzi* de la UABJO y 2) de otras zonas endémicas de la ECh en México, provenientes del InDRE (**Tabla 9**).

Tabla 9. Información general de los sueros utilizados.		
Origen de los sueros	Cantidad	Pruebas realizadas
Centro Estatal de la transfusión Sanguínea de Oaxaca y del laboratorio de <i>T. cruzi</i> de la UABJO	60 positivos 45 negativos	<ul style="list-style-type: none"> • ChagaTest III • ELISA casero InDRE • IFI InDRE • Western blot con extracto total de epimastigotes • Amplificación de secuencia C6 especie-específica de <i>T. cruzi</i>. • Amplificación de secuencia ir-miniexon especie-específica de <i>T. cruzi</i>.
InDRE	75 positivos 52 negativos	<ul style="list-style-type: none"> • IFI-InDRE • ELISA-InDRE • Chagatest ELISA recombinante V4.0 • Chagatest ELISA lisado • Chagatest HAI

Todos los sueros utilizados fueron caracterizados con mínimo 3 pruebas de acuerdo con el algoritmo diagnóstico de la Secretaría de Salud.

3.1.4.2 Establecimiento de condiciones para la técnica de ELISA con péptidos reportados en la literatura

Con el objetivo de establecer las condiciones adecuadas para el análisis de los péptidos, estas se establecieron utilizando los péptidos identificados en la literatura. Para ello utilizamos placas de alta adherencia, bloqueamos con BSA y probamos diferentes concentraciones del antígeno, y diferentes diluciones de suero positivo y negativo de Oaxaca y anticuerpo (Ab) secundario, como sigue:

- Concentración del antígeno (3, 5, 7, 10 ug/ml)
- Titulación de Ab secundario (1:625, 1:1250, 1:2500, 1:5000, 1:10000, 1:20000, 1:30000, 1:40000, 1:50000, 1:60000, 1:70000)
- Dilución del suero (1:20, 1:50, 1:100, 1:200)

Para ello, consideramos las condiciones reportadas en la literatura de los péptidos seleccionados PEP2, TcE y TcD (Burns et al., 1992; Camussone et al., 2009; De Oliveira Mendes et al., 2013; Hernández-Marín et al., 2003; Houghton et al., 2000, 1999; Kaplan et al., 1997; Peralta et al., 1994).

Titulamos primero el Ab secundario, utilizando 5ug/ml de péptido y una dilución de 1:50 de un suero positivo (P4) y de un suero negativo (N2), que son las condiciones que habían sido reportadas (**Figura 15**). Los resultados mostraron que el péptido PEP2 mostró reconocimiento con el suero positivo P4 de manera creciente a partir de la dilución 1:30000 del Ab secundario, alcanzando su máximo a la dilución 1:5000. Del mismo modo el péptido TcE mostró reconocimiento con el suero P4 desde una dilución 1:70000 del Ab secundario alcanzando su máximo a la dilución 1:5000. Por el contrario, el péptido TcD no presentó reconocimiento con el suero positivo P4 a ninguna dilución del Ab secundario. Como era esperado, los tres péptidos probados no mostraron reconocimiento con el suero negativo N2.

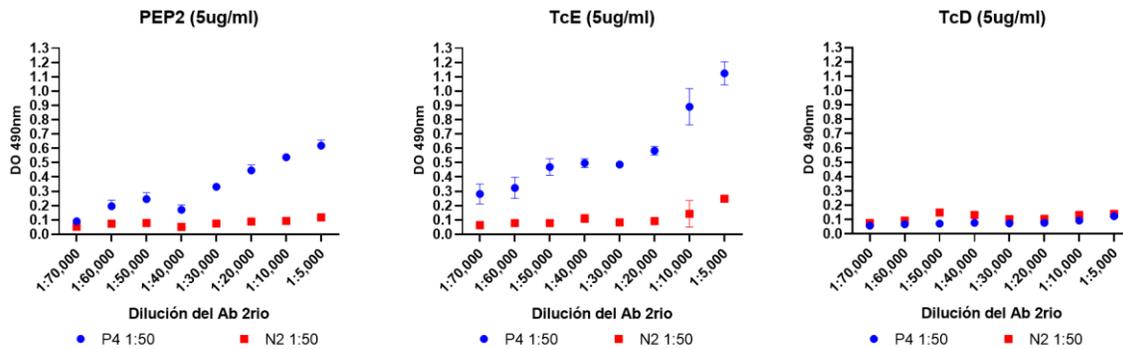


Figura 15 Titulación de anticuerpo secundario para péptidos reportados en la literatura. Concentración de antígeno 5ug/ml, Dilución de anticuerpo primario 1:50. Los resultados son el promedio de tres repeticiones \pm SEM.

Como a ninguna de las diluciones del Ab secundario se observó la meseta del reconocimiento del péptido, procedimos a realizar el análisis de los dos péptidos que mostraron los mejores resultados PEP2 y TcE, con diluciones menores del Ab secundario (1:5000, 1:2500, 1:1250 y 1:625) y utilizando 2 sueros positivos y 4 sueros negativos (**Figura 16**). Los resultados mostraron que PEP2 fue reconocido nuevamente con el suero P4, pero no así con P6. El péptido TcE también fue reconocido por el suero positivo P4, además del P6. Con ambos péptidos se observó un cambio de pendiente a las diferentes diluciones, sugiriendo que la dilución adecuada del Ab secundario para los siguientes experimentos es 1:5000. Nuevamente como era esperado, con ambos péptidos PEP2 y TcE no se obtuvo reconocimiento con los sueros negativos a *T. cruzi* N1, N2, N4 y N6. Estos resultados, no solo establecieron la dilución adecuada del Ab secundario para los experimentos posteriores, sino que también mostraron que los péptidos de manera individual no suelen ser reconocidos por los diferentes sueros positivos al parásito, como se ha observado en otros trabajos.

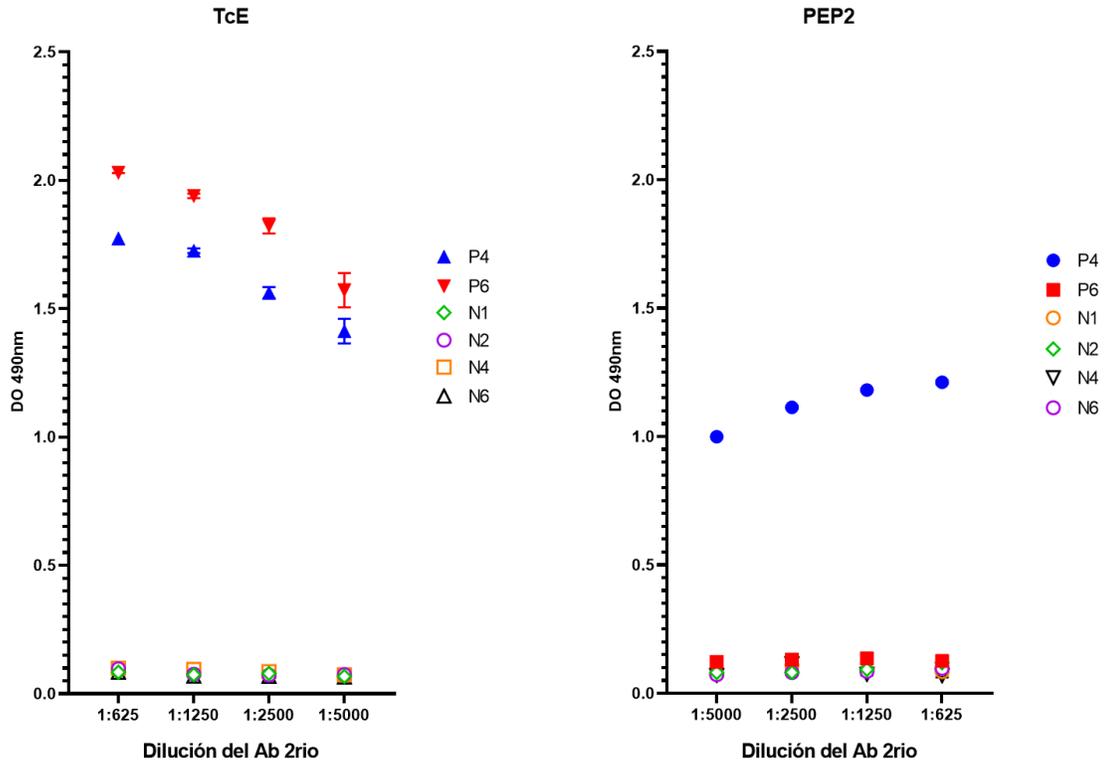


Figura 16 Titulación de anticuerpo secundario para PEP2 y TcE. Concentración del péptido 5ug/ml, dilución del suero 1:50. Los resultados son el promedio de tres repeticiones \pm SEM.

Ya titulado el Ab secundario, se procedió a establecer la mejor concentración de péptido a utilizar y la titulación del Ab primario (sueros reactivos al parásito). Probamos 3, 5, 7 y 10 ug/ml de los péptidos PEP2 y TcE, diluciones 1:20, 1:50, 1:100 y 1:200 de un suero altamente reactivo (P4) y un suero negativo (N2). En todos los casos se utilizó el Ab secundario a una dilución 1:5000. Como se muestra en la **Figura 17**, los resultados mostraron que 5 ug/ml de péptido, una dilución del suero 1:50 y una dilución de anticuerpo secundario 1:5,000 son las mejores condiciones para realizar los siguientes experimentos con los péptidos identificados en este trabajo. Como era esperado en ninguna de las condiciones se observó reconocimiento con el suero negativo N2. Cabe mencionar que aun cuando otras de las condiciones probadas dieron buenos resultados y serían factibles de utilizar, consideramos también las condiciones reportadas en la literatura (5 ug/ml de péptido, una dilución del suero 1:50) que nuestros resultados corroboraron y que

permite tener resultados comparables a los ya reportados para los péptidos identificados en la literatura.

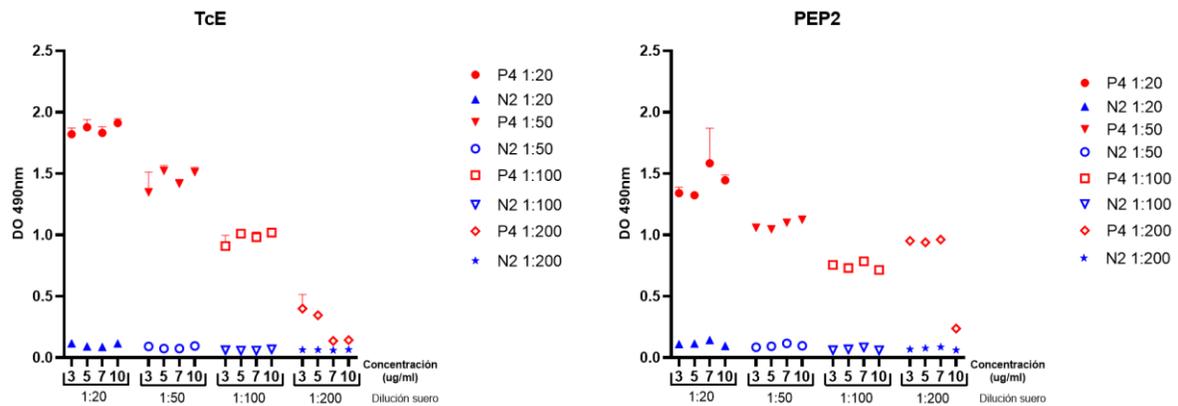


Figura 17. Establecimiento de concentración del antígeno y dilución del suero para péptidos PEP2 y TcE. Anticuerpo secundario 1:5,000. Se analizó el anticuerpo primario a una dilución 1:20, 1:50, 1:100 y 1:200 y la concentración de péptidos de 3, 5, 7 y 10ug/ml. Los resultados son el promedio de tres repeticiones \pm SEM.

3.1.5 Evaluación de los péptidos antigénicos identificados en este trabajo mediante la técnica de ELISA, con sueros caracterizados positivos y negativos al parásito de diferentes zonas endémicas de la ECh en México

Una vez establecidas todas las condiciones necesarias para el análisis de péptidos por técnica de ELISA, se procedió a realizar el análisis de los péptidos antigénicos identificados en este trabajo de investigación. Para ello, se analizaron los péptidos tanto de manera individual como en grupos y se utilizaron sueros caracterizados positivos y negativos a *T. cruzi* provenientes de las mismas zonas endémicas de donde fueron obtenidas las cepas utilizadas para su identificación, así como de diferentes zonas endémicas de otros lugares de México.

3.1.5.1 Análisis de péptidos antigénicos locales por la técnica de ELISA, con sueros positivos y negativos a *T. cruzi* provenientes de las mismas zonas endémicas de donde se aislaron las cepas usadas para su identificación

Utilizando las condiciones previamente establecidas (5 ug/ml de péptido, suero 1:50 y anticuerpo secundario 1:5,000) se procedió a analizar los 28 péptidos candidatos identificados en este trabajo, utilizando 4 sueros positivos (P4, P6, P10 y P14) a 6

pruebas aplicadas (Tabla 9), 4 sueros positivos (P15, P21, P11, P20) a 5 de seis pruebas aplicadas (Tabla9) y 3 sueros negativos (N1, N2, N4), todos ellos provenientes de Oaxaca, que es el lugar de donde se aislaron las cepas del parásito utilizadas para la identificación de los péptidos. Además, se incluyeron los péptidos reportados en la literatura PEP2, TcE y TcD, y un péptido no relacionado antigénicamente a *T. cruzi* DENV1, como control negativo. Los valores de corte fueron calculados a partir del promedio de los sueros negativos \pm dos desviaciones estándar.

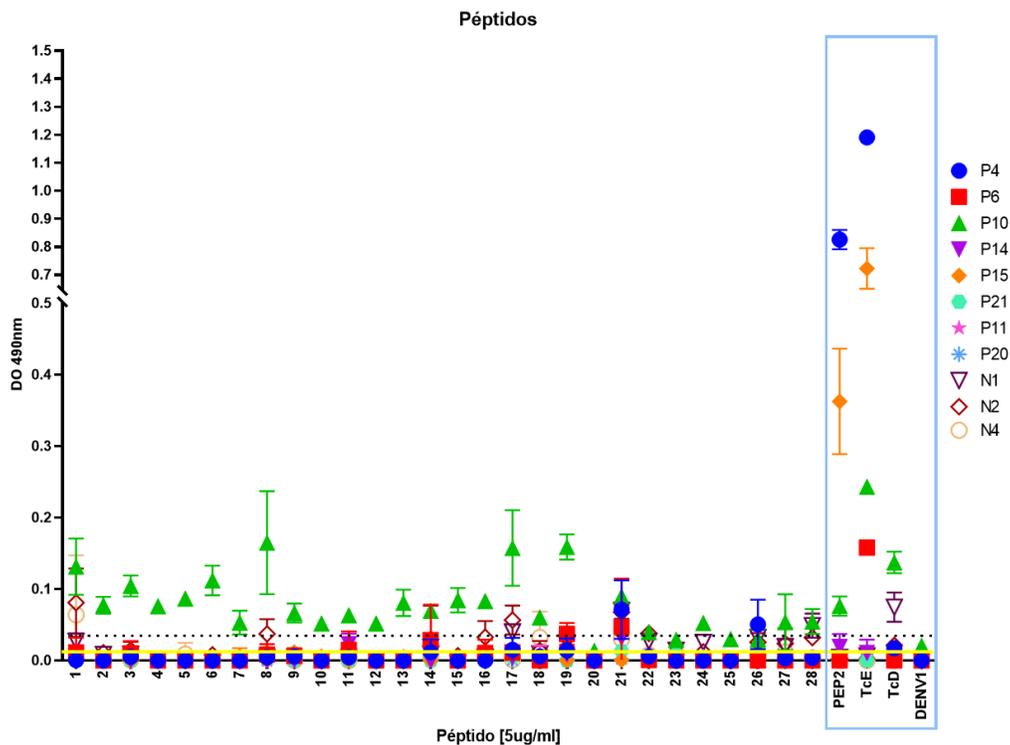


Figura 18 Análisis de péptidos candidatos (1-28), los péptidos reportados en la literatura (PEP2, TcE, TcD) y un péptido no relacionado DENV1. Los péptidos fueron evaluados con sueros determinados previamente como sueros altamente positivos (P4, P6, P10 y P14), sueros medianamente positivos (P15, P21, P11, P20) y sueros negativos (N1, N2, N4). Valor de corte (línea punteada). En el cuadro azul se muestran los resultados con los péptidos reportados en la literatura (PEP2, TcE y TcD) y el péptido no relacionado antigénicamente (DENV1). Las condiciones utilizadas fueron 5 ug/ml de péptido, suero 1:50 y anticuerpo secundario 1:5,000. Los resultados son el promedio de tres repeticiones \pm SEM.

Como se observa en la **Figura 18**, el suero P10 fue el único reconocido por múltiples péptidos candidatos (1,2,3,4,5,6,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,21, 26 y 28). Respecto a los péptidos reportados en la literatura, PEP2 presento reconocimiento con los sueros P4, P15 y P10, mientras que el péptido TcE presento las densidades

ópticas más altas con los mismos sueros que PEP2 (P4, P15 y P10), además del suero P6. En el caso del péptido TcD, únicamente presento reconocimiento con el suero P10. Con los sueros negativos N2 y N4 el péptido 1 presentó reactividad, así como el N2 con el péptido 17 y N1 con el péptido 28. Como era esperado el péptido no relacionado antigénicamente DENV1, no fue reconocido por ninguno de los sueros positivos (P4, P6, P10, P14, P15, P21, P11y P20) ni negativos (N1, N2, N4) utilizados, confirmando que es un buen control negativo.

3.1.5.2 Análisis de combinación de péptidos antigénicos locales por la técnica de ELISA, con sueros positivos y negativos a *T. cruzi* provenientes de las mismas zonas endémicas de donde se aislaron las cepas del parásito utilizadas para su identificación

Ya que es poco probable que un único péptido sea reconocido por todos los sueros, se evaluaron los péptidos que mostraron el mejor reconocimiento en el experimento anterior (péptidos 1, 3, 8, 11, 14, 17, 19, 21 y 26), realizando todas las posibles combinaciones en dúos. Para ello se colocó a partes iguales dos péptidos para obtener en conjunto 5mg/ml. Utilizando las mismas condiciones del experimento anterior (5 ug/ml de péptido, suero 1:50 y anticuerpo secundario 1:5,000) y los mismos sueros positivos y negativos. Para mayor facilidad en su interpretación, los resultados se analizaron y muestran en una gráfica de calor (**Figura 19**). En este análisis, se observó un patrón heterogéneo de reconocimiento, siendo las combinaciones con los péptidos 1 y 8 las que tuvieron menores densidades ópticas, mientras que la combinación de 14-21 y 11-14 obtuvieron las densidades ópticas más altas (0.917 con P10 y 1.371 con P15 respectivamente). No obstante, en estas combinaciones y en varios otros dúos, se observa un aumento de las densidades ópticas con los sueros negativos, indicando falsos positivos.

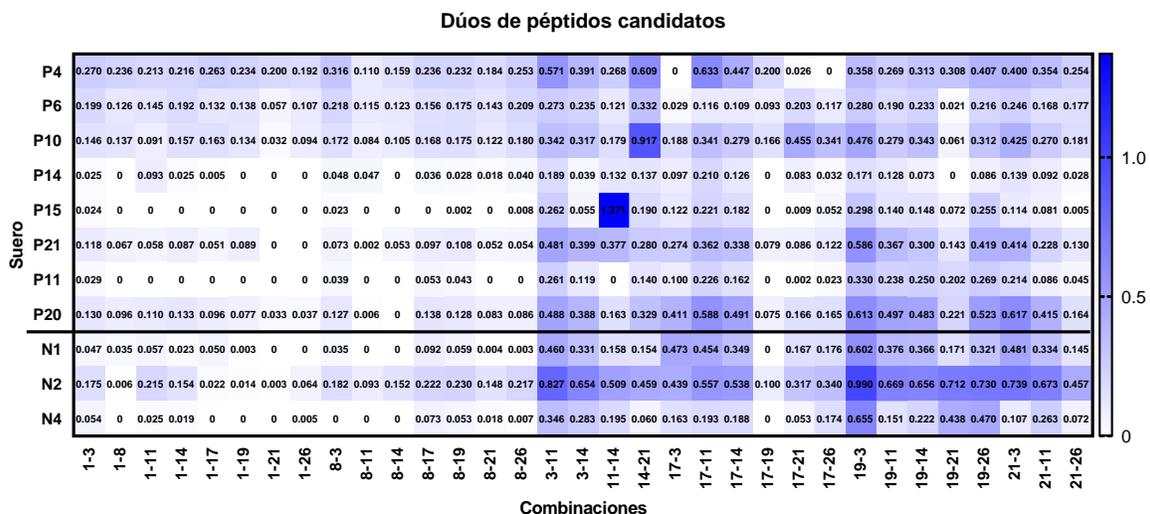


Figura 19 Análisis de péptidos identificados en dúos. Se muestra en el mapa de calor dentro de cada celda la densidad óptica obtenida de cada combinación en relación con cada uno de los sueros, en el gradiente de color azul cuya escala se muestra en la parte derecha. Las condiciones utilizadas fueron 5 ug/ml de cada combinación de péptidos, suero 1:50 y anticuerpo secundario 1:5,000. Los resultados son el promedio de tres repeticiones.

Como la combinación de péptidos 11/14 y 14/21 fueron las que mostraron las densidades ópticas más altas, procedimos a evaluar nuevamente los péptidos 11, 14 y 21, en trio, dúo y por separado, colocando en partes iguales cada péptido en combinación para obtener en conjunto 5mg/ml (**Figura 20**). Los resultados mostraron reconocimiento con el suero P14 con los péptidos 11 y 21 de manera individual, con los dos dúos 11/14 y 14/21 y con la combinación de los tres péptidos (11, 14 y 21). No se observó reconocimiento con ninguno de los sueros negativos con los ninguno de los tres péptidos probados, tanto de manera individual como en combinación. No se observó un efecto aditivo en la densidad óptica cuando se utilizaron la combinación de péptidos, posiblemente debido a que fue necesario disminuir la concentración de cada péptido para mantener la concentración final de 5ug/ml que se necesitaba por pozo.

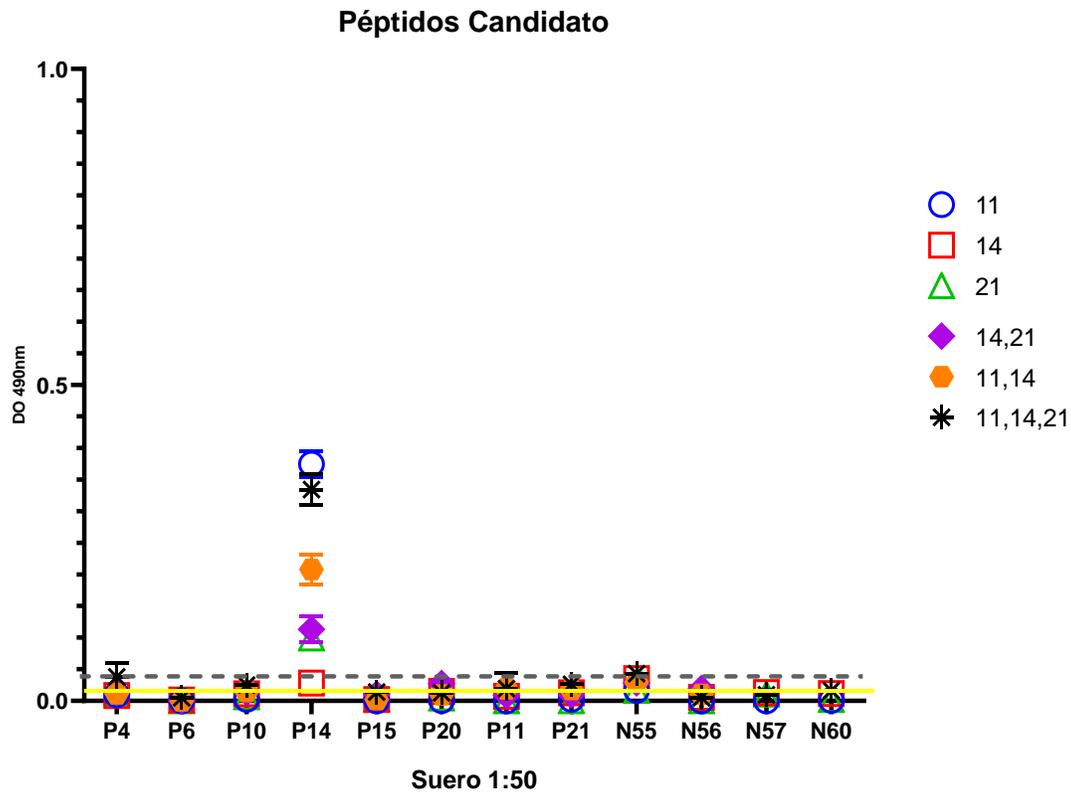


Figura 20 Análisis de los péptidos 11, 14 y 21 de manera individual y en combinación en dúo y trio. Se utilizaron 5 ug/ml de péptidos ya sea individual o en combinación, suero 1:50 y anticuerpo secundario 1:5,000. Los péptidos individuales se representan con figuras vacías, los dúos con figuras rellenas y el trio simbolizado con asterisco. Los resultados son el promedio de tres repeticiones \pm SEM.

Se evaluaron también, los péptidos reportados en la literatura PEP2, TcE y TcD tanto de manera individual como en trio, y además en su combinación con los péptidos identificados por nosotros 11, 14 y 21. Como se observa en la **Figura 21** PEP2, TcE y TcD en su conjunto mostraron un mejor reconocimiento con los sueros P4, P14 y P15, que cuando se utilizaron de manera individual. Aparentemente TcD no contribuyo en dicho resultado de la combinación de los tres péptidos, ya que por sí solo no mostró ser reconocido por los mismos sueros que si reconocieron la combinación de los tres. Cuando se evaluó la combinación de los 6 péptidos, no se observó ningún efecto aditivo de los péptidos 11, 14 y 21. Como era esperado, con ninguno de los sueros negativos (N55, N56, N57 y N60) se observó reconocimiento con ninguno de los péptidos individuales o en combinación.

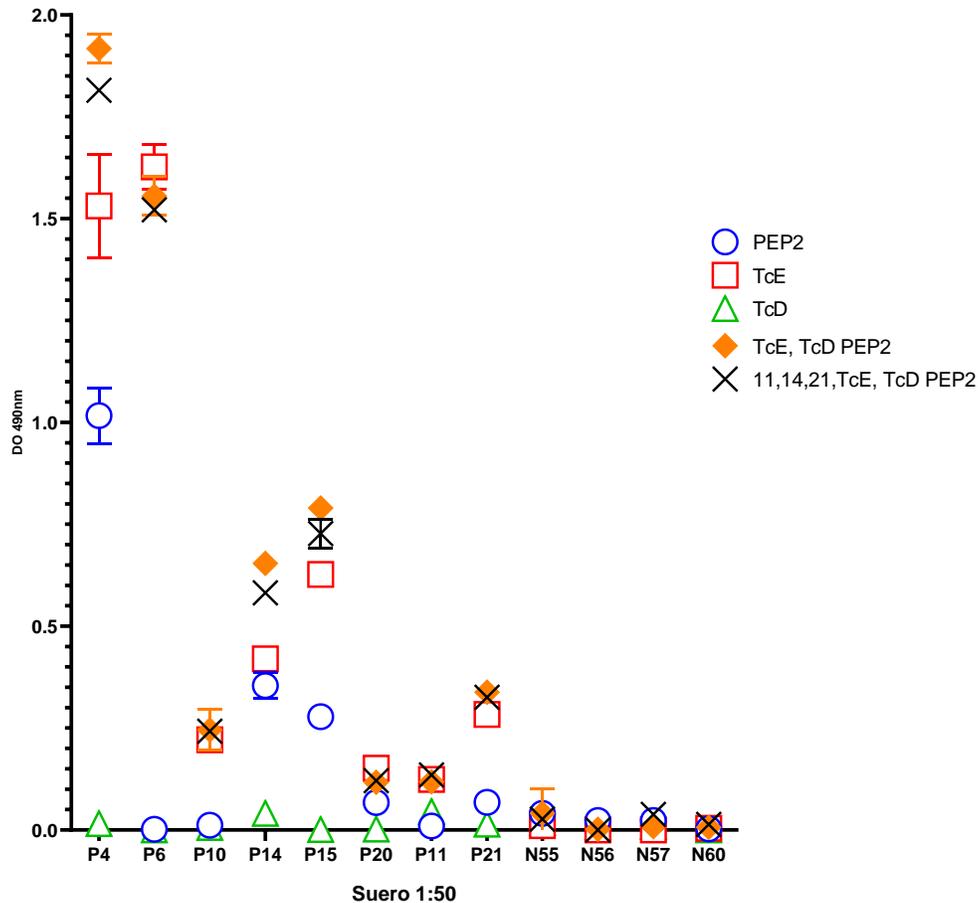


Figura 21 Análisis los péptidos PEP2, TcE y TcD tanto de manera individual como en trio, y en su combinación con los péptidos identificados 11, 14 y 21. Péptidos individuales con figuras vacías, el trio de los tres péptidos con rombo naranja relleno y la mezcla de los tres péptidos candidato y los tres péptidos reportados en la literatura simbolizados con equis negra. Se utilizaron 5 ug/ml de péptidos ya sea individual o en combinación, suero 1:50 y anticuerpo secundario 1:5,000. Los resultados son el promedio de tres repeticiones \pm SEM.

Los resultados anteriores en conjunto muestran que 21 (1,2,3,4,5,6,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,21, 26 y 28) de los 28 péptidos identificados en este trabajo fueron reconocidos por un suero de los ocho probados. Este comportamiento de reconocimiento limitado fue también observado con los péptidos reportados en la literatura, en donde PEP2 fue reconocido por un suero y TcE por dos sueros, de los cuatro sueros probados. El análisis de ambos tipos de péptidos de manera individual como en combinación, mostró que los péptidos identificados 11, 14 y 21 tienen mejor reconocimiento de manera individual que en combinación. Mientras que los péptidos reportados en la literatura PEP2 y TcE

presentan buen reconocimiento tanto solos como en combinación, no aumentando la capacidad de reconocimiento cuando éstos se combinan con los péptidos 11, 14 y 21. Aun cuando los péptidos identificados en este trabajo mostraron densidades ópticas menores que los péptidos reportados en la literatura, algunos mostraron resultados positivos, por lo que se procedió a evaluarlos con un mayor número de sueros provenientes de diferentes regiones endémicas de la ECh en México.

3.1.5.3 Análisis de los péptidos 1, 8, 11, 14, 17, 19, 21 y 26 identificados en este trabajo y de los péptidos PEP2, TcE, TcD reportados en la literatura por la técnica de ELISA, utilizando sueros positivos y negativos a *T. cruzi* provenientes de diferentes regiones endémicas de la ECh en México.

Se analizaron los ocho péptidos candidatos (1, 8, 11, 14, 17, 19, 21 y 26) seleccionados previamente con los mejores resultados (**Figura 18**), los péptidos reportados en la literatura (PEP2, TcE, TcD) y el péptido no relacionado antigénicamente a *T. cruzi* (DENV1), con 75 sueros positivos y 52 sueros negativos al parásito provenientes de diferentes zonas endémicas de la ECh en México, proporcionados por el InDRE. Como primer paso se analizaron los sueros proporcionados y caracterizados por el InDRE, por género, edad y distribución geográfica de donde provenían. Los sueros positivos correspondían a 22 mujeres y 53 hombres, mientras que de los sueros negativos son 31 de mujeres y 21 de hombres. En cuanto a edad la mayoría de los sueros corresponden a personas que se encuentran en el rango de los 18 a 59 años (43 negativos y 69 positivos). En menor proporción los sueros provenían de infantes (2 negativos), niños (4 negativos y 1 positivo), vejez (2 negativos y 3 positivos o sin datos (2 positivos) (**Figura 22**).

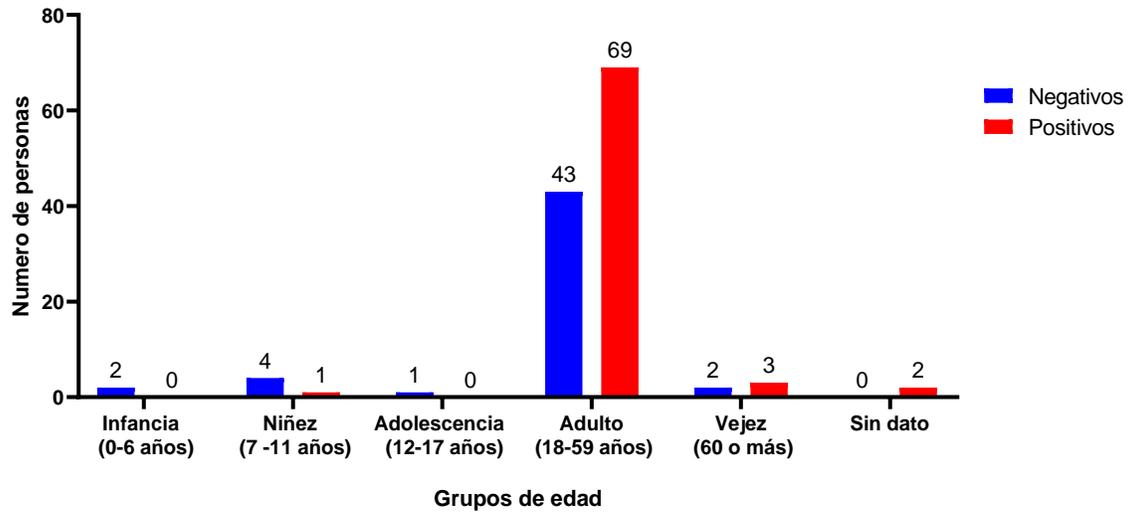


Figura 22 Sueros proporcionados por el InDRE clasificados por rango de edad de los individuos. Los sueros negativos (azul) y positivos (rojos) se agruparon por rango de edad, indicándose su número arriba de cada barra.

También, se analizó el estado de origen de los sueros ya que provenían de diversas regiones del país. Como se muestra en la **Figura 23** los sueros positivos (**panel A**) mostraron rangos promedio de densidad óptica variables que oscilan en un rango entre 0.518 en muestras del estado de Tlaxcala hasta un máximo de 1.337 en Sinaloa. Los valores promedio de densidad óptica se representó en un gradiente de color para facilidad de su análisis, mostrando que las muestras de Sinaloa, Zacatecas, Nayarit, Coahuila, Aguascalientes, Campeche y Michoacán son las que tienen los niveles de seropositividad mayores. Los sueros negativos (**panel B**) mostraron densidades ópticas con valores menores a 0.241.

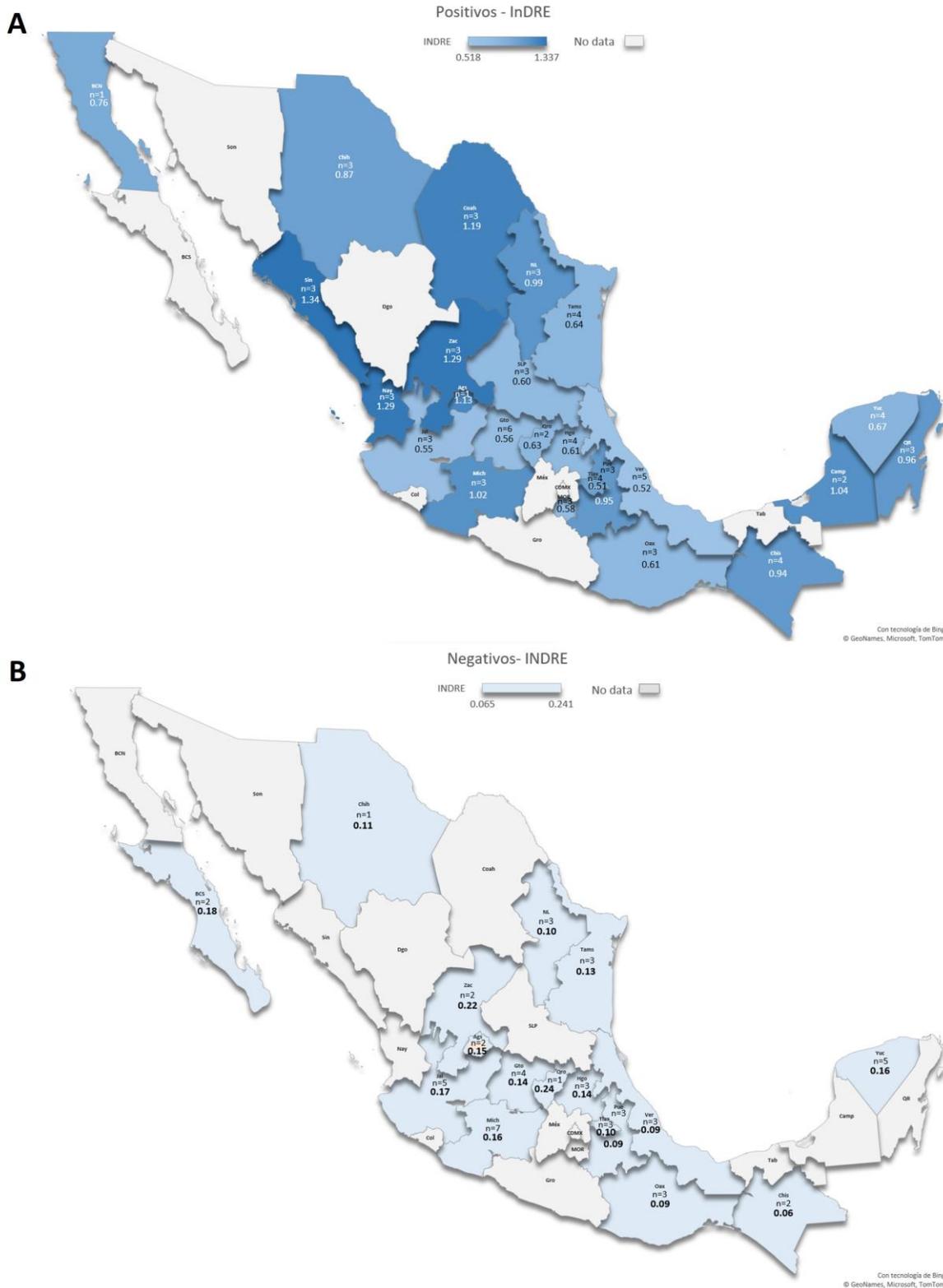


Figura 23 Análisis de la distribución de los sueros por estado. A) Sueros positivos a *T. cruzi* provenientes de los diferentes estados de México. B) Sueros negativos provenientes de los diferentes estados de México. Se muestra la abreviación del nombre del estado, la cantidad de sueros y el promedio de la densidad óptica por estado de la república. El gradiente de color azul cuya escala se muestra en la parte superior del mapa,

representa el promedio de la densidad óptica de los sueros positivos de cada estado. La abreviación de los nombres de los estados son Ags=Aguascalientes, BCN=Baja california, BCS=Baja california sur, Camp=Campeche, CDMX=Ciudad de México, Chih=Chihuahua, Chis=Chiapas, Coah=Coahuila, Col=Colima, Dgo=Durango, Gro=Guerrero, Gto=Guanajuato, Hgo=Hidalgo, Jal=Jalisco, Méx=Estado de México, Mich=Michoacán, Mor=Morelos, Nay=Nayarit, NL=Nuevo León, Oax=Oaxaca, Pue=Puebla, QR=Quintana Roo, Qro=Querétaro, Sin=Sinaloa, SLP=San Luis Potosí, Son=Sonora, Tab=Tabasco, Tams=Tamaulipas, Tlax=Tlaxcala, Ver=Veracruz, Yuc=Yucatán, Zac=Zacatecas.

Procedimos entonces a realizar el análisis de los péptidos candidatos (1, 8, 11, 14, 17, 19, 21, 26 y 28) y péptidos reportados (PEP2, TcE, TcD) con los sueros positivos y negativos a *T. cruzi* provenientes de diferentes partes de México mediante el ensayo de ELISA. El péptido DENV1 no relacionado se usó como control negativo.

3.1.5.3 Análisis del reconocimiento de péptidos identificados en este trabajo por la técnica de ELISA, con sueros positivos y negativos a *T. cruzi* provenientes de diferentes zonas endémicas de México.

Se analizaron ocho (1, 8, 11, 14, 17, 19, 21 y 26) de los 28 péptidos candidato iniciales (**Figura 18**), evaluándolos ahora con los 75 sueros positivos y los 52 sueros negativos provenientes del InDRE. Los valores de corte se calcularon a partir del promedio de los sueros negativos más dos desviaciones estándar. Los resultados mostraron que los ocho péptidos fueron reconocidos, pero por un número muy limitado de sueros positivos (péptido/suero: 1/3, 8/4, 11/2, 14/1, 17/3, 19/1, 21/1 y 26/1) (**Figura 24**). Para un mejor análisis de los resultados se calculó la sensibilidad, especificidad, índice kappa y curva ROC de los resultados de todos los péptidos analizados (**Figura 25**). Este análisis corrobora el bajo reconocimiento con este panel de sueros. Un ejemplo de ello se observó en el péptido 11 que presentó una sensibilidad de 13.3% y especificidad de 88% con una índice kappa de 0.015 teniendo una concordancia ínfima y un área bajo la curva de 0.5141 con un error estándar 0.05274, IC95% 0.4107-0.6175 con una $p=0.7874$. Por su parte, el péptido 17 presentó una sensibilidad de 6.6% y especificidad de 94.2% con una índice kappa de 0.007 teniendo una concordancia ínfima y un área bajo la curva de 0.5026 con un error estándar 0.05231, IC95% 0.4286-0.6365 con una $p=0.5335$. Estos resultados mostraron que los péptidos candidatos no presentaron un buen desempeño para ser reconocidos por sueros positivos a *T. cruzi*.

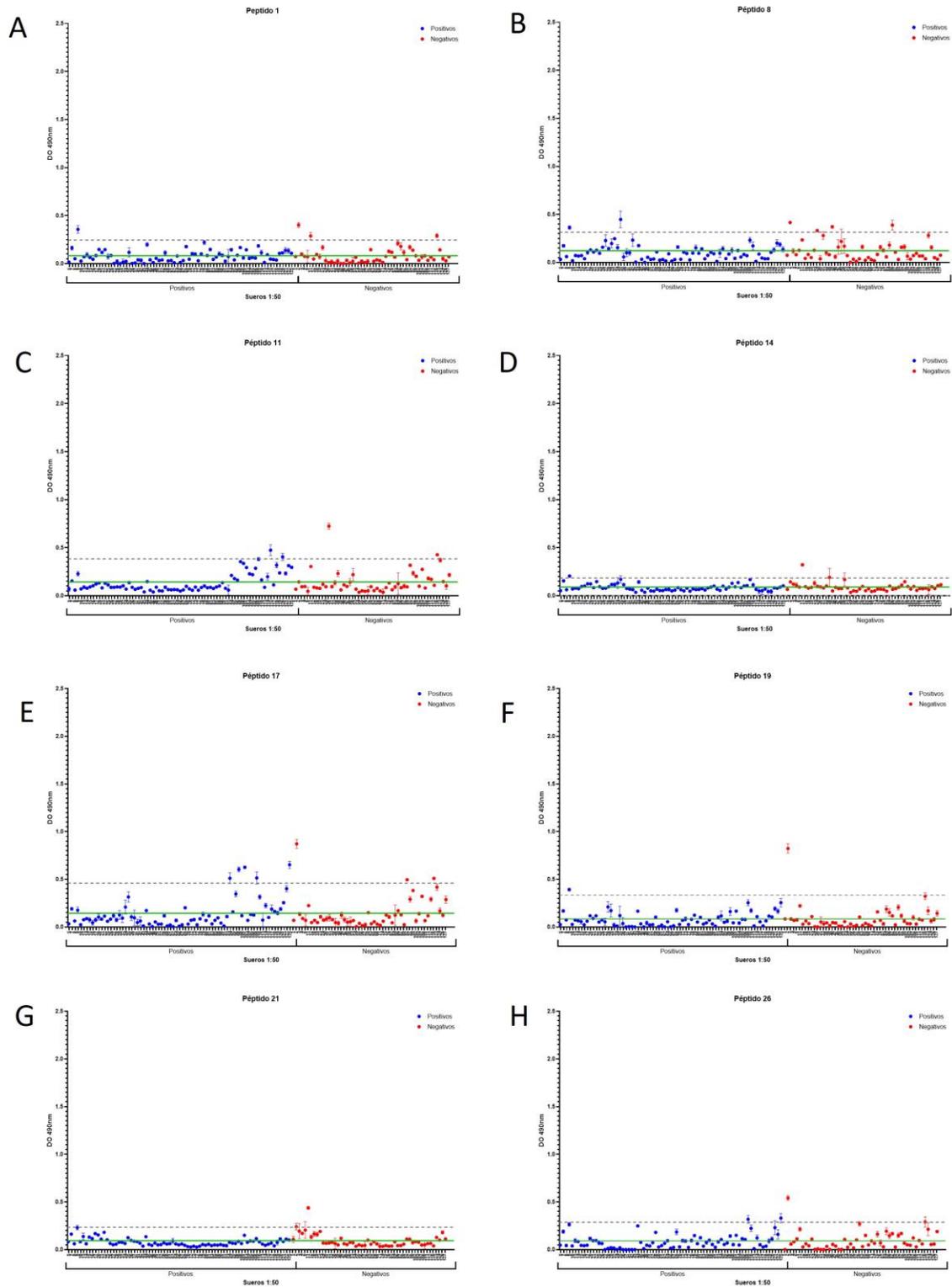


Figura 24 Análisis del reconocimiento de péptidos candidatos 1, 8, 11, 14, 17, 19, 21 y 26 con sueros positivos y negativos a *T. cruzi* provenientes de diferentes zonas endémicas de la ECh en México. Sueros caracterizados positivos (azul) y negativos (rojo) a *T. cruzi*. A) Péptido candidato 1. B) Péptido candidato 8. C) Péptido candidato 11. D) Péptido candidato 14. E) Péptido candidato 17. F) Péptido candidato 19. G) Péptido

candidato 21. H) Péptido candidato 26. Se utilizaron 5 ug/ml de péptidos, suero 1:50 y anticuerpo secundario 1:5,000. La línea de corte se muestra en verde. Los resultados son el promedio de tres repeticiones \pm SEM.

PÉPTIDOS CANDIDATOS

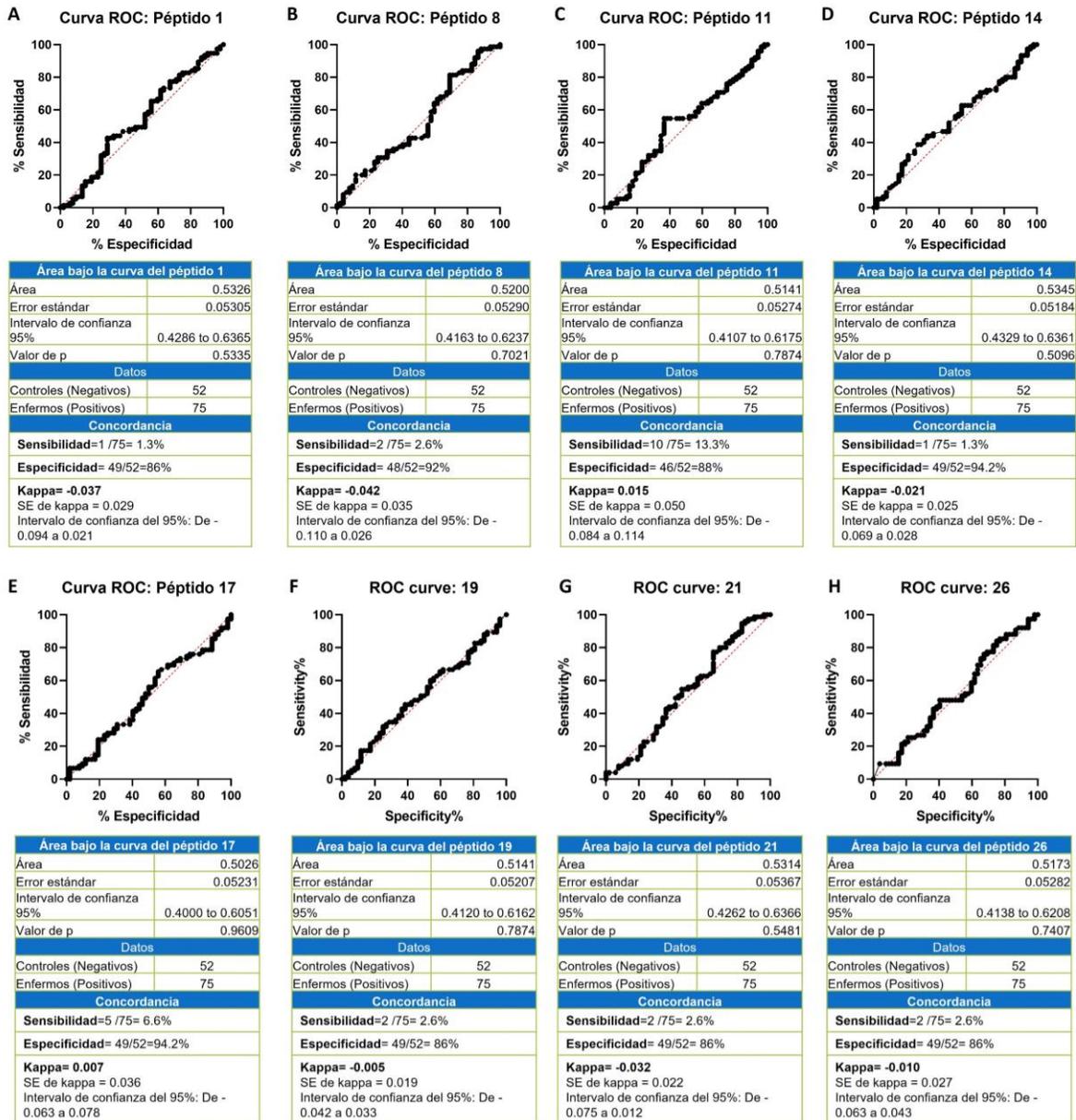


Figura 25 Análisis de los péptidos candidatos 1, 8, 11, 14, 17, 19, 21 y 26 mediante curvas ROC. Se muestra la curva ROC para péptido candidato 1 (A), 8 (B), 11 (C), 14 (D), 17 (E), 19 (F), 21 (G) y 26 (H) con sus resultados del área bajo la curva, la sensibilidad, especificidad y la índice kappa.

3.1.5.4 Análisis del reconocimiento de péptidos PEP2, TcE y TcD reportados en la literatura, por la técnica de ELISA con sueros positivos y negativos a *T. cruzi* provenientes de diferentes zonas endémicas de la ECh en México.

El mismo análisis anterior realizado con los péptidos candidato, también lo llevamos a cabo con los péptidos reportados en la literatura PEP2, TcE y TcD, usando como control negativo el péptido no relacionado DENV1 y los 75 sueros positivos y los 52 sueros negativos provenientes del InDRE. Se obtuvieron los valores de corte calculados a partir del promedio de los sueros negativos \pm desviaciones estándar.

El péptido PEP2 (**Figura 26**) mostró un buen reconocimiento con la mayoría de los sueros positivos (40 de los 75 positivos ensayados) mostrando niveles variables de reconocimiento y tres de los sueros negativos mostraron positividad (falso positivo). Se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 53.3% y 86% respectivamente y utilizando el índice kappa para evaluar la concordancia de los resultados, mostró una concordancia de moderada a baja (0.435).

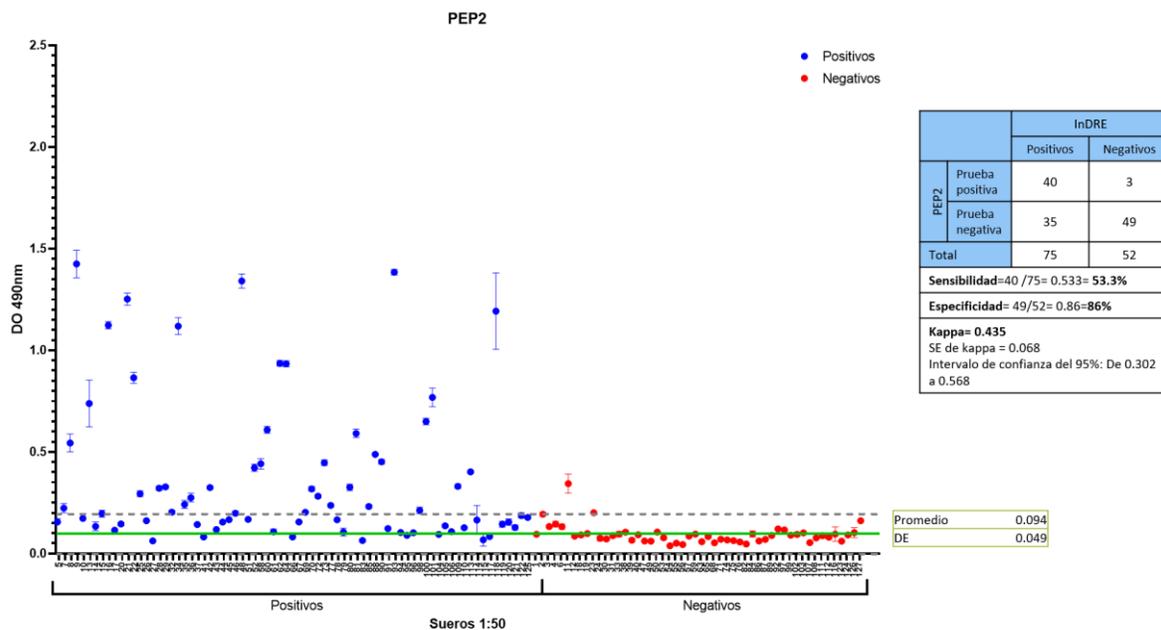


Figura 26 Análisis del reconocimiento PEP2 con sueros positivos y negativos a *T. cruzi* provenientes de otras zonas endémicas de México. Sueros caracterizados positivos (azul) y negativos (rojo) a *T. cruzi*. Se utilizaron 5 ug/ml de péptidos, suero 1:50 y anticuerpo secundario 1:5,000. La línea de corte se muestra en verde y sus valores en el recuadro verde. Los resultados son el promedio de tres repeticiones \pm SEM. En la tabla se muestran los resultados que se calcularon de sensibilidad, especificidad e índice kappa.

Como se muestra en la **Figura 27**, el análisis de TcE mostró un buen reconocimiento con la mayoría de los sueros positivos (60 de los 75 ensayados) mostrando niveles variables de reconocimiento y tres de los sueros negativos mostraron positividad (falsos positivos). Se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 80% y 86% respectivamente y utilizando el índice kappa para evaluar la concordancia de los resultados, mostró una buena concordancia (0.717).

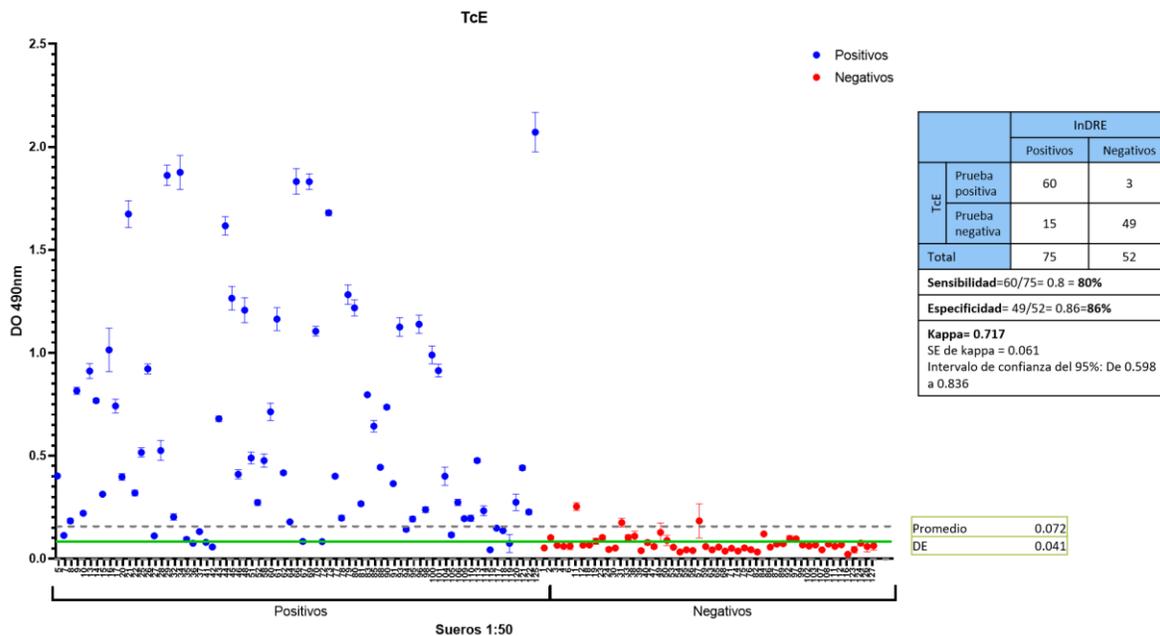


Figura 27 Análisis del reconocimiento TcE con sueros positivos y negativos a *T. cruzi* provenientes de otras zonas endémicas de México. Sueros caracterizados positivos (azul) y negativos (rojo) a *T. cruzi*. Se utilizaron 5 ug/ml de péptidos, suero 1:50 y anticuerpo secundario 1:5,000. La línea de corte se muestra en verde y sus valores en el recuadro verde. Los resultados son el promedio de tres repeticiones \pm SEM. En la tabla se muestran los resultados que se calcularon de sensibilidad, especificidad e índice kappa.

Por último, TcD (**Figura 28**) no mostró reconocimiento con la mayoría de los sueros positivos (7 de los 75 ensayados) mostrando niveles bajos de reconocimiento y dos de los sueros mostró positividad (falso positivo). Este pobre reconocimiento se observó también cuando se determinó su sensibilidad y especificidad del 9.3% y 96% respectivamente y utilizando la índice kappa para evaluar la concordancia de los resultados, mostró una concordancia baja (0.046).

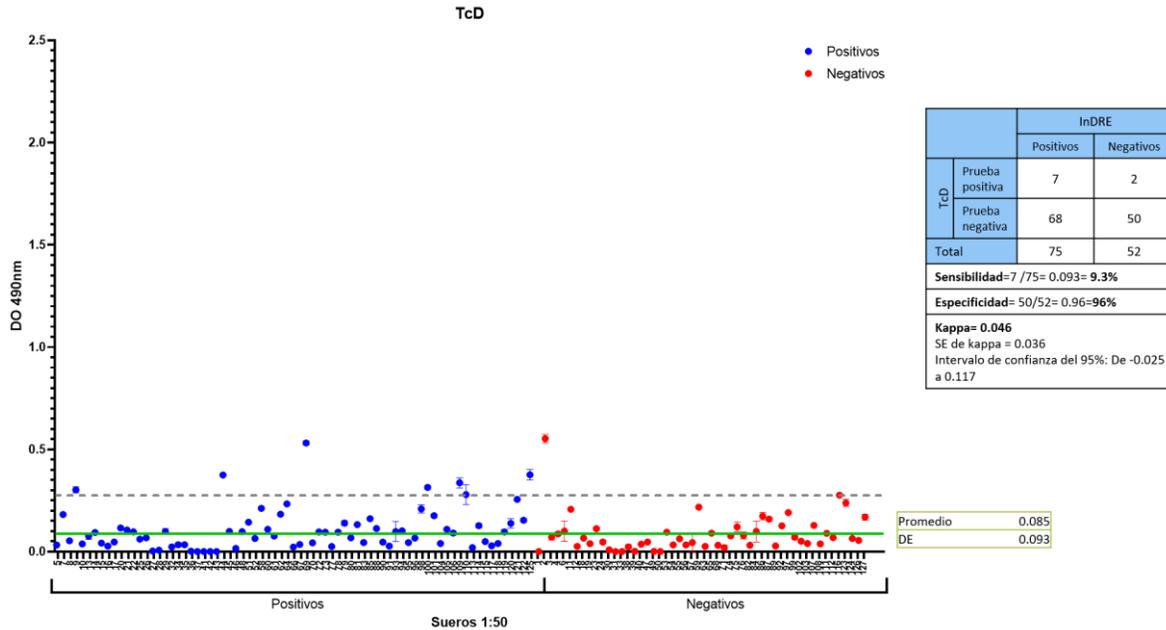


Figura 28 Análisis del reconocimiento TcD con sueros positivos y negativos a *T. cruzi* provenientes de otras zonas endémicas de México. Sueros caracterizados positivos (azul) y negativos (rojo) a *T. cruzi*. Se utilizaron 5 ug/ml de péptidos, suero 1:50 y anticuerpo secundario 1:5,000. La línea de corte se muestra en verde y sus valores en el recuadro verde. Los resultados son el promedio de tres repeticiones \pm SEM. En la tabla se muestran los resultados que se calcularon de sensibilidad, especificidad e índice kappa.

El antígeno no relacionado DENV1 al ser analizado mostró un reconocimiento con 2 sueros positivos y 3 negativos (falsos positivos al parásito) y una sensibilidad y especificidad de 2.6% y 94.2% respectivamente. Utilizando el índice kappa para evaluar la concordancia de los resultados se obtuvo, como era esperado, una ínfima concordancia (-0.026) (**Figura 29**). Es posible que los sueros tanto positivos como negativos a *T. cruzi* dieran positivos porque podrían tener Ab contra el virus del dengue.

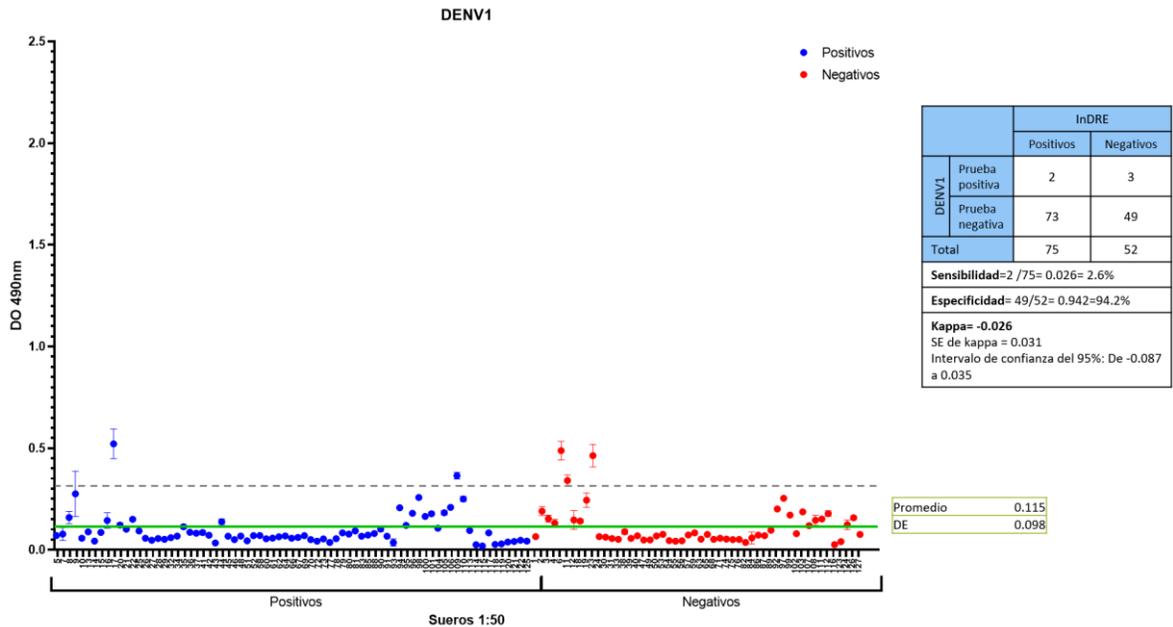


Figura 29 Análisis del reconocimiento DENV1 con sueros positivos y negativos a *T. cruzi* provenientes de otras zonas endémicas de México. Sueros caracterizados positivos (azul) y negativos (rojo) a *T. cruzi*. Se utilizaron 5 ug/ml de péptidos, suero 1:50 y anticuerpo secundario 1:5,000. La línea de corte se muestra en verde y sus valores en el recuadro verde. Los resultados son el promedio de tres repeticiones \pm SEM. En la tabla se muestran los resultados que se calcularon de sensibilidad, especificidad e índice kappa.

A estos antígenos también se les analizó su capacidad discriminativa mediante las curvas ROC obteniendo para TcE un área bajo la curva de 0.9503 con un error estándar de 0.018 y un IC95% (0.9149-0.9856) con una $p < 0.0001$. Mientras que el PEP2 presento un área bajo la curva de 0.8919 con un error estándar de 0.0287 y un IC95% (0.8356-0.9482) con una $p < 0.0001$. TcD presento un área bajo la curva de 0.5682 con un error estándar de 0.05152 y un IC95% (0.4672-0.6692) con una $p = 0.1922$. Finalmente, DENV1 presento un área bajo la curva de 0.5427 con un error estándar de 0.05244 y un IC95% (0.4399-0.6455) con una $p = 0.4143$ (**Figura 30**).

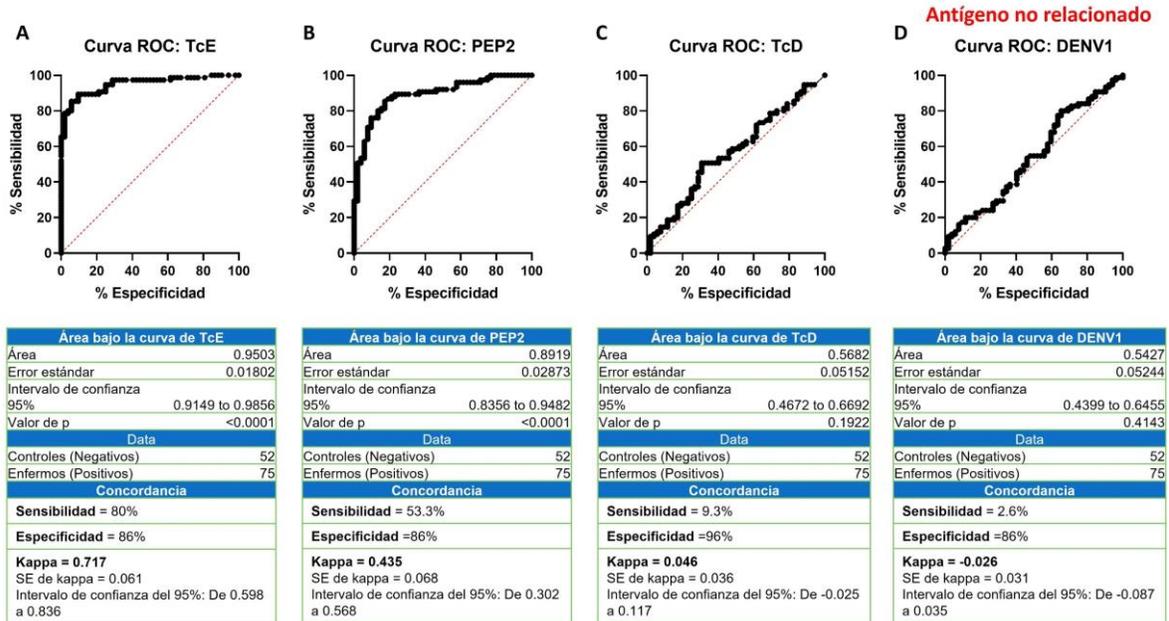


Figura 30 Análisis de los péptidos reportados mediante curvas ROC. Se muestra la curva ROC para TcE (A), PEP2 (B), TcD (C) y DENV1 (D) con sus resultados del área bajo la curva, la sensibilidad, especificidad y la índice kappa.

Se calculó la sensibilidad y especificidad obteniendo 80% y 86% respectivamente. Utilizando la índice kappa para evaluar la concordancia de los resultados, obteniendo una buena concordancia (0.717) (**Figura 27**). Estos resultados en conjunto mostraron que el péptido TcE es un muy buen candidato para evaluar sueros de personas infectadas de México. Considerando que se ha reportado que es necesaria la mezcla de antígenos para obtener una buena sensibilidad y especificidad (Da Silveira et al., 2001; Houghton et al., 1999) el hecho de que TcE por sí solo reconoció el 80% de los sueros positivos y como positiva a solo uno de los 52 sueros negativos, es indicativo de su buen desempeño. Muy posiblemente, de identificarse otros péptidos con niveles de sensibilidad y especificidad similares, la mezcla de estos con TcE mejorarían el reconocimiento de los sueros que no reconoció por sí solo en muestras provenientes de México y posiblemente de otros países endémicos donde circulan predominantemente cepas TcI.

3.2 Evaluación de extractos totales de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*, con sueros caracterizados positivos y negativos al parásito provenientes de diferentes zonas endémicas de la ECh en México

Una vez que se concluyó el análisis de los péptidos tanto identificados en este trabajo como los reportados en la literatura, procedimos a evaluar extractos totales de proteínas de epimastigotes y tripomastigotes de las 15 cepas locales. Esto no solo nos permitirá evaluar estos antígenos locales en conjunto, sino también comparar el desempeño entre los dos estadios de desarrollo del parásito, que han causado su uso controversia en el campo. Cabe mencionar que la evaluación de proteínas recombinantes se está realizando en otro proyecto de nuestro laboratorio por lo que no serán evaluadas en este trabajo.

3.2.1 Determinación el mejor método (físico y químico) para la obtención de extractos totales de proteínas de epimastigotes y tripomastigotes de las 15 cepas es estudio.

Como primer paso establecimos las condiciones para la obtención de los extractos totales. Para ello se realizó la lisis de los parásitos mediante 3 métodos diferentes: 1) el método de congelado- descongelado, 2) la obtención mediante lisis química y 3) la combinación de ambos métodos. Para ello, utilizamos epimastigotes de la cepa CL Brener que es una cepa de referencia. Al analizar los extractos totales de proteínas separadas mediante SDS-PAGE, se identificó que el método de congelado-descongelado muestra una mejor preservación de las proteínas al observar la integridad de las proteínas de alto peso molecular, en comparación con el método de lisis y el método combinado, en los cuales no se observan las proteínas de alto peso molecular (**Figura 31**).

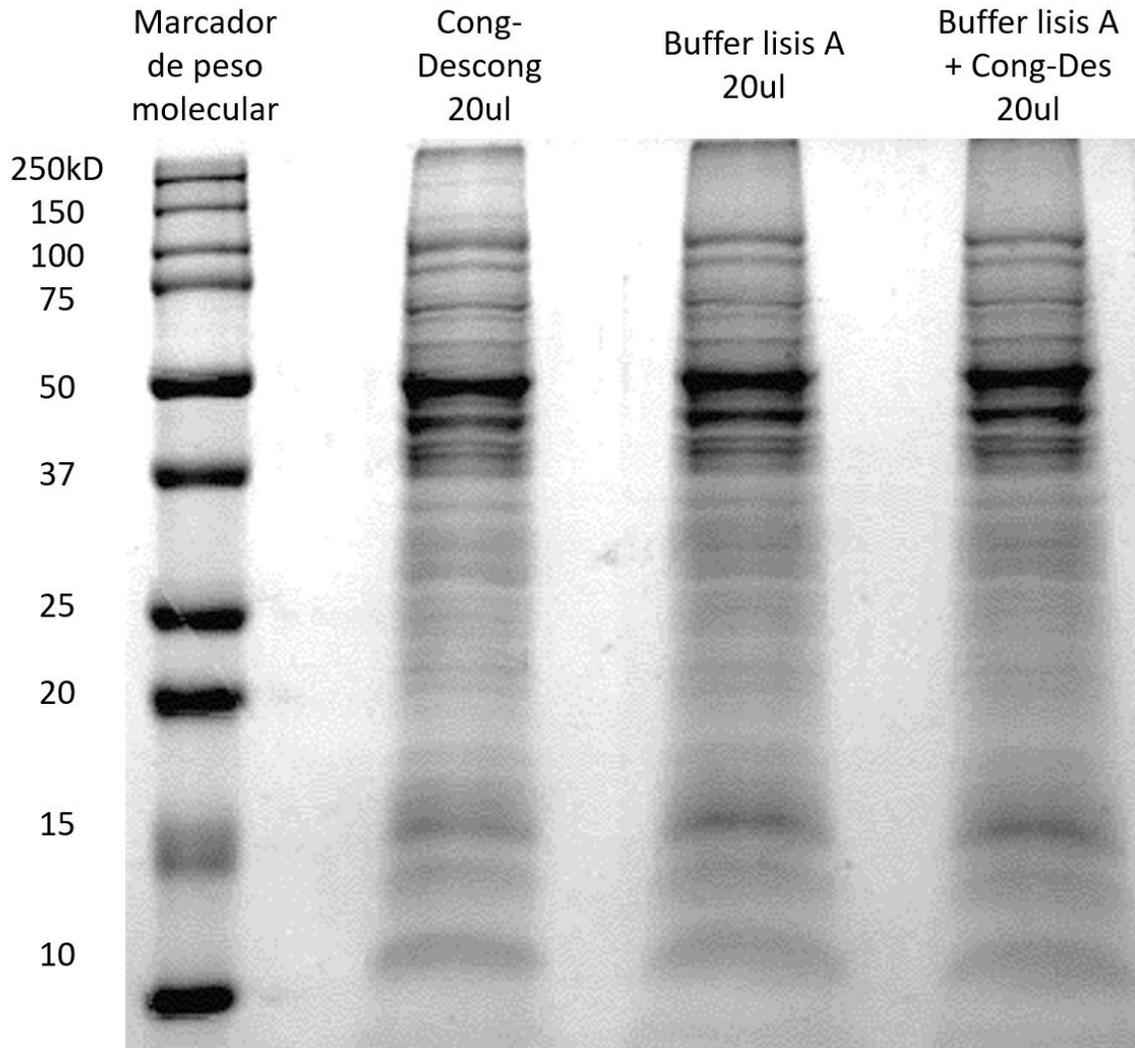


Figura 31 Análisis de los métodos de lisis para obtención de Extracto total de proteínas. Extractos totales de proteínas de epimastigotes de la cepa CL Brener obtenidos por congelado- descongelado, lisis con detergentes y la combinación de ambos métodos. Después de su cuantificación se corrieron cantidades iguales en un gel de poli-acrilamida al 10% y se tiñeron con azul coomassie.

Una vez establecidas estas condiciones para la obtención de los extractos totales de proteínas, procedimos a la obtención de los extractos de las 15 cepas locales tanto de epimastigotes y tripomastigotes, como se describe en materiales y métodos utilizando el método de congelado-descongelado para obtención de los extractos totales proteicos. En el caso de tripomastigotes se utilizaron 13 de las 15 cepas en estudio, debido a que las cepas NM4 y SS3 no fue posible obtener tripomastigotes liberados de las células infectas, ya que éstos se diferenciaban rápidamente a

epimastigotes, por lo que fue necesario descartar estas dos cepas para estos estudios.

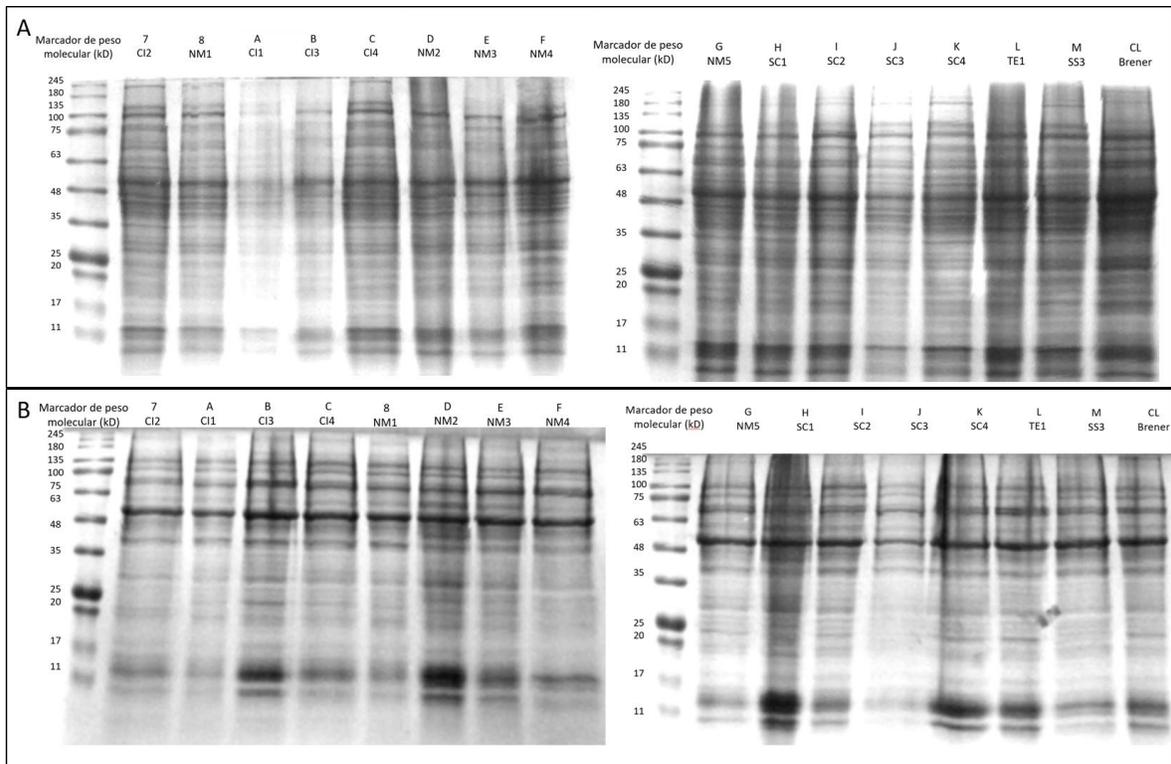


Figura 32 Extractos totales de proteínas de epimastigotes y tripomastigotes de las cepas locales de México. Extracto total de proteínas de epimastigotes (A) y tripomastigotes (B) de las cepas locales y de referencia CL Brener se analizaron en gels de poliacrilamida y se tiñeron con azul Coomassie.

Como se observa en la **Figura 32**, tanto los extractos totales de epimastigotes (**panel A**) como de tripomastigotes (**panel B**) se obtuvieron con buena integridad al observarse las proteínas de alto peso molecular, indicando que los extractos están en óptimas condiciones para sus posteriores análisis.

3.2.2 Estandarización de las condiciones para los ensayos de ELISA con extractos totales de proteínas de epimastigotes y tripomastigotes, usando sueros caracterizados positivos y negativos a *T. cruzi* provenientes de las mismas zonas endémicas de la ECh en México que las cepas de parásito.

Con el objetivo de establecer las mejores condiciones para el análisis mediante la técnica de ELISA, se analizaron las siguientes condiciones:

- Concentración del antígeno (1.25, 2.5, 5, 6, 7.5, 10 ug/ml).
- Dilución del suero (1:100, 1:200, 1:400, 1:600, 1:800).
- Titulación de anticuerpo secundario (1:5000, 1:10000, 1:20000, 1:30000, 1:40000, 1:50000, 1:60000, 1:70000).

Dichas condiciones fueron propuestas con base a las condiciones reportadas en donde trabajaron con extractos totales de proteínas y péptidos en la ECh (Burns et al., 1992; Camussone et al., 2009; De Oliveira Mendes et al., 2013; Hernández-Marín et al., 2003; Houghton et al., 2000, 1999; Kaplan et al., 1997; Peralta et al., 1994) y a las sugerencias del proveedor para el caso del Ab secundario.

Primero se realizó la titulación del anticuerpo secundario, utilizando el pool de extractos totales de proteínas usados en proporciones iguales de concentración de las 15 cepas para epimastigotes o de las 13 cepas de tripomastigotes. Se usó 5ug/ml el pool de proteínas y una dilución 1:200 del suero positivo (P4 y P6) y negativo (N1, N2, N4, N6) al parásito provenientes de Oaxaca y una dilución 1:10000 y 1:20000 del Ab secundario.

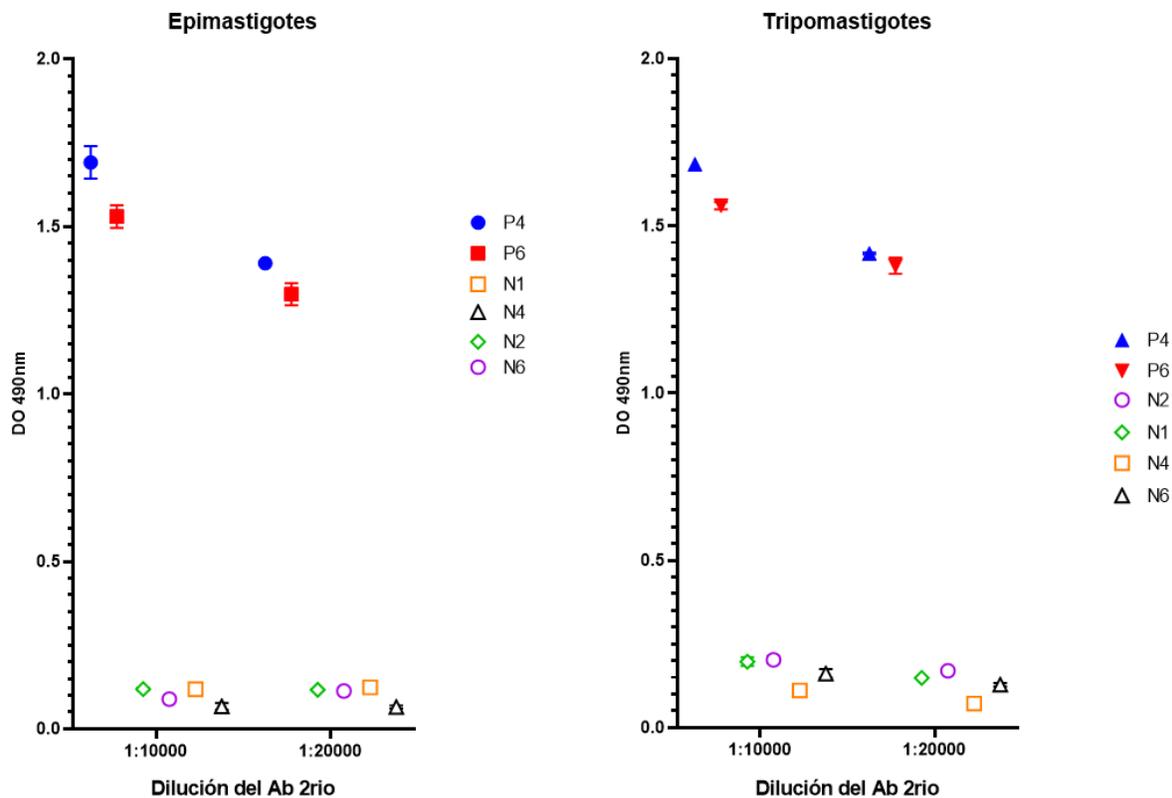


Figura 33 Titulación de Ab secundario para extracto total de epimastigotes y tripomastigotes. Ensayo de ELISA usando 5ug/ml el pool de extracto total de proteínas de epimastigotes o tripomastigotes, una dilución 1:200 del suero positivo (P4 y P6) y negativo (N1, N2, N4, N6) al parásito y una dilución 1:10000 y 1:20000 del Ab secundario. Los resultados son el promedio de tres repeticiones \pm SEM.

Como se muestra en la **Figura 33**, la dilución de 1:20,000 del anticuerpo secundario para el análisis de los extractos totales de proteínas de epimastigotes y de tripomastigotes mostró los mejores resultados, estableciéndose para los siguientes experimentos. Posteriormente se analizaron diferentes concentraciones del conjunto de extractos totales de proteínas de cada estadio del parásito con diferentes diluciones de un suero positivo (P4) y un suero negativo (N2). De acuerdo con los resultados se seleccionó la concentración de 5ug/ml del conjunto de extractos totales de proteínas y la dilución 1:200 del suero que fueron las condiciones que permitieron la correcta discriminación entre los sueros positivos y negativos (**Figura 34**).

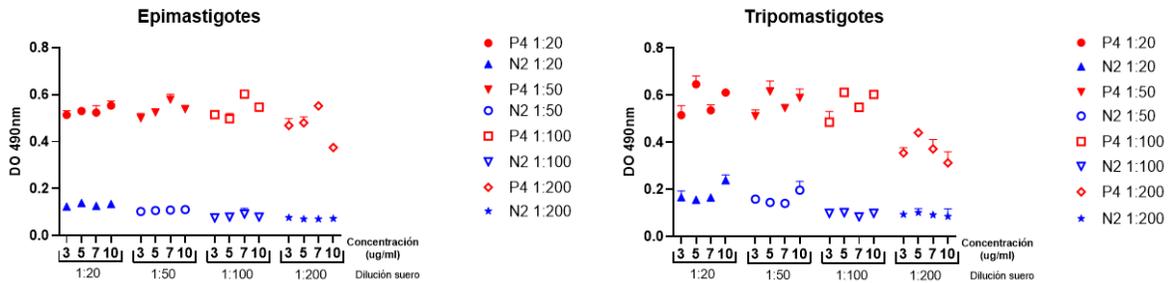


Figura 34 Establecimiento de concentración del antígeno y dilución del suero para extracto total de epimastigotes y tripomastigotes. Utilizando la dilución 1:20000 de anticuerpo secundario, se analizaron diferentes concentraciones del antígeno en un rango de 3, 5, 7 y 10 ug/ml y una dilución 1:20, 1:50, 1:100 y 1:200 del suero positivo (P4) y negativo (N2). Los resultados son el promedio de tres repeticiones \pm SEM.

Los resultados anteriores en conjunto mostraron que las mejores condiciones para realizar los ensayos de ELISA con extractos totales de proteínas tanto con epimastigotes como tripomastigotes son placas de alta adherencia, bloqueadas con BSA, 5ug/ml del conjunto de extractos totales de proteínas, una dilución 1:200 de suero y una dilución 1:20,000 del Ab secundario.

3.2.3 Evaluación de extractos totales de proteínas de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* mediante la técnica de ELISA, con sueros caracterizados positivos y negativos al parásito provenientes de diferentes zonas endémicas de la ECh México

Aun cuando los estadios del parásito comparten algunas proteínas, se sabe también que contienen otras proteínas estadio específicas que podrían estar involucradas en el reconocimiento antigénico del tripomastigote, que es el que se encuentra en el hospedero mamífero. Por ello como primer paso, se analizaron los extractos totales de proteínas de epimastigotes y tripomastigotes de las diferentes cepas locales con 1 suero positivo (P4) y 4 sueros negativos (N1, N2, N4 y N6) provenientes de Oaxaca. Como se observa en la **Figura 35**, se presentaron diferentes niveles de reconocimiento entre las cepas con el suero positivo, observándose además que no hubo el mismo patrón entre los extractos de proteínas de epimastigotes y tripomastigotes ni con los diferentes DTUs. Los sueros negativos no mostraron reconocimiento en la mayoría de los casos a excepción del N1 que dio positivo con SC1.

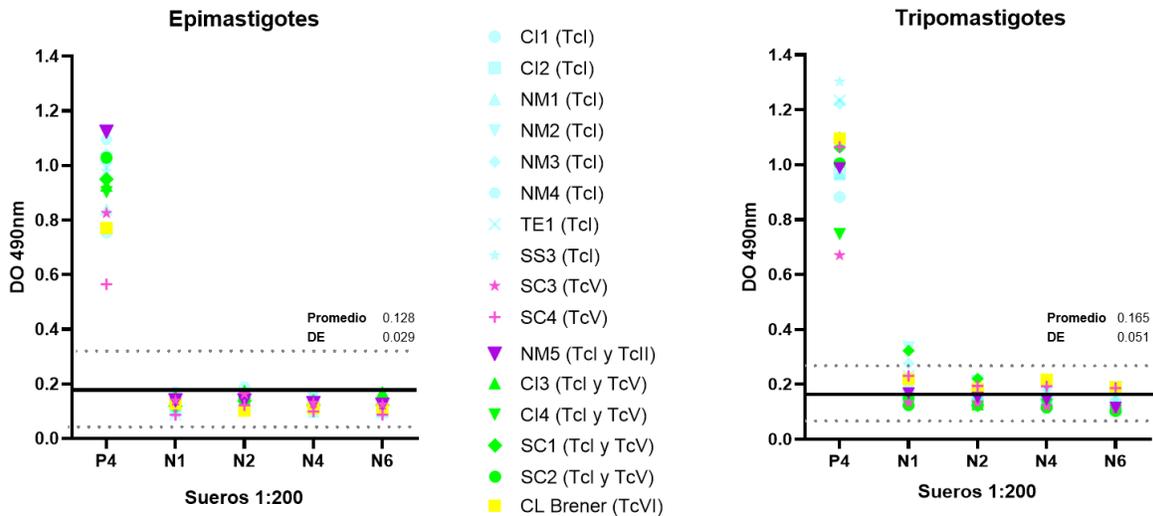


Figura 35 Comparación de reconocimiento de extractos totales de proteínas de epimastigotes y tripomastigotes de las diferentes cepas locales de *T. cruzi*. Se utilizaron 5ug/ml de los extractos totales de proteínas de epimastigotes y tripomastigotes (indicado arriba de cada gráfica) de las diferentes cepas locales de *T. cruzi* con diferente DTU (indicadas con diferentes colores de acuerdo con la tabla entre las dos gráficas), una dilución 1:200 de suero positivo (P4) y negativo (N1, N2, N4 y N6) y una dilución 1:20,000 del Ab secundario. La línea de corte (negro) es el promedio de los sueros negativos más dos desviaciones estándar (líneas punteadas). Los resultados es el promedio de tres repeticiones \pm SEM.

3.2.3.1 Análisis del reconocimiento de extractos totales de proteínas de epimastigotes y tripomastigotes por la técnica de ELISA, con sueros caracterizados positivos y negativos a *T. cruzi* provenientes de diferentes zonas endémicas de la ECh en México.

Se evaluaron los extractos totales de proteínas de epimastigotes y tripomastigotes provenientes de diferentes zonas endémicas de la ECh en México. Utilizando 75 sueros positivos y 52 sueros negativos, los cuales fueron proporcionados y caracterizados por el InDRE. La línea de corte fue calculada a partir del promedio de los sueros negativos más dos desviaciones estándar. Como se muestra en la **Figura 36** el conjunto de extractos totales de proteínas de epimastigotes confirmó el total de los sueros positivos y 51 de los 52 sueros negativos evaluados, obteniéndose una sensibilidad del 100% y una especificidad del 98%. Además, estos resultados en su análisis del índice kappa mostraron una concordancia del 0.984.

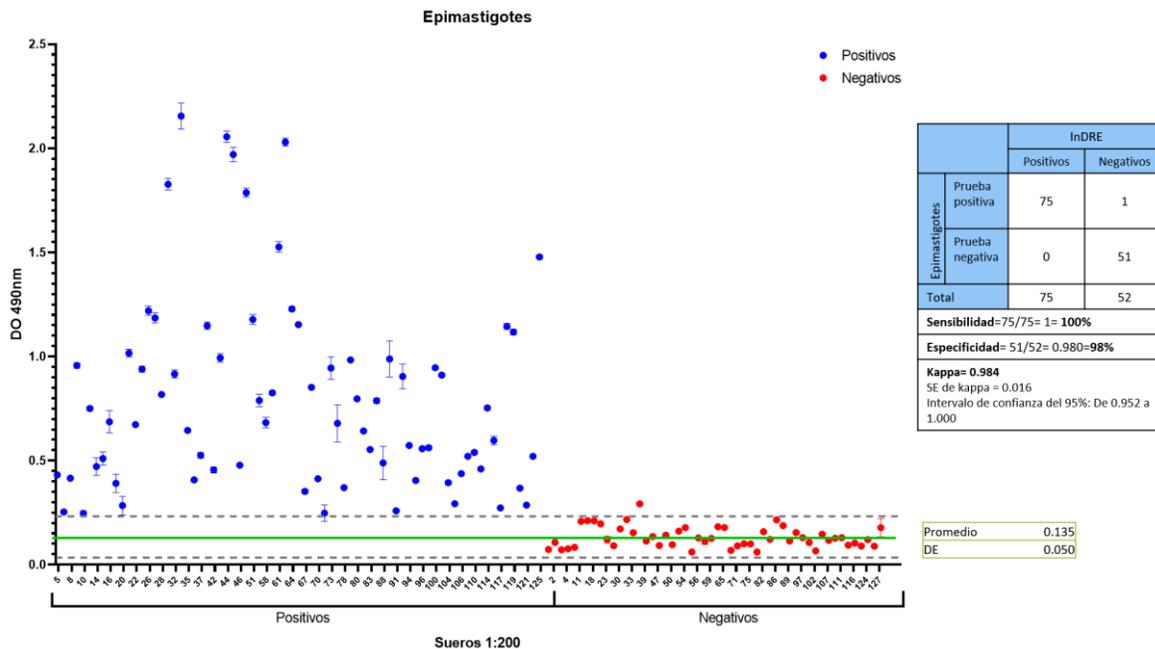


Figura 36 Análisis del reconocimiento del extracto total de epimastigotes con sueros positivos y negativos a *T. cruzi* provenientes de otras zonas endémicas de México. Mostrando en azul los sueros positivos y en rojo los negativos. En la tabla se muestran los resultados que obtuvieron para calcular la sensibilidad, especificidad e índice kappa.

En el caso del conjunto de extractos totales proteínas de tripomastigotes confirmó 71 de los 75 sueros positivos y 51 de los 52 sueros negativos, obteniéndose una sensibilidad del 94.6% y una especificidad del 98%. Además, estos resultados en su análisis del índice kappa mostraron una concordancia del 0.919 (**Figura 37**).

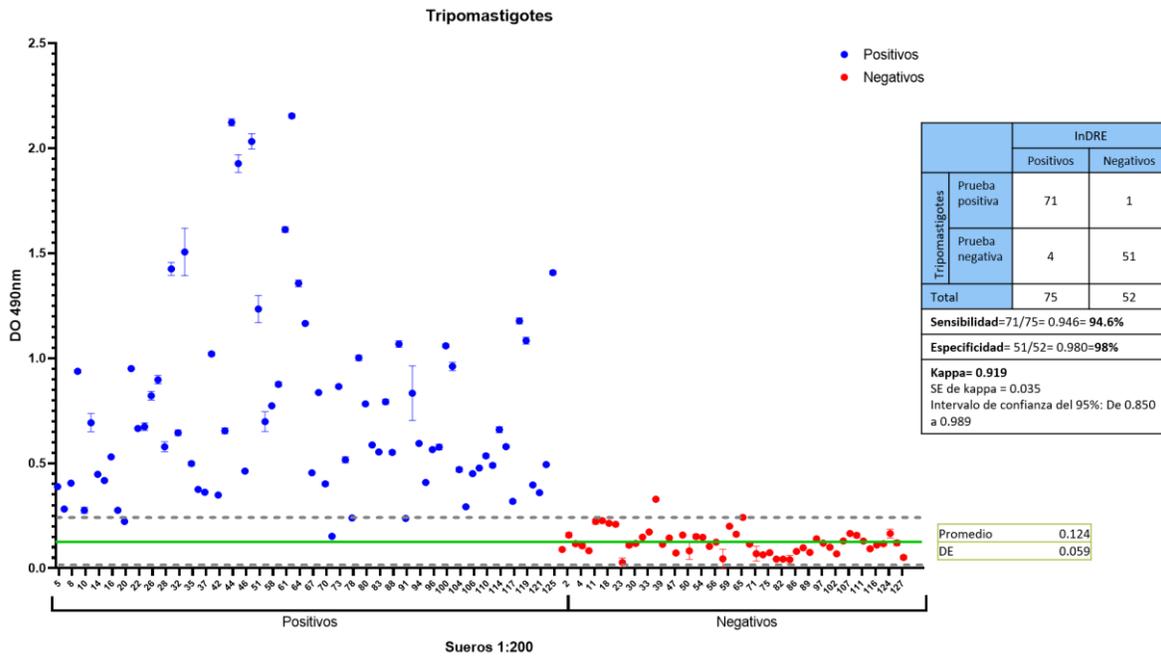


Figura 37 Análisis del reconocimiento del extracto total de tripomastigotes con sueros positivos y negativos a *T. cruzi* provenientes de otras zonas endémicas de México. Mostrando en azul los sueros positivos y en rojo los negativos. En la tabla se muestran los resultados que obtuvieron para calcular la sensibilidad, especificidad e índice kappa.

Se realizó el análisis de curvas ROC obteniendo que para el conjunto de extractos totales de proteínas de epimastigotes un área bajo la curva de 0.9982 con un error estándar de 0.0019 y un IC95% (0.994-1.00) con una $p < 0.0001$. Mientras que para el conjunto de extractos totales de proteínas de tripomastigotes un área bajo la curva de 0.9932 con un error estándar de 0.0046 y un IC95% (0.984-1.00) con una $p < 0.0001$ (**Figura 38**).

Estos resultados mostraron que los extractos totales de proteínas de epimastigotes de cepas locales son 100% sensibles, siendo por tanto muy buenos candidatos para realizar pruebas de tamizaje en zonas endémicas de México. Además, contrario a lo que se esperaba, tanto los extractos de proteínas de epimastigotes como de tripomastigotes mostraron niveles iguales de especificidad (98%), colocando a los primeros como los candidatos ideales para ser utilizados en futuros experimentos, por su facilidad de cultivo.

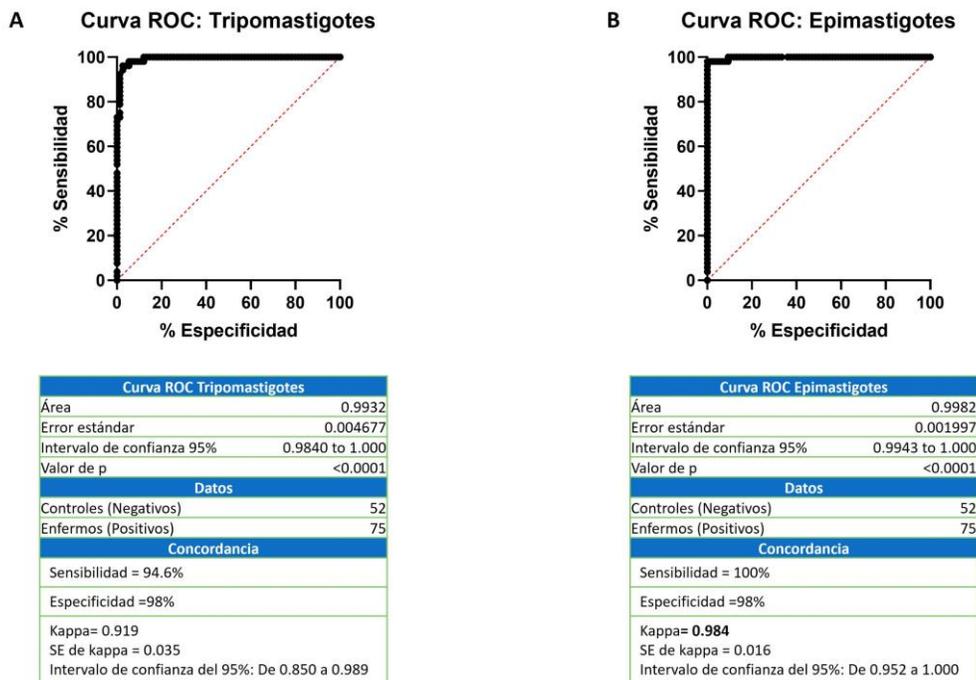


Figura 38 Análisis de los extractos totales de proteínas mediante curvas ROC. A) Se muestra la curva ROC para tripomastigotes con sus resultados del área bajo la curva, la sensibilidad, especificidad y la índice kappa. B) Se muestra la curva ROC para epimastigotes con sus resultados del área bajo la curva, la sensibilidad, especificidad y la índice kappa.

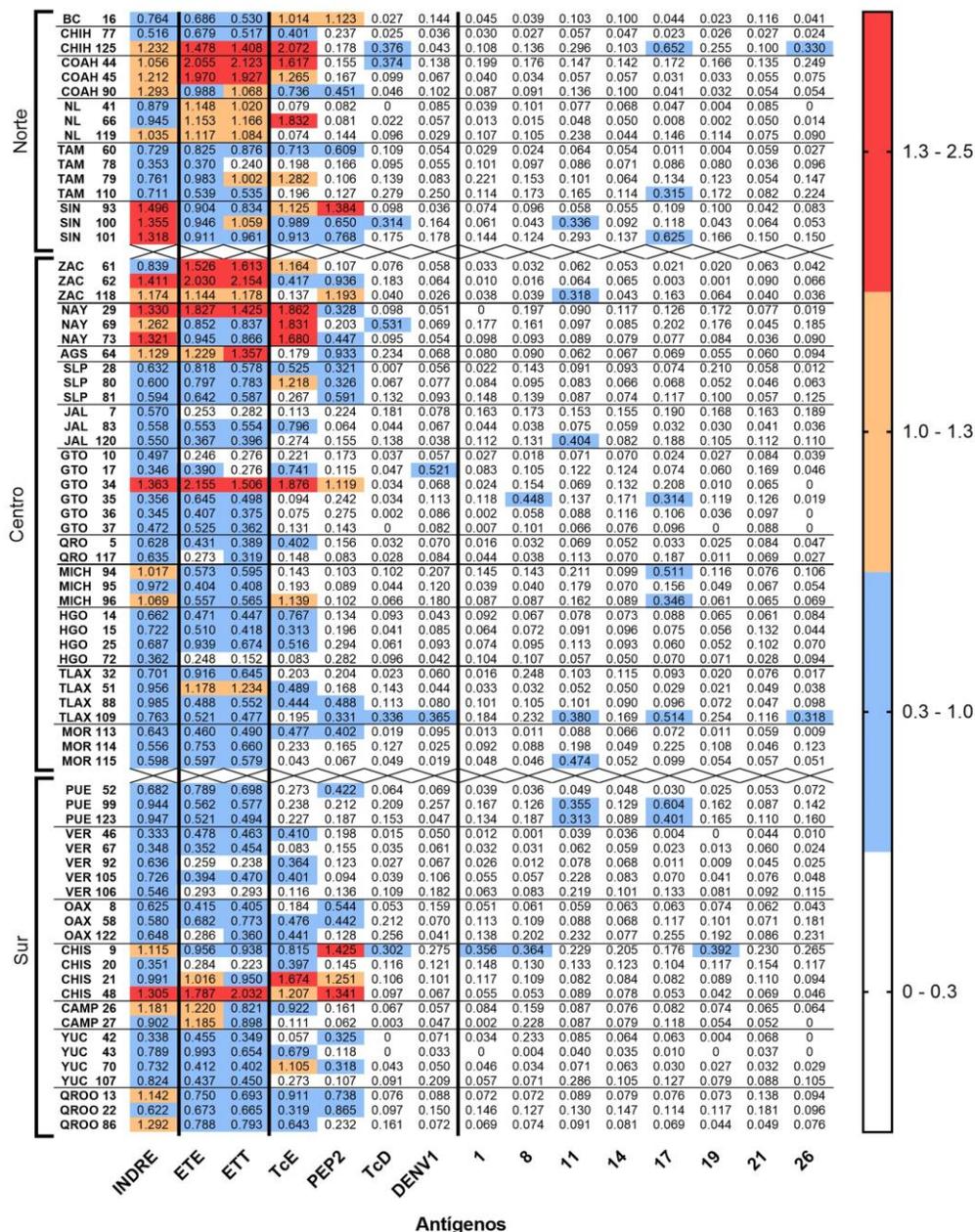
3.3 Regionalización del grado de seropositividad a *T. cruzi* de los datos del InDRE, extractos totales de proteínas de epimastigotes y tripomastigotes locales, y péptidos en estudio.

Conforme avanzábamos en los análisis de los sueros positivos a *T. cruzi*, se notó una cierta tendencia a observar mayores densidades ópticas en los sueros provenientes de algunos estados de la república mexicana en comparación a otros. Por lo tanto, se decidió comparar y analizar los sueros positivos y negativos a *T. cruzi* dividiéndolos en diferentes rangos de densidad óptica (1-0.299, 0.3-0.999, 1-1.299 y 1.3-2.5), estado o región (norte, centro y sur) del país.

Como se observa en la **Figura 39**, se encontraron niveles mayores de seropositividad ($DO \geq 1$) al parásito en los estados del norte como Coahuila y Sinaloa. También, en los estados de la parte norte del centro del país, como Zacatecas y Nayarit (colindantes con Coahuila y Sinaloa, respectivamente) se observan densidades ópticas altas (≥ 1). Por el contrario, el resto de los estados

analizados del centro y sur del país, aunque con excepciones en algunos sueros, la gran mayoría muestran densidades ópticas menores (< 1). De manera interesante, estos resultados se observaron de manera relativamente consistente cuando se utilizaron los datos obtenidos directamente de las muestras donadas y evaluadas por el InDRE, así como de nuestros resultados con los extractos totales de proteínas de epimastigotes y tripomastigotes locales y el péptido reportado en la literatura TcE. En el caso de los sueros negativos no se observó un patrón en particular (**Figura 40**). Estos resultados mostraron un probable patrón de mayor seropositividad al norte de México.

Positivos



Negativos

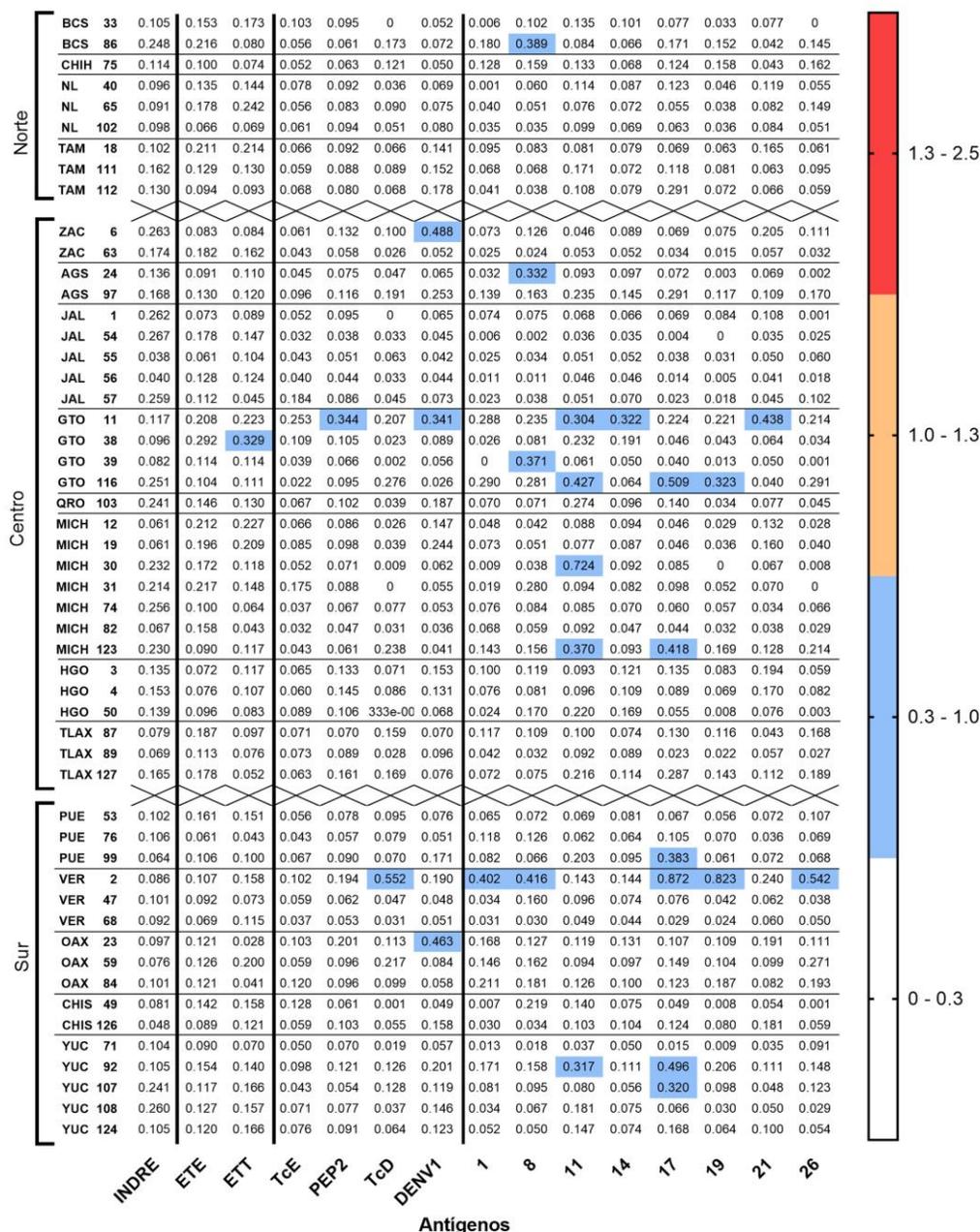


Figura 40 Regionalización del grado de seronegatividad a *T. cruzi* a través de su reconocimiento con los diferentes antígenos. Se muestra en un mapa de calor la densidad óptica de sueros negativos al parásito dividiéndolos en diferentes rangos de densidad óptica (1-0.299, 0.3-0.999, 1-1.299 y 1.3-2.5 / indicado a la derecha del mapa de calor), estado (separados con una línea horizontal) o región (norte, centro y sur /corchetes a la izquierda del mapa de calor) del país. En cada celda se muestra la densidad óptica obtenida a 490nm. A la derecha del mapa se muestra la escala de rangos de color y DO. Separando con líneas verticales se muestran los resultados del InDRE (INDRE), y los obtenidos en este trabajo con extractos totales de proteínas de epimastigotes (ETE) y tripomastigotes (ETT), así como con los péptidos reportados en la literatura TcE, PEP2, TcD, el péptido control negativo (DENV1) y los péptidos identificados en este trabajo (1,8,11,14,17,19,21 y 26). Los estados se ordenaron de acuerdo con cómo se localizan de norte a sur dentro de cada región. Además, los resultados se ordenaron de izquierda a derecha siguiendo el orden de la Figura 39.

4. DISCUSIÓN

Se ha estimado que existen alrededor de 6 a 7 millones de individuos infectados por *T. cruzi* en el mundo, siendo México el país endémico con el mayor número de afectados por la ECh en América latina (Arnal et al., 2019). La gran diversidad genética (6 DTU + Tc Bat), biológica, antigénica y geográfica de sus cepas, junto con la distinta respuesta inmune de las poblaciones humanas, dificulta el serodiagnóstico de la infección por *T. cruzi* en la actualidad (Almeida et al., 1997; Aznar et al., 1997; Balouz et al., 2017; Berrizbeitia, 2013; Herreros-Cabello et al., 2020; López-Monteon et al., 2019; Meza et al., 2014; Rubio-Ortiz et al., 2020; Zingales, 2018; Zingales & Bartholomeu, 2021). Esta problemática se ha observado principalmente en la fase crónica de la enfermedad en donde *T. cruzi* es primordialmente intracelular y su diagnóstico se basa en prueba serológicas para la detección de anticuerpos contra el parásito. Hasta el momento no hay un estándar de oro con una alta sensibilidad y especificidad, que además discrimine eficientemente entre muestras positivas y negativas sin importar su origen geográfico. Actualmente no están disponibles Kits diagnósticos conteniendo antígenos del parásito representativos de todas sus cepas, dificultando la detección de la infección en las poblaciones donde circulan cepas diferentes a las utilizadas en su elaboración. En este sentido, se ha propuesto la necesidad de contar con pruebas serológicas compuestas de un mínimo de tres o más antígenos diferentes para desarrollar una herramienta diagnóstica adecuada (Angheben et al., 2019; Candia-Puma et al., 2022; Castro-Sesquen et al., 2021; Lopez-Albizu et al., 2020; Lozano et al., 2019; Moure et al., 2016; Schijman et al., 2021). También, se ha hecho notar la importancia y necesidad de identificar nuevas biomoléculas antigénicas que permitan el desarrollo de mejores herramientas diagnósticas (Camussone et al., 2009; De Marchi et al., 2011; De Oliveira Mendes et al., 2013; Dopico et al., 2019; Elisei et al., 2018; Marcipar et al., 2005; Marcipar & Lagier, 2012; Peverengo et al., 2018). En consecuencia, considerando un contexto integral, se ha sugerido que el control del vector, junto con un diagnóstico confiable y la aplicación de un tratamiento oportuno, representaría no solo una disminución de la transmisión del

parásito, sino también un gran beneficio para las personas enfermas de la ECh y para el sector salud (Arnal et al., 2019; Bartsch et al., 2018; Dopico et al., 2019).

En un trabajo previo, nuestro grupo aisló, y caracterizó molecular y biológicamente 15 cepas del parásito de Oaxaca (Martínez-Cuevas, 2018), una zona altamente endémica de la ECh en México, en donde además existe el mayor número diferente de especies del insecto vector y la presencia de diferentes DTUs. Por ensayos de inmunoprecipitación ligados a espectrometría de masas y secuenciación, se identificaron proteínas inmunogénicas de cepas locales del parásito. Estas cepas del parásito aisladas y las proteínas antigénicas identificadas sirvieron de base para el desarrollo del presente trabajo, con el objetivo de contribuir al repertorio de antígenos útiles para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. Para ello utilizamos una estrategia para identificar y/o evaluar los antígenos candidato, contemplado tres enfoques: 1) A través de herramientas bioinformáticas se identificaron 28 péptidos antigénicos a partir de 23 proteínas antigénicas identificadas previamente a partir de las cepas locales de *T. cruzi*, los cuales fueron evaluados por ensayos de ELISA. 2) Realizamos una búsqueda de péptidos antigénicos a *T. cruzi* reportados en la literatura y los evaluamos también por la técnica de ELISA. Y 3) Obtuvimos y evaluamos extractos totales de proteínas de epimastigotes y tripomastigotes de cepas locales, utilizando el mismo abordaje serológico de ELISA. Para ello, se utilizaron sueros caracterizados como positivos y negativos al parásito, provenientes tanto de Oaxaca como de otras zonas endémicas de México.

En el primer enfoque las 23 secuencias proteicas iniciales (Q4DJ00, Q4DX97, Q4CY87, Q4DCW0, Q4E046, Q4D4I2, Q4E2A9 Q4E4W8, Q4CRX2, Q4CPF0, Q4D9H3, Q4D7V1, Q4CQ28, Q4D2C9, Q4DC56, Q4DYC3, Q4CXJ6, Q4DLI2, Q4E2E3, Q4CL09, Q4DAT6, Q4E5H7 y Q4E2M9) usadas para la identificación de epítomos antigénicos, mostraron características que las colocaba como candidatos adecuados. Esto debido a que, entre ellas se encuentran proteínas de superficie del parásito con una importante participación en la biología del parásito y su interacción

con el hospedero, teniendo buenas probabilidades de ser reconocidas por el sistema inmune. Algunas de estas se encuentran entre las siete principales familias de proteínas de superficie del parásito, como: 1) Las mucinas, las cuales son importantes en la protección del parásito, su infectividad y la modulación de la respuesta inmune del hospedero. 2) Las trans-sialidasas, que han sido utilizadas para la clasificación de los DTU por su similitud de secuencia, siendo algunas proteínas antigénicas las utilizadas en kits diagnósticos como es SAPA (antígeno de fase aguda eliminada). 3) La familia TcGP63 que por estar presentes en *Trypanosoma* y *Leishmania*, podrían presentar reacción cruzada en el diagnóstico. 4) La familia de las amastinas, que participan en la adaptación del parásito al vector en la diferenciación de *T. cruzi*. 5) La familia TcTASV (proteína rica en tripomastigote alanina, serina y valina), las cuales pueden ubicarse en la superficie del parásito y/o ser secretadas al medio, no contando con ortólogos en otros Tripanosomátidos. 6) Proteínas de superficie asociadas a mucinas (MASP), las cuales tienen su expresión preferente en los tripomastigotes sanguíneos, siendo los antígenos más abundantes en la superficie del tripomastigotes metacíclico el cual es el estadio infeccioso, que los coloca como antígenos blancos para ser usados en el diagnóstico. 7) Finalmente, la familia de cruzipaína que se expresan en los epimastigotes y amastigotes en su superficie, mientras que en los tripomastigotes se encuentran en la región de la bolsa flagelar; generando una fuerte respuesta inmune en individuos infectados (Ferrão et al., 2015; Mejía et al., 2004; Pech-Canul et al., 2017). Se esperaba que al menos los péptidos identificados de las proteínas 2 llamada 2Q4D4I2 (Mucina), 3 llamada Q4E046 (Mucina), 4 llamada Q4E4W8 (MASP), 10 llamada Q4E2A9 (MASP) y 19 llamada Q4D9H3 (Trans-sialidasa) arrojaran buenos resultados. Sin embargo, aun cuando varios de los péptidos provenientes de estas proteínas fueron reconocidos por sueros positivos a *T. cruzi* provenientes de Oaxaca, lo hicieron con baja eficiencia y por un número muy limitado de ellos. Además, de que no fueron reconocidos con sueros de otras zonas de México. Se ha reportado, el uso exitoso de péptidos sintéticos utilizando estrategias a gran escala. En estos trabajos, usando espectrometría de masas y chip de péptidos como micromatriz, se han identificado entre 457 a 22570 proteínas. De éstas mediante

análisis *in silico* de Lc B se han diseñado un número tan grande de péptidos, que requieren para su evaluación metodologías como microarreglos y DOT-ELISA, obteniendo un éxito en un rango del 0.01 al 21% (Bhattacharyya et al., 2010; Carmona et al., 2012, 2015; De Oliveira Mendes et al., 2013; Elisei et al., 2018; Mucci et al., 2017). Sin embargo, estas tecnologías a gran escala son de muy alto costo lo que las hace inaccesibles para muchos laboratorios. Por ello una alternativa fue aplicar un enfoque no común aplicado con éxito en la detección para *Rickettsia* (95%), *Ehrlichia* (95%), virus de dengue (75%), Chikungunya (75%) y Zika (95%) (comunicación personal), utilizando el diseño *in silico* de péptidos del tamaño deseado a partir de los epítomos identificados (Dzul-Rosado et al., 2020). Esta estrategia considera los epítomos lineales obtenido en Lc B más el análisis de Lc T, mediante los servidores NETMCHII pan 4.0. De este modo se predicen los péptidos de la clase MHCII considerando los alelos más frecuentes en la población mexicana, aunque como nuestro objetivo era otro, no se realizaron ensayo de activación de Lc CD4 y CD8. Los resultados negativos indican varias posibilidades, como que esta estrategia para el diseño de los péptidos no es útil para el caso de *T. cruzi*, que las proteínas candidato iniciales seleccionadas no fueron las adecuadas, o que la estrategia usada para su selección de las proteínas iniciales no fue la correcta. Con respecto a esto último, los péptidos reportados en la literatura que evaluamos con éxito en este trabajo fueron diseñados a partir de secuencias repetidas (Burns et al., 1992; Houghton et al., 1999; Peralta et al., 1994). Por tanto, posiblemente este es un factor que se podría considerar para la selección de las proteínas candidato iniciales, en un trabajo futuro.

En cuanto al segundo enfoque, la selección de los péptidos reportados en la literatura se hizo con base a que fueran péptidos lineales, analizados de manera individual y que mostraran buenos resultados de sensibilidad (**Tabla Apéndice 1**). A pesar de que se encontraron reportes de estos péptidos en tripéptidos (PEP2/TcD/TcE / S 99.6% y E 99.33%) (Houghton et al., 1999) o tetrapéptido (PEP2/TcD/TcE/Lo1.2 / S 100% y E 92.5%) (Houghton et al., 2000) con mejores niveles de sensibilidad y especificidad que en su forma individual (sensibilidad del

93% al 99%) (Burns et al., 1992; Houghton et al., 1999; Peralta et al., 1994), decidimos evaluarlos individuales para poderlos comparar con nuestros péptidos más fácilmente. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que los péptidos TcE y PEP2 tienen un muy buen desempeño diagnóstico con sueros de todas las zonas endémicas de México, mientras que TcD no mostró buenos resultados. El péptido TcE proviene de una proteína ribosomal (rTcE) de 35 kDa, la cual fue identificada mediante el cribado de una biblioteca de expresión de cDNA de *T. cruzi*. Este péptido contiene una secuencia repetida de 7 aminoácidos, encontrándose que son necesarias tres secuencias repetidas para actividad completa (KAAIAPAKAAAAPAKAATAPA). Este péptido fue analizado mediante ELISA con 240 sueros positivos, 35 sueros negativos a *T. cruzi* y 8 sueros de personas con leishmaniasis, todos originarios de Brasil, encontrándose 99% de sensibilidad en la detección (Houghton et al., 1999, 2000). En el caso de PEP2, este péptido se obtuvo de una biblioteca de expresión de DNA, con sueros positivos a *T. cruzi* provenientes de Argentina, Brasil y Chile (Ibañez et al., 1988). La clona obtenida presentó la característica de que el producto del gen contiene secuencias repetidas en tándem, a partir de las cuales se diseñó a PEP2, el cual es una secuencia peptídica de 22 aminoácidos (GDKPSPFGOAAAGDKPSPFGQA) que representa dos repetidos de 12 aminoácidos (PSPFGQAAAG DK) de la clona 1 y 10 aminoácidos del repetido encontrada en la clona dos. Este péptido fue analizado con 35 sueros de personas con ECh, reportando una reactividad en el 91% de las muestras (Vergara et al., 1991). Finalmente, TcD fue obtenido a partir de la clonación y expresión de una secuencia genética de un antígeno de *T. cruzi* que codifica para una proteína inmunodominante de 260kDa conteniendo un epítipo repetitivo. Esta secuencia es conservada en diversos aislados de tripomastigotes de la cepa Tulahuen. Se analizó con sueros de 120 paciente chagasicos en fase aguda, crónica o indeterminados provenientes de Brasil, Bolivia y Argentina, y 39 sueros de personas con leishmaniasis visceral o cutánea, tuberculosis, lepra y malaria y 32 sueros negativos. Se reportó una detección de 96.7% (116 de 120) sueros chagásicos positivos y solo el 3.3% de sueros negativos con falsos positivos (Burns et al., 1992). Posteriormente, se analizó el reconocimiento de TcD y PEP2

de manera individual como en combinación, con 142 sueros positivos y 81 sueros negativos a *T. cruzi*, y con otros 37 sueros de los cuales 23 eran de individuos con leishmaniasis, 7 con tuberculosis y 7 con lepra, todos originarios de Brasil. Los resultados mostraron una sensibilidad de 91.6% de PEP2, 93.8% TcD y del 99.4% cuando se cambiaron (Peralta et al., 1994). En estos reportes, se observa que los tres péptidos presentan en común la presencia de secuencias repetidas en su diseño y que fueron identificados a partir de secuencias de cepas del parásito y sueros, provenientes de Sudamérica. En este sentido, hay reportes en que se ha propuesto el uso de proteínas con secuencias repetidas en tándem, ya que muestran una antigenicidad significativa (Goto et al., 2008). Por tanto, como se mencionó anteriormente, en trabajos futuros sería importante considerar el identificar y evaluar péptidos antigénicos diseñados a partir de las proteínas identificadas en los ensayos de inmunoprecipitación, pero ahora en aquellas conteniendo secuencias repetidas. Nuestros resultados también sugieren que posiblemente las secuencias de TcE y PEP2 estén conservadas en algunas de las cepas que circulan en México ya que, aunque obtuvimos resultados positivos, estos no fueron al nivel de los encontrados en los trabajos realizados en Sudamérica (Burns et al., 1992; Peralta et al., 1994; Vergara et al., 1991).

Por otro lado, también se buscó un péptido que pudiera ser utilizado como control negativo, el cual correspondió a DENV1 (LKATLLAVSGVYPMSIPATLFWYFWQKKKQRS). Corresponde a un péptido de 33 aa diseñado a partir de una secuencia del Virus del dengue serotipo 1 NS2b en la posición 1445-1476 (Peña Bates, 2021), diseñado con la misma estrategia que los nuestros con muy buenos resultados para la detección de dengue y donado por el laboratorio del Dr. Cesar Lugo Caballero. Al péptido se le realizó la búsqueda de secuencias homologas mediante el programa BLAST, sin encontrar proteínas similares en *T. cruzi*, otros tripanosomátidos, ni algún otro organismo a excepción del Virus del dengue. Este péptido presento reconocimiento con 2 sueros positivos y 3 sueros negativos a *T. cruzi*, lo cual podría deberse a que la personas podrían tener antecedente de infección por dengue (una información con la que no

contamos) al compartir zonas endémicas con *T. cruzi*. Sin embargo, considerando que el número de sueros evaluados fue mayor, consideramos que es un buen péptido control, aunque sería necesario la búsqueda de otros posibles controles negativos para trabajos futuros.

Finalmente, en cuanto al tercer enfoque con extractos totales de proteínas de epimastigotes y tripomastigotes de las cepas locales, se obtuvieron excelentes resultados con un reconocimiento muy eficiente con los sueros positivos de las diferentes zonas endémicas de México, donados por el InDRE. A este respecto cabe señalar que una de las pruebas que aplica el InDRE para el análisis de los sueros, es el uso de una prueba casera con extractos totales de proteínas de 15 cepas del parásito, obtenidas de diferentes estados de la República Mexicana. Los altos niveles de reconocimiento que obtuvimos con las cepas locales, aisladas todas en Oaxaca, apoyan nuestra propuesta de que estas cepas son representativas de las que circulan en las diferentes zonas endémicas de la ECh en México. Y de que Oaxaca es un buen modelo de estudio por su gran diversidad de especies de vectores y de DTUs, presentes en su territorio. Se ha documentado que el uso de extractos proteicos de epimastigotes locales presenta una mayor respuesta inmune (Martínez-Pavetti et al., 2017). Pero también se ha propuesto, que sería mejor utilizar extractos proteicos de tripomastigotes, por ser el estadio presente en el mamífero (Almeida et al., 1997; Berrizbietia et al., 2004). Nuestros resultados mostraron niveles iguales de especificidad (98%) con ambos extractos totales de proteínas de epimastigotes y tripomastigotes, pero la sensibilidad fue mayor con epimastigotes (100%) que con tripomastigotes (94%). Este resultado apoya la hipótesis de que al compartir ambos estadios del parásito varias de sus proteínas (Ferrão et al., 2015; Mejía et al., 2004; Pech-Canul et al., 2017), es factible utilizar los extractos proteicos de epimastigotes con fines diagnóstico, ya que además brindan la ventaja de su fácil cultivo. A este respecto, es importante mencionar que este es el primer trabajo en que se compara experimentalmente el desempeño de extractos totales de epimastigotes vs tripomastigotes, con sueros positivos y negativos a *T. cruzi*. Posiblemente, debido a la imposibilidad de varios laboratorios

para la obtención de los tripomastigotes (forma no replicativa), al no contar con la infraestructura y técnica necesarias (Almeida et al., 1997; Aznar et al., 1997; Berrizbeitia, 2013; Berrizbeitia et al., 2006).

De manera interesante, se observaron niveles mayores de seropositividad al parásito en muestras serológicas provenientes del norte del país, tanto en los análisis del InDRE (**Figura 23**) como en los nuestros (**Figuras 39 y 40**). Y también, una clara disminución en la seropositividad desde el centro al sur del país. Esto es interesante porque además de las posibles diferencias en la respuesta inmune de los pobladores entre esos lugares, también podría haber diferencias en los DTUs de las cepas del parásito circulantes y de las especies de vectores. Desafortunadamente no se cuenta con mucha de esa información, que pudiera permitir un análisis integral y georreferenciado. Esto sin duda muestra la necesidad de realizar trabajos futuros encaminados en entender la contribución de cada uno de los componentes en la triada de la ECh (parásito, mamífero e insecto vector). Por ejemplo, posiblemente del centro al sur de México predominen las cepas TcI, que producen bajos niveles de parásitos y anticuerpos. Lo que coincidiría con lo observado en el diagnóstico de la infección de *T. cruzi*, en que se ha visto una mayor dificultad en muestras provenientes desde las amazonas hasta México, en comparación con las muestras de Sudamérica, y que se ha sugerido se debe posiblemente a la predominancia de cepas TcI en esos lugares (Truyens et al., 2021; World Health Organization, 2007; Zingales, 2018).

Los resultados del estudio contribuyen al desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas para la enfermedad de Chagas en México, mediante la identificación y evaluación de péptidos antigénicos reportados y extractos de proteínas de cepas locales del parásito.

5. CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados del presente estudio contribuyen al desarrollo de nuevas alternativas diagnósticas para la enfermedad de Chagas en México, mediante la identificación y evaluación de antígenos derivados de cepas locales de *T. cruzi*. Los extractos totales de proteínas de epimastigotes autóctonos, mostraron ser una promisorio herramienta serológica, al reconocer de manera eficiente sueros positivos provenientes de distintas regiones endémicas del país, confirmando la hipótesis del trabajo. Asimismo, los péptidos TcE y PEP2, reportados en la literatura, validaron su potencial diagnóstico, pero con menor sensibilidad y especificidad.

Sin embargo, se requiere continuar indagando en estrategias para la identificación de nuevos antígenos que permitan superar las limitantes impuestas por la diversidad genética del parásito y por la variabilidad en la respuesta inmune entre las poblaciones humanas. Los resultados sientan las bases para el desarrollo de pruebas diagnósticas múltiples y más sensibles, acordes a las características epidemiológicas de la enfermedad de Chagas en México.

6. PERSPECTIVAS

- Analizar las secuencias obtenidas de la inmunoprecipitación en busca de secuencias repetidas para el diseño de nuevos péptidos.
- Diseñar una prueba rápida con los extractos totales de proteínas de epimastigotes, así como realizar la validación en estudio epidemiológico en población abierta.
- Combinar TcE y PEP2 con otros antígenos para evaluar si existe un mejor reconocimiento entre sueros positivos y negativos.
- Obtener las proteínas recombinantes 6 (Q4CXJ6) y 15 (Q4E2M9) para analizar su reconocimiento entre sueros positivos y negativos a *T. cruzi*.
- Analizar los extractos totales de proteínas de epimastigotes locales con sueros de otros países endémicos de la ECh de Latinoamérica.

7. REFERENCIAS

- Acevedo, G. R., Girard, M. C., & Gómez, K. A. (2018). The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. *Frontiers in Immunology*, 9(August), 1929. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01929>
- Adiyaman, R., & McGuffin, L. J. (2019). Methods for the refinement of protein structure 3D models. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2–20. <https://doi.org/10.3390/ijms20092301>
- Almeida, I. C., Covas, D. T., Soussumi, L. M. T., & Travassos, L. R. (1997). A highly sensitive and specific chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of active *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion*, 37, 850–857. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1944.tb05917.x>
- Andrade, S. G., & Magalhães, J. B. (1997). Biodemes and zymodemes of *trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30(1), 27–35.
- Añez, N., Crisante, G., Da Silva, F. M., Rojas, A., Carrasco, H., Umezawa, E. S., Stolf, A. M. S., Ramírez, J. L., & Teixeira, M. M. G. (2004). Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. *Tropical Medicine and International Health*, 9(12), 1319–1326. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2004.01333.x>
- Angheben, A., Buonfrate, D., Cruciani, M., Jackson, Y., Alonso-Padilla, J., Gascon, J., Gobbi, F., Giorli, G., Anselmi, M., & Bisoffi, Z. (2019). Rapid immunochromatographic tests for the diagnosis of chronic chagas disease in at-risk populations: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007271>
- Antas, P. R. Z., Azevedo, E. N., Luz, R. M. P., Medrano-Mercado, N., Volpini, Â. C., Romanha, Á. J., & Araújo-Jorge, T. (2000). A reliable and specific enzyme.doc. *Parasitology Research*, 86, 813–820.
- Araújo, A. B., & Berne, M. E. A. (2013). Conventional serological performance in diagnosis of Chagas' disease in southern Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 17(2), 174–178. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.10.013>
- Araujo, F. G. (1986). Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and by antibodies to related trypanosomatids. *Infection and Immunity*, 53(1), 179–185.
- Araujo, F. G., & Guptill, D. (1984). Use of antigen preparations of the amastigote stage of *trypanosoma cruzi* in the serology of Chagas' disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 33(3), 362–371. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1984.33.362>
- Arnal, A., Waleckx, E., Rico-Chávez, O., Herrera, C., & Dumonteil, E. (2019). Estimating the current burden of Chagas disease in Mexico: A systematic review and meta-analysis of epidemiological

- surveys from 2006 to 2017. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(4), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006859>
- ATCC - American Type Culture Collection. (2003). *NIH/3T3 CRL-1658™*. <https://www.atcc.org/products/crl-1658>.
- Aznar, C., Liegeard, P., Mariette, C., Lafon, S., Levin, M. J., & Hontebeyrie, M. (1997). A simple *Trypanosoma cruzi* enzyme-linked immunoassay for control of human infection in nonendemic areas. *Immunology and Medical Microbiology*, 18, 31–37.
- Ballesteros Rodea, G., Martínez Cuevas, T. I., Jiménez Ramos, B., & Campos, A. A. (2018). Chagas disease: an overview of diagnosis. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 6(3), 151–157. <https://doi.org/10.15406/jmen.2018.06.00207>
- Balouz, V., Agüero, F., & Buscaglia, C. A. (2017). Chagas disease diagnostic applications: present knowledge and future steps. *Advances in Parasitology*, 97, 1–45. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4786-2_15
- Barfield, C. A., Barney, R. S., Crudder, C. H., Wilmoth, J. L., Stevens, D. S., Mora-Garcia, S., Yanovsky, M. J., Weigl, B. H., & Yanovsky, J. (2011). A highly sensitive rapid diagnostic test for Chagas disease that utilizes a recombinant *Trypanosoma cruzi* antigen. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 58(3), 814–817. <https://doi.org/10.1109/TBME.2010.2087334>
- Barquera, R., & Granados, J. (2013). La diversidad biológica en los haplotipos del sistema HLA en las poblaciones mestizas de México. *Cuicuilco*, 20(58), 197–225.
- Barquera, R. L. (2012). El papel de la genética de poblaciones en la inmunología del trasplante en México. *Gaceta Médica de México*, 148(1), 52–67.
- Barquera, R., Zúñiga, J., Hernández-Díaz, R., Acuña-Alonzo, V., Montoya-Gama, K., Moscoso, J., Torres-García, D., García-Salas, C., Silva, B., Cruz-Robles, D., Arnaiz-Villena, A., Vargas-Alarcón, G., & Granados, J. (2008). HLA class I and class II haplotypes in admixed families from several regions of Mexico. *Molecular Immunology*, 45(4), 1171–1178. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.07.042>
- Bartsch, S. M., Avelis, C. M., Asti, L., Hertenstein, D. L., Ndeffo-Mbah, M., Galvani, A., & Lee, B. Y. (2018). The economic value of identifying and treating Chagas disease patients earlier and the impact on *Trypanosoma cruzi* transmission. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006809>
- Benítez-Alva, J. I., Huerta, H., & Téllez-Rendón, J. L. (2012). Distribución De Triatomíneos (Heteroptera: Reduviidae) Asociados a La Vivienda Humana Y Posibles Zonas De Riesgo En Seis Estados De La República Mexicana. *Biocyt*, 5(17), 327–340. www.iztacala.unam.mx/biocyt 5(17):
- Berná, L., Pita, S., Chiribao, M. L., Parodi-Talice, A., Alvarez-Valin, F., & Robello, C. (2019). Biology of the *Trypanosoma cruzi* Genome. In *IntechOpen* (pp. 1–16). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>

- Berrizbeitia, M. (2013). Trypomastigote of trypanosoma cruzi excreted/secreted antigens (tesa) as useful tools for the diagnosis of chagas disease. *SABER. Revista Multidisciplinaria Del Consejo de Investigación de La Universidad de Oriente*, 25(4), 346–357.
- Berrizbeitia, M., Ndao, M., Bubis, J., Gottschalk, M., Aché, A., Lacouture, S., Medina, M., & Ward, B. J. (2006). Purified excreted-secreted antigens from trypanosoma cruzi trypomastigotes as tools for diagnosis of Chagas' disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(2), 291–296. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.2.291-296.2006>
- Berrizbeitia, M., Ndao, M., Gottschalk, M., Aché, A., Vásquez, F., Lacouture, S., Medina, M., & Ward, B. J. (2004). Development and Comparison of Enzyme Immunoassays for Diagnosis of Chagas' Disease Using Fixed Forms of Trypanosoma cruzi (Epimastigotes, Amastigotes, and Trypomastigotes) and Assessment of Antigen Stability for the Three Assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4), 1766–1769. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1766-1769.2004>
- Bhattacharyya, T., Brooks, J., Yeo, M., Carrasco, H. J., Lewis, M. D., Llewellyn, M. S., & Miles, M. A. (2010). Analysis of molecular diversity of the Trypanosoma cruzi trypomastigote small surface antigen reveals novel epitopes, evidence of positive selection and potential implications for lineage-specific serology. *International Journal for Parasitology*, 40(8), 921–928. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.01.002>
- Biagi, F., & Gómez-Arce, E. (1965). Los dos primeros casos de miocarditis chagásica, comprobados en México. *Archivos de Cardiología de México*, 35(5), 611–619.
- Bongertz, V., & Dvorak, J. A. (1983). TRYPANOSOMA CRUZI: ANTIGENIC CLONED ANALYSIS OF CLONED STOCKS. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 32(4), 716–722.
- Bosseno, M., Kasten, F. L., Ramsey, J., & Espinoza, B. (2002). Predominance of Trypanosoma cruzi Lineage I in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), 627–632. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.2.627>
- Branche, C., Ochaya, S., Åslund, L., & Andersson, B. (2006). Comparative karyotyping as a tool for genome structure analysis of Trypanosoma cruzi. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 147(1), 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.01.005>
- Brenière, S. F., Waleckx, E., & Barnabé, C. (2016). Over Six Thousand Trypanosoma cruzi Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(8), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004792>
- Briones, M. R. S., Souto, R. P., Stolf, B. S., & Zingales, B. (1999). The evolution of two Trypanosoma cruzi subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 104(2), 219–232. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(99\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(99)00155-3)
- Brisse, S., Henriksson, J., Barnabé, C., Douzery, E. J. P., Berkvens, D., Serrano, M., De Carvalho, M. R. C., Buck, G. A., Dujardin, J. C., & Tibayrenc, M. (2003). Evidence for genetic exchange and hybridization in Trypanosoma cruzi based on nucleotide sequences and molecular

- karyotype. *Infection, Genetics and Evolution*, 2(3), 173–183. [https://doi.org/10.1016/S1567-1348\(02\)00097-7](https://doi.org/10.1016/S1567-1348(02)00097-7)
- Brown, R. B., & Audet, J. (2008). Current techniques for single-cell lysis. *Journal of the Royal Society Interface*, 5(SUPPL.2). <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0009.focus>
- Bucio, M. I., Cabrera, M., Segura, E. L., Zenteno, E., & Salazar-Schettino, P. M. (1999). Identification of immunodominant antigens in Mexican strains of *Trypanosoma cruzi*. *Immunological Investigations*, 28(4), 257–268. <https://doi.org/10.3109/08820139909060860>
- Burns, J. M., Shreffler, W. G., Rosman, D. E., Sleath, P. R., March, C. J., & Reed, S. G. (1992). Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(4), 1239–1243. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.4.1239>
- Buscaglia, C. A., Campo, V. A., Frasc, A. C. C., & Di Noia, J. M. (2006). *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nature Reviews. Microbiology*, 4(3), 229–236. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1351>
- Caballero E., Z., Correa, R., Nascimento, M. S., Villarreal, A., Llanes, A., & Kesper, N. (2019). High sensitivity and reproducibility of in-house ELISAs using different genotypes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunology*, 41(7), 1–12. <https://doi.org/10.1111/pim.12627>
- Caballero, Z. C., Sousa, O. E., Marques, W. P., Saez-Alquezar, A., & Umezawa, E. S. (2007). Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(8), 1045–1049. <https://doi.org/10.1128/CVI.00127-07>
- Campo, V., Di Noia, J. M., Buscaglia, C. A., Agüero, F., Sánchez, D. O., & Frasc, A. C. C. (2004). Differential accumulation of mutations localized in particular domains of the mucin genes expressed in the vertebrate host stage of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 133(1), 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.09.006>
- Camussone, C., Gonzalez, V., Belluzo, M. S., Pujato, N., Ribone, M. E., Lagier, C. M., & Marcipar, I. S. (2009). Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(6), 899–905. <https://doi.org/10.1128/CVI.00005-09>
- Candia-Puma, M. A., Machaca-Luque, L. Y., Roque-Pumahuanca, B. M., Galdino, A. S., Giunchetti, R. C., Coelho, E. A. F., & Chávez-Fumagalli, M. A. (2022). Accuracy of Diagnostic Tests for the Detection of Chagas Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diagnostics*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/DIAGNOSTICS12112752/S1>
- Cano, M. I., Gruber, A., Vazquez, M., Cortés, A., Levin, M. J., González, A., Degraeve, W., Rondinelli, E., Zingales, B., Ramirez, J., Alonso, C., Requena, J. M., & Silveira, J. F. da. (1995). Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* Genome Project. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 71(2), 273–278. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(95\)00066-A](https://doi.org/10.1016/0166-6851(95)00066-A)

- Carbonetto, C. H., Malchiodi, E. L., Chiramonte, M. G., Zwirner, N. W., & Margi, R. A. (1989). Use of formalinized epimastigotes for the detection of anti- *Trypanosoma cruzi* antibodies using immunoenzyme technics. *Revista Argentina de Microbiología*, *21*, 79–83.
- Carmona, S. J., Nielsen, M., Schafer-Nielsen, C., Mucci, J., Altcheh, J., Balouz, V., Tekiel, V., Frasch, A. C., Campetella, O., Buscaglia, C. A., & Agüero, F. (2015). Towards high-throughput immunomics for infectious diseases: Use of next-generation peptide microarrays for rapid discovery and mapping of antigenic determinants. *Molecular and Cellular Proteomics*, *14*(7), 1871–1884. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.045906>
- Carmona, S. J., Sartor, P. A., Leguizamón, M. S., Campetella, O. E., & Agüero, F. (2012). Diagnostic Peptide Discovery: Prioritization of Pathogen Diagnostic Markers Using Multiple Features. *PLoS ONE*, *7*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050748>
- Carneiro, M., Romanha, A. J., & Chiari, E. (1991). Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. In *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (Vol. 86, Issue 4, pp. 387–393). <https://doi.org/10.1590/S0074-02761991000400002>
- Castro-Sesquen, Y. E., Saldaña, A., Patino Nava, D., Paulette Evans, D., Bayangos, T., Detoy, K., Trevino, A., Marcus, R., Bern, C., Gilman, R. H., Talaat, K. R., Avila, C., Camacho, F., Herrera, S., Jimenez, A., Lozano, V., Malaga, E., Merida, M., Morales, C., ... Zapata, F. (2021). Evaluation of 2 lateral flow rapid tests in the diagnosis of chagas disease in the washington metropolitan area. In *Open Forum Infectious Diseases* (Vol. 8, Issue 4). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab096>
- Cerqueira, G. C., Bartholomeu, D. C., DaRocha, W. D., Hou, L., Freitas-Silva, D. M., Machado, C. R., El-Sayed, N. M., & Teixeira, S. M. R. (2008). Sequence diversity and evolution of multigene families in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *157*(1), 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.10.002>
- Cervantes-Landín, A. Y., Martínez-Martínez, I., Reyes, P. A., Shabib, M., & Espinoza-Gutiérrez, B. (2014). Estandarización de la técnica Dot-ELISA para la detección de anticuerpos anti- *Trypanosoma cruzi* y su comparación con ELISA y Western blot. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *32*(6), 363–368. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.05.006>
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *1*, 159–218.
- Chiller, T. M., Samudio, M. A., & Zoulek, G. (1990). IgG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chagas' disease and leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *43*(6), 650–656. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.43.650>
- Consejo Nacional de Población (CONAPO). (2015). *Índice de marginación por entidad federativa y municipio 2015*.

- Conteh, L., Engels, T., & Molyneux, D. H. (2010). Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. *The Lancet*, 375(9710), 239–247. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61422-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61422-7)
- Coordinación General del Comité Estatal de Planeación para el Desarrollo de Oaxaca. (2017a). *Diagnóstico Regional Istmo*. <https://www.oaxaca.gob.mx/coplade/wp-content/uploads/sites/29/2017/04/DR-Istmo-28marzo17.pdf>
- Coordinación General del Comité Estatal de Planeación para el Desarrollo de Oaxaca. (2017b). *Diagnóstico Regional Sierra Sur*. <https://www.oaxaca.gob.mx/coplade/wp-content/uploads/sites/29/2017/04/DR-Sierra-Sur-21marzo17.pdf>
- Cortés, J. M., Velasco Castrejón, O., Labastida, M. H., Melchor, A. H., Duarte, N., & De Torre, R. (1985). La enfermedad de Chagas en Santiago Yosotiche, Oaxaca, México. *Salud Pública de Mexico*, 27(1), 60–65.
- Coura, J. R., Marquez, M. H. P., Guerra, J. A. de O., Zauza, P. L., Miguel, J. C., & Pereira, J. B. (2013). A new survey of the serology of human *Trypanosoma cruzi* infection in the Rio Negro microregion, Brazilian Amazon: A critical analysis. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(7), 909–913. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130303>
- Cruz-Reyes, A., & Pickering-López, J. M. (2006). Chagas disease in Mexico: An analysis of geographical distribution during the past 76 years - A review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(4), 345–354. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000400001>
- Cruz-Robles, D., Reyes, P. A., Monteón-Padilla, V. M., Ortiz-Muñiz, A. R., & Vargas-Alarcón, G. (2004). MHC class I and class II genes in mexican patients with Chagas disease. *Human Immunology*, 65(1), 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2003.10.008>
- Da Silveira, J. F., Umezawa, E. S., & Luquetti, A. O. (2001). Chagas disease: Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends in Parasitology*, 17(6), 286–291. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)01897-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)01897-9)
- De Fuentes-Vicente, J. A., Vidal-López, D. G., Flores-Villegas, A. L., Moreno-Rodríguez, A., De Alba-Alvarado, M. C., Salazar-Schettino, P. M., Rodríguez-López, M. H., & Gutiérrez-Cabrera, A. E. (2019). *Trypanosoma cruzi*: A review of biological and methodological factors in Mexican strains. *Acta Tropica*, 195(April), 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.04.024>
- De Leo, C., Castelan, N., Lopez, M., Gonzalez, N., Weckmann, A. L., Melin-Aldana, H., Vargas-Alarcon, G., Bordes, J., Alarcon-Segovia, D., Granados, J., Ramirez, E., & Lisker, R. (1997). HLA Class I and Class II Alleles and Haplotypes in Mexican Mestizos Established from Serological Typing of 50 Families. *Human Biology*, 69(6), 809–818. <http://www.jstor.orgURL:http://www.jstor.org/stable/41465605>
- De Marchi, C. R., Di Noia, J. M., Frasc, A. C. C., Neto, V. A., Almeida, I. C., & Buscaglia, C. A. (2011). Evaluation of a recombinant *Trypanosoma cruzi* mucin-like antigen for serodiagnosis of Chagas' disease. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(11), 1850–1855. <https://doi.org/10.1128/CVI.05289-11>

- De Oliveira Mendes, T. A., Reis Cunha, J. L., de Almeida Lourdes, R., Rodrigues Luiz, G. F., Lemos, L. D., dos Santos, A. R. R., da Câmara, A. C. J., da Cunha Galvão, L. M., Bern, C., Gilman, R. H., Fujiwara, R. T., Gazzinelli, R. T., & Bartholomeu, D. C. (2013). Identification of Strain-Specific B-cell Epitopes in *Trypanosoma cruzi* Using Genome-Scale Epitope Prediction and High-Throughput Immunoscreening with Peptide Arrays. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002524>
- De Souza, W. (2009). Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(SUPPL. 1), 89–100. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000900014>
- De Souza, W., De Carvalho, T. U., & Barrias, E. S. (2017). Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* and its interaction with host cells. In *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition* (Second Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00018-6>
- Di Noia, J. M., Buscaglia, C. A., De Marchi, C. R., Almeida, I. C., & Frasch, A. C. C. (2002). A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *Journal of Experimental Medicine*, 195(4), 401–413. <https://doi.org/10.1084/jem.20011433>
- Di Noia, J. M., D'Orso, I., Åslund, L., Sánchez, D. O., & Frasch, A. C. C. (1998). The *Trypanosoma cruzi* mucin family is transcribed from hundreds of genes having hypervariable regions. *Journal of Biological Chemistry*, 273(18), 10843–10850. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.18.10843>
- Dirección General de Epidemiología. (2022). *Vigilancia Epidemiológica Semana 52, 2022*.
- Dopico, E., Del-Rei, R. P., Espinoza, B., Ubillos, I., Zanchin, N. I. T., Sulleiro, E., Moure, Z., Celedon, P. A. F., Souza, W. V., Da Silva, E. D., Gomes, Y. M., & Santos, F. L. N. (2019). Immune reactivity to *Trypanosoma cruzi* chimeric proteins for Chagas disease diagnosis in immigrants living in a non-endemic setting. *BMC Infectious Diseases*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3872-z>
- Dvorak, J. A., Hall, T. E., Crane, M. S. J., Engel, J. C., McDaniel, J. P., & Uriegas, R. (1982). *Trypanosoma cruzi*: Flow Cytometric Analysis. I. Analysis of Total DNA/Organism by Means of Mithramycin-Induced Fluorescence. *The Journal of Protozoology*, 29(3), 430–437. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1982.tb05427.x>
- Dzul-Rosado, K., Arias-León, J., Lugo-Caballero, C., Peniche-Lara, G., Balam-Romero, B., & Rosado-Vallado, &. (2020). Application of reverse vaccinology for the identification of epitope candidates from *Rickettsia rickettsii*. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 57, 643–647. http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/
- Elisei, R. M. T., Matos, C. S., Carvalho, A. M. R. S., Chaves, A. T., Medeiros, F. A. C., Barbosa, R., Marcelino, A. P., dos Santos Emidio, K., Coelho, E. A. F., Duarte, M. C., de Oliveira Mendes, T. A., da Costa Rocha, M. O., & Menezes-Souza, D. (2018). Immunogenomic screening approach to identify new antigens for the serological diagnosis of chronic Chagas' disease. *Applied*

Microbiology and Biotechnology, 102(14), 6069–6080. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8992-7>

- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A. N., Ghedin, E., Worthey, E. A., Delcher, A. L., Blandin, G., Westenberger, S. J., Caler, E., Cerqueira, G. C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Åslund, L., Attipoe, P., ... Andersson, B. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of chagas disease. *Science*, 309(5733), 409–416. <https://doi.org/10.1126/science.1112631>
- Espinoza, B., Rico, T., Sosa, S., Oaxaca, E., Vizcaino-Castillo, A., Caballero, M. L., & Martínez, I. (2010). Mexican *Trypanosoma cruzi* T. cruzi i strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/890672>
- Fernandes, C. D., Murta, S. M. F., Cerávolo, I. P., Krug, L. P., Vidigal, P. G., Steindel, M., Nardi, N., & Romanha, A. J. (1997). Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients, triatomines and opossums naturally infected from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 92(3), 343–351. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761997000300008>
- Ferrão, P. M., D'Avila-Levy, C. M., Araujo-Jorge, T. C., Degrave, W. M., Gonçalves, A. D. S., Garzoni, L. R., Lima, A. P., Feige, J. J., Bailly, S., Mendonça-Lima, L., & Waghbi, M. C. (2015). Cruzipain activates latent TGF- β from host cells during *T. cruzi* invasion. *PLoS ONE*, 10(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124832>
- Franzén, O., Talavera-López, C., Ochaya, S., Butler, C. E., Messenger, L. A., Lewis, M. D., Llewellyn, M. S., Marinkelle, C. J., Tyler, K. M., Miles, M. A., & Andersson, B. (2012). Comparative genomic analysis of human infective *Trypanosoma cruzi* lineages with the bat-restricted subspecies *T. cruzi marinkellei*. *BMC Genomics*, 13(1), 7–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-531>
- Galindo, M., Sabaj, V., Espinoza, I., Toro, G. C., Búa, J., Grenet, J., López-Solís, R., Ruiz, A. M., & Galanti, N. (2007). Chromosomal size conservation through the cell cycle supports karyotype stability in *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Letters*, 581(10), 2022–2026. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.093>
- Galván, S. C., Rubio, J., Sánchez, R., Ortega, J., & Castañeda, M. (1983). Phenetic variation in *Trypanosoma* (schizotrypanum) *cruzi* isolates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 74B(3), 573–578. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(83\)90231-6](https://doi.org/10.1016/0305-0491(83)90231-6)
- Gil-Jaramillo, N., Motta, F. N., Favali, C. B. F., Bastos, I. M. D., & Santana, J. M. (2016). Dendritic cells: A double-edged sword in immune responses during chagas disease. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUL), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01076>
- Godsel, L. M., Tibbetts, R. S., Olson, C. L., Chaudoir, B. M., & Engman, D. M. (1995). Utility of recombinant flagellar calcium-binding protein for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(8), 2082–2085.

- Goldsmith, R., Kagan, G., Reyez-González, M., & Cedeño-Ferreira, J. (1972). Seroepidemiologic studies in Oaxaca, Mexico. *Boletín de La Oficina Sanitaria*, 2(VI), 39–52.
- Goldsmith, R., Kagan, G., Zárate, R., Reyez-González, M., & Cedeño-Ferreira, J. (1979). Estudios Epidemiológicos En Oaxaca , Mexico *. *Boletín de La Oficina Sanitaria*, 87(1), 1–19.
- Goldsmith, R. S., Zárate, R. J., Zárate, L. G., Kagan, I., & Jacobson, L. B. (1985). Clinical and epidemiologic studies of Chagas' disease in rural communities of Oaxaca, Mexico, and an eight-year followup: I. Cerro del Aire. *Bulletin of the Pan American Health Organization*, 19(2), 120–138.
- Gomes, Y. M., Lorena, V. M. B., & Luquetti, A. O. (2009). Diagnosis of Chagas disease: What has been achieved? what remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(SUPPL. 1), 115–121. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900017>
- Gómez Gutiérrez, A., & Monteón Padilla, V. M. (2008). Algunos aspectos de la organización y regulación genética en *Trypanosoma cruzi*: El agente etiológico de la enfermedad de Chagas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(3), 103–118. www.medigraphic.com
- Gómez-Hernández, C., Rezende-Oliveira, K., Nogueira Nascentes, G. A., Batista, L. R., Kappel, H. B., Martínez-ibarra, J. A., Contreras, F. T., Lages-Silva, E., & Ramírez, L. E. (2011). Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* Mexican strains and their behavior in the mouse experimental model. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(6), 1–7.
- González-Quezada, B. A., Creary, L. E., Munguia-Saldaña, A. J., Flores-Aguilar, H., Fernández-Viña, M. A., & Gorodezky, C. (2019). Exploring the ancestry and admixture of Mexican Oaxaca Mestizos from Southeast Mexico using next-generation sequencing of 11 HLA loci. *Human Immunology*, 80(3), 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2019.01.004>
- Goto, Y., Carter, D., & Reed, S. G. (2008). Immunological dominance of *Trypanosoma cruzi* tandem repeat proteins. *Infection and Immunity*, 76(9), 3967–3974. <https://doi.org/10.1128/IAI.00604-08>
- Groß, A., Hashimoto, C., Sticht, H., & Eichler, J. (2016). Synthetic peptides as protein mimics. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3(JAN). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00211>
- Guevara-Hernández, E., López-Zavala, A., Jiménez-Gutierrez, L., & Sotelo-Mundo, R. (2013). Current perspectives on the use of recombinant proteins and their importance in scientific and industrial research. *Biocencia*, XV(3), 8–17.
- Guhl, F. (2013). EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE TRYPANOSOMA CRUZI. *Revista Española de Salud Pública*, 1, 1–8.
- Guhl, F. (2017). Geographical distribution of Chagas disease. In *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition* (Second Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00005-8>

- Gutierrez, R., Angulo, V. M., Tarazona, Z., Britto, C., & Fernandes, O. (2004). Comparison of four serological tests for the diagnosis of Chagas disease in a Colombian endemic area. *Parasitology*, *129*(4), 439–444. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005785>
- Guzmán-Gómez, D., López-Monteón, A., De La Soledad Lagunes-Castro, M., Álvarez-Martínez, C., Hernández-Lutzon, M. J., Dumonteil, E., & Ramos-Ligonio, A. (2015). Highly discordant serology against *Trypanosoma cruzi* in central Veracruz, Mexico: Role of the antigen used for diagnostic. *Parasites and Vectors*, *8*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1072-2>
- Guzmán-Marín, E., Zavala-Castro, J., Acosta-Viana, K., & Rosado-Barrera, M. (1999). Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma*. *Biomedic*, *10*(3), 177–184. <http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-1999/bio993g.pdf>
- Henriksson, J., Aslund, L., & Pettersson, U. (1997). Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*, *12*(2), 108–114.
- Henriksson, J., Dujardin, J. C., Barnabé, C., Brisse, S., Timperman, G., Venegas, J., Pettersson, U., Tibayrenc, M., & Solari, A. (2002). Chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi* is mainly progressive and is evolutionarily informative. *Parasitology*, *124*(3), 277–286. <https://doi.org/10.1017/S0031182001001093>
- Hernández-Marín, M., Almenares-Guash, P., Martínez-Ortiz, C., Gómez-Cordero, I., & Melchor-Rodríguez, A. (2003). Péptidos sintéticos del *Trypanosoma cruzi* para el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Bioquímica*, *28*(1), 2–7.
- Herreros-Cabello, A., Callejas-Hernández, F., Gironès, N., & Fresno, M. (2020). *Trypanosoma cruzi* genome: Organization, multi-gene families, transcription, and biological implications. *Genes*, *11*(10), 1–26. <https://doi.org/10.3390/genes11101196>
- Houghton, R. L., Benson, D. R., Reynolds, L. D., McNeill, P. D., Sleath, P. R., Lodes, M. J., Skeiky, Y. A. W., Leiby, D. A., Badaro, R., & Reed, S. G. (1999). A Multi-Epitope Synthetic Peptide and Recombinant Protein for the Detection of Antibodies to *Trypanosoma cruzi* in Radioimmunoprecipitation-Confirmed and Consensus-Positive Sera. *The Journal of Infectious Diseases*, *179*(5), 1226–1234. <https://doi.org/10.1086/314723>
- Houghton, R. L., Benson, D. R., Reynolds, L., McNeill, P., Sleath, P., Lodes, M., Skeiky, Y. A. W., Badaro, R., Krettli, A. U., & Reed, S. G. (2000). Multiepitope Synthetic Peptide and Recombinant Protein for the Detection of Antibodies to *Trypanosoma cruzi* in Patients with Treated or Untreated Chagas' Disease. *The Journal of Infectious Diseases*, *181*, 325–330. <https://academic.oup.com/jid/article/181/1/325/894967>
- Ibañez, C. F., Affranchino, J. L., Macina, R. A., Reyes, M. B., Leguizamon, S., Camargo, M. E., Åslund, L., Pettersson, U., & Frasch, A. C. C. (1988). Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *30*(1), 27–33. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(88\)90129-6](https://doi.org/10.1016/0166-6851(88)90129-6)

- Ibáñez-Cervantes, G., León-García, G., Castro-Escarpulli, G., Mancilla-Ramírez, J., Victoria-Acosta, G., Curenó-Díaz, M. A., Sosa-Hernández, O., & Bello-López, J. M. (2019). Evolution of incidence and geographical distribution of Chagas disease in Mexico during a decade (2007-2016). *Epidemiology and Infection*, *147*(e41), 1–7. <https://doi.org/10.1017/S0950268818002984>
- Ibáñez-Cervantes, G., Martínez-Ibarra, A., Noguera-Torres, B., López-Orduña, E., Alonso, A. L., Perea, C., Maldonado, T., Hernández, J. M., & León-Avila, G. (2013). Identification by Q-PCR of *Trypanosoma cruzi* lineage and determination of blood meal sources in triatomine gut samples in México. *Parasitology International*, *62*(1), 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.09.003>
- Ihle-Soto, C., Costoya, E., Correa, J. P., Bacigalupo, A., Cornejo-Villar, B., Estadella, V., Solari, A., Ortiz, S., Hernández, H. J., Botto-Mahanid, C., Gorla, D. E., & Cattán, P. E. (2019). Spatio-temporal characterization of *Trypanosoma cruzi* infection and discrete typing units infecting hosts and vectors from non-domestic foci of Chile. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(2), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007170>
- Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M., & Marcatili, P. (2017). BepiPred-2.0: Improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Research*, *45*(W1), W24–W29. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx346>
- Jiménez, P., Jaimes, J., Poveda, C., & Ramírez, J. D. (2019). A systematic review of the *Trypanosoma cruzi* genetic heterogeneity, host immune response and genetic factors as plausible drivers of chronic chagasic cardiomyopathy. *Parasitology*, *146*(3), 269–283. <https://doi.org/10.1017/S0031182018001506>
- Kaplan, D., Ferrari, I., Bergami, P. L., Mahler, E., Levitus, G., Chiale, P., Hoebeke, J., Regenmortel, M. H. V. VAN, & Levin, M. J. (1997). Antibodies to ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in Chagas disease possess functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*, 10301–10306. [papers2://publication/uuid/10D0CD09-180A-4324-9E63-6FD2530EA6F3](https://doi.org/10.1073/pnas.94.21.10301)
- Karplus, P. A., & Schulz, G. E. (1985). Prediction of chain flexibility in proteins - A tool for the selection of peptide antigens. *Naturwissenschaften*, *72*(4), 212–213. <https://doi.org/10.1007/BF01195768>
- Kolaskar, A. S., & Tongaonkar, P. C. (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Letters*, *276*(1–2), 172–174. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80535-Q](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80535-Q)
- Konstantinou, G. N. (2017). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). In *Methods in molecular Biology* (Vol. 1592, pp. 79–99). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6925-8>
- Kringelum, J. V., Lundegaard, C., Lund, O., & Nielsen, M. (2012). Reliable B Cell Epitope Predictions: Impacts of Method Development and Improved Benchmarking. *PLoS Computational Biology*, *8*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002829>

- Lara, A. (2011). Recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(2), 209–223. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62029966013>
- Lever, M. A., Torti, A., Eickenbusch, P., Michaud, A. B., Šantl-Temkiv, T., & Jørgensen, B. B. (2015). A modular method for the extraction of DNA and RNA, and the separation of DNA pools from diverse environmental sample types. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00476>
- Lewis, M. D., Llewellyn, M. S., Gaunt, M. W., Yeo, M., Carrasco, H. J., & Miles, M. A. (2009). Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. *International Journal for Parasitology*, 39(12), 1305–1317. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.001>
- Lidani, K. C. F., Andrade, F. A., Bavia, L., Damasceno, F. S., Beltrame, M. H., Messias-Reason, I. J., & Sandri, T. L. (2019). Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Frontiers in Public Health*, 7(July), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>
- Lidani, K. C. F., Bavia, L., Ambrosio, A. R., & de Messias-Reason, I. J. (2017). The complement system: A prey of *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Microbiology*, 8(APR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00607>
- Lopez-Albizu, C., Danesi, E., Piorno, P., Fernandez, M., Campos, F. G., Scollo, K., & Crudo, F. (2020). Rapid Diagnostic Tests for *Trypanosoma cruzi* Infection: Field Evaluation of Two Registered Kits in a Region of Endemicity and a Region of Nonendemicity in Argentina. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(12). <https://journals.asm.org/journal/jcm>
- López-Cancino, S. A., Tun-Ku, E., De la Cruz-Felix, H. K., Ibarra-Cerdena, C. N., Izeta-Alberdi, A., Pech-May, A., Mazariegos-Hidalgo, C. J., Valdez-Tah, A., & Ramsey, J. M. (2015). Landscape ecology of *Trypanosoma cruzi* in the southern Yucatan Peninsula. *Acta Tropica*, 151(1), 58–72. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.021>
- López-Monteón, A., Dumonteil, E., & Ramos-Ligonio, A. (2019). More than a Hundred Years in the Search for an Accurate Diagnosis for Chagas Disease: Current Panorama and Expectations. In *Current Topics in Tropical Medicine* (pp. 1–24).
- López-Olmos, V., Pérez-Nasser, N., Piñero, D., Ortega, E., Hernandez, R., & Espinoza, B. (1998). Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 69(3), 239–254. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(97\)00131-9](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(97)00131-9)
- Lozano, D., Rojas, L., Méndez, S., Casellas, A., Sanz, S., Ortiz, L., Pinazo, M. J., Abril, M., Gascón, J., Torrico, F., & Alonso-Padilla, J. (2019). Use of rapid diagnostic tests (RDTs) for conclusive diagnosis of chronic Chagas disease - Field implementation in the Bolivian Chaco region. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0007877>
- Lukes, J., Guilbride, D. L., Votýpka, J., Zíková, A., Benne, R., & Englund, P. T. (2002). Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure. *Society*, 1(4), 495–502. <https://doi.org/10.1128/EC.1.4.495>

- Lynn, D. E. (2009). Cell culture. In *Encyclopedia of insects* (pp. 144–145). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00048-5>
- Majeau, A., Murphy, L., Herrera, C., & Dumonteil, E. (2021). Assessing trypanosoma cruzi parasite diversity through comparative genomics: Implications for disease epidemiology and diagnostics. *Pathogens*, *10*(2), 1–18. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020212>
- Malchiodi, E. L., Chiaramonte, M. G., & Margni, R. A. (1994). Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Agl63B6). *Clinical & Experimental Immunology*, *97*, 417–423.
- Marcili, A., Lima, L., Cavazzana, M., Junqueira, A. C. V., Veludo, H. H., Maia Da Silva, F., Campaner, M., Paiva, F., Nunes, V. L. B., & Teixeira, M. M. G. (2009). A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*, *136*(6), 641–655. <https://doi.org/10.1017/S0031182009005861>
- Marcipar, I. S., & Lagier, C. M. (2012). Advances in Serological Diagnosis of Chagas' Disease by Using Recombinant Proteins. In *Current Topics in Tropical Medicine* (pp. 274–298). <https://doi.org/10.5772/28100>
- Marcipar, I. S., Roodveldt, C., Corradi, G., Cabeza, M. L., Brito, M. E. F., Floeter Winter, L. M., Marcipar, A. J., & Silber, A. M. (2005). Use of full-length recombinant calflagin and its C fragment for improvement of diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(11), 5498–5503. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5498-5503.2005>
- Martínez, I., Noguera, B., Martínez-Hernández, F., & Espinoza, B. (2013). Microsatellite and Mini-Exon analysis of Mexican human DTU I *Trypanosoma cruzi* strains and their susceptibility to nifurtimox and benznidazole. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *13*(3), 181–187. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1072>
- Martínez-Cuevas, T. I. (2018). Caracterización biológica, genotipificación e identificación de antígenos de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos en el Estado de Oaxaca. In *CINVESTAV* (Vol. 1).
- Martínez-Pavetti, A. M., Infanzón, B., Rojas, A., Aria, L., López, L., Meza, T., Guillen, I. de, & Acosta de Hetter, M. E. (2017). Antigenic profile characterization of soluble protein extracts from two *Trypanosoma cruzi* strains. *Memorias Del Instituto de Investigaciones En Ciencias de La Salud*, *15*(3), 27–34. [https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2017.015\(03\)27-034](https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2017.015(03)27-034)
- Matsumoto, T. K., Hoshino-Shimizu, S., Nakamura, P. M., Andrade, H. F., & Umezawa, E. S. (1993). High resolution of *Trypanosoma cruzi* amastigote antigen in serodiagnosis of different clinical forms of Chagas' disease. *Journal of Clinical Microbiology*, *31*(6), 1486–1492.
- Mazzotti, L. (1940). Dos casos humanos de enfermedad de Chagas en el estado de Oaxaca. *Gaceta Medica de Mexico*, *70*(4), 417–420.
- McClatchey, K. (2002). *Clinical Laboratory Medicine* (Lippincott Williams & Wilkins, Ed.).

- Mejía, A. J., Paláu, T., & Zúñiga, C. A. (2004). Protein Profiles of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Parasitología Latinoamericana*, 59, 142–147.
- Meza, S. K. L., Kaneshima, E. N., Silva, S. de O., Gabriel, M., Araújo, S. M. de, Gomes, M. L., Monteiro, W. M., Barbosa, M. das G. V., & Toledo, M. J. de O. (2014). Comparative pathogenicity in Swiss mice of *Trypanosoma cruzi* IV from northern Brazil and *Trypanosoma cruzi* II from southern Brazil. *Experimental Parasitology*, 146, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.08.014>
- Miles, M. A., Pova, M. M., Prata, A., Cedillos, R. A., Souza, A. A., & Macedo, V. (1981). Do Radically Dissimilar *Trypanosoma*. *The Lancet*, 1338–1340.
- Molina, I., Salvador, F., & Sánchez-Montalvá, A. (2016). Actualización en enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(2), 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.12.008>
- Montalvo Navarro, C. A., & Lugo Flores, M. A. (2016). Electrophoresis fundamentals. *Epistemus*, 48–54.
- Monteón, V., Godínez, S., Cruz-zetina, G., Balmes, J., López, R., & El, I. (2009). *Cruzi*: Metaciclógenésis, Parasitemia Y Resistencia Contra Benznidazol. *Rev Biomed*, 20(3), 206–214.
- Monteón, V. M., Sosa, T., & Reyes, P. A. (1989). Serological tests for American trypanosomiasis. A comparative study. *Rev Latinoamer. Microbiol*, 31, 35–38.
- Morel, C., Chiari, E., Camargo, E. P., Mattei, D. M., Romanha, A. J., & Simpson, L. (1980). Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(11 I), 6810–6814. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.11.6810>
- Moreno López, R. M., Sánchez Paredes, L., Muñoz Jiménez, L., Monteón, V. M., & Reyes López, P. A. (2001). Cardiopatía chagásica en Tehuantepec. Informe preliminar. *Archivos de Cardiología de Mexico*, 71(1), 43–49.
- Morgado, M. G., Ivo-dos-Santos, J., Pinho, R. T., Argüelles, E., Rezende, J. M., & Galvão-Castro, B. (1989). *Trypanosoma cruzi*: identification of specific epimastigote antigens by human immune sera. In *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (Vol. 84, Issue 3, pp. 309–314). <https://doi.org/10.1590/S0074-02761989000300004>
- Moure, Z., Angheben, A., Molina, I., Gobbi, F., Espasa, M., Anselmi, M., Salvador, F., Tais, S., Sánchez-Montalvá, A., Pumarola, T., Albajar-Viñas, P., & Sulleiro, E. (2016). Serodiscordance in chronic Chagas disease diagnosis: a real problem in non-endemic countries. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(9), 788–792. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.06.001>
- Mucci, J., Carmona, S. J., Volcovich, R., Altcheh, J., Bracamonte, E., Marco, J. D., Nielsen, M., Buscaglia, C. A., & Agüero, F. (2017). Next-generation ELISA diagnostic assay for Chagas Disease based on the combination of short peptidic epitopes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(10), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005972>

- Myler, P. J. (1993). Molecular variation in trypanosomes. *Acta Tropica*, 53(3–4), 205–225. [https://doi.org/10.1016/0001-706X\(93\)90030-F](https://doi.org/10.1016/0001-706X(93)90030-F)
- Nagarkatti, R., de Araujo, F. F., Gupta, C., & Debrabant, A. (2014). Aptamer Based, Non-PCR, Non-Serological Detection of Chagas Disease Biomarkers in Trypanosoma cruzi Infected Mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(1), 25. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002650>
- Pan, A. A., & McMahon-Pratt, D. (1989). Amastigote and epimastigote stage-specific components of Trypanosoma cruzi characterized by using monoclonal antibodies. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 143(3), 1001–1008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2501384>
- Panamerican Health Organization. (2018). *Enfermedad de Chagas en las Américas; una revisión de la situación actual de la Salud pública y su visión para el futuro*.
- Panzer, F., Ferrandis, I., Ramsey, J., Salazar-Schettino, P. M., Cabrera, M., Monroy, C., Bargues, M. D., Mas-Coma, S., O'Connor, J. E., Angulo, V. M., Jaramillo, N., & Pérez, R. (2007). Genome size determination in Chagas disease transmitting bugs (hemiptera-triatominae) by flow cytometry. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(3), 516–521. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.76.516>
- Parker, J. M. R., Guo, D., & Hodges, R. S. (1986). New Hydrophilicity Scale Derived from High-Performance Liquid Chromatography Peptide Retention Data: Correlation of Predicted Surface Residues with Antigenicity and X-ray-Derived Accessible Sites. *Biochemistry*, 25(19), 5425–5432. <https://doi.org/10.1021/bi00367a013>
- Partel, C. D., & Rossi, C. L. (1998). A rapid, quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the immunodiagnosis of Chagas disease. *Immunological Investigation*, 27(1 y 2), 89–96.
- Pech-Canul, Á. D. L. C., Monteón, V., & Solís-Oviedo, R. L. (2017). A Brief View of the Surface Membrane Proteins from Trypanosoma cruzi. *Journal of Parasitology Research*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3751403>
- Pedroso, A., Cupolillo, E., & Zingales, B. (2003). Evaluation of Trypanosoma cruzi hybrid stocks based on chromosomal size variation. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 129(1), 79–90. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00096-3](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00096-3)
- Peña Bates, C. A. (2021). *Evaluación de la seroreactividad a péptidos sintéticos conservados e inmunogénicos de Rickettsia sp y Virus Dengue*.
- Peralta, J. M., Teixeira, M. D. G. M., Shreffler, W. G., Pereira, J. B., Burns, J. M., Sleath, P. R., & Reed, S. G. (1994). Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(4), 971–974. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.4.971-974.1994>
- Pereira Nunes, M. C., Wistremundo, D., Morillo, C. A., Encina, J. J., & Ribeiro, A. L. (2013). Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(9), 767–776. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>

- Pérez-Fuentes, R., Sánchez-Guillén, M. D. C., González-Alvarez, C., Monteón, V. M., Reyes, P. A., & Rosales-Encina, J. L. (1998). Humoral nitric oxide levels and antibody immune response of symptomatic and indeterminate Chagas' disease patients to commercial and autochthonous *Trypanosoma cruzi* antigen. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *58*(6), 715–720. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.58.715>
- Pérez-Molina, J. A., & Molina, I. (2018). Chagas disease. *Lancet*, *391*, 82–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)
- Peverengo, L. M., Garcia, V., Rodeles, L. M., Mendicino, Di., Vicco, M., Lagier, C., Gonzalez, V., Gugliotta, L., & Marcipar, I. (2018). Development and assessment of an improved recombinant multiepitope antigen-based immunoassay to diagnose chronic Chagas disease. *Parasitology*, *145*(12), 1594–1599. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000458>
- Pinto, A. D. S., De Lana, M., Bastrenta, B., Barnabé, C., Quesney, V., Noël, S., & Tibayrenc, M. (1998). Compared vectorial transmissibility of pure and mixed clonal genotypes of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*. *Parasitology Research*, *84*(5), 348–353. <https://doi.org/10.1007/s004360050409>
- Pishesha, N., Harmand, T. J., & Ploegh, H. L. (2022). A guide to antigen processing and presentation. *Nature Reviews Immunology*, *22*(12), 751–764. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00707-2>
- Pitcovsky, T. A., Buscaglia, C. A., Mucci, J., & Campetella, O. (2002). A Functional Network of Intramolecular Cross-Reacting Epitopes Delays the Elicitation of Neutralizing Antibodies to *Trypanosoma cruzi* trans -Sialidase . *The Journal of Infectious Diseases*, *186*(3), 397–404. <https://doi.org/10.1086/341463>
- Polonio, R., López-Domínguez, J., Herrera, C., & Dumonteil, E. (2021). Molecular ecology of *Triatoma dimidiata* in southern Belize reveals risk for human infection and the local differentiation of *Trypanosoma cruzi* parasites. *International Journal of Infectious Diseases*, *108*(June), 320–329. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.05.083>
- Ponomarenko, J., Bui, H. H., Li, W., Fusseder, N., Bourne, P. E., Sette, A., & Peters, B. (2008). ElliPro: A new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics*, *9*, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-514>
- Ramírez, J. D., Hernández, C., Montilla, M., Zambrano, P., Flórez, A. C., Parra, E., & Cucunubá, Z. M. (2014). First Report of Human *Trypanosoma cruzi* Infection Attributed to TcBat Genotype. *Zoonoses and Public Health*, *61*(7), 477–479. <https://doi.org/10.1111/zph.12094>
- Ramos-Ligonio, A., Torres-Montero, J., López-Monteon, A., & Dumonteil, E. (2012). Extensive diversity of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units circulating in *Triatoma dimidiata* from central Veracruz, Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*, *12*(7), 1341–1343. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.04.024>
- Ramsey, J. M., Townsend Peterson, A., Carmona-Castro, O., Moo-Llanes, D. A., Nakazawa, Y., Butrick, M., Tun-Ku, E., de la Cruz-Félix, K., & Ibarra-Cerdeña, C. N. (2015). Atlas of Mexican

- Triatominae (Reduviidae: Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3), 339–352. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140404>
- Rassi, A., & Marin-Neto, A. (2010). Seminar Chagas disease. *Lancet*, 375(9723), 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Reis-Cunha, J. L., Rodrigues-Luiz, G. F., Valdivia, H. O., Baptista, R. P., Mendes, T. A. O., de Moraes, G. L., Guedes, R., Macedo, A. M., Bern, C., Gilman, R. H., Lopez, C. T., Andersson, B., Vasconcelos, A. T., & Bartholomeu, D. C. (2015). Chromosomal copy number variation reveals differential levels of genomic plasticity in distinct *Trypanosoma cruzi* strains. *BMC Genomics*, 16(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1680-4>
- Reynisson, B., Alvarez, B., Paul, S., Peters, B., & Nielsen, M. (2021). NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: Improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. *Nucleic Acids Research*, 48(W1), W449–W454. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA379>
- Riou, G., & Delain, E. (1969). Abnormal circular DNA molecules induced by ethidium bromide in the kinetoplast of *Trypanosoma cruzi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 64(2), 618–625. <https://doi.org/10.1073/pnas.64.2.618>
- Rajo-Medina, J., Ruiz-Matus, C., Salazar-Schettino, P. M., & González-Roldán, J. F. (2018). Enfermedad de Chagas en México. *Gaceta Médica de Mexico*, 154(5), 605–612. <https://doi.org/10.24875/GMM.18004515>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(APR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Rubio-Ortiz, M., Hernández-López, L. A., Pérez-Galicia, A., Guzmán-Bracho, C., Martínez-Calvillo, S., & Manning-Cela, R. G. (2020). Diagnóstico de la infección con *Trypanosoma cruzi* : Avances y retos. *Revista Médica de La Universidad Veracruzana*, 1, 7–27. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=97256#>
- Ruiz-Garcia, M., Montilla, M., Nicholls, S. O., Angarita, L., & Alvarez, D. (2000). Genetic relationships and spatial genetic structure among clonal stocks of *Trypanosoma cruzi* in Colombia. *Heredity*, 85(4), 318–327. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2000.00752.x>
- Ruiz-Sánchez, R., De León, M. P., Matta, V., Reyes, P. A., López, R., Jay, D., & Monteón, V. M. (2005). *Trypanosoma cruzi* isolates from Mexican and Guatemalan acute and chronic chagasic cardiopathy patients belong to *Trypanosoma cruzi* I. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(3), 281–283. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000300012>
- Ryan, K. A., Shapiro, T. A., Rauch, C. A., & Englund, P. T. (1982). Replication of kinetoplast DNA in *Trypanosomes*. *Annual Review Microbiology*, 42, 339–358.
- Saez-Alquizar, A., Sabino, E. C., Salles, N., Chamone, D. F., Hulstaert, F., Pottel, H., Stoops, E., & Zrein, M. (2000). Serological confirmation of Chagas' disease by a recombinant and peptide antigen line immunoassay: INNO-LIA Chagas. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(2), 851–854.

- Salazar-Schettino, P. M., Bucio-Torres, M. I., Cabrera-Bravo, M., Alba-Alvarado, M. C., Castillo-Saldaña, D. R., Zenteno-Galindo, E. A., Rojo-Medina, J., Fernández-Santos, N. A., & Perera-Salazar, M. G. (2016). Enfermedad de Chagas en México. *Revista de La Facultad de Medicina de La UNAM*, 59(3), 6–16. <https://doi.org/10.24875/GMM.18004515>
- Salazar-Schettino, P. M., Tay, J., Bucio, M. I., Anzures, M., & Flores Ayala, S. (1984). Primer caso de megaesófago con serología positiva a *Trypanosoma cruzi*. *Salud Publica de Mexico*, 26(5), 452–455.
- Salud, S. de. (2015). *Informe sobre la Salud de los Mexicanos*.
- Sánchez, B., Monteón, V., Reyes, P. A., & Espinoza, B. (2001). Standardization of Micro-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Western blot for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from Mexican strains as Antigens. *Archives of Medical Research*, 32(5), 382–388. [https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(01\)00303-4](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(01)00303-4)
- Sánchez-Camargo, C. L., Albajar-Viñas, P., Wilkins, P. P., Nieto, J., Leiby, D. A., Paris, L., Scollo, K., Flórez, C., Guzmán-Bracho, C., Luquetti, A. O., Calvo, N., Tadokoro, K., Saez-Alquezar, A., Palma, P. P., Martin, M., & Flevaud, L. (2014). Comparative evaluation of 11 commercialized rapid diagnostic tests for detecting *Trypanosoma cruzi* antibodies in serum banks in areas of endemicity and nonendemicity. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7), 2506–2512. <https://doi.org/10.1128/JCM.00144-14>
- Sánchez-Guillén, M. D. C., Bernabé, C., Tibayrenc, M., Zavala-Castro, J., Totolhua, J. L., Méndez-López, J., González-Mejía, M. E., Torres-Rasgado, E., López-Colombo, A., & Pérez-Fuentes, R. (2006). *Trypanosoma cruzi* strains isolated from human, vector, and animal reservoir in the same endemic region in Mexico and typed as T. cruzi I, discrete typing unit 1 exhibit considerable biological diversity. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(6), 585–590. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000600002>
- Sánchez-Guillén, M. D. C., López-Colombo, A., Ordóñez-Toquero, G., Gomez-Albino, I., Ramos-Jimenez, J., Torres-Rasgado, E., Salgado-Rosas, H., Romero-Díaz, M., Pulido-Pérez, P., & Pérez-Fuentes, R. (2006). Clinical forms of *Trypanosoma cruzi* infected individuals in the chronic phase of Chagas disease in Puebla, Mexico. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(7), 733–739.
- Schijman, A. G., Alonso-Padilla, J., Longhi, S. A., & Picado, A. (2021). Parasitological, serological and molecular diagnosis of acute and chronic chagas disease: From field to laboratory. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 116(1). <https://doi.org/10.1590/0074-02760200444>
- Secretaría de Salud. (2015). *Manual de Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de chagas*. http://cnts.salud.gob.mx/descargas/ManualDX_TxEnfermedadCHAGAS2015.pdf
- Secretaría de Salud (SSA). (2014). NOM-032-SSA2-2014. Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores. In *Diario oficial de la Federación, México*.

- Secretaría de Salud (SSA). (2019). *Manual de procedimientos para la Enfermedad de Chagas en México*. www.gob.mx/salud/
- Shah, K., & Maghsoudlou, P. (2016). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): The basics. *British Journal of Hospital Medicine*, 77(7), 98–101. <https://doi.org/10.12968/hmed.2016.77.7.C98>
- Simões-Barbosa, A., Barros, A. M., Nitz, N., Argañaraz, E. R., & Teixeira, A. R. L. (1999). Integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA Minicircle Sequence in the Host Genome May Be Associated with Autoimmune Serum Factors in Chagas Disease Patients. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(SUPPL. 1), 249–252. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000700041>
- Solana, M. E., Katzin, A. M., Umezawa, E. S., & Miatello, C. S. (1995). High specificity of *Trypanosoma cruzi* epimastigote ribonucleoprotein as antigen in serodiagnosis of Chagas' disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(6), 1456–1460.
- Souto, R. P., Fernandes, O., Macedo, A. M., Campbell, D. A., & Zingales, B. (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 83(2), 141–152. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(96\)02755-7](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(96)02755-7)
- Souza, R. T., Lima, F. M., Barros, R. M., Cortez, D. R., Santos, M. F., Cordero, E. M., Ruiz, J. C., Goldenberg, S., Teixeira, M. M. G., & da Silveira, J. F. (2011). Genome size, karyotype polymorphism and chromosomal evolution in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023042>
- Tay, J., Salazar-Schettino, P. M., Bucio, M. I., Zarate, R., & Zarate, L. (1979). Estado actual de nuestros conocimientos sobre la enfermedad de Chagas en la república mexicana. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, XIV(1–3), 29–67.
- Tay, J., Salazar-Schettino, P. M., Ontiveros, A., Jiménez, J., Arteaga, I. D. H., García Yáñez, Y., & Gutiérrez Quiroz, M. (1986). Epidemiologic study of Chagas' disease in a town in Oaxaca, Mexico. *Boletín de La Oficina Sanitaria*, 20(4), 358–365.
- Teixeira, A. R. L., Argañaraz, E. R., Freitas, L. H., Lacava, Z. G. M., Santana, J. M., & Luna, H. (1994). Possible integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host cell genome by infection. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 305(2), 197–209. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90240-2](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90240-2)
- Teixeira, D. E., Benchimol, M., Crepaldi, P. H., & de Souza, W. (2012). Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(8), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001749>
- Telleria, J., & Tibayrenc, M. (2017). *American Trypanosomiasis, 100 Years of Research Chagas Disease*. <https://doi.org/9780128010693>
- Triana, O., Ortiz, S., Dujardin, J. C., & Solari, A. (2006). *Trypanosoma cruzi*: Variability of stocks from Colombia determined by molecular karyotype and minicircle Southern blot analysis. *Experimental Parasitology*, 113(1), 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.11.016>

- Truyens, C., Dumonteil, E., Alger, J., Cafferata, M. L., Ciganda, A., Gibbons, L., Herrera, C., Sosa-Estani, S., & Buekens, P. (2021). Geographic Variations in Test Reactivity for the Serological Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(12). <https://doi.org/10.1128/JCM.01062-21>
- Ucar, B., Acar, T., Pelit, A. P., Sen, M., Derman, S., & Mustafa, Z. (2019). Synthesis and Applications of Synthetic Peptides. In *IntechOpen* (pp. 1–25). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.12.014>
- Umezawa, E. S., & Franco Da Silveira, J. (1999). Serological Diagnosis of Chagas Disease with Purified and Defined *Trypanosoma cruzi* Antigens. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(SUPPL. 1), 285–288. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000700051>
- Umezawa, E. S., Nascimento, M. S., Kesper, N., Coura, J. R., Borges-Pereira, J., Junqueira, A. C., & Camargo, M. E. (1996). Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. Immunoblot Assay Using Excreted-Secreted Antigens of *Trypanosoma cruzi* in Serodiagnosis of Congenital, Acute, and Chronic Chagas' Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(9), 2143–2147. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC229206/pdf/342143.pdf>
- Umezawa, E. S., Nascimento, M. S., & Stolf, A. M. S. (2001). Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas' disease. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 39(3), 169–176. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(01\)00216-4](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(01)00216-4)
- Umezawa, E. S., Souza, A. I., Pinedo-Cancino, V., Marcondes, M., Marcili, A., Camargo, L. M. A., Camacho, A. A., Stolf, A. M. S., & Teixeira, M. M. G. (2009). TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. *Acta Tropica*, 111(1), 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.01.006>
- Vargas, N., Pedroso, A., & Zingales, B. (2004). Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 138(1), 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.08.005>
- Vargas-Alarcón, G., Granados, J., Rodríguez-Pérez, J. M., Parga, C., Pérez-Hernández, N., Rey, D., Zuñiga, J., & Arnaiz-Villena, A. (2010). Distribution of HLA class II alleles and haplotypes in Mexican Mestizo population: Comparison with other populations. *Immunological Investigations*, 39(3), 268–283. <https://doi.org/10.3109/08820131003681151>
- Velasco-Castrejón, O., & Trujillo, F. (1990). La visceromegalia digestiva por *T. cruzi* en México. *Med Cult*, 5, 4–7.
- Velasco-Castrejon, O., Valdespino, J. L., Tapia-Conyer, R., Salvatierra, B., Guzmán-Bracho, C., Magos, C., Llausás, A., Gutiérrez, G., & Sepúlveda, J. (1992). Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. *Salud Publica de Mexico*, 34, 186–196.
- Vergara, U., Lorca, M., Veloso, C., Gonzalez, Ake Engstrom, A., Aslund, L., Pettersson, U., & Frasch, A. C. C. (1991). Assay for Detection of *Trypanosoma cruzi* Antibodies in Human Sera

- Based on Reaction with Synthetic Peptides. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 29(9), 2034–2037.
- Vexenat, A. D. C., Santana, J. M., & Teixeira, A. R. L. (1996). Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. In *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* (Vol. 38, Issue 3, pp. 177–185).
- Villanueva-Lizama, L. E., Cruz-Chan, J. V., Aguilar-Cetina, A. del C., Herrera-Sanchez, L. F., Rodriguez-Perez, J. M., Rosado-Vallado, M. E., Ramirez-Sierra, M. J., Ortega-Lopez, J., Jones, K., Hotez, P., Bottazzi, M. E., & Dumonteil, E. (2018). *Trypanosoma cruzi* vaccine candidate antigens Tc24 and TSA-1 recall memory immune response associated with HLA-A and -B supertypes in Chagasic chronic patients from Mexico. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006240>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46, W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Westenberger, S. J., Cerqueira, G. C., El-Sayed, N. M., Zingales, B., Campbell, D. A., & Sturm, N. R. (2006). *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. *BMC Genomics*, 7(60), 1–18. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-60>
- World Health Organization. (2007). WHO consultation on international biological reference preparations for Chagas diagnostic tests. *World Health Organization*, July, 1–25. http://www.who.int/bloodproducts/ref_materials/WHO_Report_1st_Chagas_BRP_consultation_7-2007_final.pdf
- World Health Organization (WHO). (2019). *Chagas disease (American trypanosomiasis)*. [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- Yamagata, Y., & Nakagawa, J. (2006). Control of Chagas Disease. *Advances in Parasitology*, 61(05), 129–165. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)61004-4](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)61004-4)
- Zavala-Castro, J. E., Velasco-Castrejon, O., & Hernandez, R. (1992). MOLECULAR OF MEXICAN STOCKS. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 47(2), 201–209.
- Zingales, B. (2018). *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*, 184(September 2017), 38–52. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>
- Zingales, B., Andrade, S. G., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., & Guhl, F. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), 1051–1054.

- Zingales, B., & Bartholomeu, D. C. (2021). Trypanosoma cruzi genetic diversity: Impact on transmission cycles and chagas disease. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 116(1), 1–11. <https://doi.org/10.1590/0074-02760210193>
- Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M. G., Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages-Silva, E., Machado, C. R., Andrade, S. G., & Sturm, N. R. (2012). The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>
- Zingales, B., Pereira, M. E. S., Almeida, K. A., Umezawa, E. S., Nehme, N. S., Oliveira, R. P., Macedo, A., & Souto, R. P. (1997). Biological Parameters and Molecular Markers of Clone CL Brener - The Reference Organism of the Trypanosoma cruzi Genome Project. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 92(6), 811–814. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761997000600016>
- Zúñiga, J., Yu, N., Barquera, R., Alosco, S., Ohashi, M., Lebedeva, T., Acuña-Alonzo, V., Yunis, M., Granados-Montiel, J., Cruz-Lagunas, A., Vargas-Alarcón, G., Rodríguez-Reyna, T. S., Fernandez-Viña, M., Granados, J., & Yunis, E. J. (2013). HLA Class I and Class II Conserved Extended Haplotypes and Their Fragments or Blocks in Mexicans: Implications for the Study of Genetic Diversity in Admixed Populations. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074442>

8. APÉNDICES

Apéndice 1. Péptidos antigénicos candidatos que cumplen con todos los criterios durante en análisis *in silico*.

El análisis *in silico* para identificar los péptidos candidatos arrojó 50 péptidos que cumplían con todas las características mencionadas en la metodología (**Tabla 10**), de estos péptidos se seleccionaron 28 que contaban con las mejores características y valores para realizar su análisis con los sueros positivos y negativos a *T. cruzi*.

ID proteína	Proteína	Posición inicial	Posición final	Péptido	Núcleo	Tamaño del péptido	Alelos
3	Q4E046	106	123	SIEEPIEHVKTVTSNEHD	IEHVKTVTS	18	17
4	Q4E4W8	118	133	ASPLPSSSSAASALQG	PSSSSAASA	16	6
4	Q4E4W8	138	154	SPGAAPESVKPPQTDPV	PESVKPPQT	17	5
4	Q4E4W8	194	208	RPAVNATSIPTATQG	VNATSIPTA	15	5
5	Q4DYC3	225	239	KEMIKSVMPPSSAA	IKSVMPPPS	15	5
6	Q4CXJ6	129	146	QHFPQISRSLTDPRATVR	SRSLDPRA	18	4
6	Q4CXJ6	255	273	VTKPLRPVEDMPFAKDLKY	LRPVEDMPF	19	6
8	Q4DX97	63	77	AEGPRILSIDSSSSP	ILSIDSSSS	15	3
8	Q4DX97	180	199	VKEGSVTVLKGDVTHESPTT	LKGDVTHES	20	9
8	Q4DX97	237	253	CSYLGFAYDTADRAIFD	FAYDTADRA	17	12
8	Q4DX97	125	142	KQTDRVLQYVRDKINRHN	LQYVRDKIN	18	7
9	Q4DJ00	148	164	DTAIVQAVIPLPEEEL	IVQAVIPL	17	7
10	Q4E2A9	30	47	AEVVEIPAGGKGAVGSTG	PAGGKGAVG	18	5
11	Q4CQ28	317	331	VAMDYVYQQSRNMRR	YVYQQSRNM	15	9
11	Q4CQ28	19	33	GEDVRADYSVQLATT	VRADYSVQL	15	6
12	Q4DAT6	78	94	CVLEPVSDDDIAAYDGT	PVSDDDIAA	17	8
12	Q4DAT6	432	449	PGSSPFGAGASAGASAGA	PFGAGASAG	18	6
12	Q4DAT6	441	461	ASAGASAGATSHADAHHSDEL	ASAGATSHA	21	6
13	Q4CRX2	450	467	STAATVADGISHTVWGGT	VADGISHTV	18	10
13	Q4CRX2	131	146	SESVEGAAQALFIRQY	EGAAQALFI	16	5
13	Q4CRX2	297	314	QLEDDVRLSSIPREDVTE	VRLSSIPRE	18	6
13	Q4CRX2	378	395	SAPAAESGPAVPSAPADP	AESGPAVPS	18	6
14	Q4E5H7	406	420	GAEYHEYQTNATLLA	YHEYQTNAT	15	6
15	Q4E2M9	10	27	TVHLNESNAAPANTSMAV	LNESNAAPA	18	7
16	Q4DC56	123	137	FRRYARWVEENVVSD	YARWVEENV	15	4
16	Q4DC56	158	174	AHFMYEEGVVEIVASEH	YEEGVVEIV	17	7
17	Q4E2E3	25	39	VPLTQAGGSPVVSRA	TQAGGSPVV	15	2
17	Q4E2E3	238	253	NERTLVPAASTVLSRP	LVPAASTVL	16	8
18	Q4DLI2	302	318	PGIYGVVTMPYGVREGI	IYGVVTMPY	17	5

18	Q4DLI2	94	109	HRYGPNSFKLHRLPLP	PNSFKLHRL	16	5
18	Q4DLI2	436	453	LQTKIYDAFSHPQFQTDV	FSHPQFQTD	18	10
19	Q4D9H3	36	51	ESVELFTP GKTSLSDE	FTP GKTSLS	16	5
19	Q4D9H3	584	599	GPQKIAWELGKAYRVV	WELGKAYRV	16	4
19	Q4D9H3	676	691	YDHCFSATEVEAMEKT	FSATEVEAM	16	6
19	Q4D9H3	707	722	ATRPQDVSVSDRETSS	PQDVSVSDRE	16	8
20	Q4D2C9	303	320	RADVPIRSTKALRIRARV	IRSTKALRI	18	26
21	Q4DCW0	408	425	PQVSVSSFAEVTAAPSEF	VSVSSFAEV	18	10
21	Q4DCW0	19	33	TMSVADGGVTFSSASS	VADGGVTFSS	15	9
21	Q4DCW0	28	47	TFSASSYSFRRASTAAATTS	FRRASTAAA	20	15
22	Q4CY87	16	33	FSAQRSPASVLEDPLAQQ	PASVLEDPL	18	7
22	Q4CY87	396	410	VAHQNAGDVAIEVKD	QNAGDVAIE	15	4
22	Q4CY87	412	429	PRILVDQSSPHADGHSVL	LVDQSSPHA	18	5
23	Q4D7V1	417	432	LLAIRYVQNPLDSVNC	IRYVQNPLD	16	9
23	Q4D7V1	1689	1705	RRQIKYDMSSSLVASVT	YDMSSSLVA	17	6
23	Q4D7V1	3942	3957	NGGHVAVTNANKSQYV	VAVTNANKS	16	7
23	Q4D7V1	114	130	DDGAGAAAAATAGHLSL	AGAAAAATA	17	8
23	Q4D7V1	283	302	HERFLQRTL RGGTSQIDPVP	LRGGTSQID	20	6
23	Q4D7V1	3935	3952	QETELVPNGGHVAVTNAN	PNGGHVAVT	18	5
23	Q4D7V1	3499	3518	TAMGPGAVTL S GVAATTGVD	TL S GVAATT	20	6
Núcleo: Epítipo con potencial reconocimiento de <i>T. cruzi</i>							

8. ANEXOS

Artículos publicados:

1. Rubio-Ortiz M, Hernández-López LA, Pérez-Galicia A, Guzmán-Bracho C, Martínez-Calvillo S, Manning-Cela RG. Diagnóstico de la infección con *Trypanosoma cruzi*: Avances y retos. *Rev Médica la Univ Veracruzana*. 2020; 7-27

Premios

Primer lugar en el 6º Congreso Internacional de Vectores (*Hemíptera, Reduviidae, Triatominae*) y de *Trypanosoma cruzi*: Panorama actual y expectativas por la ponencia del trabajo “Analysis of total epimastigote and trypomastigote extracts of autochthonous *T. cruzi* strains with sera from individuals from the same endemic areas.”