

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



ESCUELA DE POSGRADO

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO
EN GESTIÓN PARA EL DESARROLLO SUSTENTABLE**

**“ESTANDARIZACIÓN DE ENSAYO INMUNOLÓGICO A
PARTIR DE ANTÍGENOS PROTEICOS PARA LA
DETECCIÓN DE *Trypanosoma cruzi*”**

Autor:

Bach. Ceili Milagros Zuta Chamoli

Asesor:

Ph.D. Alonso Rafael Tapia Limonchi

Registro: (.....)

CHACHAPOYAS – PERÚ

2023

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM



UNTRM

Reglamento del Proceso de Graduación en la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas

ANEXO 6

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM

1. Datos de autor 1

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes):

Zota Chamali Ceili Hilagos

DNI N°: 40506273

Correo electrónico: ceili.zota.epg@untrm.edu.pe

Nombre de la Maestría (X)/Doctorado ():

Gestión para el Desarrollo Sustentable

Datos de autor 2

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes):

DNI N°: _____

Correo electrónico: _____

Nombre de la Maestría ()/Doctorado ():

2. Título de la tesis para obtener el grado académico de Maestro (X)/ Doctor ()

Estandarización de ensayo inmunológico a partir de antígenos proteicos para la detección de Trypanosoma cruzi.



3. Datos de Asesor

Apellidos y nombres: Jagía Limonchi Alonso Rafael

DNI, Pasaporte, C.E N°: 25770545

ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7483-1729

Datos de Co-Asesor

Apellidos y nombres: _____

DNI, Pasaporte, C.E N°: _____

ORCID: _____

4. Campo del conocimiento según Organización para la Cooperación y el Desarrollo

Económicos-OCDE 1.06.00 - Biología/1.06.03 - Bioquímica, Biología Molecular.

5. Originalidad del Trabajo

Con la presentación de esta ficha, el autor o autores señalan expresamente que la obra es original, ya que sus contenidos son producto de su directa contribución intelectual. Se reconoce también que todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal.

6. Autorización de publicación

El o los titular de los derechos de autor otorga a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), la autorización para la publicación del documento indicado



en el punto 2, bajo la *Licencia creative commons* de tipo BY-NC: Licencia que permite distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial por lo que la Universidad deberá publicar la obra poniéndola en acceso libre en el repositorio institucional de la UNTRM y a su vez en el Registro Nacional de Trabajos de Investigación-RENATI, dejando constancia que el archivo digital que se está entregando, contiene la versión final del documento sustentado y aprobado por el Jurado Evaluador.

Chachapoyas, 07 de Agosto de 2023


AUTOR 1


AUTOR 2


ASESOR


CO-ASESOR



DEDICATORIA

A Dios: Por guiarme y permitirme mejorar día a día en este camino de retos y aprendizajes.

A mi madre: Rosa Chamoli Rojas por su amor incondicional, que me alienta a seguir construyendo mis sueños y apoyándome a lograr mis metas profesionales y personales.

A mis hermanos: Veronica y Álvaro Antonio, por ser mi apoyo fraternal y a Horacio, aunque no este físicamente con nosotros me incentivo a seguir mis sueños y enseñarme que la Educación y Lectura te pueden llevar por caminos inimaginables.

A mi hijo: Leonardo Gabriel, por ser mi ancla y horizonte, y con solo sonreír me fortalece para seguir adelante.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios que me permite seguir adelante realizándome tanto en lo personal como profesional, ser mi fortaleza espiritual, a mi madre Rosa Chamoli Rojas, a quien admiro por su constancia y perseverancia por alentarme a conseguir mis objetivos.

A mi asesor Dr. Alonso Rafael Tapia Limonchi, quien con sus conocimientos ha dirigido y guiado mi trabajo de investigación. Permitiéndome conocer la biología molecular y que ahora es parte esencial en mi desarrollo profesional.

A la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas que hizo posible desarrollar mi Tesis a través de los laboratorios del Instituto de Enfermedades Tropicales y fortalecer mis conocimientos.

Al Proyecto N° 016-2020-FONDECYT-BM “Implementación de Capacidades Tecnológicas para el Desarrollo de Dispositivos Electroquímicos para Detección de Anticuerpos y ácidos Nucleicos como Respuesta Rápida a Brotes Epidémicos en Puntos de Atención al Paciente” (CAPATEC) por hacer posibles la obtención de los reactivos y materiales para la realización de esta investigación.

Al Dr. Carlos Delfín Chávez Olortegui del Departamento de Bioquímica e Inmunología, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil. Por permitirme realizar la pasantía en el manejo del equipo del Sintetizador de Péptidos, Realizar el protocolo para inmunodetección y regeneración de membranas, y el Ensayo por Inmunoadsorción ligado a Enzimas (ELISA).

Al Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila del Laboratorio de Fisiopatología Experimental. Programa de posgraduación en Ciencias de la Salud-PPGCS, Universidad del Extremo sur Catarinense-UNESC, Brasil, por realizar la síntesis química de los péptidos.

A la Dr. Stella Chenet Carrasco, y Dr. Juan Tejedo Huamán, por sus consejos, recomendaciones y críticas constructivas que permitieron ver mis debilidades y fortalecer mis capacidades.

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO
RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Ph.D. JORGE LUIS MAICELO QUINTANA

Rector

Dr. OSCAR ANDRÉS GAMARRA TORRES

Vicerrector Académico

Dra. MARÍA NELLY LUJÁN ESPINOZA

Vicerrectora de Investigación

Dr. EFRAIN MANUELITO CASTRO ALAYO

Director de la Escuela de Posgrado

JURADO EVALUADOR DE LA TESIS



Dr. CARLOS EDUARDO MILLONES CHANAMÉ

Presidente



Mg. JULIO MARIANO CHÁVEZ MILLA

Secretario



Dr. EFRAÍN MANUELITO CASTRO ALAYO

Vocal

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



UNTRM

Reglamento del Proceso de Graduación en la
Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional
Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas

ANEXO 3

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador del Proyecto de Tesis ()/Tesis (x) Tesis en Formato de Artículo Científico () titulado:

Estandarización de ensayo inmunológico a partir de antígenos proteicos para la detección de Trypanosoma cruzi

presentado por el Aspirante Ceili Milagros Zuta Chamoli

para obtener el Grado Académico de Maestro (x)/Doctor () en Gestión para el Desarrollo Sustentable

de la Escuela de Posgrado de la UNTRM, hacemos constar que después de revisar la originalidad del Proyecto de Tesis ()/Tesis (x)/Tesis en formato de artículo científico () con el software de prevención de plagio **Turnitin**, verificamos:

- De acuerdo con el informe de originalidad (adjunto), el Proyecto de Tesis ()/Tesis (x)/ Tesis en formato de artículo científico () tiene 14 % de similitud, que es menor al 25% permitido en la UNTRM.
- La persona responsable de someter el trabajo al software de prevención de plagio

Turnitin fue:

Dr. Carlos Eduardo Millones Chanaquí y pertenece al área () / oficina () / dependencia de Facultad de Educación y Ciencias de la Comunicación

Chachapoyas, 04 de julio del 2023




SECRETARIO


PRESIDENTE


VOCAL

OBSERVACIONES:

.....
.....

ACTA DE SUSTENTACION DE LA TESIS



UNTRM

Reglamento del Proceso de Graduación en la
Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional
Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas

ANEXO 5

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En el lugar Auditorio EPG- UNTRM de la ciudad de Chachapoyas, el día 12 de Julio del año 2023, siendo las 16:00 horas, el Aspirante Ceili Milagros Zuta Chamoli, defiende en sesión pública presencial la Tesis titulada: Estandarización de ensayo inmunológico a partir de antígenos proteicos para la detección de Trypanosoma cruzi

para obtener el Grado Académico de Maestro ()/Doctor () en Gestión para el Desarrollo Sustentable a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, conformado por:

Presidente: Dr. Carlos Eduardo Millones Chanambé
Secretario: Msc. Julio Mariano Chávez Milla
Vocal: Dr. Efraín Manuelito Castro Alayo

Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y método, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

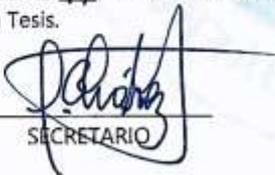
Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis, en términos de:

Aprobada () / Desaprobada () por Unanimidad () / Mayoría ().

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 17 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis.




SECRETARIO


VOCAL


PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

ÍNDICE

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM.....	ii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS.....	vi
JURADO EVALUADOR DE LA TESIS	vii
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS	viii
ACTA DE SUSTENTACION DE LA TESIS.....	ix
ÍNDICE.....	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT	xvi
I. INTRODUCCIÓN	17
II. MATERIAL Y MÉTODOS	27
III. RESULTADOS	35
IV. DISCUSIÓN	65
V. CONCLUSIONES	71
VI. RECOMENDACIONES.....	72
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
ANEXOS.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de aminoácidos de la proteína Cruzipaina.	36
Tabla 2. A. Características fisicoquímicas de la proteína Cruzipaina. B. Composición atómica de la proteína Cruzipaina.	37
Tabla 3. A. Predicción de epítomos de Células B de la proteína Cruzipaina. B. Secuencia de péptidos con mayor probabilidad de ser inmunoreactivos.	37
Tabla 4. Cantidad de reactivos y solventes para Spot synthesis en la membrana.	44
Tabla 5. Cantidad de aminoácidos que se utiliza para la síntesis de puntos de la membrana o Spot synthesis.	45
Tabla 6. Resultados del Mapeo de péptidos (15 aa) en la membrana desde la posición. (1-A01 hasta 1-T02). Cruzipaina.	45
Tabla 7. Resultados del mapeo de péptidos (15 aa) en la membrana desde la posición (1-A03 hasta 1-T04). Cruzipaina.	46
Tabla 8. Resultados del mapeo de péptidos (15 aa) en la membrana desde la posición (1-A05 hasta 1-T06). Cruzipaina.	46
Tabla 9. Resultados del mapeo de péptidos (15 aa) en la membrana desde la posición (1-A07 hasta 1-L08). Cruzipaina.	47
Tabla 10. Características Fisicoquímicas de péptidos para sintetizar.	53
Tabla 11. Nombre y posición en la síntesis química de las secuencias elegidas.	56
Tabla 12. Documentos publicados por los últimos cinco años en Scopus de la enfermedad de chagas y los cambios de migración rural-urbano.	58
Tabla 13. Países que reportan la presencia de la enfermedad de chagas.	58
Tabla 14. Epidemiología de la enfermedad de chagas en contextos urbanos reportados en las revistas durante los últimos 5 años.	60
Tabla 15. Propuesta de mejora de identificación de la enfermedad de chagas que pueden ser aplicados para reducir el impacto de las muertes personas por un mal diagnóstico.	63
Tabla 16. Categorías funcionales de <i>cruzi</i> /Proteínas excretadas/secretadas	81
Tabla 17. Predicción de accesibilidad de superficie de epítomos de anticuerpos obtenida del análisis del IEDB.	82
Tabla 18. Predicción de accesibilidad de superficie de epítomos de anticuerpos obtenida del análisis del IEDB.	83
Tabla 19. Predicción de accesibilidad de superficie de epítomos de anticuerpos obtenida del análisis del IEDB.	84

Tabla 20. Predicción de accesibilidad de superficie de epítomos de anticuerpos obtenida del análisis del IEDB.....	85
Tabla 21. Predicción de accesibilidad de superficie de epítomos de anticuerpos obtenida del análisis del IEDB.....	86
Tabla 22. Predicción de accesibilidad de superficie de epítomos de anticuerpos obtenida del análisis del IEDB.....	87
Tabla 23. Predicción de accesibilidad de superficie de epítomos de anticuerpos obtenida del análisis del IEDB.....	88
Tabla 24. Predicción de accesibilidad de superficie de epítomos de anticuerpos obtenida del análisis del IEDB.....	89
Tabla 25. Predicción de accesibilidad de superficie de epítomos de anticuerpos obtenida del análisis del IEDB.....	90
Tabla 26. Predicción de accesibilidad de superficie de epítomos de anticuerpos obtenida del análisis del IEDB.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico del Trypanosoma cruzi.	18
Figura 2. Formación del enlace peptídico.	24
Figura 3. Secuencia completa de la proteína Cruzipaina en formato fasta conformado por 467 aminoácidos.	35
Figura 4. Secuencia lineal de aminoácidos de la proteína Cruzipaina usando la herramienta BioEdit.....	36
Figura 5. Secuencia superpuesta de la proteína Cruzipaina con distribución en su posición obtenida del ABCpred.	38
Figura 6. Secuencia superpuesta de la proteína Cruzipaina con distribución en su posición obtenida del ABCpred.....	38
Figura 7. Secuencia superpuesta de la proteína Cruzipaina con distribución en su posición obtenida del ABCpred.....	39
Figura 8. Secuencia superpuesta de la proteína Cruzipaina con distribución en su posición obtenida del ABCpred.....	39
Figura 9. Resultados de predicción de la accesibilidad de la superficie datos obtenidos del IEDB.	40
Figura 10. Resultados de la predicción con mayor probabilidad de formar el modelamiento en 3D.	41
Figura 11. Resultados de la predicción con mayor probabilidad de unión de péptidos para el modelamiento en 3D.	41
Figura 12. Resultado de los modelos construidos y de la calidad.	42
Figura 13. Resultado de la estimación de calidad de la cisteína proteasa.	42
Figura 14. Estructura homologa de la cisteína proteasa sobrepuesta en la proteína Cruzipaina.	43
Figura 15. Predicción de epítomos y los ligandos de acoplamiento en la estructura globular tridimensional de péptidos candidatos de Cruzipaina.	43
Figura 16. Secuencia lineal de la proteína Cruzipaina para Spot Synthesis en la membrana reportada por el software.	44
Figura 17. Posición vertical desde el 1-A01 hasta 1-LA08 152.	48
Figura 18. Acoplamiento de los péptidos sintéticos de la Cruzipaina en la membrana.....	48
Figura 19. Elección de péptidos sintéticos entre positivos y negativos usando ImagenJ (intensidad de luminosidad de onda 801 x 335 pixeles).	49
Figura 20. Selección de positivos y negativos de péptidos sintéticos desde el N° 1 hasta el N° 20 reportado por ImagenJ.....	49

Figura 21. Selección de positivos y negativos de péptidos sintéticos desde el N° 21 hasta el N° 40 reportado por ImagenJ.....	50
Figura 22. Selección de positivos y negativos de péptidos sintéticos desde el N° 41 hasta el N° 60 reportado por ImagenJ.....	50
Figura 23. Elección de positivos y negativos de acuerdo a los pixeles por ImagenJ.	51
Figura 24. Elección de positivos y negativos de acuerdo a los pixeles por ImagenJ.	51
Figura 25. Elección de positivos y negativos de acuerdo a los pixeles por ImagenJ.	52
Figura 26. Elección de positivos y negativos de acuerdo a los pixeles por ImagenJ	52
Figura 27. Elección de positivos y negativos de acuerdo a los pixeles por Imagen J.	53
Figura 28. Cálculo de péptidos con buena solubilidad en agua demostrando que la parte superior es hidrófila y la parte inferior hidrófoba (VGAPAAVDWRARGAVTAVKDQ) ...	54
Figura 29. Cálculo de péptidos con buena solubilidad en agua demostrando que la parte superior es hidrófila y la parte inferior hidrófoba (QKHGRVYESAAEEAFRLSVFR)	54
Figura 30. Cálculo de péptidos con buena solubilidad en agua demostrando que la parte superior es hidrófila y la parte inferior hidrófoba (AGHPLTNLSEQMLVSCDKTDS)	55
Figura 31. Cálculo de péptidos con buena solubilidad en agua demostrando que la parte superior es hidrófila y la parte inferior hidrófoba (YTEDSYPYASGEGISPP)	55
Figura 32. Modelado tridimensional de los péptidos elegidos para síntesis química.....	56
Figura 33. Suero negativo y positivos de T. cruzi para recubrir las placas ELISA.....	57
Figura 34. Péptidos con mayor inmunoreactividad de reconocimiento del T. cruzi.	57
Figura 35. Países que han reportado publicaciones de la enfermedad de chagas y su interconexión realizados en Wosviewer.....	59
Figura 36. Distribución de estudios de la enfermedad de chagas durante los últimos 5 años realizados en el software WosViever	59

RESUMEN

La enfermedad de chagas es causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*. Actualmente, su diagnóstico se basa en técnicas que buscan la detección del parásito. En esta investigación se utilizó herramientas de bioinformática para identificar péptidos altamente conservados **que pueden interferir en el ciclo celular del parásito interrumpiendo su función**. Se utilizó el programa Bepipred 2.0 para realizar una predicción *In-silico* de péptidos lineales y Swiss model para identificar candidatos conservados. Se logró realizar el tamizaje masivo de 152 secuencias de péptidos derivados de la proteína Cruzipaina (acceso GenBank: AAG35357.1), desplazados por 3 aminoácidos. Usando un robot para los pasos de acoplamiento de acetilación N-terminal para aumentar la estabilidad de estos péptidos. A continuación, la membrana conteniendo los péptidos impregnados (spot) fue enfrentada a suero humano positivo para *T. cruzi* y la inmunodetección fue completada utilizando anticuerpos policlonales antihumano conjugado con fosfatasa alcalina. La señal fue revelada utilizando el sustrato de la fosfatasa alcalina, generando un precipitado azul sobre el “spot” que albergan el péptido reconocido por anticuerpos, obteniendo una intensidad de los colores directos que se cuantificó usando el software ImagenJ. Se seleccionaron tres péptidos de 21 aminoácidos y un péptido de 17 aminoácidos que dieron mayor intensidad para realizar su síntesis química, la masa molecular de estos péptidos fue reconfirmada por espectroscopia de masas. Los péptidos sintetizados fueron utilizados para estandarizar una prueba de inmunodetección en placas de microtitulación, los valores de una reacción positiva fueron medidos a una absorbancia de 492 nm con un espectrofotómetro.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, péptidos, Spot synthesis, Síntesis química, Cruzipaina.

ABSTRACT

Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. Currently, its diagnosis is based on techniques that seek to detect the parasite. In this research, bioinformatics tools were used to identify highly conserved peptides that can interfere with the parasite's cell cycle and disrupt its function. Bepipred 2.0 was used to perform in-silico prediction of linear peptides and Swiss model to identify conserved candidates. Mass screening of 152 peptide sequences derived from the Cruzipain protein (GenBank accession: AAG35357.1), displaced by 3 amino acids, was achieved. Using a robot for the N-terminal acetylation coupling steps to increase the stability of these peptides. Next, the membrane containing the impregnated peptides (spot) was confronted with *T. cruzi* positive human serum and immunodetection was completed using alkaline phosphatase-conjugated polyclonal anti-human antibodies. The signal was revealed using the alkaline phosphatase substrate, generating a blue precipitate on the spot harboring the peptide recognised by antibodies, obtaining an intensity of the direct colours that was quantified using ImagenJ software. Three peptides of 21 amino acids and one peptide of 17 amino acids that gave higher intensity were selected for chemical synthesis, the molecular mass of these peptides was reconfirmed by spectroscopy.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, peptide, spot synthesis, chemical synthesis, cruzipain.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. La Enfermedad de Chagas

La enfermedad de chagas (EC), es ocasionada por el parásito flagelado *Trypanosoma cruzi*, es una de las parasitosis desatendidas de mayor impacto en la Salud Pública de América Latina. Actualmente por la globalización y flujo de personas entre áreas endémicas y no endémicas provocan la expansión de esta enfermedad a otras regiones del mundo. (Florencia et al., 2022). En la actualidad se reportan que alrededor de 8 millones de personas que están infectadas, reportándose un promedio de 28 mil nuevos casos y 12 mil muertes cada año, mientras que 90 millones se encuentran en riesgo de contraer la infección (Florencia et al., 2022).

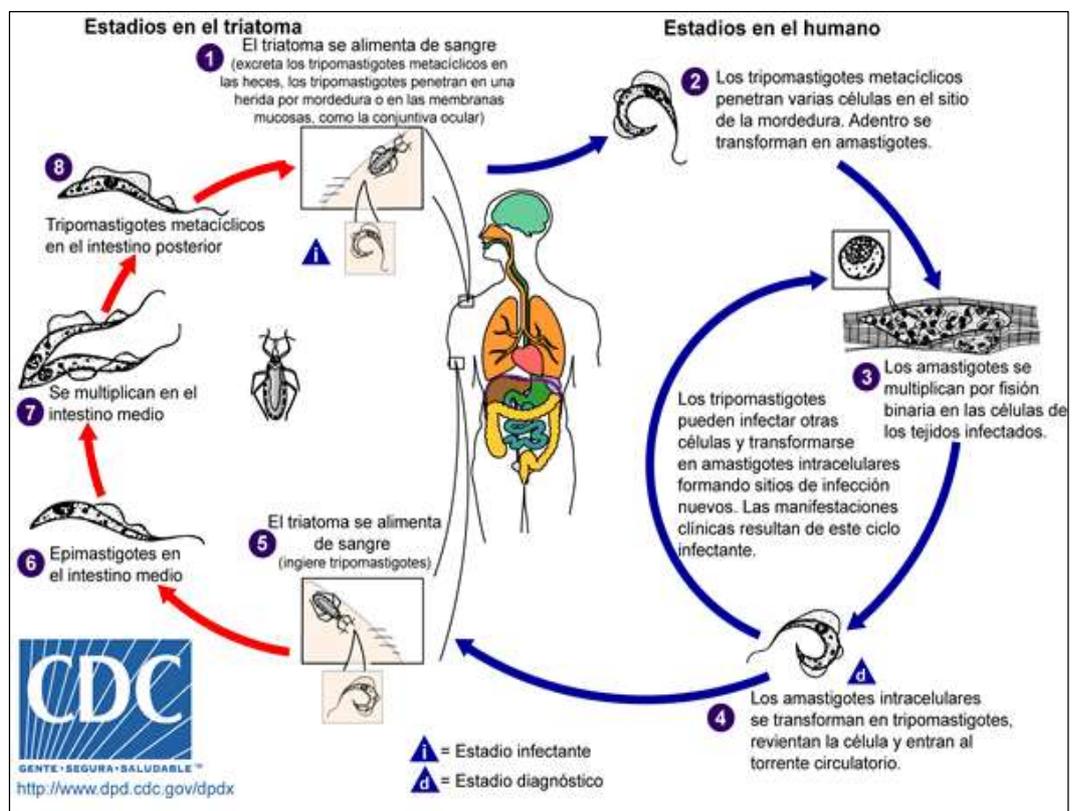
La EC es una zoonosis, transferida naturalmente a mamíferos (hombres, animales domésticos y salvajes) por insectos triatominos, que son los vectores de la enfermedad que alcanzan a más de 130 especies (Batista et al., 2019).

En ese sentido, Bayer-Santos et al. (2013) mencionan que este protozoo mide alrededor de 20-30 micrones, es muy movable y se encuentran en los animales domésticos. Tanto la persona infectada como el animal reservorio tiene la forma de trypomastigote. El parásito a lo largo de su ciclo de vida alterna entre el insecto vector y huéspedes mamíferos. Según el hospedero en el que se encuentre adoptando diferentes formas biológicas, las cuales se caracterizan por las posiciones relativas del flagelo, el cinetoplasto y el núcleo; y son funcionalmente distintas (Sáenz-García et al., 2020). La forma epimastigote se localiza en el tracto digestivo del vector, se identifica por presentar un cinetoplasto alargado y es una forma replicativa (Cabrera, 2002). La forma trypomastigote se caracteriza por presentar un cinetoplasto localizado por detrás del núcleo, el flagelo nace en su proximidad y emerge por un costado del cuerpo del parásito (Santos et al., 2013). Los trypomastigotes están presentes en la circulación de mamíferos y es la forma que ingiere el vector. (Noazin et al., 2019), otra forma, llamada trypomastigote metacíclico, se encuentra sólo en la ampolla rectal del vector y representa la forma infectiva en mamíferos. Estas últimas dos formas trypomastigote carecen de capacidad replicativa. Por último, la forma amastigote, de localización intracitoplasmática, carece de flagelo libre, es de

forma esférica u ovalada y se replica por fisión binaria en mamíferos (Rubio-ortiz et al., 2020).

También Bayer-Santos et al. (2013) en su investigaciones manifiesta que una vez dentro del intestino del vector, los epimastigotes tienen la capacidad de replicarse y diferenciarse a trypomastigote metacíclico, que es la forma infecciosa para el mamífero, invadiendo diferentes células nucleadas y una vez allí se diferencia a la forma amastigote. El estadio amastigote puede replicarse y diferenciarse en trypomastigote sanguíneo, el cual puede seguir invadiendo otras células del huésped o ser ingerido por el vector dando inicio nuevamente al ciclo. A continuación, podemos observar en la figura 1 el ciclo biológico del vector *Triatoma*, que ingiere la sangre y excreta los trypomastigotes metacíclicos penetrando en una herida o conjuntiva ocular para luego convertirse en amastigotes en tejidos infectados. Al final se transforman en trypomastigotes reventando la célula para ingresar al torrente circulatorio.

Figura 1. Ciclo biológico del *Trypanosoma cruzi*.



Fuente: ciclo biológico del *Trypanosoma cruzi* adaptado del CDC 2010. (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades)

El reporte de esta enfermedad se encuentra extendida por todo Latinoamérica, y Perú no es la excepción, hasta el 2020 el Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades del MINSA ha reportado 8 caso en Arequipa y 6 casos en Ayacucho, y en la Región Amazonas se ha reportado un caso en el Distrito de Nieva en la Comunidad Nativa Yahuahua (Vega et al., 2021). También existe un reporte en la provincia de Rodríguez de Mendoza en el centro poblado de Omia la presencia de *Pastrongilus herreri* y de la enfermedad (Crisanto, 1950). Hasta la fecha el Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades ha reportado 30 casos de Chagas en el Perú, 1 por defunción (Chagas, 2023). Cabe mencionar que la complejidad y el tiempo de desarrollo de la enfermedad dificulta la detección oportuna, mayormente se confunde con una fiebre (dengue, malaria) o diarreas, donde el tratamiento es equivocado y agudiza más la enfermedad volviéndose crónico.

1.2. Interacción de proteínas – anticuerpos y Aminoácidos

Las proteínas se consideran junto con el ADN y el ARN las macromoléculas más importantes en las células. En muchos organismos representan casi el 50% de su masa seca y en el ser humano existen al menos 30.000 proteínas diferentes ubicadas dentro de las células que realizan diferentes funciones (Rubio-ortiz et al., 2020). La información genética, por ejemplo, se expresa mediante proteínas que están involucradas en reacciones enzimáticas, contracción muscular, división celular, respuestas inmunes, auto reconstrucción y reparación de tejidos, control hormonal, transporte de sustancias por fluidos corporales y transporte celular intermembrana, en la construcción de membranas, transmisión o conducción de impulsos nerviosos, reserva y almacenamiento de nutrientes, también como en venenos y toxinas, agentes antimicrobianos, sustancias anticongelantes, etc. No es de extrañar que sean la segunda sustancia más común que se encuentra en los seres vivos, después del agua (Machado et al., 2004).

Los estudios que utilizan herramientas de modelado y simulación computacional pueden proporcionar una gran cantidad de información sobre la estructura y energética de las proteínas. Algunos de los aspectos que se

pueden investigar incluyen la densidad de empaquetamiento, la similitud funcional, las relaciones evolutivas y las clasificaciones topológicas de las proteínas, también se pueden realizar alineamientos estructurales para evaluar la estructura, la predicción de la estructura terciaria, el análisis de la red de contactos y el uso de potenciales empíricos para predecir la estabilidad termodinámica. Estas técnicas también permiten realizar interferencias sobre el proceso de plegamiento, las interacciones proteína-proteína y las interacciones proteína-ligando. Por lo tanto, el modelado y la simulación computacional son herramientas poderosas que pueden proporcionar información valiosa sobre las proteínas, su función y su interacción con otros biomoléculas (Peng et al., 2004).

Desde el descubrimiento de que los antígenos eran compuestos proteicos fue un gran avance en el campo de la inmunología. Michael Heidelberger y Oswald Avery demostraron en la década de 1930 que los anticuerpos podían precipitar antígenos, y que estos eran proteínas. Esto sentó las bases para una línea de investigación en la que se analizan las propiedades bioquímicas de la interacción antígeno-anticuerpo. En los años 30 el médico estadounidense John Marrack llevó a cabo un análisis detallado de la unión de un antígeno con su anticuerpo permitiendo una comprensión más profunda de la estructura y función de los anticuerpos cimentando las bases para investigación posterior en el campo de la inmunología, desde entonces la investigación en inmunología ha avanzado significativamente, y se han desarrollado técnicas cada vez más sofisticadas para analizar la interacción antígeno-anticuerpo y su papel en la respuesta inmunológica (Of et al., 2013).

Bayer-Santos et al. (2013) nos dice que la Proteómica es una herramienta importante para la investigación en inmunología, ya que permite a los investigadores estudiar las proteínas involucradas en la respuesta inmunitaria. Con la ayuda de la bioinformática y fisicoquímica, se pueden descifrar las características físico-químicas de las interacciones antígeno-anticuerpo. En particular el trabajo del inmunólogo italiano Lucca Simonelli se enfoca en localizar un conjunto de reglas estructurales en las interacciones de un antígeno viral con un anticuerpo. Esto se logra utilizando técnicas de modelado y simulación computacional para analizar la estructura y la

dinámica de las proteínas involucradas en la interacción antígeno-anticuerpo. En resumen, la combinación de la proteómica, la bioinformática, la fisicoquímica y el modelado computacional son herramientas valiosas para la investigación en inmunología, y están permitiendo una comprensión cada vez más profunda de las interacciones antígeno-anticuerpo y su papel en la respuesta inmunitaria (Kitchen et. al., 2004).

1.3. Bioinformática

El aumento exponencial en el número de estructuras proteicas depositadas en el Protein Data Bank (PDB) es un claro reflejo del rápido avance de la tecnología y la capacidad de la comunidad científica para producir datos más precisos y detallados sobre las estructuras proteicas. La identificación de residuos de unión entre proteínas y péptidos es fundamental para comprender los mecanismos de las funciones proteicas y explorar descubrimientos de fármacos o vacunas. La utilización de métodos computacionales para el diseño de nuevas características y el descubrimiento de nuevos enfoques de interacción del funcionamiento de las proteínas se ha convertido en una herramienta clave en la investigación en inmunología (Wang et. al. 2022), el software BLAST en línea es un ejemplo de un programa de búsqueda local y comparación de similitudes entre secuencias de proteínas que ha permitido a los investigadores identificar secuencias similares entre proteínas conocidas y nuevas proteínas desconocidas. Esto es especialmente útil en la identificación de nuevas proteínas con una función similar a proteínas ya conocidas, lo que puede ser útil en la identificación de nuevos objetivos terapéuticos y en el diseño de fármacos o vacunas.

De igual manera (Kopicki-Saikia et al. 2022), argumenta que la biología ha evolucionado hacia un enfoque más integrado y sistémico, donde se busca entender como los distintos componentes del organismo interactúan y se regulan entre sí para llevar a cabo las diversas funciones biológicas. Esto ha llevado al surgimiento de nuevas disciplinas interdisciplinarias como la biología de sistemas y la biología sintética, que buscan diseñar y construir sistemas biológicos complejos a partir de componentes básicos. Además, la integración de técnicas computacionales y experimentales ha permitido una

comprensión más profunda de los procesos biológicos y ha abierto nuevas oportunidades para el descubrimiento de fármacos y terapias.

Es impresionante ver cómo el Protein Data Bank (PDB) ha crecido en tamaño y diversidad de estructuras, lo que refleja la constante investigación y avance en la comprensión de las estructuras proteicas y su función en los seres vivos. La disponibilidad de esta información es invaluable para la comunidad científica en la búsqueda de nuevos descubrimientos y el desarrollo de fármacos y terapias basadas en la comprensión de las estructuras moleculares. Es emocionante pensar en el potencial que esto tiene para el futuro de la medicina y la biotecnología. desde sus inicios y desde algunos años también se encuentran en formato mmCIF, desarrollado específicamente para los datos estructurales del AP. Se agregan desde 6000 a 7000 estructuras cada año (Sáenz-García et al., 2020).

La bioinformática es una disciplina clave para manejar y analizar la gran cantidad de información generada en la investigación de estructuras proteicas y otros campos de la biología molecular. La capacidad de almacenar, integrar y analizar grandes conjuntos de datos biológicos es fundamental para la comprensión de los procesos biológicos y la identificación de nuevas terapias y medicamentos. La bioinformática permite el uso de herramientas computacionales avanzadas para la comparación y análisis de secuencias de proteínas, modelado molecular, análisis de datos ómicos y otras técnicas de análisis de datos. Además, la disponibilidad de estas herramientas y bases de datos en línea ha permitido la colaboración global y el acceso a información para la investigación en todo el mundo (Kopicki-Saikia et al., 2022).

En resumen, la evolución de la tecnología informática ha permitido a los investigadores en acceder a una cantidad sin precedentes de datos sobre las estructuras proteicas y desarrollar nuevas herramientas y métodos computacionales para analizarlos y comprender mejor la función de las proteínas.

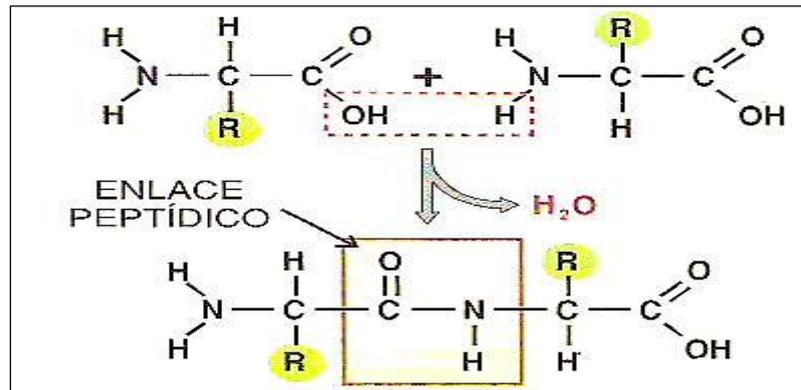
1.4. Péptido y Mapeo de Epítomos

Los péptidos también pueden ser utilizados como fármacos o vacunas, debido a su capacidad para interactuar específicamente con proteínas objetivo y modular su actividad biológica. La identificación de péptidos con potencial terapéutico se ha vuelto una práctica común en la investigación farmacéutica y biomédica, y la proteómica ha jugado un papel importante en la identificación de péptidos bioactivos a partir de proteínas conocidas y en la caracterización de sus propiedades estructurales y funcionales. También se utilizan herramientas de bioinformática y simulación molecular para diseñar péptidos con propiedades específicas, como afinidad de unión, selectividad, estabilidad y biodisponibilidad, lo que ha llevado al desarrollo de una amplia gama de péptidos terapéuticos y diagnósticos (Ospina, 2020).

Los péptidos son una clase de moléculas señalizadoras que utilizan los organismos multicelulares para regular sus complejas actividades. La interrelación dinámica entre los procesos opuestos, denominada homeostasis, mantiene un ambiente interno estable. En la actualidad se conocen moléculas peptídicas con funciones antagónicas que afectan la regulación de numerosos procesos como la presión sanguínea. Dos péptidos que afectan al volumen sanguíneo son la vasopresina y el factor natriurético auricular. La vasopresina que también se denomina hormona antidiurética (ADH), contiene nueve residuos de aminoácidos. También tiene estructura semejante a la oxitocina (Frank, 2002a).

Los aminoácidos reaccionan para la formación de enlaces peptídicos covalentes interviniendo al grupo carboxilo (-COOH) de un aminoácido y reaccionando con otro aminoácido contiguo al grupo amino (-NH₂) y el desprendimiento de una molécula de agua. R representa la cadena lateral del aminoácido. La molécula resultante de la reacción es un dipéptido, compuesto por dos aminoácidos unidos por un enlace peptídico. La repetición de esta reacción con más aminoácidos produce una cadena peptídica o proteína. En la figura 2 se muestra esta reacción.

Figura 2. Formación del enlace peptídico.



Los epítomos son extremadamente importantes en la respuesta inmune, ya que son la parte específica del antígeno que es reconocida y unida por los receptores de células B o células T del sistema inmunológico. Los receptores de células B reconocen epítomos de antígenos solubles, mientras que los receptores de células T reconocen epítomos representados en la superficie de células presentadoras de antígenos. El reconocimiento de los epítomos por los receptores de células B o T desencadena una respuesta inmunitaria específica y adaptativa que incluye la producción de anticuerpos y la activación de células T citotóxicas. La identificación de epítomos específicos es importante para el desarrollo de vacunas y terapias inmunológicas, así como para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y alérgicas (Mendel-Ben-Nun et. al. 1996).

Así mismo (Frank 2002), indica que la identificación y caracterización de epítomos es de gran importancia en la investigación inmunológica, ya que permite entender cómo el sistema inmunológico reconoce y responde a agentes extraños como patógenos y células cancerosas. La técnica de cristalografía de rayos X es una de las más utilizadas para resolver la estructura 3D del complejo antígeno-anticuerpo, pero requiere una gran cantidad de muestra con alta pureza y es un proceso lento. Por otro lado, la síntesis rápida y paralela de una gran cantidad de péptidos mediante el método de Spot Synthesis permite la identificación de epítomos de manera más eficiente y con una amplia gama de métodos de análisis y selección. Además, la técnica de cristalografía también puede ser complementada con la

predicción computacional de estructuras de proteínas y péptidos, lo que permite acelerar y optimizar la identificación de epítomos.

1.5. Ensayos Inmunológicos

En las investigaciones realizadas por (Dinatale & Balbi, 2020), mencionan que es importante destacar la detección temprana de la enfermedad de chagas (EC), siendo fundamental para el éxito del tratamiento y la prevención de complicaciones graves. El tratamiento en la fase aguda se base en el uso de medicamentos antiparasitarios, mientras que en la fase crónica se enfoca en el manejo de los síntomas y la prevención de complicaciones, como la insuficiencia cardíaca y la enfermedad gastrointestinal. Es por eso que la realización de pruebas de diagnóstico precisas y confiables es crucial para el manejo y tratamiento efectivo de la enfermedad de chagas.

Para la enfermedad de chagas los fármacos actualmente usados son el benznidazol y nifurtimox son efectivos en los casos agudos y en los casos congénitos o la reactivación por inmunosupresión a menudo se suspende el tratamiento debido a su uso prolongado tratamiento y sus efectos adversos que se desarrollan (Nagarkatti et al., 2020). En la actualidad se están llevando a cabo investigaciones para encontrar nuevas alternativas terapéuticas para la enfermedad de chagas, debido a los efectos secundarios y la duración del tratamiento con los fármacos existentes. Algunas de estas alternativas incluyen el uso de terapias combinadas, nuevos fármacos en desarrollo y la identificación de nuevos blancos moleculares. Además, también se están explorando enfoques basados en la inmunoterapia y la terapia génica para el tratamiento de la EC. Estas investigaciones están en curso y se espera que en el futuro cercano puedan ofrecer nuevas opciones terapéuticas más efectivas y con menos efectos secundarios para los pacientes con EC. En este sentido, se busca nuevos métodos o ensayos para encontrar un mecanismo que permita desarrollar nuevos caminos a través de la biología molecular (Immunochemistry Diagnostics, 2015).

En esta investigación se tiene como objetivo general estandarizar la técnica de inmunoensayo de absorción ligado a enzimas (ELISA) con antígeno de péptido sintético para detección de *T. cruzi*. Los objetivos específicos

tenemos: Primero, diseñar y realizar el análisis *In-silico* de péptidos candidatos para la detección de *T. cruzi*, identificándose las secuencias adecuadas para el reconocimiento del parásito, optimizando la búsqueda con el modelamiento en 3D para el análisis de acoplamiento, enlaces, etc. Para el segundo objetivo que es sintetizar químicamente los péptidos para detección serológica de *T. cruzi* se realizó en dos etapas; a) las secuencias de la proteína Cruzipaina se obtuvo a través de la técnica de Spot Synthesis, realizando una selección o mapeo de 152 secuencias desplazados en 3 posiciones, luego se utilizó el protocolo de inmunodetección de péptidos sintetizados en membrana y se analizaron con el software imagen J para elegir 4 péptidos que se sintetizaron químicamente. Para el tercer objetivo se procedió a estandarizar los péptidos usando el protocolo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) para identificar el parásito de *T. cruzi*. Y para el cuarto objetivo se ha revisado propuestas para el fortalecimiento equitativo al servicio de salud, a través de un análisis sistemático de artículos científicos publicados de los cambios en la transmisión de la enfermedad identificando publicaciones en los últimos 5 años de la enfermedad de Chagas y su distribución usando el software VOSviewer para visualizar los avances.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Ubicación de la investigación

Geográficamente la ejecución de la presente investigación se realizó en la en la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, en el Instituto de Enfermedades Tropicales, ubicado a 2.4 km del centro de la ciudad de Chachapoyas. Así mismo para completar la investigación se utilizaron los laboratorios de Inmunoquímica de Proteínas y de Parasitología del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad Federal Minas Gerais, también el laboratorio de Fisiopatología Experimental de la Universidad de Extremo Sur Catarinense – UNESC, Brasil donde se realizó la síntesis química de los péptidos.

2.2. Unidad de Investigación

Esta investigación se realiza con el fin de identificar nuevos marcadores que puedan ser usados en pruebas de diagnóstico rápido para la detección de *T. cruzi* causante de la enfermedad de chagas, se realizó utilizando la secuencia general de la proteína Cruzipaina presente en la fase aguda y crónica, del parásito seleccionando epítomos con alta afinidad y sensibilidad. Estos péptidos se probaron como antígeno para el diagnóstico de la enfermedad de chagas.

2.3. Objetivo 1: Diseño *In-silico* de péptidos candidatos para detección de *T. cruzi*.

- **Predicción de epítomos para reconocimiento de *T. cruzi*.**

Al desarrollar esta investigación, se realizó una búsqueda de artículos publicados de la enfermedad de chagas preferentemente en identificar secuencias de aminoácidos para el reconocimiento del parásito *T. cruzi*, se inició con el artículo base denominado “Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins” (Bayer-Santos et al., 2013). Reportando posibles candidatos de péptidos lineales para el análisis. Se encontró una proteína que se encuentra presente en la relación huésped –

parásito de *T. cruzi* con dominios antigénicos en su estructura que han sido considerados como una herramienta potencial para el diagnóstico con dominio catalítico de la enzima conocida como Cruzipaina reportado en el artículo “Enzymatic activity, protein expression, and gene sequence of cruzipain in virulent and attenuated *Trypanosoma cruzi* strains”(Journal, 2016), esta proteína puede ser usado para el diagnóstico y seguimiento del tratamiento de la EC en fase aguda y crónica (Soprano et al., 2022).

La secuencia lineal de la proteína Cruzipaina se identificó en el National Center for Biotechnology information (NCBI) en la Base de Datos de Inmunoepítopes (IEDB), <http://www.iedb.org>. Se procedió a identificar los candidatos para la predicción *In-silico* utilizando las herramientas como:

- **El ABCpred** (<http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/>) es un servidor de predicción de epítomos (Saha, 2006) basado en redes neuronales artificiales, permite predecir regiones de epítomos lineales de células B continuos que reaccionan de forma cruzada con un anticuerpo y se van uniendo a un polipéptido conformacional, la selección puede ser de 10, 12, 14, 16 y 18 y traza los epítomos en color azul a lo largo de la columna vertebral de la proteína de color negro formando una tabla de longitud de los aminoácidos desde el N-Terminal hasta el C-Terminal en una proteína predicha (Saha et al., 2005).

Como modelo de predicción de epítomos de células B, se utilizó una red neuronal recurrente (RNN) entrenada con un conjunto de datos de péptidos conocidos que son epítomos de células B. Una vez identificada, la red se utilizó para predecir nuevos epítomos de células B a partir de secuencias de aminoácidos aleatorias.

Para hacer la predicción, se fijó un patrón de longitud de 16 aminoácidos y se evaluó el rendimiento por péptido o epítomo considerando todas las posibles combinaciones de 16 aminoácidos en la secuencia de péptidos que predice la probabilidad de cada combinación de epítomos de células B, se realizó el uso de la red neuronal recurrente que está entrenada para predecir la probabilidad de que cada péptido sea un epítomo de células B y se ordenan por puntuación. Los péptidos con una puntuación mayor a 65.3%

se consideran predicciones positivas, para mejorar la precisión de la predicción se fijó 85%.

- **Base de Datos de Epítomos Inmunes (IEDB)** <http://www.iedb.org/>, se utilizó para realizar la predicción de epítomos de anticuerpos y mide parámetros como hidrofilia, flexibilidad, accesibilidad, giros, superficie expuesta, polaridad y propensión antigénica de las cadenas polipeptídicas que se han correlacionado con la ubicación de epítomos continuos (Pellequer et al., 1993).

La predicción de accesibilidad de la superficie se calculó la puntuación para un residuo dado y se consideraron los aminoácidos en un intervalo de la longitud elegida, centrados alrededor del residuo.

Para la predicción de epítomos de células B el BepiPred utilizó el algoritmo Random Forest que ha sido diseñado para identificar epítomos y aminoácidos no epítomos determinados a partir de estructuras cristalinas. Se fijó el tamaño de secuencia a 16 aminoácidos con un límite de 1.0, para ser parte de un epítomo se colorean de color amarillo en el gráfico donde los ejes Y representan los puntajes de los residuos y las posiciones de los residuos en los ejes X en la secuencia.

- **SWISS MODEL:** Es un generador de modelos estructurales tridimensionales de proteínas cuyas estructuras aún no están depositadas en el PDB realiza la búsqueda de proteínas cristalizadas homologas hasta la generación del modelo 3D final. Cuando una secuencia de estructura desconocida tiene un homólogo claro de estructura conocida permite el alineamiento de los péptidos mostrando las regiones con estructura secundarias definidas permitiendo el modelado. De esta manera usando las coordenadas del esqueleto y la estructura molde se realizan aproximaciones dependiendo del programa (Schwede et al., 2003).

Para generar el modelo estructural se tomó la secuencia primaria en formato FASTA de la proteína Cruzipaina realizando la búsqueda para identificar una proteína homóloga con estructura conocida que se encuentra en el PDB, se encontró una plantilla similar con el mayor

porcentaje de identidad realizando ajustes con los aminoácidos de la Cruzipaina (Johé et al., 2021).

2.4. Objetivo 2: Síntesis química de los péptidos para detección serológica de *T. cruzi*

- **Mapeo de Péptidos por la Técnica Spot Synthesis o Síntesis de Puntos en membrana.**

El equipo utilizado para la Spot Synthesis es ResPep RS (Intavis ®) que utiliza un software Multi pep (Intavis) para la generación de la lista de péptidos, protocolos de pipeteo (incluido en el kit de síntesis) y un software de operación del brazo robot ASP222 (De-Simone et al., 2016), el acoplamiento de los aminoácidos se realizó la proteína Cruzipaina (número de acceso de GenBank: >AAG35357.1 Cruzipain [*Trypanosoma cruzi*]) de forma vertical para una membrana con capacidad de 600 spots que tiene una escala de 1-10 µmol. El mapeo se realizó utilizando los marcos de lectura colocando la secuencia con una longitud de 15 péptidos que son leídos en tripletes codificando a cada aminoácido correspondiente. Se utilizó una membrana de nitrocelulosa estable a los ácidos (Intavis, Koln, Alemania) funcionalizados con amino-polietilenglicol (Sigma Aldrich) de acuerdo con (Laune et al., 2002), los 20 aminoácidos usados son de Calbiochem-Merck (Darmstadt, Alemania) que son derivados del Fluorenil metil oxicarbonilo (F-moc).

La Síntesis química se realizó con Oxyma/DIC y la acetilación N-terminal para aumentar la estabilidad de los péptidos. Después de ensamblar las secuencias peptídicas, los grupos protectores de la cadena lateral se eliminaron mediante un tratamiento con tricloroacético (Frank, 2002a).

- **Inmunodetección de la membrana para identificar los péptidos candidatos.**

Los péptidos se sintetizaron covalentemente en membranas de nitrocelulosa preactivadas según la técnica de Spot synthesis (Frank, 2002b), la membrana se bloqueó con BSA al 3% y sacarosa al 5% en TBS-T al 0.1% overnight, después del lavado con TBS-T se agregó los anticuerpos a testear a una dilución de 1/1000 y se incubaron durante una hora y treinta minutos con suero positivo de *T. cruzi* en solución de

bloqueo. Después se lavaron con TBS-T tres veces por 10 minutos, la membrana se incubó con anticuerpos anti-IgG humano hecho en cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Invitrogen, Itapevi SP, Brasil) diluidos a 1/15000 en solución de bloqueo, luego se lavaron con TBS-T y CBS por 10 minutos cada uno por duplicado. Se revelaron con el sustrato de CBS 20 ml, BCIP 120 µl, MgCl₂ 150 µl y MTT 180 µl por 30 minutos. Todo este proceso se desarrolló en agitación a Temperatura ambiente. Los puntos se visualizaron mediante escaneo.

Para la regeneración de la membrana se realizó con Dimetilformamida (DMF) por 10 minutos tres veces a temperatura ambiente en agitación. Luego se realizó el lavado con agua mili-Q por 2 minutos por tres veces a temperatura ambiente en agitación. Después se realizó el lavado con Regen A 50 mL + 50 uL B-mercapto etanol a temperatura ambiente en agitación durante toda la noche. Al siguiente día se continuo con los lavados en Regen B durante 10 minutos por tres veces a T° ambiente en agitación. luego se utilizó el alcohol absoluto al 99.5% P.A.

El Spot Synthesis en la membrana se realizó en el laboratorio de Inmunología y Genómica de Parásitos-LIGP, el protocolo de inmunodetección y regeneración de la membrana se realizó en el laboratorio de Bioquímica e Inmunología, ambos laboratorios se encuentran en el Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad Federal Minas Gerais (UFMG), Brasil.

- **Síntesis Química de péptidos.**

Una vez estandarizado los puntos con mayor reconocimiento de péptidos se analizó cuantitativamente con el software ImageJ para elegir los péptidos candidatos con una línea cutoff de 151 pixeles de intensidad.

Los péptidos elegidos se modelaron usando como base la estructura homóloga de la cisteína proteasa y la proteína Cruzipaina en el Swiss model que muestra los 4 péptidos de plegamiento en la superficie revelando su potencial de antigenicidad.

Se utilizó 4 columnas de polipropileno y los 20 aminoácidos usados son de Calbiochem-Merck (Darmstadt, Alemania) que son derivados del Fluorenil metil oxicarbonilo (F-moc). La Síntesis química se realizó con

Oxyrna/DIC y la acetilación N-terminal para aumentar la estabilidad de los péptidos. Después de ensamblar las secuencias peptídicas, los grupos protectores de la cadena lateral se eliminaron mediante un tratamiento con tricloroacético (Frank, 2002a).

Se utilizó el protocolo de síntesis química de péptidos analizando el punto isoeléctrico y la masa molar del péptido (De-Simone et al., 2016). Calculado en: https://web.expasy.org/compute_pi/>. Además, permitió confirmar valores como la solubilidad de la secuencia peptídica en agua (Insuasty Cepeda et al., 2019), dilución del péptido. Para la obtención se utilizó la herramienta digital disponible en el sitio < <https://pepcalc.com/>>. Después de pesar la resina en la jeringa previamente identificada, se añadió una cantidad suficiente para cubrir toda la resina (con los restos) con DMF, a los 30 minutos se retiró utilizando la bomba de vacío.

Para desproteger el enlace químico de la resina, se agregó piperidina 25% durante 5 minutos, se retiró y se vuelve a añadir durante 15 minutos y retiramos.

Para eliminar las impurezas, se lavaron con DMF, 3 veces durante 15 segundos cada una, y 1 vez durante 15 segundos con DCM. Para confirmar la reacción, se añadió tres gotas de bromofenol al 0,1% resultando un color azul desprotegiendo la región amina del aminoácido. Con la región amina desprotegida y lista para unirse con el aminoácido se añadió al eppendorf 500 µL de la solución Oxyrna (Merck) + el volumen calculado de DIC y se homogenizó en el vórtex.

Para eliminar las impurezas se lavaron con DMF y metanol, 2 veces durante 15 segundos cada uno, y un lavado final con DCM, 1 vez durante 15 segundos. Para confirmar la unión, se realiza la prueba del bromofenol al 0,1 % dando un color amarillo desprotegiendo la región amina. El procedimiento se repite empezando por la adición de piperidina al 25% para cada aminoácido presente en la secuencia. Después de acoplar todos los aminoácidos, se repite el procedimiento de desprotección hasta que el bromofenol 0,1% (resultado azul). Con la confirmación de desprotección, la resina debe secarse completamente y toda la resina debe transferirse a un tubo falcon.

Para la limpieza se preparó la solución de escisión en un tubo de ensayo de vidrio, se añadió al tubo falcon con la resina por 3 horas. Después de este período, se transfirió a la jeringa (para pasar por el filtro). Luego se añadió otros 500 µL de TFA en la jeringa inyectando de nuevo el contenido de la jeringa en el mismo tubo falcon. Se añadió 10 mL de éter etílico y se deja toda la noche para precipitar el péptido.

Para realizar la centrifugación es necesario enfriar la centrífuga a 4°C, y luego centrifugar durante 10 minutos a 4°C a 10000 rpm. Descartar el sobrenadante, se añadió 10 mL de éter etílico y centrifugar de nuevo (10 minutos a 4 °C a 10000 rpm). Descartar de nuevo el sobrenadante y almacenar. Para culminar se liofilizó la muestra.

Los péptidos fueron sintetizados en el Laboratorio de Fisiopatología Experimental de la universidad del extremo sur de Santa Catarina - UNESC. Brasil.

2.5. Objetivo 3: Estandarizar la técnica de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) para obtención de péptidos de *T. cruzi*.

La selección de los péptidos obtenidos de la síntesis química y el *T. cruzi* se utilizó la técnica por ELISA. Se sensibilizaron las placas (Becton Dickinson France SA) durante la noche a 4° C con 0.5 µg por pocillo en solución de 100 µl de solución de coating buffer durante toda la noche. Luego las placas se lavaron con PBS 1x, Tween 20 al 0.1 % con pH al 9.6 y luego se bloquearon con PBS-T 0.05%, Tween 20 al 0.1 % y caseína al 2 % durante 1 h a 37°C. Se añadieron sueros de *T. cruzi* (diluidos en solución de incubación 1:100 y 1:200) a los pocillos respectivos. Las placas se incubaron durante 1h a 37° C. La unión se detectó usando un conjugado de peroxidasa IgG de cabra anti IgG humano (Sigma) diluido 1:10000 en tampón de bloqueo. Después de 1 hora 37 °C y lavado, se añadió el sustrato de peroxidasa (10 mL de solución citrato + 2 mg de OPD + 2 uL de H₂O₂). La reacción se detuvo con ácido sulfúrico (1:20) después de 30 minutos y el color resultante se midió a 492 nm con un lector de placas de microtitulación automatizado (Modelo 450, BioRad). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

2.6. Revisar propuestas para el fortalecimiento del acceso equitativo al servicio de salud, a través de un análisis sistemático de los cambios en la transmisión de la enfermedad.

Los documentos que se utilizaron de fuente para el análisis bibliométrico de artículos publicados en los últimos 5 años, se utilizaron los buscadores de literatura científica y técnica en salud de América Latina y el Caribe (LILACS), PubMed, base de datos colaborativa multilingüe de evidencia en salud (epistemonikos), Cochrane, Scopus. La búsqueda de artículos científicos se hizo en idioma inglés, portugués y español, con fecha de corte de la búsqueda el 4 de enero de 2023, empleando la ecuación de búsqueda para la extracción de documentos como la búsqueda de transmisión vertical de *T. cruzi*, bancos de sangre y donantes, distribución epidemiológica en áreas urbanas y su aparición en regiones no endémicas en los campos de título de los artículos, resumen y palabras claves, utilizando palabras como epidemiología de la enfermedad de chagas, distribución geográfica y evolución para determinar la proporción de publicaciones sobre producción científica general en un contexto urbano. Se mantuvo las variables de autor, Institución, País y palabras claves, y a partir de ahí se generan los indicadores bibliométricos.

Para el procesamiento de los datos de las listas de distribución de frecuencia se generaron con el programa Microsoft Excel 2019. La construcción de la red de datos se utilizó una herramienta de software VOSviewer visualizando la superposición del análisis aplicando la técnica de normalización de la fuerza de asociación, luego la técnica del mapeo VOS (Visualización de similitudes) y finalmente la técnica de agrupación. Se analizó la información incluyendo los países en la red con publicaciones relevantes de coautoría entre países, cada círculo representa un país y su tamaño refleja la cantidad de documentos publicados en la revista, la cercanía o lejanía de un país a otro refleja la fuerza de coautoría que ejerce cada país. Es decir, cuanto más cerca se encuentra un país de otro, mayor es la fuerza de coautoría entre ellos y los que se encuentran más lejos el uno del otro menor es la relación de coautoría. Los colores indican una agrupación de países que están relativamente relacionados entre sí.

III. RESULTADOS

3.1. Objetivo 1: Diseño *In-silico* de la proteína Cruzipaina: >AAG35357.1 cruzipain

Se utilizó la secuencia de aminoácidos de la proteína Cruzipaina obtenida del NCBI (National Center for Biotechnology Information) en formato FASTA y se comparó con las proteínas homólogas conocidas en el PDB (Protein Data Bank) con el código >AAG35357.1 Cruzipain conformado por 467 aminoácidos.

La figura 3 muestra la descripción en formato FASTA de la secuencia de la proteína Cruzipaina, este es un formato de archivo utilizado para representar secuencias de ácidos nucleicos o proteínas mediante el uso de códigos de una letra para los diferentes aminoácidos o bases nucleotídicas.

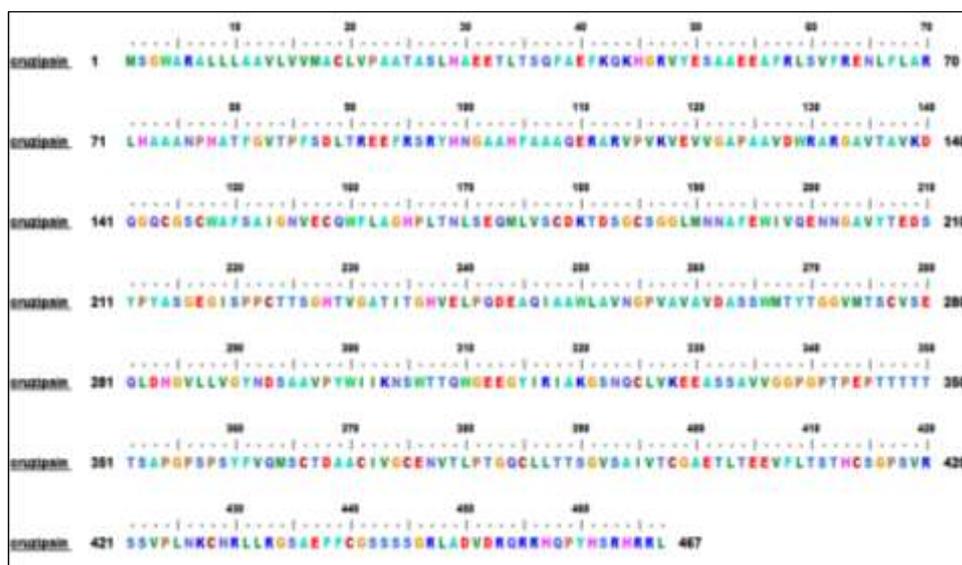
Figura 3. Secuencia completa de la proteína Cruzipaina en formato fasta conformado por 467 aminoácidos.



```
FASTA CRUZIPAINA.txt: Bloc de notas
Archivo Edición Formato Ver Ayuda
>cruzipain [Trypanosoma cruzi]
MSGWARALLLAAVLVVMAACLVAATASLHAEETLTSQFAEFKQKHGRVYESAAEEAFRLS
VFRENLF LARLHAAANPHATFGVTPFSDLTREEFRSRYHNGAAHFAAAQERARVPVKVEV
VGAPAAVDWRARGAVTAVKDQGCQWAFSAIGNVEQWFLAGHPLTNLSEQMLVSCDK
TDSGCSGGLMNNAFEWIVQENNGAVYTEDSYPPYASGEGISPPCTTSGHTVGATITGHVEL
PQDEAQIAAWLAVNGPVAVAVDASSWMTYTGGVMTSCVSEQLDHGVLLVGYNDSAAVPYW
IIKNSWTTQWGEEGYIRIAKGSNQCLVKEEASSAVVGGPGPTPEPTTTTTTSAPGPSPSY
FVQMSCTDAACIVGCENVTLPTGQCLLTSSGVSIVTCGAETLTEEVFLTSTHCSGPSVR
SSVPLNKCNRLLRGSAEFFCGSSSSGRLADVDRQRHQPYPYHSRHRRL
```

La herramienta BioEdit se utilizó para alinear la secuencia múltiple de aminoácidos con la secuencia de nucleótidos del gen que la codifica, permitiendo una mejor comprensión de su estructura y función. Se utilizó como edición de alineamiento y análisis de la proteína Cruzipaina como se muestra en la Figura 4.

Figura 4. Secuencia lineal de aminoácidos de la proteína Cruzipaina usando la herramienta BioEdit.



La composición de cada uno de los 20 aminoácidos de la secuencia de la proteína Cruzipaina se realizó en el ABCpred, además se analizó la cantidad exacta por cada uno de ellos tal como se muestra en el Tabla 1.

Tabla 1. Composición de aminoácidos de la proteína Cruzipaina.

aa	Símbolo	Total de aa	Composición
Ala	A	56	12.00%
Arg	R	23	4.9%
Asn	N	16	3.4%
Asp	D	13	2.8%
Cys	C	17	3.6%
Gln	Q	17	3.6%
Glu	E	30	6.4%
Gly	G	39	8.4%
His	H	14	3.0%
Ile	I	11	2.4%
Leu	L	33	7.1%
Lys	K	9	1.9%
Met	M	7	1.5%
Phe	F	16	3.4%
Pro	P	23	4.9%
Ser	S	43	9.2%
Thr	T	37	7.9%
Trp	W	10	2.1%
Tyr	Y	11	2.4%
Val	V	42	9.0%
Pyl	O	0	0.0%
Sec	U	0	0.0%

El ABCpred calculó las características fisicoquímicas de la proteína Cruzipaina como el número de aminoácidos, el peso molecular y el punto Isoeléctrico. Además, calculó la composición atómica tal como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. **A.** Características fisicoquímicas de la proteína Cruzipaina. **B.** Composición atómica de la proteína Cruzipaina.

A		B	
Características Fisicoquímicas de la proteína Cruzipaina		Composición atómica de la Proteína Cruzipaina	
Nº de aa	467	Carbono C	2178 g/mol
Peso Molecular	49807.39 KDa	Hidrógeno H	3376 g/mol
pI teórico	5.7	Nitrogeno N	616 g/mol
		Oxígeno O	678 g/mol
		Azufre S	24 g/mol
		Total	6872

Con los datos de la tabla 2 se continuó con el programa ABCpred, se ingresó la secuencia de aminoácidos en un código de letras, un umbral (0.1-1) y una longitud de entrada que se muestra en la tabla 3. Por lo tanto, se eligieron a los péptidos con una mayor puntuación es decir una mayor probabilidad de ser un epítipo, se eligieron por encima del valor umbral (0.85).

Tabla 3. **A.** Predicción de epítipos de Células B de la proteína Cruzipaina. **B.** Secuencia de péptidos con mayor probabilidad de ser inmunoreactivos.

A		B			
Predicción de Epítipos de Células B		Rango	Secuencia	Posicion	Score
Secuencia	Cruzipaina	1	SGEGISPPCTTSGHTV	215	0.94
Tamaño	467	2	GHTVGATITGHVELPQ	227	0.93
secuencia de entrada	16	3	KEEASSAVVGGPGPTP	328	0.92
Ajuste del umbral	0.85	4	AVVGGPGPTPEPTITT	334	0.90
		5	PEPTTTTTTSAPGPSP	343	0.89
		5	ASSWMTYTGGVMTSCV	263	0.89
		5	YTEDSYPYASGEGISP	206	0.89
		6	AEEAFRLSVFRENLFL	53	0.88
		6	SAPGPSYSYFVQMSCT	352	0.88
		7	CDKIDSGCSGGLMNA	178	0.87
		8	DWRARGAVTAVKDQGQ	128	0.86
		9	CGSSSSGRLADVDRQR	440	0.85
		9	SWTTQWGEEGYIRIAK	305	0.85
		9	QGQCGSCWAFSAIGNV	141	0.85

Figura 7. Secuencia superpuesta de la proteína Cruzipaina con distribución en su posición obtenida del ABCpred.

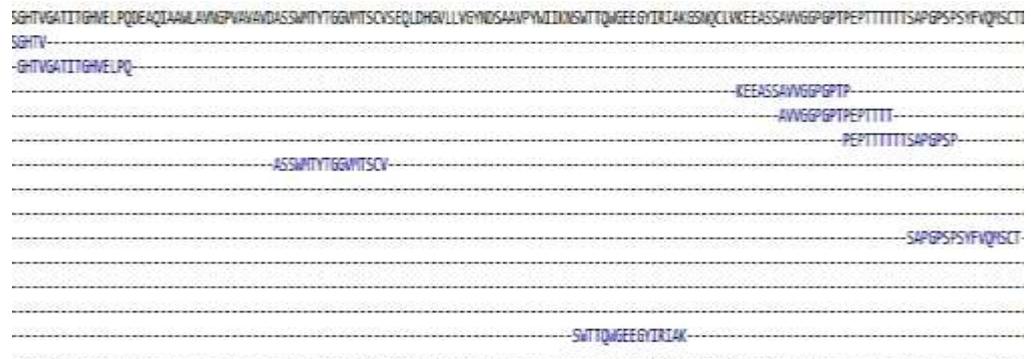
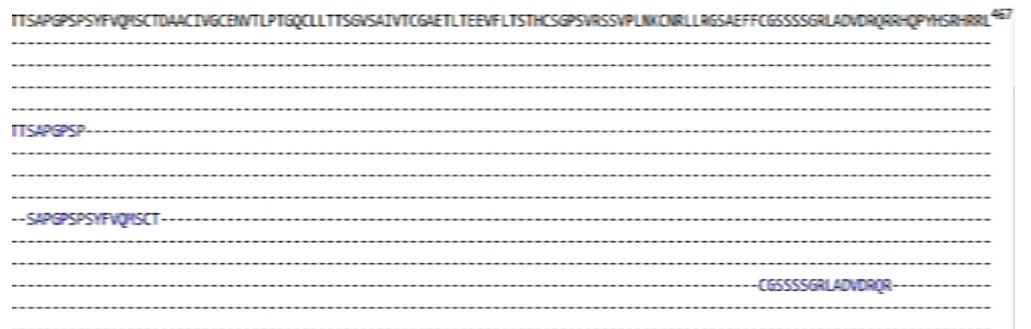


Figura 8. Secuencia superpuesta de la proteína Cruzipaina con distribución en su posición obtenida del ABCpred.



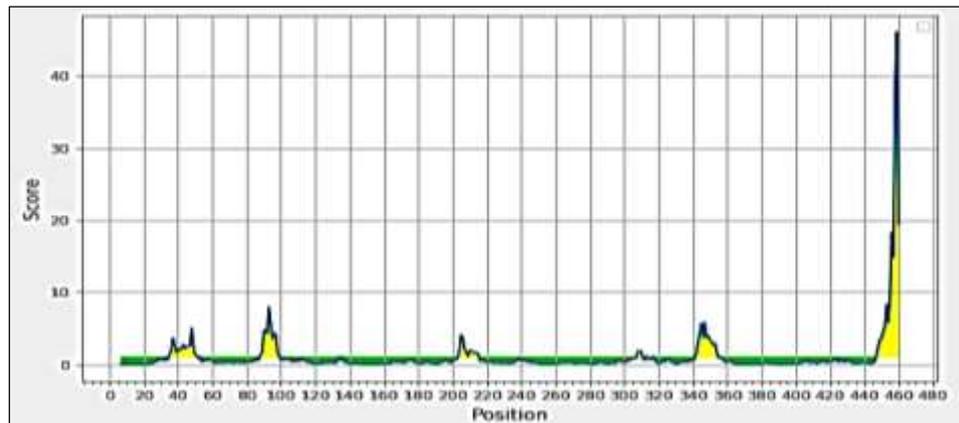
- **Predicción de epítomos de anticuerpos usando IEDB**

Con esta herramienta se identificó los posibles epítomos en una secuencia lineal de proteína siendo reconocidas por el sistema inmunitario que puede generar una respuesta inmune. Se han agrupado los aminoácidos de acuerdo a ciertos criterios de predicción y se les asignó un puntaje (score) en función de su frecuencia. Los péptidos seleccionados tienen una longitud de 16 aminoácidos con una especificidad del 85% (capacidad del método de identificar correctamente los epítomos verdaderos es decir evitar falsos positivos). Este proceso utilizó ciertos criterios de predicción y puntajes de frecuencia de aminoácidos para identificar posibles epítomos en una secuencia lineal de proteína seleccionando los péptidos para el análisis en función de su longitud y especificidad. Los resultados obtenidos fueron:

En la figura 9 se muestra los resultados obtenidos por el análisis bioinformático del IEDB, se ingresó a la predicción de accesibilidad de Emini Surface con los datos de la secuencia de la proteína Cruzipaina, de

color amarillo son los péptidos con mayor probabilidad y una puntuación más alta de ser un buen candidato de epítipo inmunorreactivo y los de color verde tienen la menor probabilidad.

Figura 9. Resultados de predicción de la accesibilidad de la superficie datos obtenidos del IEDB.



La predicción de epítipos inmunorreactivos continuos analizó parámetros como hidrofilia, flexibilidad, accesibilidad, giros, superficie expuesta, polaridad y propensión antigénica de las cadenas polipeptídicas formadas que se han correlacionado con la ubicación de epítipos continuos. Los cálculos de predicción se basaron en escalas de propensión (método bioinformático para predecir la solubilidad o agregación de un péptido) para uno de los 20 aminoácidos. Los resultados se observan en las tablas 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 que se encuentran en los anexos.

Después de obtener los resultados de estas tablas que están en los anexos se generó la figura 10 para asignar una puntuación a cada uno de los residuos de accesibilidad de los epítipos y se ubicó en la secuencia lineal de la Cruzipaina dando un score de >0.9 un color amarillo y >0.8 un color celeste para identificar los posibles candidatos para el modelado por homologación.

Figura 10. Resultados de la predicción con mayor probabilidad de formar el modelamiento en 3D.

```

MSGWARALLLA AVL VVMACLVPAATASLHAEETLSQFAEFKQKHGRVYESA AEEAFRLSVFRENFLARLH
AAANPHATFGVTPFSDLTREFRSRYHNGAAHFAAAQERARVPVKVEVVGAPAAVDWRARGAVTKDQ
GQCGSCWAFSAIGNVECWFLAGHPLTNLSEQMLVSCDKTDSGCGGLMNNAFEWIVQENNGAVYTED
SYPYASGEGISPPCTTSGHTVGATITGHVELPQDEAQIAAWLAVNGPVAVAVDASSWMTYTGGVMTSCV
SEQLDHGVLLVGYNDSAAVPYWIKN SWTTQWGEEGYIRIAKGSNQCLVKEEASSAVVGGPGPTPEPTTT
TTSAPGPSYFVQMSCTDAACIVGCENVTLPTGQCLLTTSGVSAIVTCGAETLTEEVLSTHCSGPSVRSS
VPLNKCNRLLRGSAEFFCGSSSSGRLADVDRQR RHQPYHSRHRRL
    
```

Score > 0,9

Score > 0,8

En base a los resultados de la figura 10 se verificó la especificidad al 85% de tamaño de secuencia lineal de 16 aminoácidos asignando un color a los aminoácidos en función de su puntaje de accesibilidad y conformación. En la figura 11 se asignó un puntaje de accesibilidad mayor o igual a 1 marcando en amarillo, aquellos con un puntaje mayor o igual a 2 en verde, aquellos con un puntaje mayor o igual a 4 en morado, y aquellos con un puntaje mayor o igual a 10 en rojo.

Figura 11. Resultados de la predicción con mayor probabilidad de unión de péptidos para el modelamiento en 3D.

```

MSGWARALS LAAVL VVMACLVPAATASLH A EETLASQFAEFKQK
HGRVYESA AEEAFRLSVFRENFLARLHAAANPHATFGVTPFSDLT
REEFRSRYHNGAAHFAAAQERARVPVNVEVVG_APAAVDWRARG
AVTAVKDQ GQCGSCWAFSAIGNVECWFLAGHPLTNLSEQMLVS
CDKTDSGCGGLMNNAFEWIVQENNGAVYTEDSYPYASGEGISPP
CTTSGHTVGATITGHVELPQDEAQIAAWLAVNGPVAVAVDASSW
MTYTGGVMTSCVSEQLDHGVLLVGYNDSAAVPYWIKN SWTAQ
WGEDGYIRIAKGSNQCLVKEEASSAVV_GPGPTPEPTTTTTTSAP
GPSPSYFVQMSCTDAACIVGCENVTLPTGQCLLTTSGVSAIVTCGA
ETLTEEVFFTSTHCSGPSVRSSVPLNQCNRLLRGSVEFFCGSSSSGR
LADVDRQR RRYQPYQSRHRRL
    
```

aa score ≥ 1 aa score ≥ 2 aa score ≥ 4 aa score ≥ 10

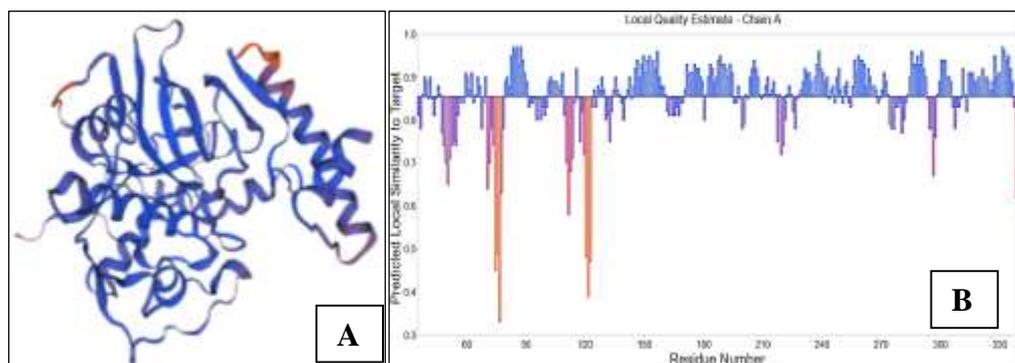
- **Resultados del uso del Software Swiss model**

Una vez evaluado los 467 aminoácidos y con los resultados obtenidos de la figura 11 se procedió al modelado por homología o modelo comparativo de proteínas (predice la estructura tridimensional de la proteína), se utilizó la estructura de una proteína homóloga conocida de la cisteína proteasa. El Swiss model se utilizó para el modelado por homología (maneja una gran

cantidad de plantillas de estructuras proteicas de alta calidad para producir modelos precisos proporcionando herramientas para visualización y análisis del modelo generado en función de su accesibilidad y conformación).

El análisis del uso del software Swiss model proporcionó una primera vista esencial de percepción para el modelado, mostró ligandos, calidad global y local, alineaciones. En la figura 12.A se visualizó el modelo de la cisteína proteasa (Estructura cristalina de Pro-Rhodesain C150A obtenida por método de difracción de rayos X 2,80 A) y la figura 12.B Resultado de la Calidad de Estimación del Modelo Global-GMQE que combina las propiedades de alineación de la Cruzipaina asignando a cada residuo un valor entre 0 y 1 (puntuación de fiabilidad). El valor de calidad obtenido es 0.59.

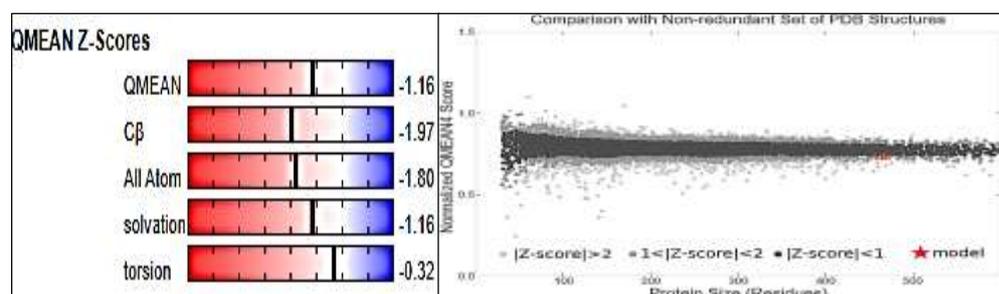
Figura 12. Resultado de los modelos construidos y de la calidad.



A. Resultado del modelo construido de la cisteína proteasa B. Resultado de la Calidad de Estimación del Modelo Global-GMQE.

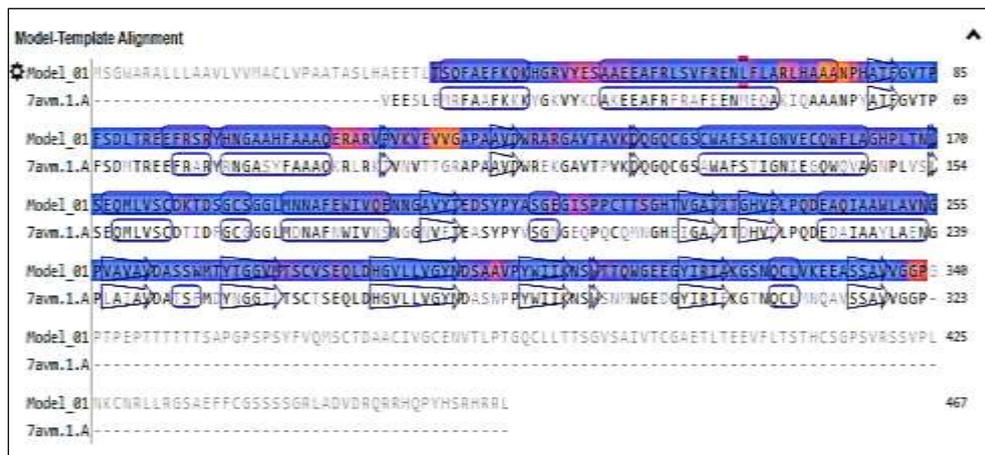
En la figura 13 se observó los resultados de estimación de la calidad de la Cruzipaina comparándolo con secuencias de la cisteína proteasa obtenido por cristalografía de rayos X con una alta resolución de tamaño similar dando un valor de estimación de calidad de 0.85 confiable para el modelado.

Figura 13. Resultado de la estimación de calidad de la cisteína proteasa.



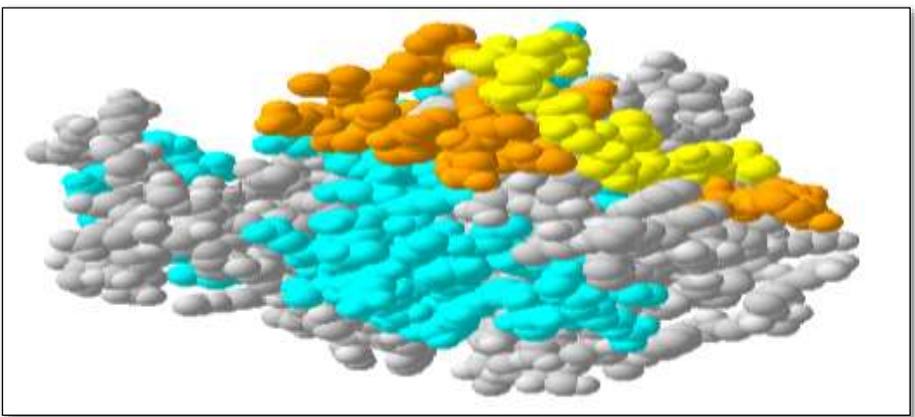
También el Swiss model mostró la sobreposición de la cisteína proteasa (secuencia más cercana) con la proteína Cruzipaina reportando una identidad de 67.10 %, valor aceptable para modelado.

Figura 14. Estructura homologa de la cisteína proteasa sobrepuesta en la proteína Cruzipaina.



Con estos análisis bioinformáticos de la conformación de la estructura por homología se realizó la predicción *In-silico* de la interacción de los ligandos de acoplamiento de los péptidos y mostrar el plegamiento de la estructura terciaria y específica de las posiciones de cada átomo en la proteína los resultados se muestran en la figura 15.

Figura 15. Predicción de epítomos y los ligandos de acoplamiento en la estructura globular tridimensional de péptidos candidatos de Cruzipaina.



3.2. Objetivo 2. Síntesis química de los péptidos para detección serológica de *T. cruzi*.

- Mapeo de los péptidos obtenido por Spot synthesis de la membrana

La figura 16 representa la secuencia lineal de la proteína Cruzipaina conformada por 467 aminoácidos reconocida por el software MULTIPeP utilizando lenguaje de programación para ser sintetizados en la membrana ;\$ **AAG35357.1 cruzipain.seq,15,3**

Figura 16. Secuencia lineal de la proteína Cruzipaina para Spot Synthesis en la membrana reportada por el software.

```
;$ AAG35357.1 cruzipain
.seq,15,3
MSGWARALLLAAVLVVMACLVPAATASLHAEETLTSQFAEFKQKHGRVY
ESAAEEAFRLSVFRENLFRLARLHAAANPHATFGVTPFSDLTREEFRSRYHN
GAAHFAAAQERARVPVKVEVVGAPAAVDWRARGAVTAVKDGQCGSC
WAFSAIGNVECQWFLAGHPLTNLSEQMLVSCDKTDSGCSGGLMNNAFE
WIVQENNGAVYTEDSYPPYASGEGISPPCTTSGHTVGATITGHVELPQDEA
QIAAWLAVNGPVAVAVDASSWMTYTGGVMTSCVSEQLDHGVLLVGYN
DSAAVPYWIKNSWTTQWGEEGYIRIAKGSNQCLVKEEASSAVVGGPGP
TPEPTTTTTTAPGSPSYFVQMSCTDAACIVGCENVTLPTGQCLLTTSG
VSAIVTCGAETLTEEVFLTSTHCSGPSVRSSVPLNKCNRLLRGSAEFFCGS
SSSGRLADVDRRRHQPHYHSRHRRL
```

Después de ingresar las secuencias en el MULTIPeP, el software calculó la cantidad de reactivos y aminoácidos que se agregaron para el Spot synthesis detallados en los cuadros 14 y 15.

Tabla 4. Cantidad de reactivos y solventes para Spot synthesis en la membrana.

Nombre	Peso		mL usado	mL		mL	mL	mL	mL
	(g/mol)	c(M)		Preparación	actual				
Oxyrna Pura	142.1	1.1	12.80	2.000 g	15	2.350 g	50	2.5	
DIC			17.033	2.180 ml	15	2.560 ml	50	2.5	
NMP			1.690		5		30	1.5	
Anhidrido acetico		3	53.10	1.600 ml	80	2.400 ml	230	15	
Piperidina 25%		25	93.60	23.40 ml	120	30.00 ml	230	15	
HOAt	136.11	1.1			0		30	1.5	
Solvente 1			846.00		0		2000		
DMF			2160		0		2000		
Solvente 2			320		0		1000		

Tabla 5. Cantidad de aminoácidos que se utiliza para la síntesis de puntos de la membrana o Spot synthesis.

Posición	Código	Nombre	c (M)	CoupL	Cantidad		Adición	mL	mg	Adición	mL	mL
					ml	mg						
1	A	Fmoc-Ala-OH	0.5	1766	1.26	199	1.16	2	312	1.81	13	0.15
2	R	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	0.5	730	1.16	377	0.93	2	649	1.61	13	0.15
3	N	Fmoc-Asn(Trt)-OH	0.5	822	1.17	349	0.96	2	597	1.64	13	0.15
4	D	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.5	806	1.17	241	1.02	2	412	1.75	13	0.15
5	C	Fmoc-Cys(Trt)-OH	0.5	272	1.11	325	0.91	2	586	1.65	13	0.15
6	Q	Fmoc-Gln(Trt)-OH	0.5	430	1.13	344	0.92	2	611	1.63	13	0.15
7	E	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.5	870	1.18	250	1.03	2	426	1.74	13	0.15
8	G	Fmoc-Gly-OH	0.5	1554	1.25	187	1.14	2	298	1.82	13	0.15
9	H	Fmoc-His(Trt)-OH	0.5	602	1.14	355	0.93	2	620	1.63	13	0.15
10	I	Fmoc-Ile-OH	0.5	568	1.14	202	1.02	2	354	1.79	13	0.15
11	L	Fmoc-Leu-OH	0.5	1162	1.21	214	1.08	2	354	1.79	13	0.15
12	K	Fmoc-Lys(Boc)-OH	0.5	616	1.15	269	0.99	2	469	1.72	13	0.15
13	M	Fmoc-Met-OH	0.5	248	1.1	206	0.98	2	372	1.78	13	0.15
14	F	Fmoc-Phe-OH	0.5	536	1.14	221	1.00	2	388	1.77	13	0.15
15	P	Fmoc-Pro-OH	0.5	1068	1.2	203	1.08	2	338	1.8	13	0.15
16	S	Fmoc-Ser(tBU)-OH	0.5	2080	1.31	252	1.16	2	384	1.77	13	0.15
17	T	Fmoc-Thr(tBU)-OH	0.5	1338	1.23	244	1.08	2	398	1.76	13	0.15
18	W	Fmoc-Trp(Boc)-OH	0.5	330	1.11	294	0.94	2	527	1.68	13	0.15
19	Y	Fmoc-Tyr(tBU)-OH	0.5	438	1.13	259	0.97	2	460	1.72	13	0.15
20	V	Fmoc-Val-OH	0.5	1432	1.24	211	1.11	2	340	1.80	13	0.15

El MULTYPEP Intavis también generó el mapeo de las 152 secuencias de péptidos sintéticos (imitan fragmentos de una cadena de proteína) de la proteína Cruzipaina descritos en las tablas 6,7, 8 y 9.

Tabla 6. Resultados del Mapeo de péptidos (15 aa) en la membrana desde la posición. (1-A01 hasta 1-T02). Cruzipaina.

N°	Posición	Peso molecular	Cruzipaina	N°	Posición	Peso molecular	Cruzipaina
1	1-A01	1569.895941	MSGWARALLAAVLV	21	1-A02	1726.952544	VFRENFLARLHAAA
2	1-B01	1595.947977	WARALLAAVLVVM	22	1-B02	1672.869208	ENFLARLHAAAANPH
3	1-C01	1497.892102	ALLAAVLVVMACLV	23	1-C02	1635.85283	FLARLHAAAANPHATF
4	1-D01	1439.813852	LAAVLVVMACLVPA	24	1-D02	1561.800794	RLHAAAANPHATFGVT
5	1-E01	1443.77238	VLVVMACLVPAATAS	25	1-E02	1486.709913	AAANPHATFGVTPFS
6	1-F01	1453.731578	VMACLVPAATASLHA	26	1-F02	1602.757256	NPHATFGVTPFSDLT
7	1-G01	1511.718429	CLVPAATASLHAEET	27	1-G02	1668.78895	ATFGVTPFSDLTREE
8	1-H01	1497.720536	PAATASLHAEETLTS	28	1-H02	1739.837297	GVTTPFSDLTREEFRS
9	1-I01	1604.75765	TASLHAEETLTSQFA	29	1-I02	1938.923093	PFSDLTREEFRSRYH
10	1-J01	1749.8468	LHAEETLTSQFAEFK	30	1-J02	1849.871392	DLTREEFRSRYHNGA
11	1-K01	1821.879163	EEILTSQFAEFKQKH	31	1-K02	1875.877147	REEFRSRYHNGAAHF
12	1-L01	1774.937288	LTSQFAEFKQKHGRV	32	1-L02	1674.802192	FRSRYHNGAAHFAAA
13	1-M01	1852.911468	QFAEFKQKHGRVYES	33	1-M02	1697.802921	RYHNGAAHFAAAQER
14	1-N01	1777.864183	EFKQKHGRVYESAAE	34	1-N02	1567.786208	NGAAHFAAAQERARV
15	1-O01	1720.806334	QKHGRVYESAAEEAF	35	1-O02	1649.900844	AHFAAAQERARVPVK
16	1-P01	1683.811084	GRVYESAAEEAFRLS	36	1-P02	1621.915825	AAAQERARVPVKVEV
17	1-Q01	1773.858034	YESAAEEAFRLSVFR	37	1-Q02	1635.931475	QERARVPVKVEVVG
18	1-R01	1750.889668	AAEEAFRLSVFRENL	38	1-R02	1461.856185	ARVPVKVEVVGAPAA
19	1-S01	1810.962439	EAFRLSVFRENLFLA	39	1-S02	1535.824216	PVKVEVVGAPAAVDW
20	1-T01	1870.058405	RLSVFRENLFLARLH	40	1-T02	1594.847411	VEVVGAPAAVDWRAR

Tabla 7. Resultados del mapeo de péptidos (15 aa) en la membrana desde la posición (1-A03 hasta 1-T04). Cruzipaina.

N°	Posición	Peso molecular	Cruzipaina	N°	Posición	Peso molecular	Cruzipaina
41	1-A03	1494.794982	VGAPAAVDWRARGAV	61	1-A04	1501.570778	TDSGCSGGLMNNAFE
42	1-B03	1538.821196	PAAVDWRARGAVTAV	62	1-B04	1596.69592	GCSGGLMNNAFEWIV
43	1-C03	1670.874688	VDWRARGAVTAVKDQ	63	1-C04	1720.777341	GGLMNNAFEWIVQEN
44	1-D03	1558.789245	RARGAVTAVKDQGC	64	1-D04	1735.751854	MNNAFEWIVQENNG
45	1-E03	1422.612586	GAVTAVKDQGCQSC	65	1-E04	1739.804936	AFEWIVQENNGAVYT
46	1-F03	1599.670435	TAVKDQGCQSCWAF	66	1-F04	1723.758379	WIVQENNGAVYTETS
47	1-G03	1599.670435	KDQGCQSCWAFSAI	67	1-G04	1748.70601	QENNGAVYTETSYPY
48	1-H03	1498.622756	GQCGSCWAFSAIGNV	68	1-H04	1592.652518	NGAVYTETSYPYASG
49	1-I03	1570.643885	GSCWAFSAIGNVECQ	69	1-I04	1649.699134	VYTETSYPYASGEGI
50	1-J03	1769.812999	WAFSAIGNVECQWFL	70	1-J04	1567.657269	EDSYPYASGEGISPP
51	1-K03	1630.745648	SAIGNVECQWFLAGH	71	1-K04	1541.660246	YPYASGEGISPPCTT
52	1-L03	1670.776948	GNVECQWFLAGHPLT	72	1-L04	1399.593228	ASGEGISPPCTTSGH
53	1-M03	1714.803162	ECQWFLAGHPLTNLS	73	1-M04	1441.640178	EGISPPCTTSGHTVG
54	1-N03	1742.834462	WFLAGHPLTNLSEQM	74	1-N04	1427.660913	SPPCTTSGHTVGTATI
55	1-O03	1595.787177	AGHPLTNLSEQMLVS	75	1-O04	1441.651411	CTTSGHTVGTATITGH
56	1-P03	1676.800778	PLTNLSEQMLVSCDK	76	1-P04	1477.741941	SGHTVGTATITGHVEL
57	1-Q03	1668.722921	NLSEQMLVSCDKTDS	77	1-Q04	1536.767822	TVGTATITGHVELPQD
58	1-R03	1601.626579	EQMLVSCDKTDSGCS	78	1-R04	1607.768551	ATITGHVELPQDEAQ
59	1-S03	1440.611915	LVSCDKTDSGCSGGL	79	1-S04	1577.757987	TGHVELPQDEAQIAA
60	1-T03	1500.553748	CDKTDSGCSGGLMNN	80	1-T04	1652.830424	VELPQDEAQIAAWLA

Tabla 8. Resultados del mapeo de péptidos (15 aa) en la membrana desde la posición (1-A05 hasta 1-T06). Cruzipaina.

N°	Posición	Peso molecular	Cruzipaina	N°	Posición	Peso molecular	Cruzipaina
81	1-A05	1581.768158	PQDEAQIAAWLAVNG	101	1-A06	1810.842049	IKNSTWTTQWGEEGY
82	1-B05	1508.788165	EAQIAAWLAVNGPVA	102	1-B06	1838.848197	NSWTTQWGEEGYIRI
83	1-C05	1449.823822	IAAWLAVNGPVAVAV	103	1-C06	1707.84747	TTQWGEEGYIRIACG
84	1-D05	1467.761615	WLAVNGPVAVAVDAS	104	1-D06	1706.827069	WGEEGYIRIACGNSQ
85	1-E05	1501.71295	VNGPVAVAVDASSWM	105	1-E06	1649.845362	EGYIRIACGNSQCLV
86	1-F05	1596.73883	PVAVAVDASSWMTYT	106	1-F06	1686.898125	IRIACGNSQCLVKEE
87	1-G05	1542.69188	VAVDASSWMTYTGGV	107	1-G06	1549.730056	AKGNSQCLVKEEASS
88	1-H05	1592.638129	DASSWMTYTGGVMTS	108	1-H06	1562.750457	SNQCLVKEEASSAVV
89	1-I05	1608.651671	SWMTYTGGVMTSCVS	109	1-I06	1444.712616	CLVKEEASSAVVGGP
90	1-J05	1574.68508	TYTGGVMTSCVSEQL	110	1-J06	1384.672859	KEEASSAVVGGPGPT
91	1-K05	1518.633714	GGVMTSCVSEQLDHG	111	1-K06	1321.640831	ASSAVVGGPGPTPEP
92	1-L05	1630.758914	MTSCVSEQLDHGVLL	112	1-L06	1379.682695	AVVGGPGPTPEPTTT
93	1-M05	1630.79193	CVSEQLDHGVLLVGY	113	1-M06	1413.651787	GGPGPTPEPTTTTTT
94	1-N05	1657.784201	EQLDHGVLLVGYNDS	114	1-N06	1457.678001	GPTPEPTTTTTTSAP
95	1-O05	1528.741608	DHZVLLVGYNDSAAV	115	1-O06	1443.662351	PEPTTTTTTSAPGPS
96	1-P05	1665.829695	VLLVGYNDSAAVPYW	116	1-P06	1467.662351	TTTTTSAPGPSPSY
97	1-Q05	1694.856244	VGYNDSAAVPYWIIC	117	1-Q06	1538.714723	TTTSAPGPSPSYFVQ
98	1-R05	1762.857305	NDSAAVPYWIICNSW	118	1-R06	1556.653387	SAPGPSPSYFVQMSC
99	1-S05	1776.909341	AAVPYWIICNSWTTQ	119	1-S06	1588.643216	GPSPSYFVQMSCTDA
100	1-T05	1907.910069	PYWIICNSWTTQWGE	120	1-T06	1634.667323	PSYFVQMSCTDAACI

Tabla 9. Resultados del mapeo de péptidos (15 aa) en la membrana desde la posición (1-A07 hasta 1-L08). Cruzipaina.

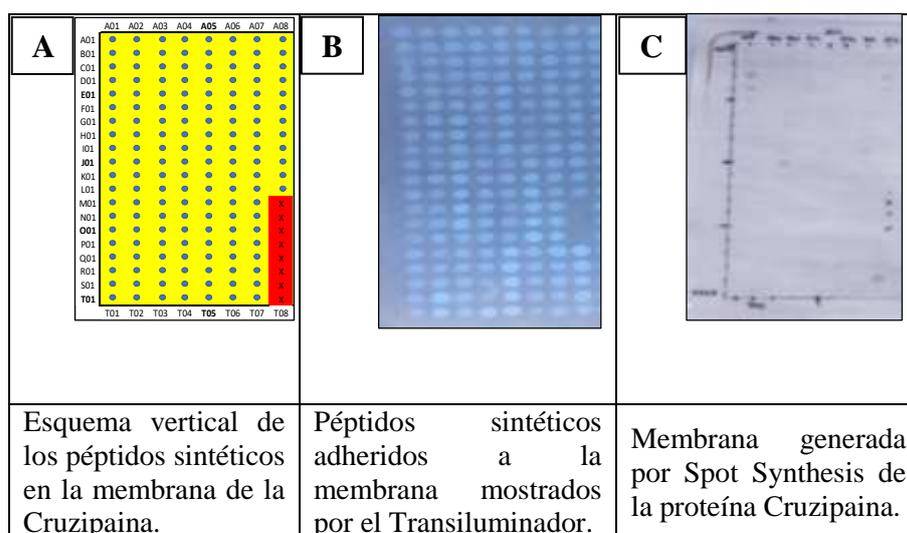
N°	Posición	Peso molecular	Cruzipaina	N°	Posición	Peso molecular	Cruzipaina
121	1-A07	1546.618265	FVQMSCTDAACIVGC	141	1-A08	1642.883142	SSVPLNKCNRLLRGS
122	1-B07	1514.576793	MSCCTDAACIVGCENV	142	1-B08	1716.898793	PLNKCNRLLRGSAEF
123	1-C07	1504.679601	TDAACIVGCENVTLPTLP	143	1-C08	1699.818101	KCNRLLRGSAEFFCG
124	1-D07	1503.695586	ACIVGCENVTLPTGQ	144	1-D08	1615.76711	RLLRGSAEFFCGSSS
125	1-E07	1545.742536	VGCENVTLPTGQCLL	145	1-E08	1533.652474	RGSAEFFCGSSSSGR
126	1-F07	1575.770857	ENVTLPTGQCLLTTS	146	1-F08	1532.645992	AEFFCGSSSSGRLAD
127	1-G07	1476.738829	TLPTGQCLLTTSQVSV	147	1-G08	1555.694339	FCGSSSSGRLADVDR
128	1-H07	1448.743915	TGQCLLTTSQVSAIV	148	1-H08	1688.856076	SSSSGRLADVDRQR
129	1-I07	1423.694522	CLLTTSQVSAIVTCG	149	1-I08	1789.930246	SGRLADVDRQRHQ
130	1-J07	1395.644594	TTSQVSAIVTCGAET	150	1-J08	1876.929912	LADVDRQRHQPYHS
131	1-K07	1449.691545	GVSIVTCGAETLTE	151	1-K08	2027.042925	VDRQRHQPYHSRHR
132	1-L07	1581.74906	AIVTCGAETLTEEVF	152	1-L08	2082.132743	RQRHQPYHSRHRRL
133	1-M07	1599.723238	TCGAETLTEEVFLTS				
134	1-N07	1679.760686	AETLTEEVFLTSTHC				
135	1-O07	1619.739557	LTEEVFLTSTHCSGP				
136	1-P07	1618.766775	EVFLTSTHCSGPSVR				
137	1-Q07	1516.719824	LTSTHCSGPSVRSSV				
138	1-R07	1539.735809	THCSGPSVRSSVPLN				
139	1-S07	1543.767109	SGPSVRSSVPLNKC				
140	1-T07	1684.930092	SVRSSVPLNKCNRLL				

Los péptidos sintéticos adheridos a la membrana se generaron en 15 ciclos (cada ciclo: 3 horas y 50 minutos), haciendo un total de 52 horas con 50 minutos.

- **Obtención de péptidos sintéticos usando el Protocolo por inmunodetección en la membrana de puntos.**

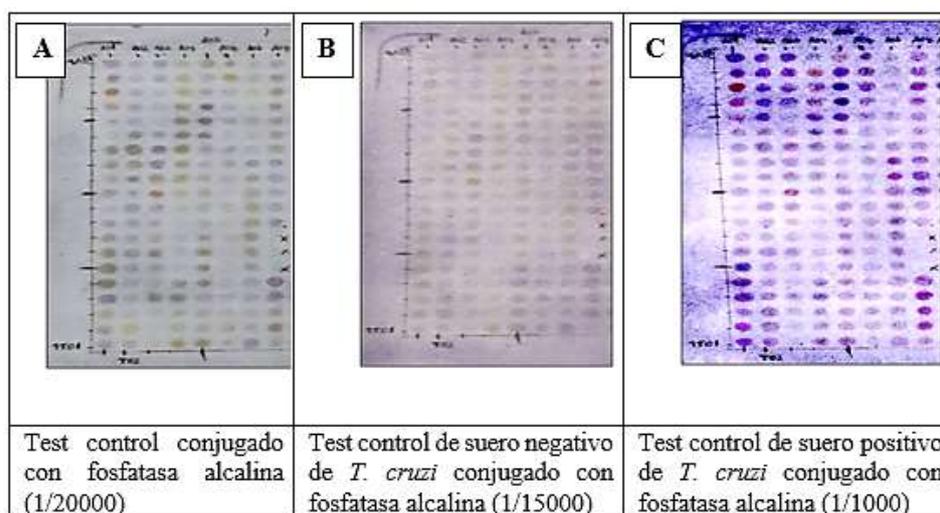
En la figura 17 se muestra a los péptidos adheridos a la membrana A. Esquema de los péptidos sintéticos en la membrana de puntos Cruzipaina. B. Ubicación de los 152 péptidos en la membrana de la proteína Cruzipaina mostrado por el Transiluminador. C. Membrana adherida con los péptidos sintéticos de la proteína Cruzipaina lista para continuar el protocolo de inmunodetección.

Figura 17. Posición vertical desde el 1-A01 hasta 1-LA08 152.



El acoplamiento de los péptidos sintéticos en la membrana se muestra en la figura 18, usando el protocolo de inmunodetección, A. se marcaron con colores amarillos las reacciones inespecíficas, los de color morado candidatos positivos y los blancos son candidatos negativos. Se muestra que al ser conjugados solamente con fosfatasa alcalina se observan las reacciones de falsos positivos. B. Resultados obtenidos con suero negativo de *T. cruzi* demostrando que los péptidos candidatos son reconocidos por los parásitos. C. Dilución óptima del suero positivo de *T. Cruzii* con mayor diferencia de valores entre sueros positivos y negativos del péptido

Figura 18. Acoplamiento de los péptidos sintéticos de la Cruzipaina en la membrana.



- **Selección de candidatos para síntesis química de péptidos.**

Para elegir a los péptidos se analizó las 152 secuencias generadas por el MULTYPEP con el Software ImagenJ evaluando cuantitativamente la línea umbral o cut-off (punto de discriminación entre las muestras positivas y negativas), se asignó un promedio de 151 pixeles como se muestra en las figuras 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, y 27.

Figura 19. Elección de péptidos sintéticos entre positivos y negativos usando ImagenJ (intensidad de luminosidad de onda 801 x 335 pixeles).

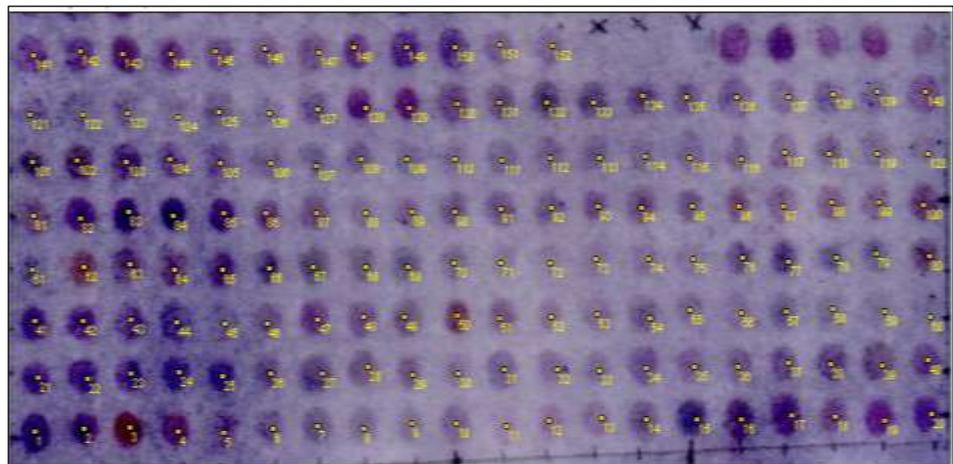


Figura 20. Selección de positivos y negativos de péptidos sintéticos desde el N° 1 hasta el N° 20 reportado por ImagenJ.

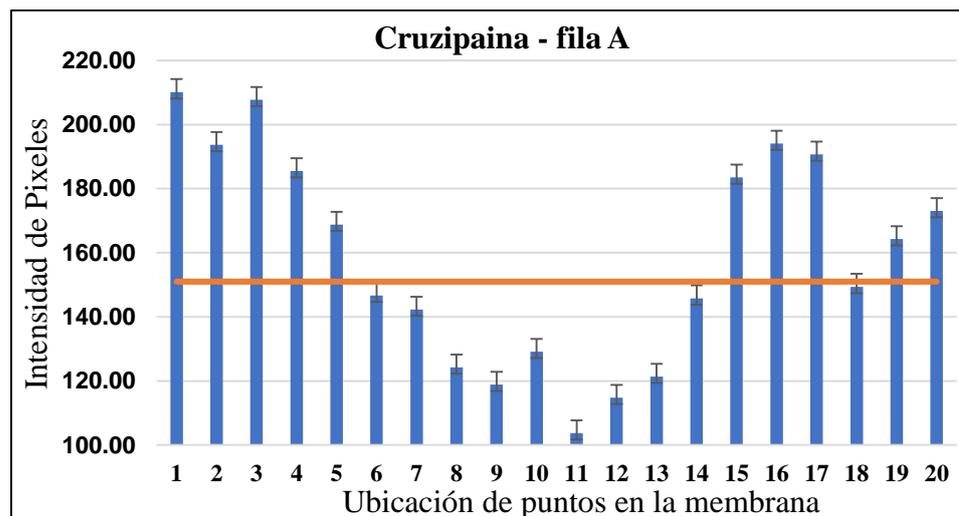


Figura 21. Selección de positivos y negativos de péptidos sintéticos desde el N° 21 hasta el N° 40 reportado por ImagenJ

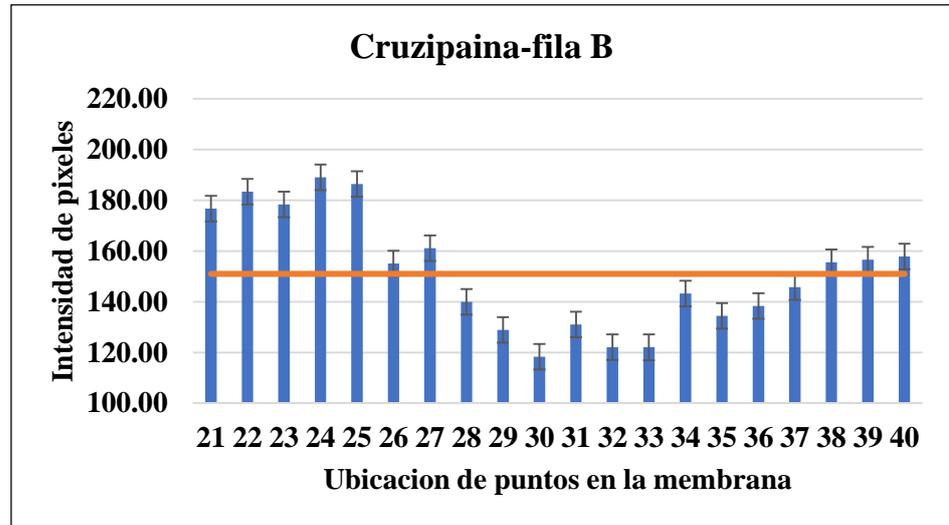


Figura 22. Selección de positivos y negativos de péptidos sintéticos desde el N° 41 hasta el N° 60 reportado por ImagenJ

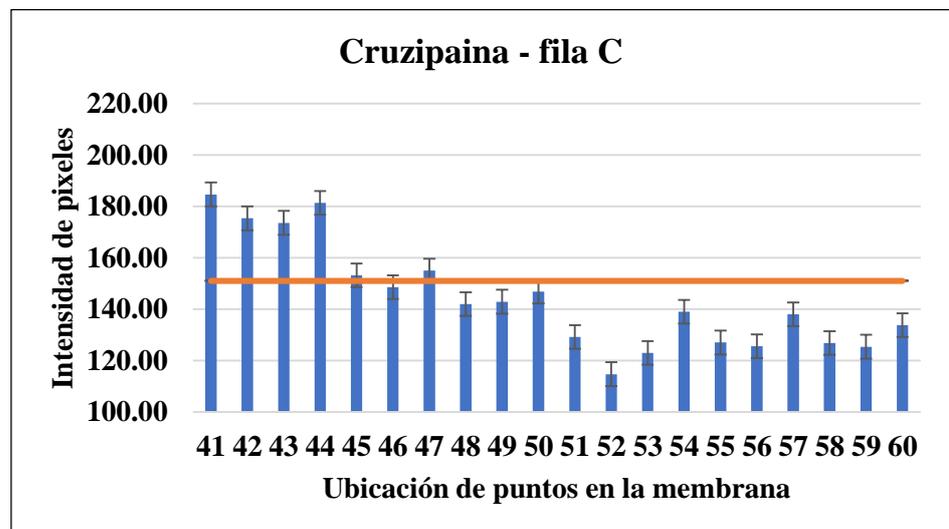


Figura 23. Elección de positivos y negativos de acuerdo a los pixeles por ImagenJ.

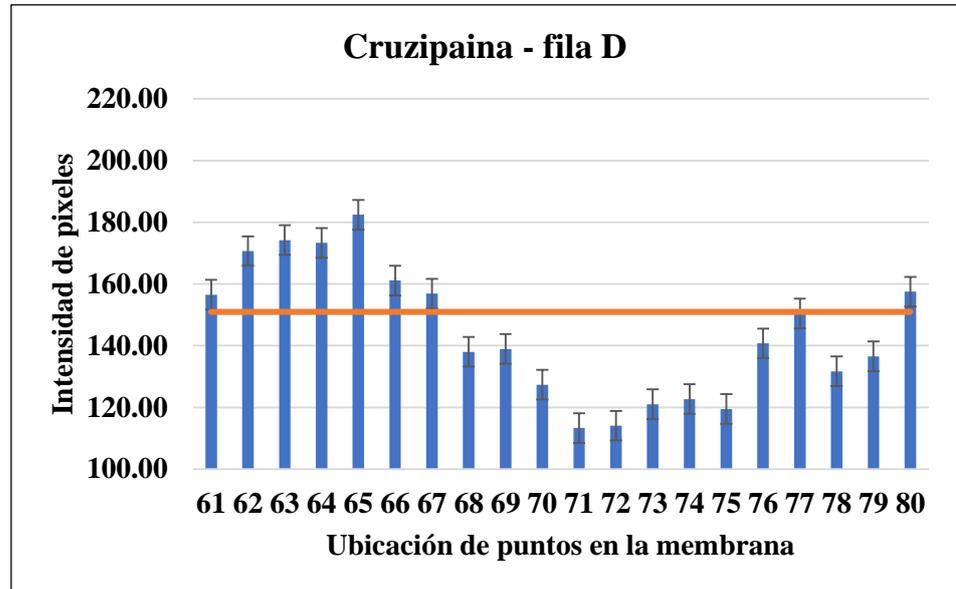


Figura 24. Elección de positivos y negativos de acuerdo a los pixeles por ImagenJ.

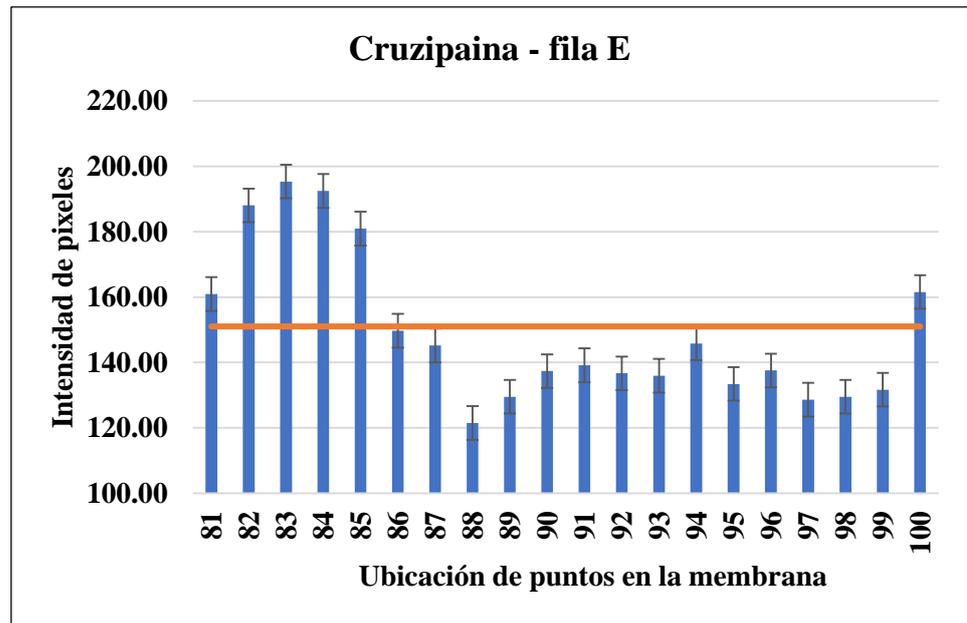


Figura 25. Elección de positivos y negativos de acuerdo a los pixeles por ImagenJ.

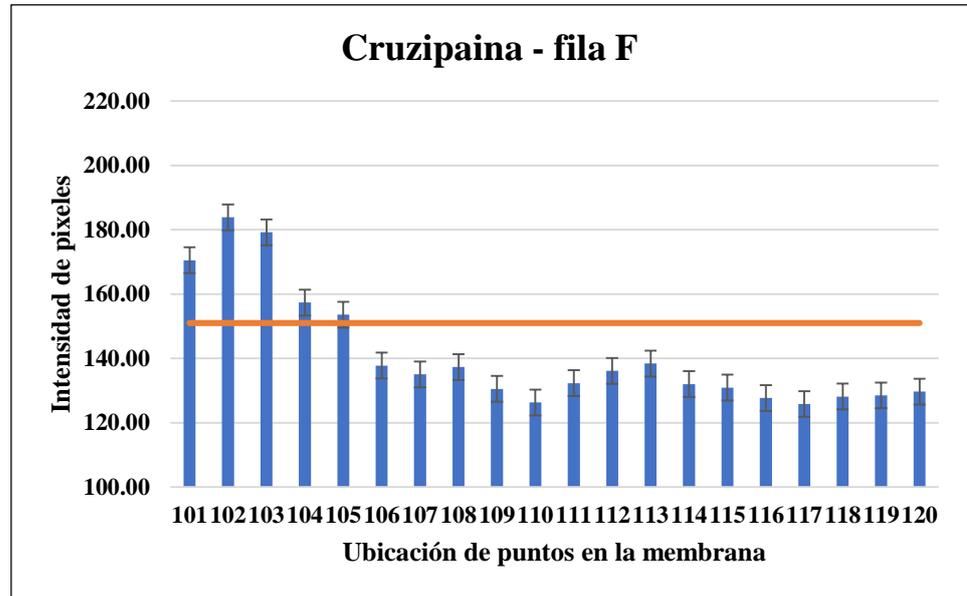


Figura 26. Elección de positivos y negativos de acuerdo a los pixeles por ImagenJ

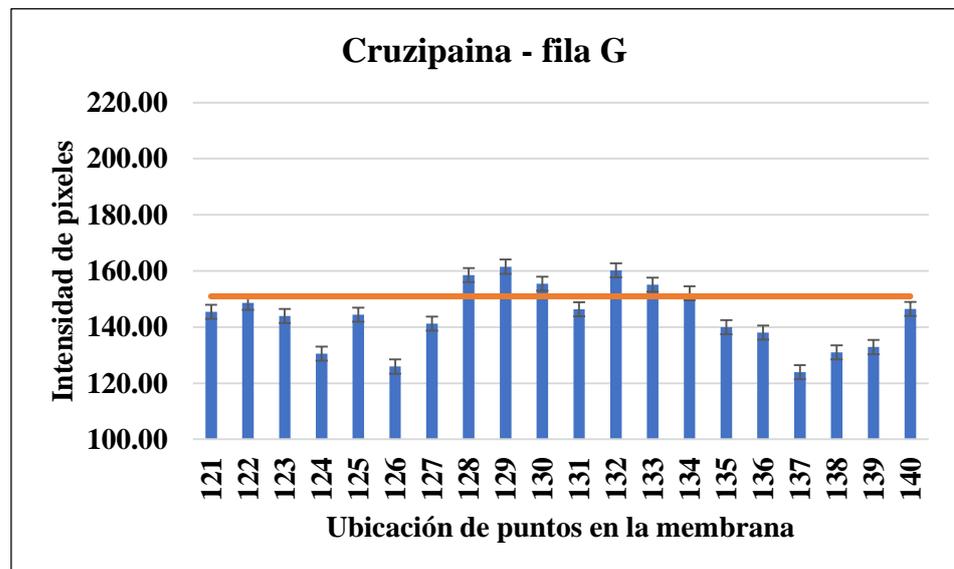
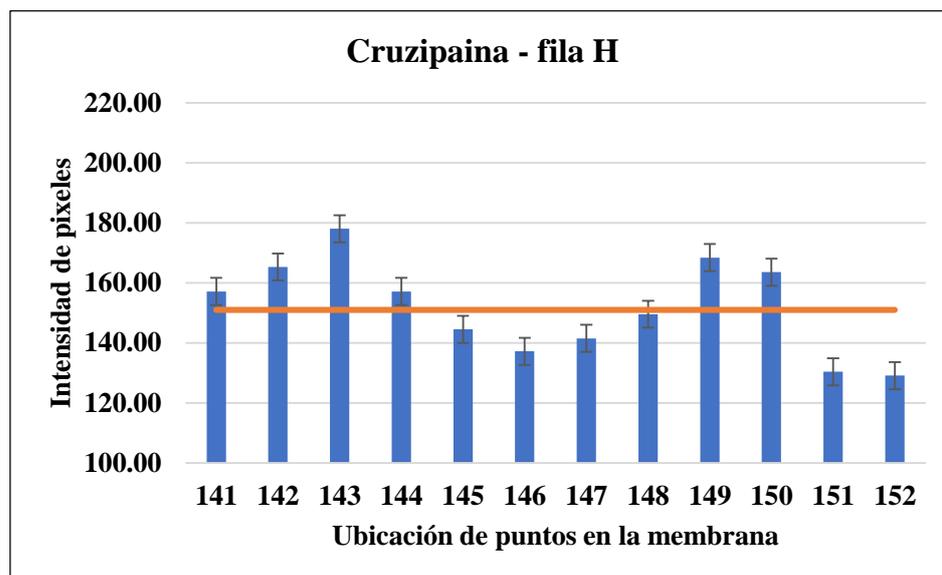


Figura 27. Elección de positivos y negativos de acuerdo a los pixeles por Imagen J.



Después del análisis de las 152 secuencias de péptidos para elegir los péptidos positivos y negativos se analizó 4 secuencias que demostraron mayor reacción inmunogénica como se muestra en la tabla 10 y también los resultados de análisis de los péptidos mostrados en la figura 28, 29, 30 y 31.

Tabla 10. Características Fisicoquímicas de péptidos para sintetizar.

Secuencias Elegidas	N° de aa	Peso molecular	pI	Fórmula	N° de átomos
VGAPAAVDWRARGAVTAVKDQ	21	2138.41	10.07	$C_{93}H_{152}N_{30}O_{28}$	303
QKHGRVYESAAEEAFRLSVFR	21	2480.77	9.47	$C_{110}H_{170}N_{34}O_{32}$	346
AGHPLTNLSEQMLVSCDKTDS	21	2246.49	4.16	$C_{92}H_{152}N_{26}O_{35}S_2$	307
YTEDSYPYASGEGISPP	17	1832.89	0.76	$C_{82}H_{113}N_{17}O_{31}$	243

Figura 28. Cálculo de péptidos con buena solubilidad en agua demostrando que la parte superior es hidrófila y la parte inferior hidrófoba (VGAPAAVDWRARGAVTAVKDQ)

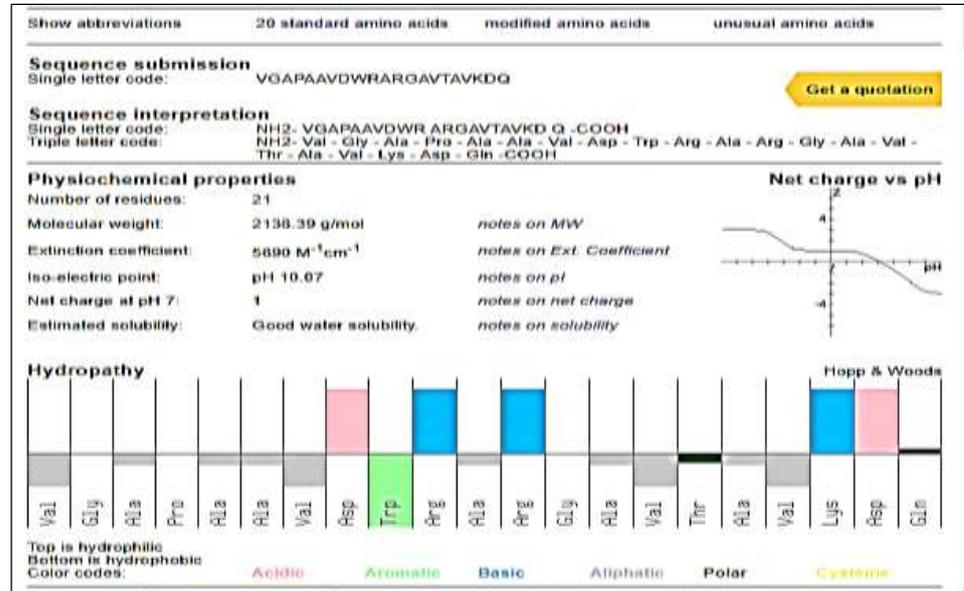


Figura 29. Cálculo de péptidos con buena solubilidad en agua demostrando que la parte superior es hidrófila y la parte inferior hidrófoba (QKHGRVYESAAEEAFRLSVFR)

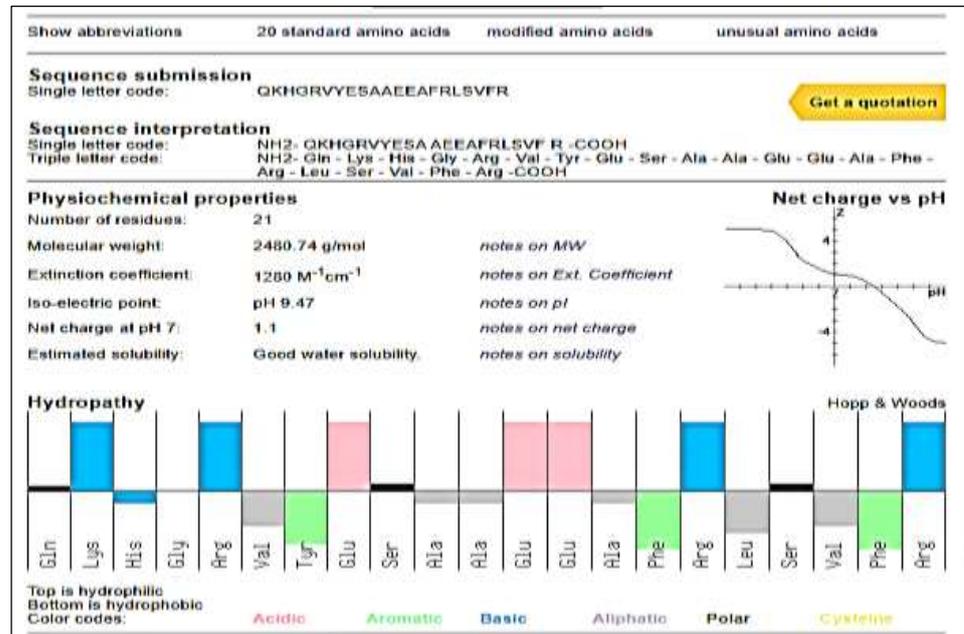


Figura 30. Cálculo de péptidos con buena solubilidad en agua demostrando que la parte superior es hidrófila y la parte inferior hidrófoba (AGHPLTNLSEQMLVSCDKTDS)

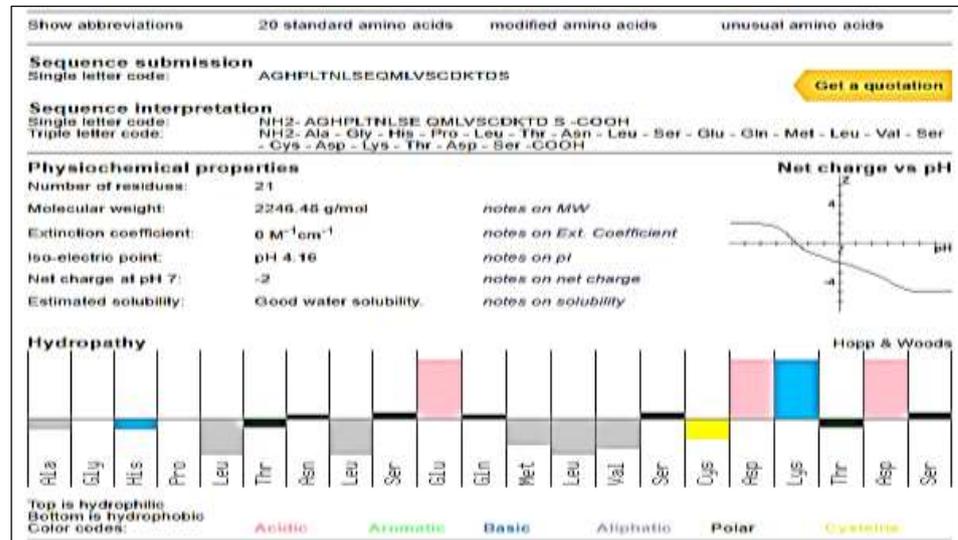
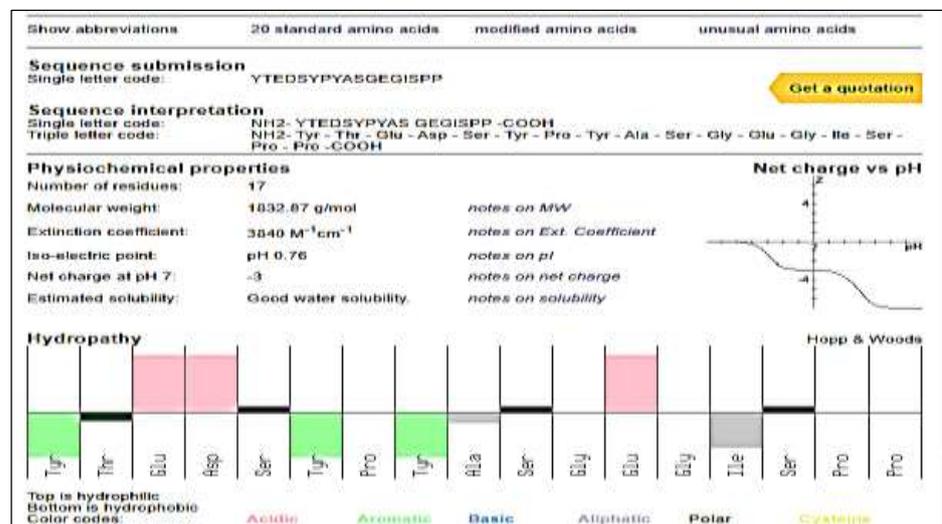


Figura 31. Cálculo de péptidos con buena solubilidad en agua demostrando que la parte superior es hidrófila y la parte inferior hidrófoba (YTEDSYPYASGEGISPP)



En la tabla 11 se muestra las secuencias peptídicas elegidas y en la figura 32 el modelado en 3D, color amarillo (M1), color rosado (M2B), color celeste (M3), Color verde (B1).

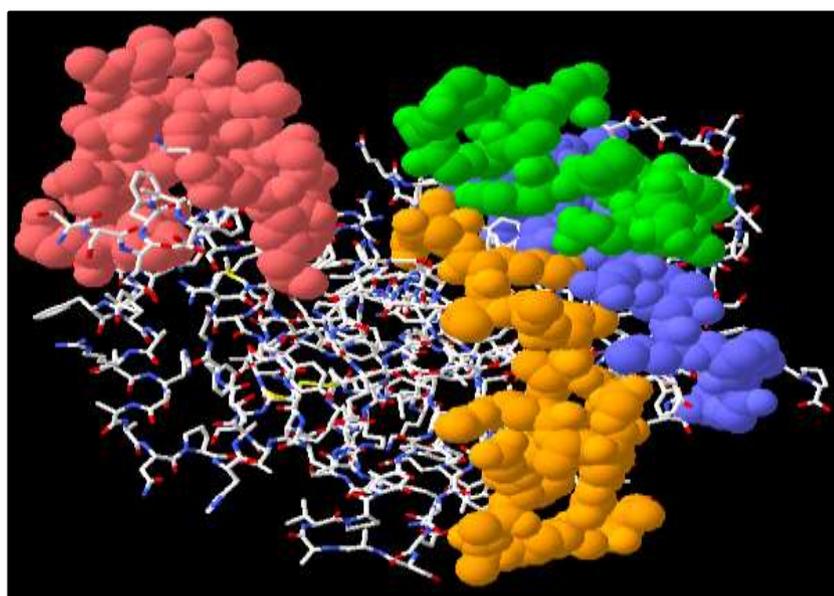
Tabla 11. Nombre y posición en la síntesis química de las secuencias elegidas.

Nombre	Posición del Péptido en la membrana	Secuencias obtenidas por síntesis química	Peso molecular
Membrana positiva (M1)	41	VGAPAAVDWRARGAVTAVKDQ	2138.39 g/mol
Bioinformática+membrana (M2B)	15	QKHGRVYESAAEEAFRLSVFR	2480.74 g/mol
Membrana negativa (M3)	55	AGHPLTNLSEQMLVSCDKTDS	2246.48 g/mol
Bioinformática (B1)	69	YTEDSYPYASGEGISPP	1832.87 g/mol

- **Selección de péptidos para síntesis química**

Se realizó el modelado con Swiss model de los 4 péptidos elegidos que se muestra en la figura 32, color amarillo (M1), color rosado (M2B), color celeste (M3), Color verde (B1). Se obtuvo 100 mg de cada péptido siguiendo el método de síntesis de péptidos en fase sólida.

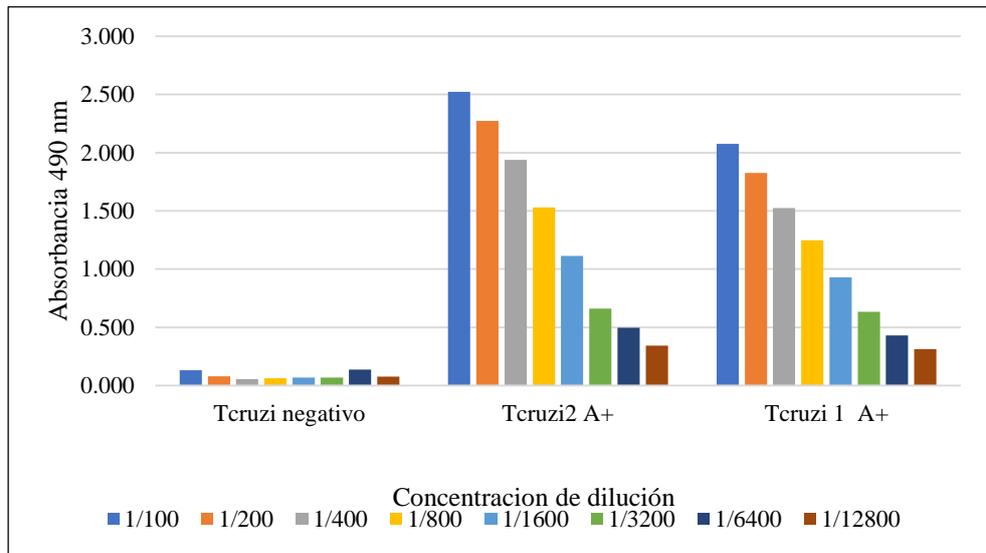
Figura 32. Modelado tridimensional de los péptidos elegidos para síntesis química.



3.3. Objetivo 3. Resultados de la inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA)

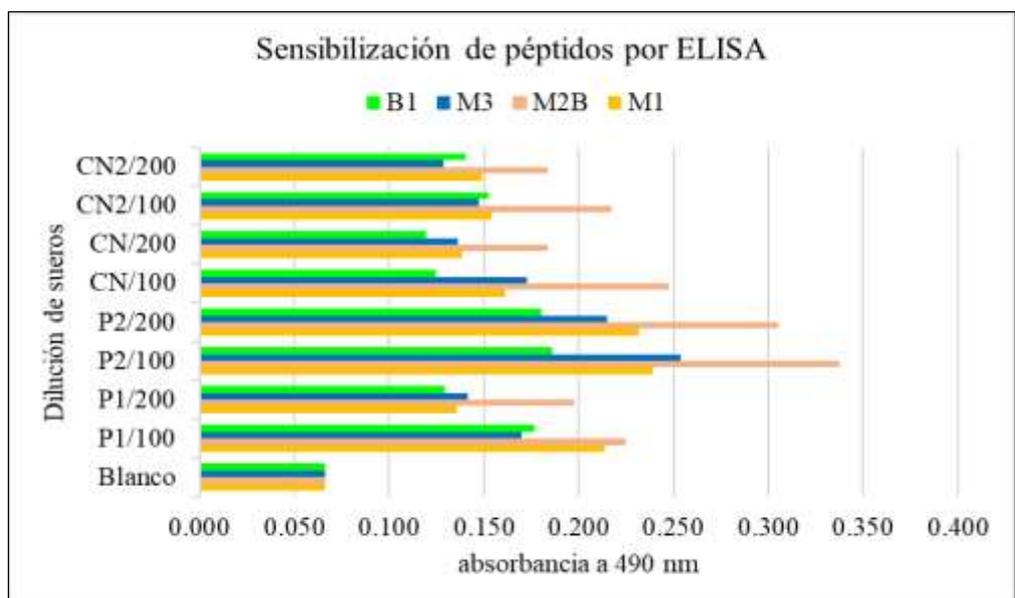
Los sueros positivos y negativos de *T. cruzi* que se utilizaron para la estandarización fueron proporcionados por la Dirección Regional de Salud de Amazonas (DIRESA), los resultados se muestran en la figura 33.

Figura 33. Suero negativo y positivos de T. cruzi para recubrir las placas ELISA.



Se evaluaron los cuatro péptidos para determinar la reactividad frente a sueros positivos y negativos mediante ELISA. Finalmente, el péptido 2 (M2B) mostró una mayor inmunoreactividad obtenido con una dilución de 1:100 y una concentración de recubrimiento del péptido de 10 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ como se muestra en la figura 34.

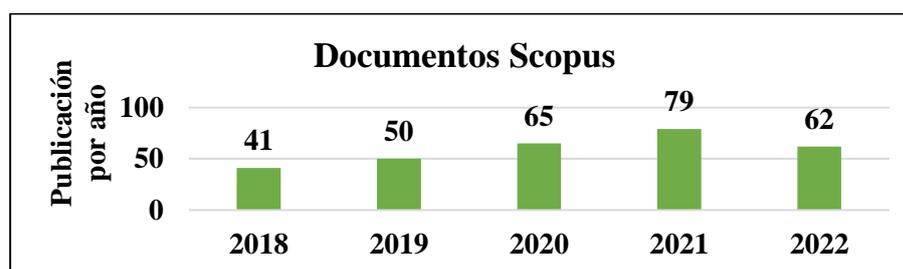
Figura 34. Péptidos con mayor inmunoreactividad de reconocimiento del T. cruzi.



3.4. Objetivo 4. Revisar propuestas para el fortalecimiento del acceso equitativo al servicio de salud.

Mediante este análisis bibliométrico se recuperaron 1302 documentos, los cuales fueron sometidos a un proceso de normalización de metadatos y de eliminación de documentos duplicados. La muestra final para el análisis quedó en 297 documentos se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Documentos publicados por los últimos cinco años en Scopus de la enfermedad de chagas y los cambios de migración rural-urbano.

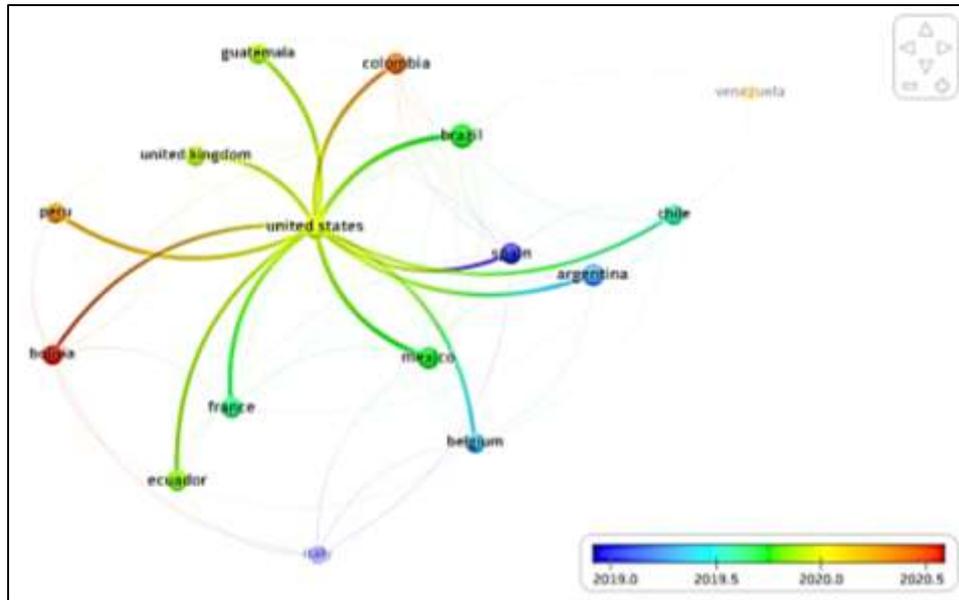


En la tabla 13 se muestra los artículos publicados de la enfermedad de chagas durante los últimos 5 años de países que han reportado al vector, y su migración de áreas rurales a urbanos en SCOPUS. También se muestra en la figura 34.

Tabla 13. Países que reportan la presencia de la enfermedad de chagas.

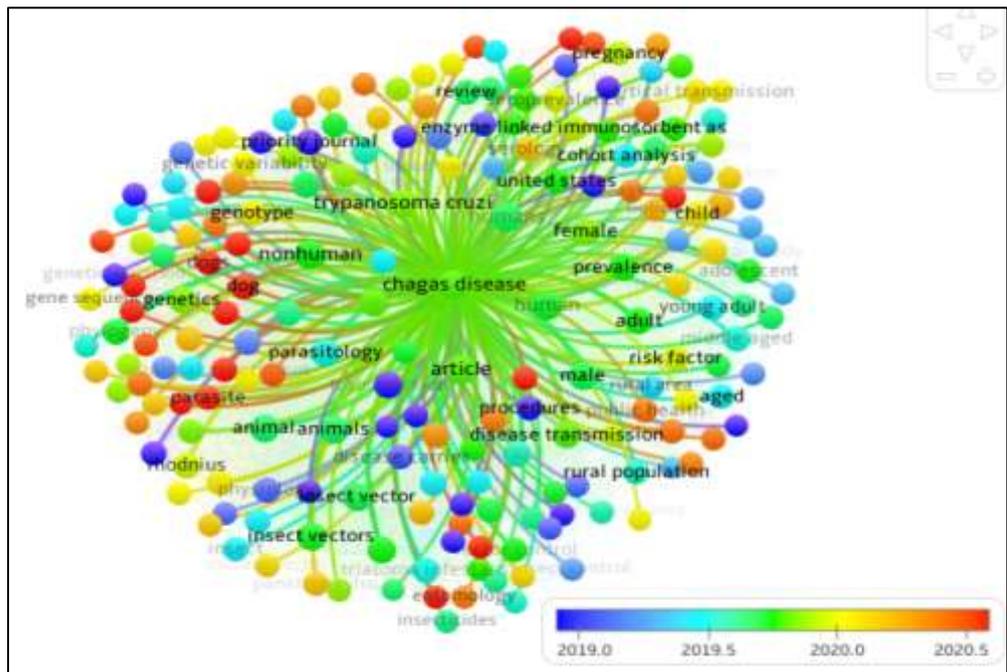
N°	País	Documentos	Citaciones	Total de Enlaces
1	Estados Unidos	79	652	84
2	Brasil	82	554	30
3	México	25	236	29
4	Francia	14	124	26
5	Argentina	21	177	23
6	Ecuador	12	77	18
7	Reino Unido	10	87	18
8	Colombia	19	103	17
9	España	13	133	14
10	Bolivia	7	20	13
11	Chile	10	63	13
12	Bélgica	6	50	12
13	Perú	7	40	12
14	Guatemala	8	56	8
15	Italia	6	120	5
16	Venezuela	5	21	2

Figura 35. Países que han reportado publicaciones de la enfermedad de chagas y su interconexión realizados en Wosviewer.



En la figura 35 se describe la importancia de investigación en temas relacionados a la enfermedad de chagas, se muestra el año 2019 de color azul, mayo del año 2019 de color celeste, el año 2020 de color amarillo y en mayo del 2020 de color anaranjado y rojo.

Figura 36. Distribución de estudios de la enfermedad de chagas durante los últimos 5 años realizados en el software WosViever



Se realizó el análisis de los artículos con mayor reporte de migración rural – urbano tanto del vector y las personas mostrados en la tabla 14.

Tabla 14. Epidemiología de la enfermedad de chagas en contextos urbanos reportados en las revistas durante los últimos 5 años.

N°	Revista	País	Evidencia	DOI
1	Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo	Brasil	Reportes en el área urbana de las ciudades de Sao Paulo y Brasilia a partir de viviendas infestadas. Tasa de infestación del hogar del 16%. Baja prevalencia de infección vectorial (3%)	http://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201860033 https://doi.org/10.1590/0037-8682-0330-2020
2	Fundación Oswaldo Cruz	Colombia	Asociación del vector con el ciclo salvaje de <i>T. cruzi</i> y transmisión oral de la enfermedad de chagas. Se encuentra en palmeras ubicadas cerca de una vivienda. Alta prevalencia de infección por vectores (54%)	https://doi.org/10.1590/0102-311X00024013
3	Entomología Médica y Veterinaria	Brasil	Aspectos bioecológicos de triatominos y marsupiales como salvajes <i>T. cruzi</i> reservorios en áreas urbanas con ocurrencia del vector dentro de viviendas, sin colonización. Amplio rango de prevalencia de infección vectorial (6%-41%)	http://Doi:10.1111/mve.12507
4	Revista de Sociedad Brasileira de Medicina Tropical	Brasil	Presencia del vector en viviendas urbanas, pero sin signos de colonización. Muy alta prevalencia de infección por vector (71%)	https://doi.org/10.1590/0037-8682-0177-2018
5	Instituto Oswaldo Cruz	Argentina Perú	Importante colonización de viviendas urbanas con variada tasa de infestación (7%-3.3%). Amplio rango de prevalencia de infección por vectores (8%-47%). En Argentina, los únicos reportes de Chagas agudo por transmisión vectorial para el país, ubicados en el área	https://doi.org/10.1590/0074-02760210056 https://Doi:10.3201/eid2012.131820

- metropolitana de la ciudad de San Juan 2016-2020.
- Un bicho de campo en la ciudad: infestación urbana por el vector de la enfermedad de chagas *Triatoma infestans* Arequipa, Perú. La prevalencia de infestación de los hogares varía entre 0,0 y el 77.9% que oscilaban entre 0,1 y 68.7% de hectárea.
- 6 Revista Internacional de Geografía Sanitaria Perú <https://doi.org/10.1186/1476-072X-12-48>
- 7 Entomología Médica y Veterinaria México <https://doi.org/10.1111/j.0269-283X.2005.00563>
- 8 Enfermedades transmitidas por vectores y zoonóticas EE UU (Texas) <http://doi.org/10.1089/vbz.2018.2352>
- 9 Revista de Crecimiento y Desarrollo Humano Brasil <http://Doi:10.36311/jhgd.v31010925>
- 10 Revista de Enfermería Brasil <https://doi.org/10.36489/nursing.2021v24i275p5514-5529>
- 11 Folletos de Salud Pública (CSP) Brasil <https://doi:10.1590/0102-311X00175920>
- 12 Revista de Sociedad Brasileira de Medicina Tropical Argentina <http://Doi:10.1590/0037-8682-0560-2019>
- Infestación de viviendas urbanas de la ciudad de Cuernavaca, con muy alta prevalencia de Infección vectorial (50-88%)
- Primer registro del Vector en espacios verdes del área urbana de Houston. Insectos infectados con *Trypanosoma cruzi*
- El panorama epidemiológico de la Amazonía occidental Amazonia Brasileña de 2007 a 2018 incluye mayor número de casos de infección por *T. cruzi* en hombres de 20 a 39 años, y la transmisión oral fue prevalente. Brasil es el país con mayor prevalencia de pacientes con enfermedad, considerando que la enfermedad es de progresión lenta y tratamiento precoz con el consiguiente déficit en calidad de vida de los pacientes
- El conocimiento de la distribución territorial de los casos se infectó hace mucho tiempo y en las últimas décadas marcadas por una intensa migración de la población. Estudios han demostrado la importancia del sistema inmunitario y el efecto racimo de una mayor tasa a través de generaciones de una misma familia y de madre a hijo con origen geográfico y sus antecedentes familiares en una

13	Revista Médica Risaralda	Colombia	<p>población contemporánea urbana de Argentina.</p> <p>La prevalencia de la infección por <i>T. cruzi</i> de donantes en mujeres es el 70%, el 85% son donantes voluntarios por primera vez, el rango de mayor prevalencia fue de 41 a 50 y de 51 a 65 años con un 35% cada uno.</p>	<p>https://doi.org/10.22517/25395203.24601</p>
14	Medicina Tropical y Salud Internacional	Brasil	<p>Los Países de América del Sur y Central tienen una alta prevalencia y transmisión vertical de la enfermedad de chagas. Los tamizajes sistemáticos durante el periodo prenatal son necesarios para el diagnóstico y tratamiento.</p> <p>Se conjugan cuatro dimensiones interrelacionadas biomédica, epidemiológica, sociocultural y política considerando las nuevas configuraciones geográficas de Chagas asociadas principalmente a los movimientos migratorios y al cambio climático en diferentes escalas</p>	<p>http://Doi:10.1111/tmi.13398</p>
15	Bases Moleculares de las Enfermedades (BBA)	Argentina	<p>Se conjugan cuatro dimensiones interrelacionadas biomédica, epidemiológica, sociocultural y política considerando las nuevas configuraciones geográficas de Chagas asociadas principalmente a los movimientos migratorios y al cambio climático en diferentes escalas</p>	<p>https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165691</p>

A través de los análisis realizados en los artículos publicados de la situación actual de la enfermedad de chagas debido a los flujos migratorios se demostró que ha dejado de ser un problema de países endémicos y se ha convertido en un problema de salud pública mundial, debido a esto se propone mejorar la identificación de la enfermedad para reducir los impactos de los contagios y muertes debido a un incorrecto diagnóstico tal como se detalla en la tabla 15.

Tabla 15. Propuesta de mejora de identificación de la enfermedad de chagas que pueden ser aplicados para reducir el impacto de las muertes personas por un mal diagnóstico.

Problema de Identificación	Solución
<p>Problema de la inequidad: por razones de distribución del vector afecta a poblaciones más pobres rurales o periurbanas, desinformadas y olvidadas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - El diagnóstico debe formar parte de la atención integral en los centros de salud de atención primaria. - Fortalecer el acceso a la información del riesgo asociado a la presencia del vector dentro y cerca de los domicilios, y el riesgo de transmisión de madre a hijo. - Seguimiento a pacientes diagnosticados para no interrumpir el tratamiento y eliminar la cadena de transmisión.
<p>Problema económico: Según la OMS el coste medio por individuo es de 474 dólares al año mientras que el coste de productividad laboral es 4.600 dólares anuales. Se estima que la carga financiera es de 7.200 millones de dólares anuales. Existiendo pocas investigaciones para reducir los casos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Sensibilizar sobre la importancia de detectar, diagnosticar y tratar una enfermedad para el acceso una vida saludable. - Identificar gastos económicos y sociales por parte de las autoridades locales, nacionales e internacionales en implementación de una vigilancia continua epidemiológica de la enfermedad de chagas.
<p>Problemas de acceso a diagnóstico y tratamiento: En la actualidad menos del 1% de las personas reciben tratamiento por la falta de formación del personal sanitario, la falta de acceso a medicamentos y diagnóstico, la falta de tratamientos antiparasitarios eficaces en pacientes crónicos, y la falta de acceso e innovación en diagnóstico y medicamentos</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Fortalecer la información de la enfermedad al personal sanitario (médicos, pediatras, obstetras, enfermeras, laboratoristas, centros de investigación), y población. - El acceso al tratamiento debe identificarse lo más rápido posible desde el neonato hasta un adulto crónico con problemas cardiacos con nuevos tratamientos. - Generar mayor investigación y desarrollo para el control y tratamiento con mejores herramientas de diagnóstico, nuevos medicamentos que sean eficaces y desarrollo de biomarcadores.
<p>El problema psicosocial: la falta de información, educación y comunicación forman una barrera en el tratamiento, además existe el miedo a la estigmatización asociada a la pobreza y exclusión social.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Fortalecer un enfoque psicosocial en atención integral de los pacientes, incluyendo campañas de información, educación y sensibilización.

- El control del vector:** Tradicionalmente se usaban insecticidas contra el vector, generando resistencias.
- Falta de compromiso de Instituciones Públicas y privadas.
- Desarrollar alternativas de control vectorial como modificación genética para reducir su fertilidad o su capacidad de transmisión del parásito y que sean sostenibles con el medio ambiente.
 - Colaboración con la DIRESA- Amazonas y la UNTRM para crear plataformas de atención integral a pacientes con enfermedad de chagas para diagnóstico y tratamiento y brindar formación sobre el manejo de la enfermedad desarrollando proyectos de investigación (biomarcadores de progresión y respuesta terapéutica, identificación de complicaciones cardiacas)
 - Fomentar el compromiso político para desarrollar estrategias de lucha y poner en marcha programas de acceso al diagnóstico y tratamiento. Estableciendo políticas claras en líneas con los objetivos de Desarrollo Sostenible acorde con las metas de la OMS.
-

IV. DISCUSIÓN

Diseño y análisis *In-silico* de péptidos candidatos para detección de *T. cruzi*.

Los péptidos identificados mediante diseño *In-silico* pueden ser alternativas eficaces a los métodos experimentales tradicionales en la investigación de péptidos, ya que pueden ahorrar tiempo y esfuerzo (Ospina, 2020). Sin embargo, existen obstáculos para la adopción de estos métodos avanzados, como la falta de experiencia en la utilización de bibliotecas de programación, el acceso a estos recursos computacionales y la flexibilidad de las líneas de producción pueden superar estos obstáculos, es importante evaluar el impacto de diferentes herramientas, métodos y algoritmos en el diseño *In-silico* de péptidos, compartir y distribuir los resultados de los flujos de trabajo para mejorar la eficiencia y eficacia de estos métodos (Joshi & Blankenberg, 2022). Además, el uso de conjuntos de herramientas que proporcionan análisis de característica, visualización y trazado de datos, modelado y recuperación de conjuntos de datos puede ser de gran ayuda para los investigadores que deseen utilizar métodos de diseño *In-silico* de péptidos. Es importante mencionar que el diseño *In-silico* de péptidos es un campo en constante evolución y que se espera que se desarrollen nuevas herramientas y métodos que mejoren aún más su eficiencia y precisión en el futuro. Tal como se realizó en esta investigación con la identificación de una proteína y el diseño del mismo.

Es interesante resaltar que la biblioteca de plantillas de Swiss model es una herramienta valiosa para el modelado *In-silico* de proteínas, ya que contiene datos estructurales de proteínas determinadas experimentalmente y que son derivadas del Protein Data Bank (Gherzi et al., 2020)(Bittrich et al., 2023) siendo utilizado por tener las formas 3D de proteínas, ácidos nucleicos y conjunto de complejos que ayuda a comprender todos los aspectos de la biomedicina, desde la síntesis de proteínas hasta la salud y la enfermedad. Este almacenamiento en la base de datos permite una mayor eficiencia en el proceso de modelado, la calidad de estimación global del modelo (GMQE) es una medida importante para evaluar la calidad del modelo obtenido. Este análisis *In-silico* permite la identificación de aminoácidos y la evaluación de los parámetros físico-químicos de interacción con un modelo aproximado a cada una de las proteínas de análisis. Es importante comprobar si la estructura es suficientemente homóloga y obtener un buen alineamiento de las regiones con estructuras secundarias, lo que puede mejorar la calidad del modelo y su capacidad para predecir la estructura y función de la proteína, tal como

se realizó en esta investigación utilizando una proteína homóloga como la cisteína proteinasa que tiene secuencias parecidas a la proteína Cruzipaina.

Estudios recientes se centran en la búsqueda de posibles candidatos para vacunas que puedan ser diseñadas usando herramientas *In-Silico* (Ma et al., 2016), permitiendo analizar el acoplamiento molecular y los de simulación de diferentes funciones de las proteínas, con el uso de herramientas nuevas que ayudan a perfeccionar estas interacciones que se encuentran disponibles en el banco de proteínas o GenBank (Abbasi et al., 2022) permiten identificar nuevas secuencias con interacción de alelos polimórficos de epítopos (polimorfismo genético o secuencias de ADN) que pueden ser utilizados de acuerdo a la investigación deseada (Disease et al., 2022). Este trabajo me permitió el uso de diferentes softwares para elegir los mejores péptidos de interacción presentes en la superficie del parásito con un análisis más detallado integrando la formación y ligación de las estructuras para modelamiento e interpretación.

(Soprano et al., 2022), nos dice que la Cruzipaina es una cisteína proteinasa de múltiples funciones en la patogénesis de la EC, los protozoos patógenos desempeñan un papel importante en la regulación de la interacción entre el huésped y el parásito, ya que participan en la modulación de una serie de efectos parasito biológicos, como la absorción de nutrientes, la evasión inmunitaria y la degradación del tejido del huésped. La Cruzipaina también se conoce como cruzina, antígeno GP57/51, se expresan diferencialmente en las cuatro etapas principales del ciclo vital del parásito, mostrando una actividad significativamente mayor en los epimastigotes en comparación con las otras formas del parásito. Esta codificada por un número grande de genes (130 cepa Tul2)(Chain et al., 2019) dispuestos de cabeza-cola, enzima lisosomal de tipo I, tiene una molécula catalítica con alta homología a la papaína y a algunas catepsinas de mamíferos, una extensión carboxiterminal (C-T), (Duschak & Couto, 2009), tiene un peso molecular de 41 kDa. La inmunoreactividad de la Cruzipaina en sueros de pacientes chagásicos crónicos es una evidencia importante de su papel en la patogénesis de la enfermedad de chagas. La detección de anticuerpos específicos contra esta proteína en suero de pacientes es un indicador útil de la presencia de la enfermedad, y se utiliza ampliamente en pruebas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de chagas. Además, se ha demostrado que la Cruzipaina (Cazzulo, 1999).tiene una actividad proteolítica que puede contribuir a la patogénesis de la enfermedad al degradar los tejidos del huésped y facilitar la invasión parasitaria. Por lo tanto, el estudio de esta proteína es importante para comprender la

patogénesis de la enfermedad de chagas y desarrollar estrategias terapéuticas efectivas. Para esta investigación se eligió esta proteína por estar presente en el parásito, al no haber modelos *In-silicos* se ha diseñado siguiendo los pasos descritos en esta tesis.

Síntesis química de los péptidos para detección serológica de *T. cruzi*.

La síntesis química de péptidos se realizó utilizando el método de Merrifield (Frank, 2002a), el cual es ampliamente utilizado en la síntesis de péptidos debido a su eficiencia y alta pureza de los productos finales. Se utilizó un grupo de aminoácidos de eficiencia y alta pureza para los productos finales. También se utilizó un grupo protector denominado química Fmoc (9- fluorometixicarbonil) para proteger el grupo amina del aminoácido y una resina solida como soporte para la síntesis. La secuencia sintetizada permitió obtener 4 candidatos de péptidos, que luego se probaron contra sueros positivos y negativos de *Trypanosoma cruzi* utilizando un protocolo de ELISA (Buchwalow et al., 2011).

La síntesis de péptidos se realizó utilizando la química Fmoc/tBu que emplea el grupo Fmoc como protector temporal del grupo α -amino y grupos del tipo ter-butil (tBu) para proteger las cadenas laterales de los aminoácidos. El grupo protector α -amino se elimina antes de la unión del siguiente aminoácido. La eliminación del grupo protector se realiza en medio ácido mientras que la eliminación del grupo Fmoc se realiza en medio básico, generalmente con piperidina. Una vez el grupo α -amino se encuentra libre, se une el aminoácido siguiente, previa activación, al aminoácido anterior formando el enlace peptídico. El proceso de acoplamiento requiere la activación del grupo α -carboxilo del aminoácido entrante de modo que este sea susceptible de reaccionar con el grupo amino de la cadena de péptido creciente. Este proceso de desprotección y acoplamiento se repite tantas veces como sea necesario hasta completar la secuencia del péptido deseado. Una vez sintetizado la cadena peptídica esta se separa y se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos (Escoda, 2007). Para esta investigación se mantiene los mismos conceptos.

Al realizar la técnica de inmunodetección en la membrana se realizó el bloqueo para testear los anticuerpos presentes, este procedimiento reduce aún más las uniones no específicas y va a depender de la fuerza de los anticuerpos utilizados, aquellos anticuerpos de unión débil pueden ser eliminados por un exceso de detergente en los lavados posteriores. De igual manera la sacarosa ayudó en la generación de energía y transporte

de carbohidratos, se utilizó altas concentraciones funcionando como tampón bastante bueno.

Estandarización de la Técnica Elisa con el antígeno sintético obtenido y evaluación de la inmunorreacción.

Para realizar los ensayos por inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) con los péptidos se procedió a realizar un ELISA indirecto (Versiani et al., 2019), actualmente el diagnóstico de la enfermedad de chagas en fase crónica se continua realizando técnicas serológicas que detectan anticuerpos de tipo de inmunoglobulina G específicos de antígenos parasitarios según el estadio del parásito como epimastigotes, amastigote o trypomastigote (Llano et al., 2014), y la diversidad de pruebas de ELISA resultan variaciones muy diversas en una misma prueba y otras pruebas que se realizan, de los 4 péptidos sintetizados de la proteína Cruzipaina que se encuentran en la superficie sugiere que podrían tener antígenos específicos en los estadios del parásito que no son detectados por otras pruebas existentes en el mercado. Lo más importante de esta estandarización es que se usaron en muestras de la región Amazonas demostrando que es una zona endémica y que aún falta continuar investigaciones que permitan implementar diagnósticos tempranos y oportunos en las personas y una mejor intervención del sistema de salud que presenta falencias en la identificación de estas enfermedades.

Revisión de propuestas para el fortalecimiento del acceso equitativo al servicio de salud

De acuerdo a las publicaciones de los artículos revisados, en los últimos 5 años como se muestra en la tabla 13, Estados Unidos supera en investigación de acuerdo al reporte del software, y los países endémicos con mayores publicaciones son Brasil, Argentina y México, esta figura indica que existe una colaboración con los países para enfrentar la enfermedad de chagas, ya que en los últimos años se ha visto un aumento en el crecimiento de contagios de la enfermedad según reporta la OMS, (Organización Panamericana de la Salud. 57. o Consejo Directivo 71. a Sesión del Comité Regional de la OMS para las Américas, 2019). Las investigaciones de esta enfermedad se desarrollaron de diferentes maneras, como estudios en diferentes proteínas, PCR, transmisiones, pacientes, vectores como los triatomíneos, lo cual demuestra un gran interés en todos los países del mundo de disminuir los riesgos de contagio ya que afectan a la población urbana y rural, también es importante encontrar nuevas alternativas de tratamientos para disminuir la alta tasa de mortalidad en la etapa crónica, que se agudiza

aún más con el poco interés en los análisis preliminares en los centros de salud como hospitales, clínicas, bancos de sangre donde aún no existe una normativa clara acerca de la identificación oportuna y así reducir dicha enfermedad (Batista et al., 2019).

La revisión y análisis de los documentos considerados en este objetivo de desarrollo sostenible permitió establecer una base sobre la dispersión del vector infectado con *T. cruzi* existen registros de Texas en el centro urbano de la ciudad de Houston reportando la presencia del parásito (Dye-Braumuller et al., 2019), estos reportes permiten identificar y utilizar técnicas de vigilancia pasiva y activa que monitorean las actividades de los triatominos. En las dos últimas décadas el crecimiento demográfico y la pérdida de bosques por el incremento de la urbanización y la deforestación provocada por la misma ha llevado a cambios entre el huésped-vector, esto se da porque las personas invaden los hábitats y zonas silvestres aumentando la probabilidad que los vectores entren en contacto con los humanos (Parham et al., 2015).

Los constantes movimientos migratorios han convertido a la enfermedad de chagas en un problema de salud mundial (Carbajal-de-la-Fuente et al., 2022), aún sigue siendo una enfermedad desatendida elevando una crisis de salud pública silenciosa, los expertos señalan que se necesitarán estrategias multidisciplinarias nacional e internacional para el control (bancos de sangre y órganos, transmisión vertical, vectores), llegando a la conclusión de que se tiene que gestionar recursos para un mejor manejo de la infección en personas infectadas y ampliar las investigaciones en diagnóstico y tratamiento. (Pinazo & Gascon, 2015). De igual manera la Organización Mundial de la Salud hace hincapié a una colaboración integrada y global en el control de vectores que causan una carga de morbilidad extrema (OMS, 2019).

Es innegable que la falta de métodos altamente precisos para diagnosticar la enfermedad de chagas ha sido un desafío importante para la identificación y tratamiento adecuado de personas infectadas en todo el mundo incluyendo países no endémicos. (Elisa et al., n.d.). Estos métodos actuales para la enfermedad de chagas incluyen pruebas serológicas, como la prueba de ELISA, y pruebas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, estas pruebas pueden presentar limitaciones, como la falta de sensibilidad y especificidad en las primeras etapas de la infección y la incapacidad para distinguir entre una infección activa y una infección pasada. La necesidad de pruebas de diagnóstico más precisas y accesibles es crucial para el tratamiento adecuado y la

prevención de la transmisión en todo el mundo. (Escudero-Nieto & Guerrero-Espejo, 2005). Los estudios de esta investigación se centran en el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico como la utilización de la proteómica y genómica para identificar nuevos biomarcadores de la enfermedad, representa un desafío importante para el tratamiento y prevención de la enfermedad. La necesidad de pruebas más precisas y accesibles es crucial para la identificación y tratamiento adecuado de personas infectadas y la prevención de la transmisión en todo el mundo.

V. CONCLUSIONES

- Mediante el análisis *In-silico* se determinó que las estructuras de las secuencias modeladas en 3D se localiza en la membrana celular del parásito. Presenta cercanía al extremo C-terminal indicando dominios característicos, y la identificación de la proteína Cruzipaina puede ser considerada como una estrategia potencial para el tratamiento de la enfermedad de chagas.
- Se logró realizar la síntesis química de 152 secuencias de péptidos en la membrana de la proteína Cruzipaina y también la síntesis química de 4 péptidos.
- Se identificó una secuencia de péptido (M2B) por la Técnica ELISA con mayor potencial inmunorreactivo para reconocimiento del parásito *T. cruzi*.
- El metaanálisis bibliográfico permitió identificar la evolución de la enfermedad de chagas y la necesidad de una colaboración de todos los países para abordar problemas de salud global y encontrar soluciones viables para la prevención y el tratamiento de enfermedades infecciosas como la enfermedad de chagas.

VI. RECOMENDACIONES

- Continuar con la búsqueda de péptidos en otras proteínas puede identificar nuevos antígenos específicos del *T. cruzi* y desarrollar pruebas de diagnóstico más sensibles y específicas. Además, la comparación de estos péptidos con los ya identificados puede ayudar a mejorar el conocimiento sobre las características del parásito y su interacción con el hospedero. Es importante tener en cuenta que estas investigaciones requieren una cuidadosa validación para garantizar la fiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos.
- El uso de péptidos permitirá presentar nuevas alternativas de diagnóstico y presentar ventajas importantes como su capacidad para reconocer regiones específicas de antígenos y su facilidad de síntesis en grandes cantidades. Es importante compararlas con otras pruebas comerciales disponibles en el mercado. También es importante considerar aspectos económicos y su accesibilidad para implementar nuevas pruebas de diagnóstico en la práctica clínica.
- Continuar las investigaciones para desarrollar nuevas técnicas de diagnóstico que sea más sensibles y específicas para diferentes cepas de *T. cruzi* y que permitan una detección y tratamiento más precisos de la enfermedad de chagas. Debido a su variabilidad genética y la reacción cruzada con otros parásitos pueden afectar la sensibilidad y especificidad de las pruebas de diagnóstico.
- Realizar pruebas de validación clínica en muestras clínicas de pacientes chagásicos para evaluar la sensibilidad y especificidad de los péptidos identificados.
- Realizar estudios de estabilidad de los péptidos identificados para determinar su durabilidad y almacenamiento adecuado para su uso en futuros estudios y evaluar la posibilidad de utilizar técnicas de biología molecular para amplificar y detectar la presencia de genes específicos del *T. cruzi*.
- Realizar pruebas en los animales peri domiciliarios para identificar la transmisión vectorial del parásito por ser considerados reservorios del *T. cruzi*. Las pruebas pueden incluir la detección de anticuerpos en suero, así como la búsqueda de parásitos en la sangre o en tejidos.
- Fortalecer alianzas con otros investigadores para obtener una mejor comprensión de la distribución geográfica del *T. cruzi*. La elaboración de mapas que muestren

la distribución del parásito en diferentes regiones del país para monitorear y prevenir la propagación de la enfermedad.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi, B. A., Saraf, D., Sharma, T., Sinha, R., Singh, S., Sood, S., Gupta, P., Gupta, A., Mishra, K., Kumari, P., & Rawal, K. (2022). Identification of vaccine targets & design of vaccine against SARS-CoV-2 coronavirus using computational and deep learning-based approaches. *PeerJ*, *10*, e13380. <https://doi.org/10.7717/peerj.13380>
- Batista, C., Forsyth, C. J., Herazo, R., Certo, M. P., & Marchiol, A. (2019). *Un proceso de cuatro pasos para construir un acceso sostenible al diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas*. 1–9.
- Bayer-Santos, E., Aguilar-Bonavides, C., Rodrigues, S. P., Cordero, E. M., Marques, A. F., Varela-Ramirez, A., Choi, H., Yoshida, N., Da Silveira, J. F., & Almeida, I. C. (2013). Proteomic analysis of trypanosoma cruzi secretome: Characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. *Journal of Proteome Research*, *12*(2), 883–897. <https://doi.org/10.1021/pr300947g>
- Bittrich, S., Bhikadiya, C., Bi, C., Chao, H., Duarte, J. M., Dutta, S., Fayazi, M., Henry, J., Khokhriakov, I., Lowe, R., Piehl, D. W., Segura, J., Vallat, B., Voigt, M., Westbrook, J. D., Burley, S. K., & Rose, Y. (2023). RCSB Protein Data Bank: Efficient Searching and Simultaneous Access to One Million Computed Structure Models Alongside the PDB Structures Enabled by Architectural Advances. *Journal of Molecular Biology*, *xxxx*, 167994. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2023.167994>
- Buchwalow, I., Samoilova, V., Boecker, W., & Tiemann, M. (2011). Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: Fallacies and facts. *Scientific Reports*, *1*, 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep00028>
- Cabrera, R. (2002). Enfermedad de Chagas o Trypanosomiasis americana CIE-10: B57. *Articulo Salud*, *10*(57), 1–24.
- Carbajal-de-la-Fuente, A. L., Sánchez-Casaccia, P., Piccinali, R. V., Provecho, Y., Salvá, L., Meli, S., Cano, F., Hernández, R., & Nattero, J. (2022). Urban vectors of Chagas disease in the American continent: A systematic review of epidemiological surveys. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *16*(12), e0011003. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011003>
- Cazzulo, J. J. (1999). *ESTRUCTURA, ANTIGENICIDAD Y POSIBLES FUNCIONES DE*

LA CRUZIPAINA, CISTEÍNA PROTEEVASA PRINCIPAL DEL Trypanosoma cruzi.
J.J. CAZZULO. 80.

Chagas, E. De. (2023). *Número casos de Enfermedad de Chagas por distrito , Perú 2023*
*.

Chain, C. Y., Pires Souto, D. E., Sbaraglini, M. L., Labriola, C. A., Daza Millone, M. A., Ramirez, E. A., Cisneros, J. S., Lopez-Albizu, C., Scollo, K., Kubota, L. T., Ruiz, A. M., & Vela, M. E. (2019). Trypanosoma cruzi virulence factors for the diagnosis of chagas' disease. *ACS Infectious Diseases*, 5(11), 1813–1819.
<https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00269>

De-Simone, S. G., Napoleão-Pêgo, P., & De-Simone, T. S. (2016). Spot synthesis: An optimized microarray to detect ige epitopes. *Methods in Molecular Biology*, 1352, 263–277. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3037-1_20

Dinatale, B., & Balbi, C. B. (2020). *Desarrollos preclínicos de vacunas profilácticas contra la Enfermedad de Chagas basadas en Transialidasa . prophylactic vaccines against Chagas disease . 1*, 23–38.

Disease, C., Cruzi, T., Repertoire, A., & Repertoire, E. (2022). *A Trypanosoma cruzi Antigen and Epitope Atlas : deep characterization of antibody specificities in Chagas Disease patients across the Americas The Chagas Disease Antigen and Epitope Atlas.*

Duschak, V., & Couto, A. (2009). Cruzipain, the Major Cysteine Protease of Trypanosoma cruzi: A Sulfated Glycoprotein Antigen as Relevant Candidate for Vaccine Development and Drug Target. A Review. *Current Medicinal Chemistry*, 16(24), 3174–3202. <https://doi.org/10.2174/092986709788802971>

Dye-Braumuller, K. C., Gorchakov, R., Gunter, S. M., Nielsen, D. H., Roachell, W. D., Wheless, A., Debboun, M., Murray, K. O., & Nolan, M. S. (2019). Identification of Triatomines and Their Habitats in a Highly Developed Urban Environment. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 19(4), 265–273.
<https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2352>

Elisa, C. C., Clinico, S., & Ensayo, F. D. E. L. (n.d.). *Celquest chagas elisa.*

Escoda, T. P. (2007). *Diseño y síntesis de péptidos para el diagnóstico de la infección*

- por el virus de la hepatitis G (GBV-C/HGV). 1–79.
- Escudero-Nieto, R., & Guerrero-Espejo, A. (2005). Enfermedades producidas por Borrelia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(4), 232–240. <https://doi.org/10.1157/13073150>
- Florencia, M., Belén, F., Dinatale, B., Bulfoni, C., Raquel, S., Farré, C., Lupi, G., Espariz, M., Sebastián, V., Magni, C., Marcipar, I., & Rosa, A. (2022). Nasal immunization with a *L. lactis* -derived trans-sialidase antigen plus c-di-AMP protects against acute oral *T. cruzi* infection. *Vaccine*, 40(15), 2311–2323. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.02.071>
- Frank, R. (2002a). *La técnica de síntesis SPOT Matrices de péptidos sintéticos sobre soportes de membrana : principios y aplicaciones*. 267, 13–26.
- Frank, R. (2002b). *The SPOT-synthesis technique Synthetic peptide arrays on membrane supports — principles and applications*. 267, 13–26.
- Gherzi, B. M., Peterson, A. C., Gibson, N. L., Dash, A., Elmayan, A., Schwartzburg, H., Tu, W., Riegel, C., Herrera, C., & Blum, M. J. (2020). In the heart of the city: Trypanosoma cruzi infection prevalence in rodents across New Orleans. *Parasites and Vectors*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04446-y>
- Immunochemistry Diagnostics. (2015). Introducción a los Inmunoensayos. *Abbott División Diagnóstico Global Marketing: Inmunoquímica*, 25–45.
- Insuasty Cepeda, D. S., Pineda Castañeda, H. M., Rodríguez Mayor, A. V., García Castañeda, J. E., Maldonado Villamil, M., Fierro Medina, R., & Rivera Monroy, Z. J. (2019). Synthetic Peptide Purification via Solid-Phase Extraction with Gradient Elution: A Simple, Economical, Fast, and Efficient Methodology. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(7). <https://doi.org/10.3390/molecules24071215>
- Johé, P., Jaenicke, E., Neuweiler, H., Schirmeister, T., Kersten, C., & Hellmich, U. A. (2021). Structure , interdomain dynamics , and pH-dependent autoactivation of pro-rhodesain , the main lysosomal cysteine protease from African trypanosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100565. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100565>
- Joshi, J., & Blankenberg, D. (2022). PDAUG: a Galaxy based toolset for peptide library

- analysis, visualization, and machine learning modeling. *BMC Bioinformatics*, 23(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12859-022-04727-6>
- Journal, T. (2016). *Enzymatic Activity , Protein Expression , and Gene Sequence of Cruzipain in Virulent and Attenuated Trypanosoma cruzi Strains* Author (s): Vilma G . Duschak , Mirella Ciaccio , Julio R . Nasser and Miguel A . Basombrío Published by : Allen Press on behal. 87(5), 1016–1022.
- Laune, D., Molina, F., Ferrières, G., Villard, S., Bès, C., Rieunier, F., Chardès, T., & Granier, C. (2002). Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *Journal of Immunological Methods*, 267(1), 53–70. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(02\)00140-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(02)00140-0)
- Llano, M., Pavía, P., Flórez, A. C., Cuéllar, A., González, J. M., & Puerta, C. (2014). Evaluación preliminar de la prueba comercial Chagas (Trypanosoma cruzi) IgG-ELISA® en individuos colombianos. *Biomedica*, 34(2), 228–236. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.1580>
- Ma, F., Zhang, L., Wang, Y., Lu, R., Hu, B., Lv, S., Xue, X., Li, X., Ling, M., Fan, S., Zhang, H., & Yan, X. (2016). Development of a peptide ELISA for the diagnosis of Aleutian mink disease. *PLoS ONE*, 11(11), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165793>
- Machado, A., Liria, C. W., Proti, P. B., Remuzgo, C., Terêsa, M., Bioquímica, D. De, Química, I. De, Paulo, U. D. S., Prof, A., & Prestes, L. (2004). *Revisão*. 27(5), 781–789.
- Nagarkatti, R., Acosta, D., Acharyya, N., de Araujo, F. F., Elói-Santos, S. M., Martins-Filho, O. A., Teixeira-Carvalho, A., & Debrabant, A. (2020). A novel Trypanosoma cruzi secreted antigen as a potential biomarker of Chagas disease. *Scientific Reports*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76508-1>
- Noazin, S., Lee, J. A., Malaga, E. S., Valencia Ayala, E., Condori, B. J., Roca, C., Lescano, A. G., Bern, C., Castillo, W., Mayta, H., Menduiña, M. C., Verastegui, M. R., Tinajeros, F., & Gilman, R. H. (2019). Trypomastigote Excretory Secretory Antigen Blot Is Associated with Trypanosoma cruzi Load and Detects Congenital T. cruzi Infection in Neonates, Using Anti-Shed Acute Phase Antigen

- Immunoglobulin M. *Journal of Infectious Diseases*, 219(4), 609–618.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiy562>
- Of, T., Useful, A. S., For, T., Diagnosis, T. H. E., & Chagas, O. F. (2013). ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN/SECRECIÓN DE TRIPOMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi* (TESA) COMO HERRAMIENTAS ÚTILES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. *Saber*, 25(4), 346–357.
- OMS. (2019). Consejo Directivo. Retrieved May, 2013, 1–14.
<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Consejo+directivo#8%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Consejo+Directivo#8>
- Organización Panamericana de la Salud. 57. o Consejo Directivo 71. a Sesión del Comité Regional de la OMS para las Américas. (2019). *Iniciativa de la OPS para la eliminación de enfermedades: política para aplicar un enfoque integrado y sostenible de las enfermedades transmisibles en la región de las Américas*. 1–3.
https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&alias=50599-cd57-r7-s-iniciativa-eliminacion-enfermedades&category_slug=cd57-es&Itemid=270&lang=es
- Ospina, J. D. (2020). Los aptámeros como novedosa herramienta diagnóstica y terapéutica y su potencial uso en parasitología. *Biomédica*, 40(Supl. 1), 148–165.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.4765>
- Parham, P. E., Waldock, J., Christophides, G. K., Hemming, D., Agosto, F., Evans, K. J., Fefferman, N., Gaff, H., Gumel, A., Ladeau, S., Lenhart, S., Mickens, R. E., Naumova, E. N., Ostfeld, R. S., Ready, P. D., Thomas, M. B., Velasco-Hernandez, J., & Michael, E. (2015). Climate, environmental and socio-economic change: Weighing up the balance in vector-borne disease transmission. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1665), 1–17.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0551>
- Pellequer, J. L., Westhof, E., & Van Regenmortel, M. H. V. (1993). Correlation between the location of antigenic sites and the prediction of turns in proteins. *Immunology Letters*, 36(1), 83–99. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(93\)90072-A](https://doi.org/10.1016/0165-2478(93)90072-A)
- Pinazo, M. J., & Gascon, J. (2015). The importance of the multidisciplinary approach to

- deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). *Acta Tropica*, 151(1), 16–20. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.06.013>
- 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 Diagnosis of Trypanosoma cruzi infection : Advances and challenges. 2020, 7–27.*
- Sáenz-García, J. L., Yamanaka, I. B., Pacheco-Lugo, L. A., Miranda, J. S., Córneo, E. S., Machado-de-Ávila, R. A., De Moura, J. F., & DaRocha, W. D. (2020). Targeting epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* with a peptide isolated from a phage display random library. *Experimental Parasitology*, 210(December 2019), 107830. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107830>
- Saha, S., Bhasin, M., & Raghava, G. P. S. (2005). Bcipep: A database of B-cell epitopes. *BMC Genomics*, 6, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-79>
- Sanchez, G. (2013). Las instituciones de ciencia y tecnología en los procesos de aprendizaje de la producción agroalimentaria en Argentina. *El Sistema Argentino de Innovación: Instituciones, Empresas y Redes. El Desafío de La Creación y Apropiación de Conocimiento.*, 14(October 2006), 659–664. <https://doi.org/10.1002/prot>
- Santos, L., Garcia-Gomes, A., Catanho, M., Sodre, C., Santos, A., Branquinha, M., & d'Avila-Levy, C. (2013). Aspartic Peptidases of Human Pathogenic Trypanosomatids: Perspectives and Trends for Chemotherapy. *Current Medicinal Chemistry*, 20(25), 3116–3133. <https://doi.org/10.2174/0929867311320250007>
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., & Peitsch, M. C. (2003). SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3381–3385. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg520>
- Soprano, L. L., Ferrero, M. R., Landoni, M., García, G. A., Esteva, M. I., Couto, A. S., & Duschak, V. G. (2022). Cruzipain Sulfotopes-Specific Antibodies Generate Cardiac Tissue Abnormalities and Favor *Trypanosoma cruzi* Infection in the BALB/c Mice Model of Experimental Chagas Disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(January), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.814276>
- Vega, S., Cabrera, R., Alvarez, C. A., Uribe Vilca, I., Guerrero Quincho, S., Ancca Juárez,

- J., Cabrera Campos, B., Celis Trujillo, A., Zuñiga Saca, M., Bernal Fiestas, M., & Oriundo Palomino, R. (2021). Características Clínicas Y Enfermedad De Chagas Aguda En La Characteristics of Cases of Acute Chagas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 38(1), 70–76.
- Versiani, A. F., Rocha, R. P., Mendes, T. A. O., Pereira, G. C., Dos Reis, J. G. A. C., Bartholomeu, D. C., & Da Fonseca, F. G. (2019). Identification of B-Cell epitopes with potential to serologically discriminate dengue from Zika infections. *Viruses*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/v11111079>
- Peng, J., Gygi, S.P. Proteomics: the move to mixtures. *J. Mass Spectrom*, 2001; 36(10):1083-1091.
- Kitchen, D.B., Decornez, H., Furr, J.R., Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews. Drug discovery*, 2004; 3(11):935-949.
- Wang R, Jin J, Zou Q, Nakai K, Wei L. Predicting protein-peptide binding residues via interpretable deep learning. *Bioinformatics*. 2022 May 23;btac352. doi: 10.1093/bioinformatics/btac352. Epub ahead of print. PMID: 35604077.
- Kopicki JD, Saikia A, Niebling S, Günther C, Anjanappa R, Garcia-Alai M, Springer S, Uetrecht C. Opening opportunities for K_d determination and screening of MHC peptide complexes. *Commun Biol*. 2022 May 23;5(1):488. doi: 10.1038/s42003-022-03366-0. PMID: 35606511.
- Mendel Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A. Delineation of the minimal encephalitogenic epitope within the immunodominant region of myelin oligodendrocyte glycoprotein: diverse V beta gene usage by T cells recognizing the core epitope encephalitogenic for T cell receptor V beta b and T cell receptor V beta a H-2b mice. *Eur J Immunol*. 1996 Oct;26(10):2470-9. doi: 10.1002/eji.1830261030. PMID: 8898962.

ANEXOS

Tabla 16. Categorías funcionales de *cruzi*/Proteínas excretadas/secretadas

Categoría funcional	Epimastigote norte (%)	Metacíclico tripomastigote n (%)
Interacción huésped-parásito	11 (3,2%)	10 (3,8%)
Señalización	22 (6,4%)	20 (7,5%)
proteolisis, peptidolisis	27 (7,8%)	25 (9,4%)
Transcripción y síntesis de proteínas	29 (8,4%)	16 (6,0%)
Proteínas de choque térmico y chaperonas	21 (6,1%)	15 (5,7%)
Tráfico y fusión de membranas	17 (4,9%)	13 (4,9%)
Transportistas	7 (2,0%)	5 (1,9%)
Estructura y motilidad celular.	18 (5,2%)	17 (6,4%)
Reducción de oxidación	24 (7,0%)	22 (8,3%)
Metabolismo de los carbohidratos	24 (7,0%)	17 (6,4%)
Metabolismo de lípidos	8 (2,3%)	7 (2,6%)
Metabolismo de proteínas y aminoácidos	34 (9,9%)	28 (10,6%)
Metabolismo intermedio	9 (2,6%)	7 (2,7%)
Metabolismo de nucleótidos	7 (2,0%)	6 (2,3%)
Unión de ácidos nucleicos	38 (11,0%)	19 (7,2%)
Otros	49 (14,2%)	38 (14,3%)
Total	345 (100%)	265 (100%)

Fuente: Obtenido del artículo “Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins”, (Bayer-Santos et al., 2013).

Tabla 17. Predicción de accesibilidad de superficie de epítomos de anticuerpos obtenida del análisis del IEDB.

Position	Residue	Start	End	Peptide	Score
10	L	3	18	GWARALLLA AVL VVMA	0.009
11	A	4	19	WARALLLA AVL VVMAC	0.005
12	A	5	20	ARALLLA AVL VVMACL	0.004
13	V	6	21	RALLLA AVL VVMACLV	0.003
14	L	7	22	ALLLA AVL VVMACLV P	0.002
15	V	8	23	LLLA AVL VVMACLVPA	0.002
16	V	9	24	LLA AVL VVMACLVPA A	0.003
17	M	10	25	LA AVL VVMACLVPA AT	0.005
18	A	11	26	AA VL VVMACLVPA AT A	0.006
19	C	12	27	AV LV VVMACLVPA AT AS	0.007
20	L	13	28	VL VVMACLVPA AT AS L	0.006
21	V	14	29	LV VVMACLVPA AT AS LH	0.011
22	P	15	30	VV MACLVPA AT AS LH A	0.014
23	A	16	31	VM ACLVPA AT AS LH AE	0.032
24	A	17	32	MACLVPA AT AS LH AE E	0.074
25	T	18	33	ACL VPA AT AS LH AE ET	0.108
26	A	19	34	CL VPA AT AS LH AE ET L	0.088
27	S	20	35	LV PA AT AS LH AE ET LT	0.238
28	L	21	36	VPA AT AS LH AE ET LTS	0.387
29	H	22	37	PA AT AS LH AE ET LTS Q	0.903
30	A	23	38	AAT AS LH AE ET LTS Q F	0.506
31	E	24	39	AT AS LH AE ET LTS Q FA	0.506
32	E	25	40	TAS LH AE ET LTS Q FA E	0.867
33	T	26	41	AS LH AE ET LTS Q FA EF	0.52
34	L	27	42	SL HAE ET LTS Q FA E FK	1.03
35	T	28	43	LH AE ET LTS Q FA E FK Q	1.331
36	S	29	44	HAE ET LTS Q FA E FK Q K	3.228
37	Q	30	45	AE ET LTS Q FA E FK Q KH	3.228
38	F	31	46	E ET LTS Q FA E FK Q KH G	3.162
39	A	32	47	ET LTS Q FA E FK Q KH GR	3.576
40	E	33	48	TL TS Q FA E FK Q KH GR V	1.533
41	F	34	49	LS Q FA E FK Q KH GR V Y	1.664
42	K	35	50	TS Q FA E FK Q KH GR V YE	3.494
43	Q	36	51	SQ FA E FK Q KH GR V YES	3.245
44	K	37	52	QFA E FK Q KH GR V YES A	2.446
45	H	38	53	FA E FK Q KH GR V YES AA	1.427
46	G	39	54	AE FK Q KH GR V YES AA E	2.854
47	R	40	55	EF K Q KH GR V YES AA EE	4.892
48	V	41	56	FK Q KH GR V YES AA EEA	2.854
49	Y	42	57	KQ KH GR V YES AA EEEAF	2.854
50	E	43	58	QKH GR V YES AA EEEAFR	2.795
51	S	44	59	KH GR V YES AA EEEAFRL	1.331
52	A	45	60	HGR V YES AA EEEAFRLS	0.892
53	A	46	61	GR V YES AA EEEAFRLSV	0.486
54	E	47	62	RV YES AA EEEAFRLSVF	0.426
55	E	48	63	VYES AA EEEAFRLSVFR	0.426
56	A	49	64	YES AA EEEAFRLSVFRE	0.993

Tabla 18. Predicción de accesibilidad de superficie de epítomos de anticuerpos obtenida del análisis del IEDB.

Position	Residue	Start	End	Peptide	Score
57	F	50	65	ESAAEEAFRLSVFREN	1.019
58	R	51	66	SAAEEAFRLSVFRENL	0.485
59	L	52	67	AAEEAFRLSVFRENLF	0.314
60	S	53	68	AEEAFRLSVFRENLFL	0.256
61	V	54	69	EEAFRLSVFRENFLA	0.256
62	F	55	70	EAFRLSVFRENLFLAR	0.29
63	R	56	71	AFRLSVFRENLFLARL	0.138
64	E	57	72	FRLSVFRENLFLARLH	0.186
65	N	58	73	RLSVFRENLFLARLHA	0.217
66	L	59	74	LSVFRENLFLARLHAA	0.112
67	F	60	75	SVFRENLFLARLHAAA	0.137
68	L	61	76	VFRENLFLARLHAAAN	0.164
69	A	62	77	FRENLFLARLHAAANP	0.342
70	R	63	78	RENLFLARLHAAANPH	0.538
71	L	64	79	ENLFLARLHAAANPHA	0.277
72	H	65	80	NLFLARLHAAANPHAT	0.231
73	A	66	81	LFLARLHAAANPHATF	0.124
74	A	67	82	FLARLHAAANPHATFG	0.149
75	A	68	83	LARLHAAANPHATFGV	0.128
76	N	69	84	ARLHAAANPHATFGVT	0.224
77	P	70	85	RLHAAANPHATFGVTP	0.343
78	H	71	86	LHAAANPHATFGVTPF	0.152
79	A	72	87	HAAANPHATFGVTPFS	0.246
80	T	73	88	AAANPHATFGVTPFSD	0.302
81	F	74	89	AANPHATFGVTPFSDL	0.247
82	G	75	90	ANPHATFGVTPFSDLT	0.353
83	V	76	91	NPHATFGVTPFSDLTR	0.684
84	T	77	92	PHATFGVTPFSDLTRE	0.736
85	P	78	93	HATFGVTPFSDLTREE	0.825
86	F	79	94	ATFGVTPFSDLTREEF	0.525
87	S	80	95	TFGVTPFSDLTREEFR	1.017
88	D	81	96	FGVTPFSDLTREEFRS	0.945
89	L	82	97	GVTTPFSDLTREEFRSR	2.137
90	T	83	98	VTPFSDLTREEFRSRY	3.383
91	R	84	99	TPFSDLTREEFRSRYH	6.203
92	E	85	100	PFSDLTREEFRSRYHN	6.911
93	E	86	101	FSDLTREEFRSRYHNG	4.423
94	F	87	102	SDLTREEFRSRYHNGA	5.161
95	R	88	103	DLTREEFRSRYHNGAA	3.89
96	S	89	104	LTREEFRSRYHNGAAH	3.17
97	R	90	105	TREEFRSRYHNGAAHF	3.328
98	Y	91	106	REEFRSRYHNGAAHFA	2.33
99	H	92	107	EEFRSRYHNGAAHFAA	1.202
100	N	93	108	EFRSRYHNGAAHFAAA	0.701
101	G	94	109	FRSRYHNGAAHFAAAQ	0.701
102	A	95	110	RSRYHNGAAHFAAAQE	1.402
103	A	96	111	SRYHNGAAHFAAAQER	1.402

Tabla 19. Predicción de accesibilidad de superficie de epítomos de anticuerpos obtenida del análisis del IEDB

Position	Residue	Start	End	Peptide	Score
104	H	97	112	RYHNGAAHF ⁹⁷⁻¹¹² AAAQERA	1.057
105	F	98	113	YHNGAAHF ⁹⁸⁻¹¹³ AAAQERAR	1.057
106	A	99	114	HNGAAHF ⁹⁹⁻¹¹⁴ AAAQERARV	0.501
107	A	100	115	NGAAHF ¹⁰⁰⁻¹¹⁵ AAAQERARVP	0.569
108	A	101	116	GAAHF ¹⁰¹⁻¹¹⁶ AAAQERARVPV	0.263
109	Q	102	117	AAHF ¹⁰²⁻¹¹⁷ AAAQERARVPVK	0.531
110	E	103	118	AHF ¹⁰³⁻¹¹⁸ AAAQERARVPVKV	0.39
111	R	104	119	HFA ¹⁰⁴⁻¹¹⁹ AAAQERARVPVKVE	0.668
112	A	105	120	FAA ¹⁰⁵⁻¹²⁰ AQERARVPVKVEV	0.365
113	R	106	121	AAA ¹⁰⁶⁻¹²¹ QERARVPVKVEVV	0.312
114	V	107	122	AA ¹⁰⁷⁻¹²² QERARVPVKVEVVG	0.306
115	P	108	123	A ¹⁰⁸⁻¹²³ QERARVPVKVEVVGGA	0.306
116	V	109	124	Q ¹⁰⁹⁻¹²⁴ ERARVPVKVEVVGAP	0.468
117	K	110	125	ER ¹¹⁰⁻¹²⁵ ARVPVKVEVVGAPAA	0.273
118	V	111	126	R ¹¹¹⁻¹²⁶ ARVPVKVEVVGAPAAV	0.159
119	E	112	127	AR ¹¹²⁻¹²⁷ VPVKVEVVGAPAAVD	0.06
120	V	113	128	R ¹¹³⁻¹²⁸ VPVKVEVVGAPAAVDW	0.1
121	V	114	129	VP ¹¹⁴⁻¹²⁹ VKVEVVGAPAAVDWR	0.054
122	G	115	130	P ¹¹⁵⁻¹³⁰ VKVEVVGAPAAVDWRAR	0.141
123	A	116	131	V ¹¹⁶⁻¹³¹ KVEVVGAPAAVDWRARG	0.092
124	P	117	132	K ¹¹⁷⁻¹³² VEVVGAPAAVDWRARGAV	0.244
125	A	118	133	VE ¹¹⁸⁻¹³³ VVGAPAAVDWRARGAVT	0.121
126	A	119	134	EV ¹¹⁹⁻¹³⁴ VVGAPAAVDWRARGAVTA	0.164
127	V	120	135	V ¹²⁰⁻¹³⁵ VGAPAAVDWRARGAVTAV	0.07
128	D	121	136	V ¹²¹⁻¹³⁶ GAPAAVDWRARGAVTAVK	0.137
129	W	122	137	G ¹²²⁻¹³⁷ APAAVDWRARGAVTAVKD	0.186
130	R	123	138	AP ¹²³⁻¹³⁸ AAVDWRARGAVTAVKDG	0.14
131	A	124	139	PA ¹²⁴⁻¹³⁹ AVDWRARGAVTAVKDGQ	0.277
132	R	125	140	AA ¹²⁵⁻¹⁴⁰ VDWRARGAVTAVKDGQG	0.299
133	G	126	141	AV ¹²⁶⁻¹⁴¹ DWRARGAVTAVKDGQGC	0.512
134	A	127	142	VD ¹²⁷⁻¹⁴² WRARGAVTAVKDGQGC	0.502
135	V	128	143	DW ¹²⁸⁻¹⁴³ RARGAVTAVKDGQGC	1.171
136	T	129	144	WR ¹²⁹⁻¹⁴⁴ ARGAVTAVKDGQGC	0.376
137	A	130	145	RA ¹³⁰⁻¹⁴⁵ RGAVTAVKDGQGC	0.354
138	V	131	146	AR ¹³¹⁻¹⁴⁶ GAVTAVKDGQGC	0.242
139	K	132	147	RG ¹³²⁻¹⁴⁷ AVTAVKDGQGC	0.128
140	D	133	148	GA ¹³³⁻¹⁴⁸ VTAVKDGQGC	0.069
141	Q	134	149	AV ¹³⁴⁻¹⁴⁹ TAVKDGQGC	0.07
142	G	135	150	VT ¹³⁵⁻¹⁵⁰ AVKDGQGC	0.06
143	Q	136	151	TA ¹³⁶⁻¹⁵¹ VKDGQGC	0.109
144	C	137	152	AV ¹³⁷⁻¹⁵² KDGQGC	0.076
145	G	138	153	VK ¹³⁸⁻¹⁵³ DQGQCGSC	0.053
146	S	139	154	KD ¹³⁹⁻¹⁵⁴ QGQCGSC	0.071
147	C	140	155	DQ ¹⁴⁰⁻¹⁵⁵ GQCGSC	0.057
148	W	141	156	QG ¹⁴¹⁻¹⁵⁶ QCGSC	0.025
149	A	142	157	GQ ¹⁴²⁻¹⁵⁷ CGSC	0.025
150	F	143	158	QC ¹⁴³⁻¹⁵⁸ GSWAFSAIGNVEC	0.014

Tabla 20. Predicción de accesibilidad de superficie de epítomos de anticuerpos obtenida del análisis del IEDB

Position	Residue	Start	End	Peptide	Score
151	S	144	159	CGSCWAFSAIGNVECQ	0.014
152	A	145	160	GSCWAFSAIGNVECQW	0.027
153	I	146	161	SCWAFSAIGNVECQWF	0.023
154	G	147	162	CWAFSAIGNVECQWFL	0.014
155	N	148	163	WAFSAIGNVECQWFLA	0.027
156	V	149	164	AFSAIGNVECQWFLAG	0.026
157	E	150	165	FSAIGNVECQWFLAGH	0.034
158	C	151	166	SAIGNVECQWFLAGHP	0.062
159	Q	152	167	AIGNVECQWFLAGHPL	0.038
160	W	153	168	IGNVECQWFLAGHPLT	0.054
161	F	154	169	GNVECQWFLAGHPLTN	0.124
162	L	155	170	NVECQWFLAGHPLTNL	0.103
163	A	156	171	VECQWFLAGHPLTNLS	0.086
164	G	157	172	ECQWFLAGHPLTNLSE	0.201
165	H	158	173	CQWFLAGHPLTNLSEQ	0.201
166	P	159	174	QWFLAGHPLTNLSEQM	0.371
167	L	160	175	WFLAGHPLTNLSEQML	0.177
168	T	161	176	FLAGHPLTNLSEQMLV	0.125
169	N	162	177	LAGHPLTNLSEQMLVS	0.193
170	L	163	178	AGHPLTNLSEQMLVSC	0.126
171	S	164	179	GHPLTNLSEQMLVSCD	0.207
172	E	165	180	HPLTNLSEQMLVSCDK	0.419
173	Q	166	181	PLTNLSEQMLVSCDKT	0.445
174	M	167	182	LTNLSEQMLVSCDKTD	0.48
175	L	168	183	TNLSEQMLVSCDKTDS	0.78
176	V	169	184	NLSEQMLVSCDKTDSG	0.535
177	S	170	185	LSEQMLVSCDKTDSGC	0.178
178	C	171	186	SEQMLVSCDKTDSGCS	0.29
179	D	172	187	EQMLVSCDKTDSGCSG	0.214
180	K	173	188	QMLVSCDKTDSGCSGG	0.122
181	T	174	189	MLVSCDKTDSGCSGGL	0.058
182	D	175	190	LVSCDKTDSGCSGGLM	0.058
183	S	176	191	VSCDKTDSGCSGGLMN	0.114
184	G	177	192	SCDKTDSGCSGGLMNN	0.246
185	C	178	193	CDKTDSGCSGGLMNNA	0.186
186	S	179	194	DKTDSGCSGGLMNNAF	0.3
187	G	180	195	KTDSGCSGGLMNNAFE	0.311
188	G	181	196	TDSGCSGGLMNNAFEW	0.163
189	L	182	197	DSGCSGGLMNNAFEWI	0.079
190	M	183	198	SGCSGGLMNNAFEWIV	0.035
191	N	184	199	GCSGGLMNNAFEWIVQ	0.046
192	N	185	200	CSGGLMNNAFEWIVQE	0.08
193	A	186	201	SGGLMNNAFEWIVQEN	0.239
194	F	187	202	GGLMNNAFEWIVQENN	0.287
195	E	188	203	GLMNNAFEWIVQENNG	0.287
196	W	189	204	LMNNAFEWIVQENNGA	0.293
197	I	190	205	MNNAFEWIVQENNGAV	0.264

Tabla 21. Predicción de accesibilidad de superficie de epítomos de anticuerpos obtenida del análisis del IEDB

Position	Residue	Start	End	Peptide	Score
198	V	191	206	NNAFEWIVQENNGAVY	0.418
199	Q	192	207	NAFEWIVQENNGAVYT	0.375
200	E	193	208	AFEWIVQENNGAVYTE	0.404
201	N	194	209	FEWIVQENNGAVYTED	0.667
202	N	195	210	EWIVQENNGAVYTEDS	1.033
203	G	196	211	WIVQENNGAVYTEDSY	0.935
204	A	197	212	IVQENNGAVYTEDSYP	1.374
205	V	198	213	VQENNGAVYTEDSYPY	3.072
206	Y	199	214	QENNGAVYTEDSYPYA	4.181
207	T	200	215	ENNGAVYTEDSYPYAS	3.236
208	E	201	216	NNGAVYTEDSYPYASG	1.849
209	D	202	217	NGAVYTEDSYPYASGE	1.991
210	S	203	218	GAVYTEDSYPYASGEG	1.225
211	Y	204	219	AVYTEDSYPYASGEGI	0.868
212	P	205	220	VYTEDSYPYASGEGIS	1.151
213	Y	206	221	YTEDSYPYASGEGISP	2.399
214	A	207	222	TEDSYPYASGEGISPP	2.367
215	S	208	223	EDSYPYASGEGISPPC	0.879
216	G	209	224	DSYPYASGEGISPPCT	0.733
217	E	210	225	SYPYASGEGISPPCTT	0.633
218	G	211	226	YPYASGEGISPPCTTS	0.633
219	I	212	227	PYASGEGISPPCTTSG	0.4
220	S	213	228	YASGEGISPPCTTSGH	0.352
221	P	214	229	ASGEGISPPCTTSGHT	0.324
222	P	215	230	SGEGISPPCTTSGHTV	0.238
223	C	216	231	GEGISPPCTTSGHTVG	0.176
224	T	217	232	EGISPPCTTSGHTVGA	0.18
225	T	218	233	GISPPCTTSGHTVGAT	0.15
226	S	219	234	ISPPCTTSGHTVGATI	0.106
227	G	220	235	SPPCTTSGHTVGATIT	0.218
228	H	221	236	PPCTTSGHTVGATITG	0.161
229	T	222	237	PCTTSGHTVGATITGH	0.142
230	V	223	238	CTTSGHTVGATITGHV	0.068
231	G	224	239	TTSGHTVGATITGHVE	0.22
232	A	225	240	TSGHTVGATITGHVEL	0.126
233	T	226	241	SGHTVGATITGHVELP	0.135
234	I	227	242	GHTVGATITGHVELPQ	0.174
235	T	228	243	HTVGATITGHVELPQD	0.294
236	G	229	244	TVGATITGHVELPQDE	0.374
237	H	230	245	VGATITGHVELPQDEA	0.262
238	V	231	246	GATITGHVELPQDEAQ	0.61
239	E	232	247	ATITGHVELPQDEAQI	0.432
240	L	233	248	TITGHVELPQDEAQIA	0.432
241	P	234	249	ITGHVELPQDEAQIAA	0.303
242	Q	235	250	TGHVELPQDEAQIAAW	0.454
243	D	236	251	GHVELPQDEAQIAAWL	0.259
244	E	237	252	HVELPQDEAQIAAWLA	0.265

Tabla 22. Predicción de accesibilidad de superficie de epítomos de anticuerpos obtenida del análisis del IEDB

Position	Residue	Start	End	Peptide	Score
245	A	238	253	VELPQDEAQIAAWLAV	0.144
246	Q	239	254	ELPQDEAQIAAWLAVN	0.313
247	I	240	255	LPQDEAQIAAWLAVNG	0.179
248	A	241	256	PQDEAQIAAWLAVNGP	0.335
249	A	242	257	QDEAQIAAWLAVNGPV	0.161
250	W	243	258	DEAQIAAWLAVNGPVA	0.094
251	L	244	259	EAQIAAWLAVNGPVAV	0.042
252	A	245	260	AQIAAWLAVNGPVAVA	0.024
253	V	246	261	QIAAWLAVNGPVAVAV	0.018
254	N	247	262	IAAWLAVNGPVAVAVD	0.017
255	G	248	263	AAWLAVNGPVAVAVDA	0.025
256	P	249	264	AWLAVNGPVAVAVDAS	0.033
257	V	250	265	WLAVNGPVAVAVDASS	0.044
258	A	251	266	LAVNGPVAVAVDASSW	0.044
259	V	252	267	AVNGPVAVAVDASSWM	0.052
260	A	253	268	VNGPVAVAVDASSWMT	0.075
261	V	254	269	NGPVAVAVDASSWMTY	0.158
262	D	255	270	GPVAVAVDASSWMTYT	0.142
263	A	256	271	PVAVAVDASSWMTYTG	0.142
264	S	257	272	VAVAVDASSWMTYTTGG	0.091
265	S	258	273	AVAVDASSWMTYTTGGV	0.091
266	W	259	274	VAVDASSWMTYTTGGVM	0.089
267	M	260	275	AVDASSWMTYTTGGVMT	0.173
268	T	261	276	VDASSWMTYTTGGVMTS	0.23
269	Y	262	277	DASSWMTYTTGGVMTSC	0.166
270	T	263	278	ASSWMTYTTGGVMTSCV	0.074
271	G	264	279	SSWMTYTTGGVMTSCVS	0.098
272	G	265	280	SWMTYTTGGVMTSCVSE	0.126
273	V	266	281	WMTYTTGGVMTSCVSEQ	0.163
274	M	267	282	MTYTTGGVMTSCVSEQL	0.128
275	T	268	283	TYTTGGVMTSCVSEQLD	0.216
276	S	269	284	YTGGVMTSCVSEQLDHD	0.204
277	C	270	285	TGGVMTSCVSEQLDHG	0.129
278	V	271	286	GGVMTSCVSEQLDHGVL	0.066
279	S	272	287	GVMTSCVSEQLDHGVLL	0.055
280	E	273	288	VMTSCVSEQLDHGVLL	0.046
281	Q	274	289	MTSCVSEQLDHGVLLV	0.046
282	L	275	290	TSCVSEQLDHGVLLVVG	0.046
283	D	276	291	SCVSEQLDHGVLLVVG	0.05
284	H	277	292	CVSEQLDHGVLLVVGYN	0.06
285	G	278	293	VSEQLDHGVLLVVGYN	0.187
286	V	279	294	SEQLDHGVLLVVGYNDS	0.337
287	L	280	295	EQLDHGVLLVVGYNDSA	0.254
288	L	281	296	QLDHGVLLVVGYNDSAA	0.148
289	V	282	297	LDHGVLLVVGYNDSAAV	0.063
290	G	283	298	DHGVLLVVGYNDSAAVP	0.119
291	Y	284	299	HGVLLVVGYNDSAAVPY	0.112

Tabla 23. Predicción de accesibilidad de superficie de epítomos de anticuerpos obtenida del análisis del IEDB

Position	Residue	Start	End	Peptide	Score
292	N	285	300	GVLLVGYNDSAAVPYW	0.086
293	D	286	301	VLLVGYNDSAAVPYWI	0.061
294	S	287	302	LLVGYNDSAAVPYWII	0.058
295	A	288	303	LVGYNDSAAVPYWIIK	0.14
296	A	289	304	VGYNDSAAVPYWIIKN	0.273
297	V	290	305	GYNDSAAVPYWIIKNS	0.493
298	P	291	306	YNDSAAVPYWIIKNSW	0.524
299	Y	292	307	NDSAAVPYWIIKNSWT	0.482
300	W	293	308	DSAAVPYWIIKNSWTT	0.433
301	I	294	309	SAAVPYWIIKNSWTTQ	0.449
302	I	295	310	AAVPYWIIKNSWTTQW	0.352
303	K	296	311	AVPYWIIKNSWTTQWG	0.345
304	N	297	312	VPYWIIKNSWTTQWGE	0.592
305	S	298	313	PYWIIKNSWTTQWGEE	1.38
306	W	299	314	YWIIKNSWTTQWGEEG	0.883
307	T	300	315	WIIKNSWTTQWGEEGY	0.883
308	T	301	316	IIKNSWTTQWGEEGYI	0.589
309	Q	302	317	IKNSWTTQWGEEGYIR	1.645
310	W	303	318	KNSWTTQWGEEGYIRI	1.645
311	G	304	319	NSWTTQWGEEGYIRIA	0.831
312	E	305	320	SWTTQWGEEGYIRIAK	1.034
313	E	306	321	WTTQWGEEGYIRIAKG	0.763
314	G	307	322	TTQWGEEGYIRIAKGS	0.973
315	Y	308	323	TQWGEEGYIRIAKGSN	1.084
316	I	309	324	QWGEEGYIRIAKGSNQ	1.301
317	R	310	325	WGEEGYIRIAKGSNQC	0.403
318	I	311	326	GEEGYIRIAKGSNQCL	0.316
319	A	312	327	EEGYIRIAKGSNQCLV	0.237
320	K	313	328	EGYIRIAKGSNQCLVK	0.274
321	G	314	329	GYIRIAKGSNQCLVKE	0.274
322	S	315	330	YIRIAKGSNQCLVKEE	0.479
323	N	316	331	IRIAKGSNQCLVKEEA	0.309
324	Q	317	332	RIAKGSNQCLVKEEAS	0.59
325	C	318	333	IAKGSNQCLVKEEASS	0.404
326	L	319	334	AKGSNQCLVKEEASSA	0.582
327	V	320	335	KGSNQCLVKEEASSAV	0.427
328	K	321	336	GSNQCLVKEEASSAVV	0.159
329	E	322	337	SNQCLVKEEASSAVVG	0.159
330	E	323	338	NQCLVKEEASSAVVGG	0.117
331	A	324	339	QCLVKEEASSAVVGGP	0.113
332	S	325	340	CLVKEEASSAVVGGPG	0.064
333	S	326	341	LVKEEASSAVVGGPGP	0.186
334	A	327	342	VKEEASSAVVGGPGPT	0.325
335	V	328	343	KEEASSAVVGGPGPTP	0.677
336	V	329	344	EEASSAVVGGPGPTPE	0.586
337	G	330	345	EASSAVVGGPGPTPEP	0.523
338	G	331	346	ASSAVVGGPGPTPEPT	0.436

Tabla 24. Predicción de accesibilidad de superficie de epítomos de anticuerpos obtenida del análisis del IEDB

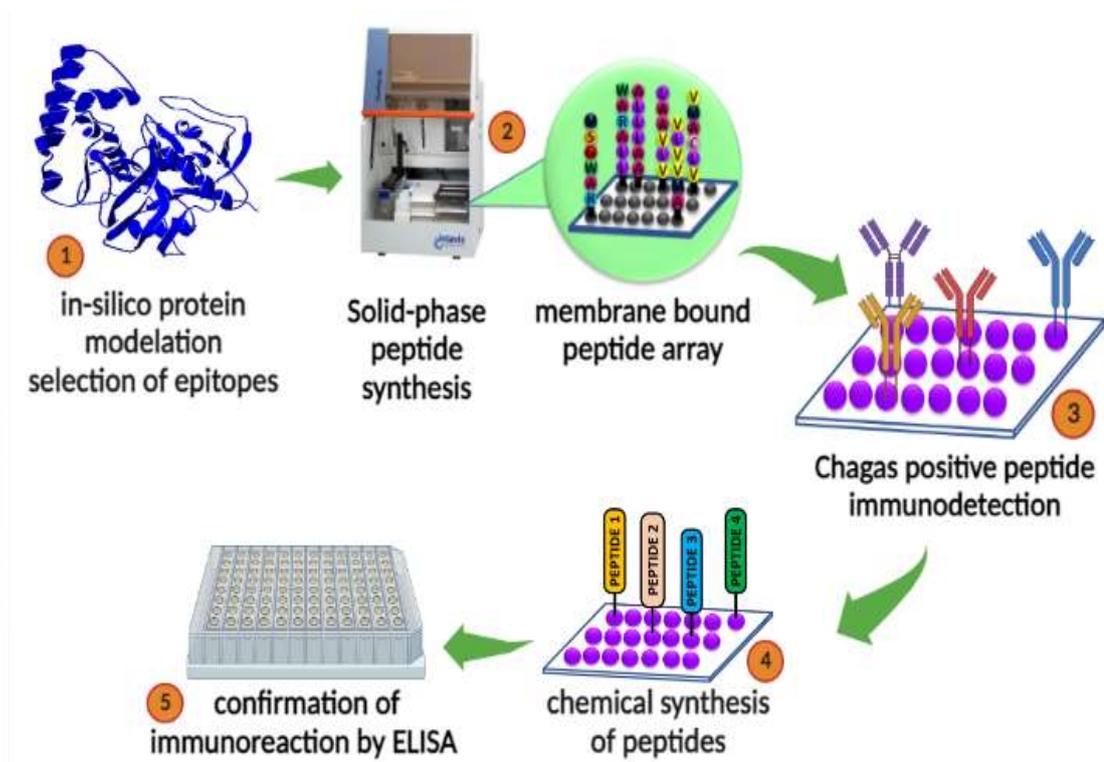
Position	Residue	Start	End	Peptide	Score
339	P	332	347	SSAVVGGPGPTPEPTT	0.623
340	G	333	348	SAVVGGPGPTPEPTTT	0.671
341	P	334	349	AVVGGPGPTPEPTTTT	0.723
342	T	335	350	VVGGPGPTPEPTTTTT	1.032
343	P	336	351	VGGPGPTPEPTTTTTT	2.007
344	E	337	352	GGPGPTPEPTTTTTTTS	3.624
345	P	338	353	GPGPTPEPTTTTTTTSA	3.7
346	T	339	354	PGPTPEPTTTTTTTSAP	5.781
347	T	340	355	GPTPEPTTTTTTTSAPG	3.7
348	T	341	356	PTPEPTTTTTTTSAPGP	5.781
349	T	342	357	TPEPTTTTTTTSAPGPS	5.01
350	T	343	358	PEPTTTTTTTSAPGSP	5.368
351	T	344	359	EPTTTTTTTSAPGSPS	4.652
352	S	345	360	PTTTTTTTSAPGSPSY	4.209
353	A	346	361	TTTTTTSAPGSPSYF	2.357
354	P	347	362	TTTTTSAPGSPSYFV	1.212
355	G	348	363	TTTTSAPGSPSYFVQ	1.455
356	P	349	364	TTTSAPGSPSYFVQM	0.997
357	S	350	365	TTSAPGSPSYFVQMS	0.926
358	P	351	366	TSAPGSPSYFVQMSC	0.344
359	S	352	367	SAPGSPSYFVQMST	0.344
360	Y	353	368	APGSPSYFVQMSTDA	0.429
361	F	354	369	PGSPSYFVQMSTDA	0.429
362	V	355	370	GSPSYFVQMSTDAAC	0.28
363	Q	356	371	PSPSYFVQMSTDAAC	0.152
364	M	357	372	SPSYFVQMSTDAACI	0.069
365	S	358	373	PSYFVQMSTDAACIV	0.038
366	C	359	374	SYFVQMSTDAACIVG	0.024
367	T	360	375	YFVQMSTDAACIVGC	0.01
368	D	361	376	FVQMSTDAACIVGCE	0.011
369	A	362	377	VQMSTDAACIVGCEN	0.02
370	A	363	378	QMSTDAACIVGCENV	0.02
371	C	364	379	MSCTDAACIVGCENV	0.017
372	I	365	380	SCTDAACIVGCENVTL	0.014
373	V	366	381	CTDAACIVGCENVTL	0.016
374	G	367	382	TDAACIVGCENVTLPT	0.043
375	C	368	383	DAACIVGCENVTLPTG	0.03
376	E	369	384	AACIVGCENVTLPTGQ	0.031
377	N	370	385	ACIVGCENVTLPTGQC	0.016
378	V	371	386	CIVGCENVTLPTGQCL	0.013
379	T	372	387	IVGCENVTLPTGQCLL	0.02
380	L	373	388	VGCENVTLPTGQCLLT	0.042
381	P	374	389	GCENVTLPTGQCLLTT	0.082
382	T	375	390	CENVTLPTGQCLLTTS	0.111
383	G	376	391	ENVTLPTGQCLLTSG	0.205
384	Q	377	392	NVTLPTGQCLLTSGV	0.088
385	C	378	393	VTLPTGQCLLTSGVS	0.073

Tabla 25. Predicción de accesibilidad de superficie de epítomos de anticuerpos obtenida del análisis del IEDB

Position	Residue	Start	End	Peptide	Score
386	L	379	394	TLPTGQCLLTSGVSA	0.1
387	L	380	395	LPTGQCLLTSGVSAI	0.048
388	T	381	396	PTGQCLLTSGVSAIV	0.044
389	T	382	397	TGQCLLTSGVSAIVT	0.041
390	S	383	398	GQCLLTSGVSAIVTC	0.015
391	G	384	399	QCLLTSGVSAIVTCG	0.015
392	V	385	400	CLLTSGVSAIVTCGA	0.009
393	S	386	401	LLTSGVSAIVTCGAE	0.028
394	A	387	402	LTSGVSAIVTCGAET	0.05
395	I	388	403	TTSGVSAIVTCGAETL	0.05
396	V	389	404	TSGVSAIVTCGAETLT	0.05
397	T	390	405	SGVSAIVTCGAETLTE	0.06
398	C	391	406	GVSAIVTCGAETLTEE	0.077
399	G	392	407	VSAIVTCGAETLTEEV	0.058
400	A	393	408	SAIVTCGAETLTEEVF	0.068
401	E	394	409	AIVTCGAETLTEEVFL	0.042
402	T	395	410	IVTCGAETLTEEVFLT	0.059
403	L	396	411	VTCGAETLTEEVFLTS	0.113
404	T	397	412	TCGAETLTEEVFLTST	0.221
405	E	398	413	CGAETLTEEVFLTSTH	0.208
406	E	399	414	GAETLTEEVFLTSTHC	0.208
407	V	400	415	AETLTEEVFLTSTHCS	0.282
408	F	401	416	ETLTEEVFLTSTHCSG	0.276
409	L	402	417	TLTEEVFLTSTHCSGP	0.246
410	T	403	418	LTEEVFLTSTHCSGPS	0.229
411	S	404	419	TEEVFLTSTHCSGPSV	0.206
412	T	405	420	EEVFLTSTHCSGPSVR	0.279
413	H	406	421	EVFLTSTHCSGPSVRS	0.216
414	C	407	422	VFLTSTHCSGPSVRSS	0.167
415	S	408	423	FLTSTHCSGPSVRSSV	0.167
416	G	409	424	LTSTHCSGPSVRSSVP	0.299
417	P	410	425	TSTHCSGPSVRSSVPL	0.299
418	S	411	426	STHCSGPSVRSSVPLN	0.333
419	V	412	427	THCSGPSVRSSVPLNK	0.497
420	R	413	428	HCSGPSVRSSVPLNKC	0.185
421	S	414	429	CSGPSVRSSVPLNKC	0.218
422	S	415	430	SGPSVRSSVPLNKCNR	0.797
423	V	416	431	GPSVRSSVPLNKCNR	0.49
424	P	417	432	PSVRSSVPLNKCNRLL	0.409
425	L	418	433	SVRSSVPLNKCNRLLR	0.518
426	N	419	434	VRSSVPLNKCNRLLRG	0.382
427	K	420	435	RSSVPLNKCNRLLRGS	0.69
428	C	421	436	SSVPLNKCNRLLRGS	0.356
429	N	422	437	SVPLNKCNRLLRGS	0.46
430	R	423	438	VPLNKCNRLLRGS	0.297
431	L	424	439	PLNKCNRLLRGS	0.347
432	L	425	440	LNKCNRLLRGS	0.12

Tabla 26. Predicción de accesibilidad de superficie de epítomos de anticuerpos obtenida del análisis del IEDB

Position	Residue	Start	End	Peptide	Score
433	R	426	441	NKCNRLLRGSAEFFCG	0.144
434	G	427	442	KCNRLLRGSAEFFCGS	0.12
435	S	428	443	CNRLLRGSAEFFCGSS	0.081
436	A	429	444	NRLLRGSAEFFCGSSS	0.201
437	E	430	445	RLLRGSAEFFCGSSSS	0.168
438	F	431	446	LLRGSAEFFCGSSSSG	0.085
439	F	432	447	LRGSAEFFCGSSSSGR	0.201
440	C	433	448	RGSAEFFCGSSSSGRL	0.201
441	G	434	449	GSAEFFCGSSSSGRLA	0.104
442	S	435	450	SAEFFCGSSSSGRLAD	0.175
443	S	436	451	AEFFCGSSSSGRLADV	0.097
444	S	437	452	EFFCGSSSSGRLADV	0.161
445	S	438	453	FFCGSSSSGRLADVDR	0.182
446	G	439	454	FCGSSSSGRLADVDRQ	0.363
447	R	440	455	CGSSSSGRLADVDRQR	0.821
448	L	441	456	GSSSSGRLADVDRQR	3.001
449	A	442	457	SSSSGRLADVDRQR	4.126
450	D	443	458	SSSGRLADVDRQR	5.332
451	V	444	459	SSGRLADVDRQR	6.152
452	D	445	460	SGRLADVDRQR	7.193
453	R	446	461	GRLADVDRQR	7.304
454	Q	447	462	RLADVDRQR	9.89
455	R	448	463	LADVDRQR	9.89
456	R	449	464	ADVDRQR	16.319
457	H	450	465	DVDRQR	31.639
458	Q	451	466	VDRQR	37.108
459	P	452	467	DRQR	41.231



Metodología utilizada para realizar la síntesis química de péptidos

	PROCEDURE OPERATOIRE	Code : PRO-LA-02 Révision : 00
	IMMUNODETECTION DES PEPTIDES SYNTHETISES SUR MEMBRANE SPOT	Date d'application : 10/05/2000 Page : 8 / 9

ANNEXE 1 : FICHE OPERATOIRE DE SUIVI DE LA MANIPULATION

IDENTIFICATION				
Date de la manipulation :				
Essai :				
Référence de la membrane utilisée :				
Anticorps :		Dilution :	Tampon de dilution :	
Conjugué AP :		Dilution :	Tampon de dilution :	
IMMUNODETECTION				
N° étape	Réactifs	N° de lot du réactif	Temps, température et conditions d'incubation	Nombre de répétitions
1	Tampon TBS		10 mn à température ambiante	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
2	Tampon de saturation		Une nuit à TA sous agitation	<input type="checkbox"/>
3	Tampon TBS-T		10 mn à TA sous agitation	<input type="checkbox"/>
4	Anticorps à tester		1h30mn à 37°C sous agitation	<input type="checkbox"/>
5	Tampon TBS-T		10 mn à TA sous agitation	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
6	Conjugué AP		1h à TA sous agitation	<input type="checkbox"/>
7	Tampon TBS-T		10 mn à TA sous agitation	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
8	Tampon CBS		10 mn à TA sous agitation	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
9	Substrat AP		De 1 à 30 mn sous agitation	<input type="checkbox"/>
10	Eau milli Q		3 lavages rapides sous agitation	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

REGENERATION				
N° étape	Réactifs	N° de lot du réactif	Temps, température et conditions d'incubation	Nombre de répétitions
11	DMF		10 mn à TA sous agitation	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
12	Eau milli Q		2 mn à TA sous agitation	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
13	Regen A + β-mercapto-éthanol (500 µl / 500 ml)		10 mn à TA sous agitation	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
14	Regen B		10 mn à TA sous agitation	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
15	Méthanol		10 mn à TA sous agitation	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

Sécher la membrane ou recommencer l'expérience d'immunodétection en changeant de bac, à l'étape 1.

PROTOCOLO PARA ELISA

1. SENSIBILIZAR

- Diseñar la placa
- Número de pocillos/suero *T. cruzi*.
- Tampón de recubrimiento o coating buffer
- Colocar 100 ul/pocillo
- Incubar over night en refrigeración 4 °C

2. BLOQUEO (leche 3% o caseína 2% en PBS-T 0,05 %)

- Lavado 3X (PBS- T 0,05 %)
- Colocar 100 ul/pocillo de solución de bloqueo
- Incubar 37 °C durante 1 hora.

3. SUERO

- Lavar 3x (PBS-T 0,05%)
- Suero diluido en buffer de incubación.
- Aplicar suero ejemplo: 1 pocillo 200 ul, otros pocillos 100 ul de buffer de incubación y dilución seriada.
- Incubar 37 °C durante 1 hora.

4. CONJUGADO

- Lavar 3x.
- Conocer a dilución del conjugado
- Diluir el conjugado en buffer de incubación
- Colocar 100 ul/pocillo
- Incubar 37 °C durante 1 hora

5. REVELACIÓN

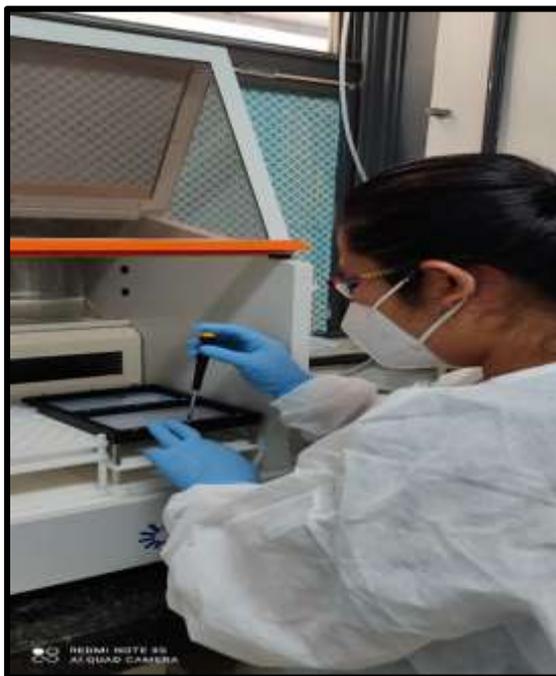
- Lavar 3X
- Sustrato (10 ml de tampón citrato + 2 mg de OPD +2 ul de H₂O₂)
- Colocar 100 ul/pocillo
- Incubar 30 min en la oscuridad
- Detener la reacción con H₂SO₄ (1:20), 25 ul/pocillo
- Lectura a 492 nm



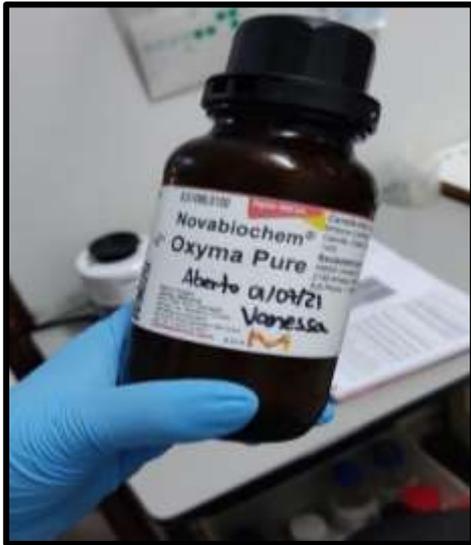
Equipo de Spot Síntesis de UFMG-Brasil



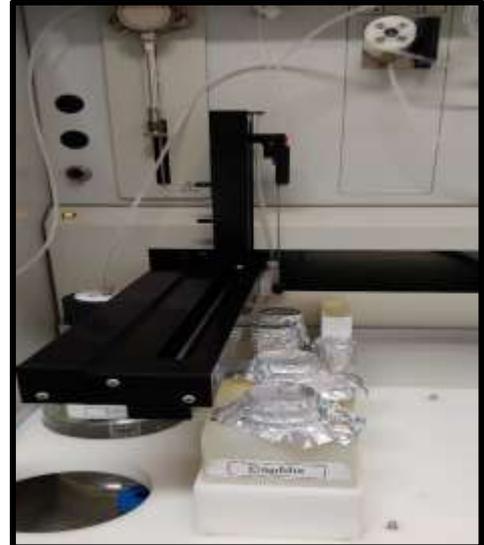
Equipo de Spot Síntesis de la UNTRM



Colocación de la membrana en el Sintetizador para el procedimiento



Verificación de cada uno de los reactivos



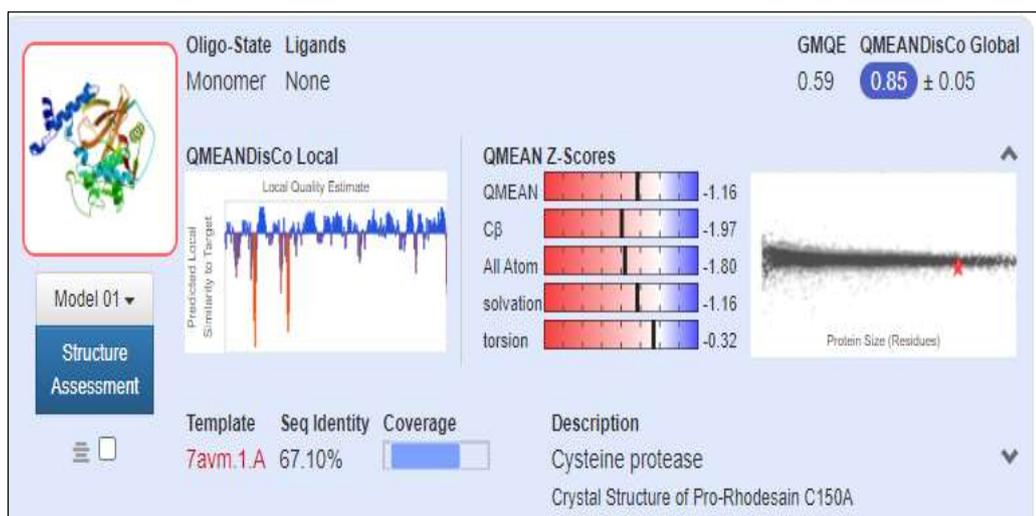
Verificación del brazo robótico



Obtención del péptido sintético



Pruebas de péptidos en las placas ELISA



Resultados de la homologación de la cisteína proteasa

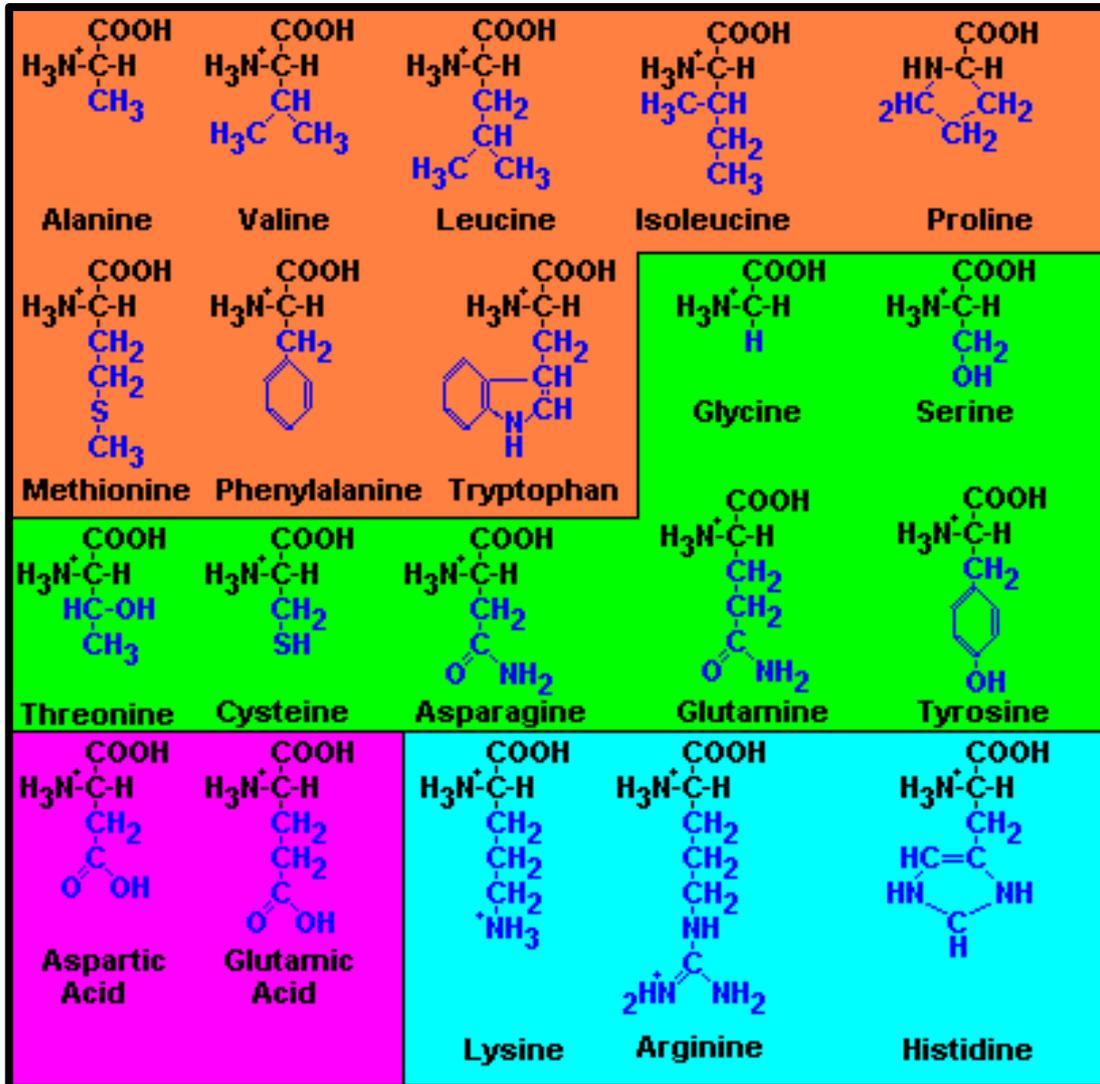


Figura: 20 aminoácidos y sus estructuras

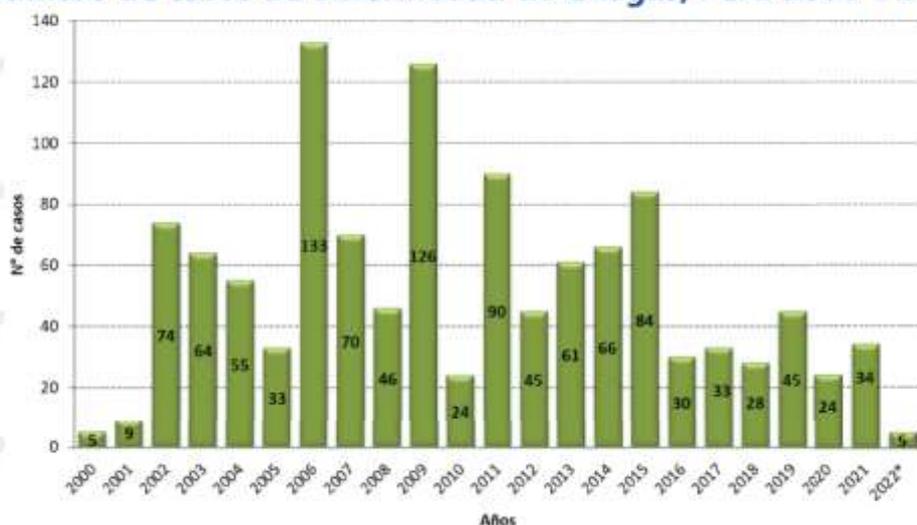
color marrón : aminoácidos hidrófobos

color verde : aminoácidos polares

color fucsia : aminoácidos ácidos

color turquesa : aminoácidos básicos

Número de casos de enfermedad de Chagas, Perú 2000 – 2022*



Fuente: Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades – MINSA. (*) Hasta la SE 06 – 2022.

Número de casos de Enfermedades de Chagas según departamentos Perú 2018-2023 *

DEPARTAMENTOS	Casos acumulados						Corte Hasta la SE 26					
	2018	2019	2020	2021	2022	2023*	2018	2019	2020	2021	2022	2023*
AMAZONAS	1	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
ANCASH	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
APURIMAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AREQUIPA	9	23	10	19	16	9	5	12	4	4	11	9
AYACUCHO	2	1	3	1	4	2	2	0	2	1	3	2
CAJAMARCA	3	1	2	0	0	1	0	1	1	0	0	1
CALLAO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CUSCO	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
HUANCAVELICA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HUANUCO	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
ICA	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
JUNIN	0	0	0	2	1	1	0	0	0	1	0	1
LA LIBERTAD	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
LAMBAYEQUE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIMA	1	0	0	0	2	3	1	0	0	0	2	3
LORETO	3	3	1	0	0	2	2	3	1	0	0	2
MADRE DE DIOS	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
MOQUEGUA	0	1	1	4	5	3	0	0	1	0	2	3
PASCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PIURA	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1
PUNO	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
SAN MARTIN	3	5	0	1	4	4	2	2	0	0	2	4
TACNA	0	3	2	0	2	0	0	1	2	0	2	0
TUMBES	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UCAYALI	3	3	3	0	0	2	3	1	3	0	0	2
Perú	28	45	24	29	36	30	16	24	16	7	24	30

Fuente: Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y control de Enfermedades-MINSA (*) Hasta la SE 26-2023.