

Búsqueda de Epítomos de Chikungunya para Inmunodiagnóstico

Search of Chikungunya Epitopes for Immunodiagnosis

Miguel Medina Gómez*,

Instituto Politécnico Nacional - Escuela Superior de Medicina
Laboratorio de Medicina de Conservación (ESM), México
gbpmiguelmig@gmail.com

Jazmín García Machorro,

Instituto Politécnico Nacional - Escuela Superior de Medicina
Laboratorio de Medicina de Conservación (ESM), México
jazzgama@hotmail.com

José Correa Basurto,

Instituto Politécnico Nacional - Escuela Superior de Medicina
Laboratorio de Medicina de Conservación (ESM), México
josecorreabasurto@hotmail.com

Recibido 09, agosto 2019

Aceptado 12, octubre 2020

Resumen

El presente estudio fue realizado durante un año y medio, con el objetivo de la obtención de péptidos a partir de las proteínas estructurales y no estructurales de Chikungunya (CHIKv), que funcionarán como epítomos para células B, para el futuro desarrollo de un método de diagnóstico serológico específico de CHIKv. Mediante el uso de 1,320 secuencias publicadas en NCBI de las proteínas de CHIKv, se construyeron secuencias consenso de cada proteína estructural y no estructural del virus. Con la finalidad de detectar similitudes y futuras reacciones cruzadas entre las proteínas de los virus CHIKv, DENV y ZIKv se realizaron alineamientos con las secuencias consenso de las proteínas de los virus. A partir de los alineamientos anteriores, fueron seleccionados aquellos péptidos que no presentaron similitud con alguna proteína de los flavivirus (DENV o ZIKv) para posteriormente determinar su actividad antigénica mediante el servidor EMBOSS antigenic, Bepirpred y Bcell Epitope. Se obtuvieron un total de 13 péptidos de CHIKv que no se encuentran en las proteínas de los flavivirus DENV y ZIKv, se seleccionaron aquellos que se detectaron por dos o más programas bioinformáticos (Clustal W, T-Coffe o MUSCLE). A partir de las regiones antigénicas de las proteínas de CHIKv determinadas con EMBOSS antigenic, Bepirpred y Bcell Epitope se buscaron los péptidos específicos seleccionados, obteniendo un total de 13 epítomos que coincidían con estas regiones antigénicas de los cuales 6 fueron de las proteínas estructurales, 3 para E1 y 3 para E2. Los 7 restantes fueron de las proteínas no estructurales del virus. Con base a los resultados obtenidos, los péptidos obtenidos a partir de las proteínas E2 y E1 son los candidatos más fuertes para ser utilizados en el futuro desarrollo de un método de diagnóstico serológico específico de CHIKv ya que no presentan secuencias cruzadas con las proteínas de DENV ni ZIKv.

Palabras clave: Chikungunya Virus (CHIKv), Dengue Virus (DENV), Zika Virus (ZIKv), Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), Base de Datos de Epítomos Inmunes (IEBD), Múltiples Péptidos Antigénicos (MAPs).

JEL Classification System: C9; **Mathematics Subject Classification (2020):** 62P20

Abstract

The present study was carried out for a year and a half, with the aim of obtaining peptides from the structural and non-structural proteins of Chikungunya (CHIKv), which functioned as epitopes for B cells, for the future development of a method of serological diagnosis specific to CHIKv. By using 1,320 sequences published in NCBI of the CHIKv proteins, consensus sequences of each structural and non-structural protein of the virus were constructed. To detect similarities and future cross-reactions between the proteins of the CHIKv, DENV and ZIKv viruses, alignments were made with the consensus sequences of the virus proteins. From the previous alignments, those peptides that did not show similarity with some flavivirus protein (DENV or ZIKv) were selected to subsequently determine their antigenic activity through the EMBOSS antigenic, Bepirpred and Bcell Epitope server. A total of 13 peptides of CHIKv were obtained that are not found in flavivirus proteins DENV and ZIKv, those that were detected by two or more bioinformatic programs (Clustal W, T-Coffe or MUSCLE) were selected. From the antigenic regions of the proteins of CHIKv determined with EMBOSS antigenic, Bepirpred and Bcell Epitope the specific peptides selected were searched, obtaining a total of 13 epitopes that coincided with these antigenic regions of which 6 were of the structural proteins, 3 for E1 and 3 for E2. The remaining 7 were from the non-structural proteins of the virus. Based on the results obtained, the peptides obtained from the E2 and E1 proteins are the strongest candidates to be used in the future development of a specific serological diagnostic method of CHIKv since they do not present sequences crossed with the DENV or ZIKv proteins.

Keywords: Chikungunya Virus (CHIKv), Dengue Virus (DENV), Zika Virus (ZIKv), National Center for Biotechnology Information (NCBI), Immune Epitope Database (IEBD), Multiple Antigenic Peptides (MAPs).

1. INTRODUCCIÓN

La palabra Chikungunya deriva del Makonde una lengua hablada en el sur de Tanzania y que significa “enfermedad del hombre encorvado” refiriéndose a la postura que toman los pacientes por el característico dolor articular producido por la infección. La fiebre de Chikungunya es una enfermedad caracterizada por fiebre, dolor de cabeza, náuseas, vomito, mialgia y artralgia, producida por el virus **Chikungunya (CHIKv)**(Cardenas-Marrufo & Arias-León, 2015)).

Chikungunya en el mundo

El primer caso conocido fue en 1952 en Tanzania a partir de éste se presentaron otros brotes en varios países de África. En el año 2004 un brote originado en las costas de Kenia inició la propagación del virus a la India con más de 1.93 millones de casos a finales del 2006 (Lo Presti et al., 2012).

En septiembre del 2007 la propagación del virus en Europa tomó mayor importancia tras la detección del primer caso autóctono (con una transmisión humano-mosquito-humano). El 6 de septiembre de ese mismo año el Ministerio de Salud Italiana confirmó un brote del virus en su país, con 160 casos y un anciano de 83 años fallecido. Para 2010 se presentaron 200 casos autóctonos en el sureste de Francia(Grandadam et al., 2011).

En diciembre del 2013 la OMS reportó los 10 primeros casos autóctonos de Chikungunya en el continente Americano, en la isla caribeña de San Martín Puerto Rico(Miembros, Martín, Maarten, Unidos, & Lanka, 2013). Hasta mayo del 2014 se presentaron un total de 103,018 casos sospechosos y 4,406 casos confirmados provenientes de República Dominicana, Martinica, Guadalupe, Haití y San Martín.

Para la décima semana del 2015 la OPS y la OMS confirmaron 25,400 y 183 defunciones en el continente americano (Cdc, 2014) (Figura 1).

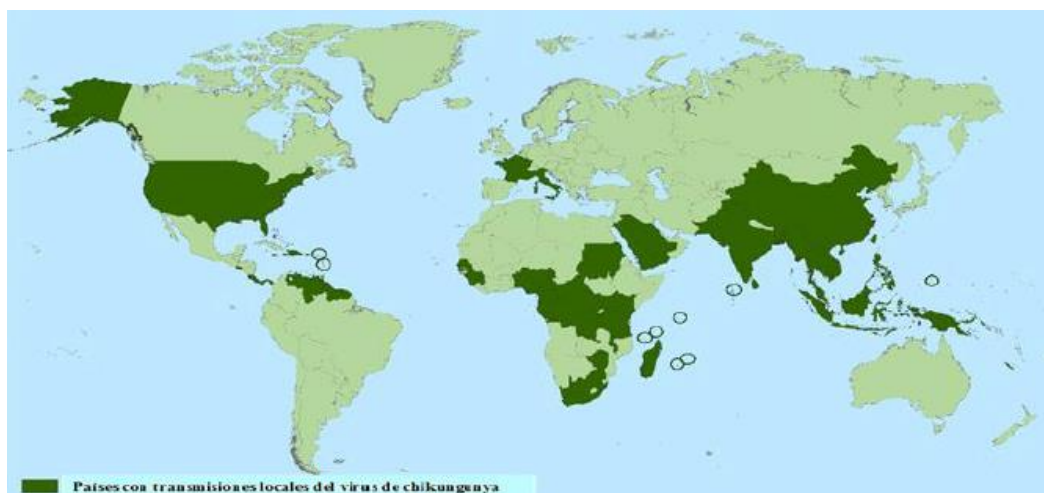


Figura 1.- Países y territorios con reportes de casos autóctonos de Chikungunya hasta el 12 de agosto del 2014, no se incluyen lugares con casos importados de Chikungunya (CDC & Organización Panamericana de la, 2011).

Chikungunya en México

El primer caso de Chikungunya en México se presentó en una mujer de 39 años procedente del Caribe. A su arribo a la Ciudad de México, refirió el inicio de la sintomatología con fiebre, escalofríos, malestar y debilidad generalizada, cefalea, mialgias y artralgias con dolores articulares muy intensos. A partir de la sintomatología y de los antecedentes epidemiológicos se realizó un diagnóstico empírico dando como resultados infección por virus de Chikungunya o Dengue. La confirmación diagnóstica de Chikungunya la realizó el IndRE (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos), mediante la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction). A partir de esta fecha se presentaron brotes importantes en diferentes estados de la república, hasta diciembre del 2018 el SINAVE reportó 9,375 casos confirmados de infección por el virus Chikungunya, Guerrero encabeza la lista con 1,620 casos confirmados (Tabla 1).

Tabla 1.- Casos conformados de Fiebre Chikungunya hasta diciembre 2018.

Estado	Número de casos confirmados
Guerrero	1,620
Michoacán	1,548
Veracruz	1,203
Oaxaca	1,151
Yucatán	1,131
Colima	956
Chiapas	661
Morelos	412
Campeche	171
Jalisco	114
Quintana Roo	90

Baja California Sur	69
Sonora	49
Estado de México	46
Nayarit	38
Sinaloa	36
Tabasco	35
Coahuila	21
Nuevo león	11
Tamaulipas	4
Guanajuato	2

Nota: * tomado de la plataforma oficial CENAVECE (diciembre 2018).

Generalidades del virus

CHIKV es un alfavirus perteneciente a la familia **Togaviridae**. Es esférico y pequeño de alrededor de 60-70 nm de diámetro (Figura 2), envuelto con un genoma de 11.8 kb constituido de una hebra simple de ARN (Acido Ribo Nucleico) de polaridad positiva, compuesto de dos marcos de lectura, el primero codifica para una poliproteína precursora de 4 proteínas no estructurales (**NSP1, NSP2, NSP3 y NSP4**) con participación en la replicación del genoma viral. El segundo codifica para una poli proteína precursora de proteínas estructurales(**C, E1, E2 y E3**) (Figura3)(Bleijs, 2016)(Casal et al., 2015).



Figura 2.- Esquema y fotografía por microscopía electrónica del virus de CHIKV(Bleijs, 2016).

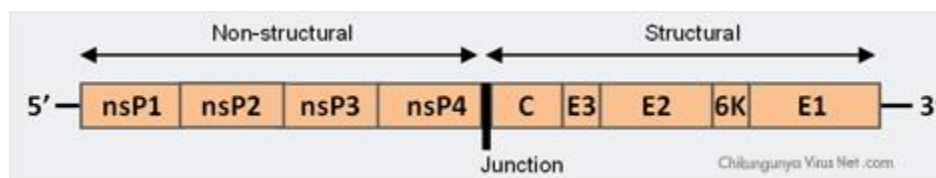


Figura 3.- Estructura del genoma de virus Chikungunya (CHIKV)(Casal et al., 2015).

Estructura viral.

Chikungunya posee una envoltura fosfolipídica donde se encuentran ancladas las glicoproteínas estructurales E1 y E2 formando 80 espigas triméricas, cada una compuesta por tres heterodímeros de glicoproteínas E1/E2 que son proteínas transmembranales con regiones citoplasmáticas C-terminales que interactúan con la núcleo cápside la cual tiene una forma icosaédrica compuesta por 240 monómeros de proteínas de cápside C y una cadena de RNA(Fernández & Navarro, 2015) (Figura 4). Las glicoproteínas E1 y E2 están involucradas en la mediación de la fusión e interacción con los

receptores del hospedero durante la infección, ya que la penetración celular esta mediada por la posterior acidificación en las endosomas que lleva a la activación de E1 produciendo la fusión viral interacción de E2 con el receptor celular aún desconocido, seguida de la endocitosis del virus y una

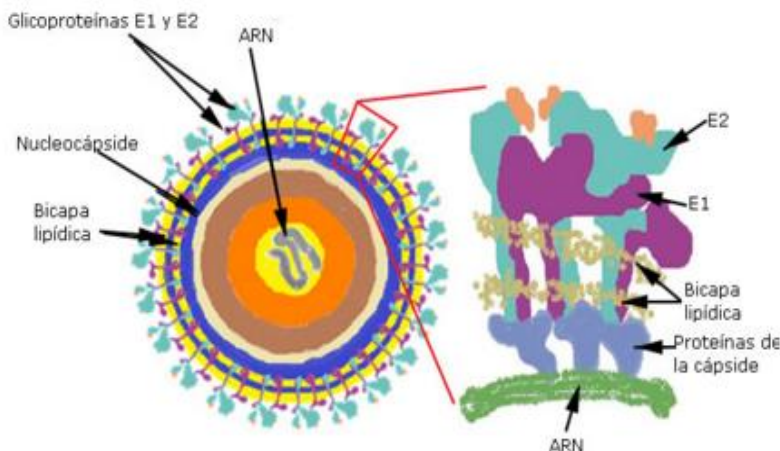


Figura 4.- Vista transversal de virus Chikungunya. En el centro se encuentra la nucleocápside que contiene el RNA. En la superficie esta la envoltura junto la membrana bilipídica y las glicoproteínas E1 y E2. A la derecha se observan las espículas de las glicoproteínas con sus dominios transmembranales que interactúan con la nucleocápside (Fernández & Navarro, 2015).

Manifestaciones Clínicas

Posterior a la picadura del mosquito del género *Aedes* infectado con el virus, se produce un periodo de incubación que va de tres a siete días. La enfermedad se desarrolla de forma aguda, subaguda y crónica sin presentar preferencias por sexo, edad o región.

Fase Aguda:

Se caracteriza por una triada de síntomas constituida por fiebre abrupta con temperatura superior a los 39 °C, artralgias y erupción cutánea y otros síntomas asociados como cefalea, mialgias, fatigas, escalofríos, náuseas, vómitos, dolor de espalda y conjuntivitis.

Fase subaguda:

La mayoría de los pacientes presenta una mejoría clínica a los 10 días, sin embargo, a los dos o tres meses los síntomas pueden reaparecer, se presenta la persistencia de la artritis la cual puede permanecer por cuatro a ocho semanas.

Fase crónica:

La fase crónica se caracteriza por que los síntomas permanecen por un tiempo mayor a tres meses presentando como síntoma más frecuente la artralgia persistente que produce un deterioro de la calidad de vida ya que impide ciertas actividades diarias (Eugenia, 2015) (Figura 5).

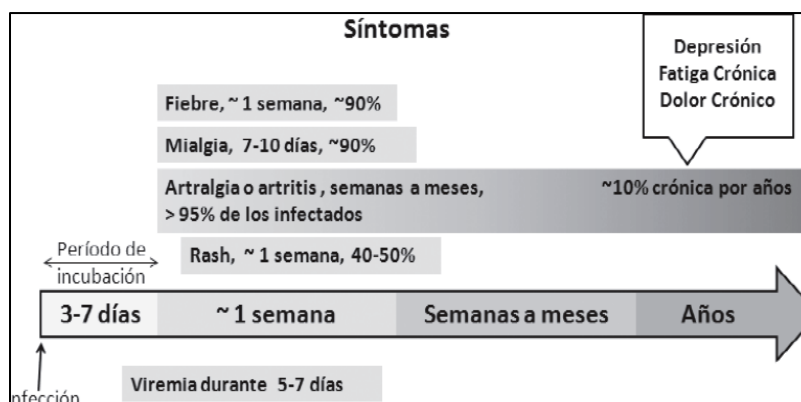


Figura 5.- Transcurso de la fiebre de Chikungunya. Se muestra el transcurso típico de la enfermedad a través de los días, así como los principales síntomas que se presentan a lo largo de la enfermedad (Eugenia, 2015).

Respuesta Inmunitaria

La infección inicial induce una respuesta de monocitos y macrófagos en nódulos linfáticos, donde también se encuentra replicándose el virus y donde estos monocitos y macrófagos se ven infectados de forma masiva, por lo cual se considera a los monocitos y macrófagos como “caballos de Troya” que ayudan a la diseminación del virus (Wauquier et al., 2011). La infección por el virus parece inducir inmunidad protectora contra posibles reinfecciones (Staples & Fischer, 2014).

Diagnóstico

El diagnóstico presuntivo de un caso sospechoso se realiza con base a los signos y síntomas clínicos cuando se presenta una fiebre mayor de 38 °C y que reside o ha visitado áreas epidémicas o endémicas, mientras la confirmación se realiza mediante pruebas de laboratorio como aislamiento el cual se puede realizar mediante cultivo celular en células C6/36 y VERO a partir de muestras de suero, RT-PCR solo durante la fase inicial de la viremia de cinco a diez días después de iniciada la sintomatología o pruebas serológicas basadas en la detección de IgM que aparecen en suero a partir del cuarto día de la aparición de los síntomas y detección de IgG a partir del séptimo día (Panning et al., 2009), (Hasebe et al., 2002), (Barba Evia, 2015) (Figura 6).

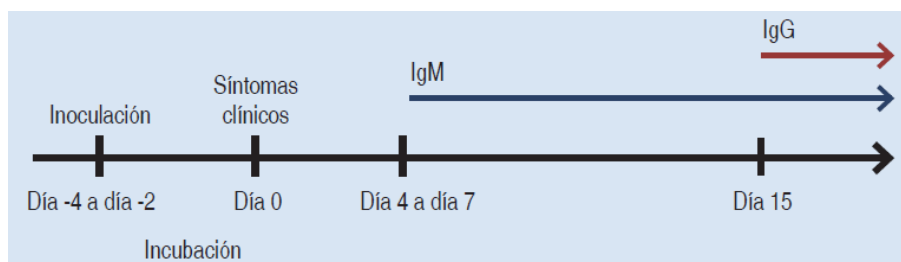


Figura 6.- Detección de IgM e IgG en pacientes infectados con el virus Chikungunya. Se muestran los días en los que son detectables las inmunoglobulinas G y M después de la aparición de los síntomas (Barba Evia, 2015).

Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial se realiza contra los Flavivirus DENV y ZIKV por dos consideraciones importantes, es transmitido por el mismo vector y presentar sintomatología parecida. Existen dos sintomatologías relevantes para su diferenciación; las artralgias tienden a ser predominantes en infecciones por CHIKV y en infecciones por dengue se presenta una trombocitopenia mucho más marcada, así como manifestaciones hemorrágicas. Se presentan más síntomas que pueden ayudar a la diferenciación las cuales se enlistan en la Tabla 2.

Tabla 2.- Comparación de los síntomas presentados en las fiebres de Chikungunya, Dengue y Zika.

Chikungunya	Dengue	Zika
Síntomas aparecen 3-7 días después de la picadura	Síntomas aparecen 5-8 días después de la picadura	Síntomas aparecen 3-12 días después de la picadura
Fiebre mayor a 39 °C	Fiebre mayor a 40 °C	Fiebre mayor a 40 °C
Dolor de cabeza	Dolor intenso de cabeza	Dolor de cabeza
Dolores musculares	Dolores musculares	Dolores musculares
Fuertes dolores Articulares	Dolores Articulares	Conjuntivitis purulenta
Malestar general	Malestar general	Artritis o artralgia
Nauseas	Vómitos	Vómitos
Manchas rojas o puntos purpura en la piel	Parches de sangre bajo la piel	Erupciones en la piel con puntos rojos
Inflamación de articulaciones	Disminución del apetito	Falta de apetito

Tratamiento

Hasta la fecha no existen medicamentos específicos que actúen contra el virus, sin embargo, los pacientes son tratados con medicamentos para aliviar los síntomas, como antiinflamatorios no esteroideos (AINES) para disminuir el dolor articular, uso de acetaminofén o paracetamol para el alivio de dolores y fiebres. El uso de la ribavirina a pacientes por dos semanas después de la infección inicial, dan resolución a las alteraciones articulares (Parashar & Cherian, 2014).

Bioinformática

Es un área que se ocupa de la aplicación de la recopilación, almacenamiento, organización, análisis, manipulación, presentación y distribución de la información relativa a datos biológicos de algunas macromoléculas como el DNA, RNA y proteínas.

La bioinformática ha sido utilizada para el estudio y análisis del DNA y proteínas de algunos organismos con el objetivo de obtener tanto vacunas como métodos de diagnóstico.

Lo anterior se ha logrado para otros organismos mediante la predicción de epítomos para células B y T, con diferentes programas que realizan la predicción de epítomos de células B, estos son clasificados de acuerdo con el tipo de epítomos que predicen:

1. Epítomo Conformacional o discontinuo: Constituido por secuencias de aminoácidos continuos o discontinuos y distantes, que se aproximan entre sí debido al plegamiento o conformación tridimensional del antígeno (Bertha & Robledo, 2009).
 - a. ElliPro
 - b. Bepi
 - c. DscoTope
 - d. SEPPA
2. Epítomo Lineal o continuo: Formado por secuencias de aminoácidos continuos y contiguos (Bertha & Robledo, 2009).
 - a. BepiPred
 - b. BcePred
 - c. ABCpred
 - d. BCpreds

El epítipo predicho por el programa debe superar un valor de corte que varía dependiendo del programa utilizado, el epítipo debe cumplir con ciertos criterios como estar expuesto y conocer la secuencia aminoacídica

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se trata de un estudio no experimental, transeccional, descriptivo.

1. Material

- Equipo de cómputo con sistema operativo Windows 10Pro de 64 Bits, procesador Intel Pentium Dual CPU T3400
- Equipo de cómputo con sistema operativo Linux de 64 Bits, procesador Intel Pentium Dual CPU T3400
- Programa Bioinformático MEGA versión 7
- Programa Bioinformático Clustal W versión 2015
- Programa Bioinformático MUSCLE versión 2014
- Programa Bioinformático T-Coffe versión 2016
- Base de datos GenBank del NCBI
- Base de datos IEBD

2. Métodos

Diagrama general de trabajo.

La Figura 7 muestra el diagrama general de trabajo.

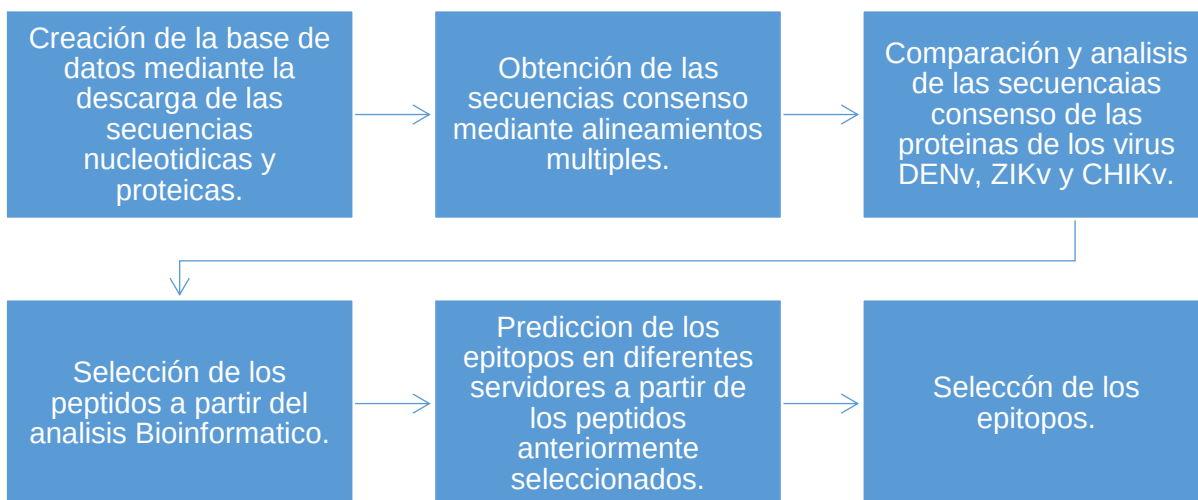


Figura 7.- Diagrama general de trabajo.

2.1 Obtención de base de datos a partir de secuencias reportadas.

Se buscaron aquellas secuencias nucleotídicas codificantes para las proteínas estructurales y no estructurales de los virus CHIKV, DENV y ZIKV, en la base de datos del GeneBank del servidor NCBI y se descargaron en paquetes en formato FASTA. Posteriormente las secuencias nucleotídicas fueron traducidas a la secuencia proteica.

2.2 Obtención de las secuencias consenso

A partir de la base de datos construida anteriormente (secuencias nucleotídicas y proteicas) se realizaron alineamientos múltiples en el programa MEGA 7 utilizando los parámetros establecidos por el programa, para evitar errores en los alineamientos debido a secuencias incompletas, se realizó una depuración de aquellas secuencias cuyo tamaño era mayor al promedio de las secuencias restantes. Al finalizar los alineamientos el paquete se guardó en formato FASTA con todas las secuencias alineadas y ordenadas, éste último fue ingresado en el servidor EMBOSS cons (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/cons>) para obtener una secuencia consenso nucleotídica y proteica para cada proteína estructural y no estructural de cada virus.

2.3 Alineamiento de las secuencias de las proteínas de CHIKv, DENV y ZIKv

Con las secuencias consenso de las proteínas que constituyen a CHIKv, DENV y ZIKv se realizaron nuevos alineamientos entre las secuencias consenso de las proteínas de los 3 serotipos de DENV y las proteínas de CHIKv, tomando como secuencias base las secuencias consenso de Zika y los 3 serotipos de DENV y como secuencia problema o secuencia en estudio cada una de las secuencias de las proteínas de CHIKv. Cada alineamiento se realizó por triplicado en diferentes programas bioinformáticos Clustal W, MUSCLE y T-Coffe, con el objetivo de darle robustez y una validación más amplia a los alineamientos. Se omitió el serotipo 4 de DENV debido a que no fue posible realizar un correcto alineamiento de este con los serotipos 1, 2 y 3 del mismo virus y tampoco con las secuencias de CHIKv.

2.4 Selección de los péptidos

Se obtuvieron péptidos de CHIKv que alinearon con alguna secuencia de DENV o ZIKv, fueron seleccionados aquellos que cumplieran con el primer criterio de selección: **ser detectados cuando menos por 2 o 3 programas**, ya que como se mencionó en el apartado anterior se busca una mayor veracidad en los resultados obtenidos.

A estos péptidos se les asignó un valor de porcentaje (%) de similitud basado en el tamaño de la secuencia de DENV o ZIKv con la que alinee con el péptido de CHIKv y el número de aminoácidos coincidentes, como se muestra a continuación:

Péptido CHIKv: RSMGEEPNYQEEVW **Aminoácidos coincidentes:** 2

Secuencia DENV: VRNPLSRNSTHEMYWV **Largo:** 16 Aminoácidos

16aa-----→100%
2aa-----→ X = 12.50 %

De estos últimos péptidos y con base en el porcentaje de similitud se seleccionaron aquellos que cumplieran con el segundo criterio de selección: **Presentar un porcentaje de similitud menor al 25%**. (El valor del 25% fue asignado de manera arbitraria tomando en cuenta los menores porcentajes de similitud de todos los péptidos).

2.5 Predicción de epítomos

A partir de las secuencias consenso de cada una de las proteínas de CHIKv (obtenidas en los alineamientos iniciales), se realizó la predicción de epítomos tipo lineal para células B con el empleo de tres diferentes servidores. Fueron empleados tres diferentes predictores de epítomos de tipo lineal para células B los cuales fueron **EMBOSS antigenic** (www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/antigenic), **Bepipred** (www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/) y el **Bcell Epitope Prediction** del Immune Epitope Prediction (tools.immuneepitope.org/bcell/). La secuencia proteica de cada proteína fue ingresada de manera individual en cada uno de los tres servidores utilizando los criterios de base sugeridos por cada uno de los servidores.

2.6 Selección de epítomos

Los tres servidores anteriores mostraron las regiones de las proteínas de CHIKv más factibles a formar parte de un epítomo, fueron tomadas en cuenta aquellas regiones que cuanto menos aparecieran en dos de los tres servidores. En estas regiones se buscaron aquellos péptidos obtenidos en el punto 2.4 seleccionando aquellos péptidos con un porcentaje de similitud bajo con alguna proteína de DENv y/o ZIKv y al mismo tiempo que formaran parte de un epítomo.

3. RESULTADOS

1. Secuencias descargadas de la base de datos del NCBI.

El total de secuencias descargadas de cada uno de los tres virus DENv, ZIKv y CHIKv fue, en el caso de CHIKv para las proteínas estructurales un total de 1320 secuencias y 784 para las proteínas no estructurales. Para DENv fueron descargadas en forma de poliproteína un total de 10709 secuencias para el serotipo 1, 8871 secuencias para el serotipo 2, 5804 secuencias para el serotipo 3 y 2959 secuencias para el serotipo 4. Con ZIKv, fueron encontradas en la base de datos sólo secuencias incompletas, por lo que se utilizaron diferentes genomas publicados de manera incompleta para la obtención de un genoma completo. Se utilizaron 11 secuencias del genoma de ZIKv las cuales se encuentran en el Tabla 3. Todas Las secuencias anteriormente mencionadas fueron descargadas de la base de datos GenBank.

2. Obtención de las secuencias consenso para cada proteína

De los primeros alineamientos realizados en el programa MEGA 7 con todas las secuencias descargadas de los 3 virus fueron obtenidos archivos con todas las secuencias alineadas y comprimidas como se muestra en la Figura 11 el cual es un ejemplo del alineamiento realizado a partir de las secuencias de la proteína E1 de CHIKv. Estos archivos se guardaron en formato FASTA, el número de archivos obtenidos se muestra en la Tabla 4 donde se identifica cada archivo el número de secuencias que lo constituyen, la proteína y el virus del cual provienen dichas secuencias.

Species/Abbrv	Gr	*** * ***** ** *****
1. Proteina E1 CHIKV		YEHVVIPATVGVVKKLVREGYSEMVLMEELLVLEETLLDVIICEYKTVISSEYVKKCC
2. gi 224589186 gb ACN59442.1 _structural		YEHVVIPATVGVVKKLVREGYSEMVLMEELLVLEETLLDVIICEYKTVISSEYVKKCC
3. gi 224589188 gb ACN59443.1 _structural		YEHVVIPATVGVVKKLVREGYSEMVLMEELLVLEETLLDVIICEYKTVISSEYVKKCC
4. gi 224589190 gb ACN59444.1 _structural		YEHVVIPATVGVVKKLVREGYSEMVLMEELLVLEETLLDVIICEYKTVISSEYVKKCC
5. gi 239836191 gb ACS29292.1 _E1_envelop		YEHVVIPATVGVVKKLVREGYSEMVLMEELLVLEETLLDVIICEYKTVISSEYVKKCC
6. gi 239836193 gb ACS29293.1 _E1_envelop		YEHVVIPATVGVVKKLVREGYSEMVLMEELLVLEETLLDVIICEYKTVISSEYVKKCC
7. gi 239836201 gb ACS29297.1 _E1_envelop		YEHVVIPATVGVVKKLVREGYSEMVLMEELLVLEETLLDVIICEYKTVISSEYVKKCC
8. gi 239836211 gb ACS29302.1 _E1_envelop		YEHVVIPATVGVVKKLVREGYSEMVLMEELLVLEETLLDVIICEYKTVISSEYVKKCC
9. gi 239836213 gb ACS29303.1 _E1_envelop		YEHVVIPATVGVVKKLVREGYSEMVLMEELLVLEETLLDVIICEYKTVISSEYVKKCC
10. gi 239836215 gb ACS29304.1 _E1_envelop		YEHVVIPATVGVVKKLVREGYSEMVLMEELLVLEETLLDVIICEYKTVISSEYVKKCC
11. gi 239836217 gb ACS29305.1 _E1_envelop		YEHVVIPATVGVVKKLVREGYSEMVLMEELLVLEETLLDVIICEYKTVISSEYVKKCC

Figura 8.- Fragmento del alineamiento realizado: Alineamiento de las secuencias de la proteína E1 de CHIKv Descargadas de NCBI.

Tabla 3.- Secuencias incompletas utilizadas para la obtención del genoma completo de ZIKV.

Virus	No. De Archivo	Proteínas	No. De secuencias
CHIKv	1	Estructurales	1320
	2	No estructurales	784
DENV	1	Poliproteína DENV-1	10709
	2	Poliproteína DENV-2	8871
	3	Poliproteína DENV-3	5804
	4	Poliproteína DENV-4	2959
ZIKv	1	Poliproteína ZIKv	11

Tabla 4.- Archivos obtenidos (FASTA) a partir de los primeros alineamientos en MEGA 7 con las secuencias descargadas de NCBI

No. De secuencia	País de aislamiento	No. Del GenBank	Año de aislamiento
1	Tailandia	KU681081	2012
2	Tailandia	KU681082	2012
3	China	KU744693	2016
4	Estados unidos	KU955591	2016
5	Estados unidos	KU955592	2016
6	Estados unidos	KU955593	2016
7	Estados unidos	KU955594	2016
8	Estados unidos	KU955595	2016
9	México-InDRE	KU922960	2016
10	Francia	KU647676	2016
11	Reino Unido	KX673530	2016

Fueron obtenidas un total de 7 secuencias consenso tomando en cuenta los tres virus. Para DENV se obtuvieron 4 secuencias consenso una para cada serotipo en forma de poliproteína la cual incluye las proteínas estructurales y no estructurales. En el caso de ZIKv al no tener informes de diferentes serotipos, se obtuvo únicamente 1 secuencia consenso en forma de poliproteína al igual que con DENV. En las Figuras 12 y 13 muestran las dos únicas secuencias consenso de las proteínas estructurales y no estructurales respectivamente de CHIKv. Todas las secuencias consenso fueron generadas en el servidor EMBOSS cons a partir de los archivos de la Tabla 4.



Figura 9.- Secuencias consenso de las proteínas estructurales de CHIKV.



Figura 10.- Secuencias consenso de las proteínas no estructurales de CHIKV.

Las secuencias consenso generadas por EMBOSS cons, les fue realizado un BLASTp para confirmar la identidad de cada secuencia consenso obtenida. En la Tabla 5 se muestran los porcentajes de identidad que se obtuvieron por el programa BLASTp de todas las proteínas de CHIKV.

Tabla 6.- Número total de péptidos para cada proteína de CHIKv en tres programas diferentes

Proteína	Clustal W	MUSCLE	T-Coffee
nsP1	26	56	53
nsP2	40	74	68
nsP3	26	49	41
nsP4	26	47	45
C	18	33	18
E3	3	11	9
E2	19	43	28
E1	19	33	24

A partir de los péptidos mostrados en la Tabla 6, se realizó una selección de aquellos que fueron **detectados cuando menos en 2 o 3 programas**, el número de estos péptidos se muestran en la Tabla 7 en la columna A.

En la columna B de la Tabla 7 se muestra el total de los péptidos que cumplió con el segundo criterio **presentar un porcentaje de similitud menor al 25% con la secuencia de DENv y/o ZIKv con la que alineo**, partiendo de los péptidos que ya habían cumplido con el primer criterio de selección.

Tabla 7.- Número total de péptidos que cumplieron con el primer y segundo criterio de selección

Proteína	A) No. De péptidos Primer Criterio	B) No. De Péptidos Segundo Criterio
nsP1	7	3
nsP2	8	1
nsP3	9	4
nsP4	12	2
C	5	0
E3	6	0
E2	17	5
E1	17	4

La columna B de la Tabla 7 muestra el total de péptidos obtenidos a partir de cada proteína de CHIKv que **fueron elegidos por cumplir los dos requisitos importantes**, para las proteínas C y E3 no fue posible obtener péptidos ya que presentaban un porcentaje de similitud mayor al 30% por lo que no son de significancia para ese estudio. Todos los péptidos recolectados a partir de las proteínas estructurales y no estructurales fueron reportados en las Tablas 8 y 9 respectivamente.

Tabla 8.- Péptidos obtenidos a partir de las proteínas estructurales de CHIKv

Proteína CHIKv	Péptido CHIKv	Secuencia DENv	Secuencia ZIKv	Programas	Porcentaje de similitud
E1	LRVLYQGNNIT	VPSIKSGNDIANCL	VPSIKSGNDIANCL	Clustal	17.24%
	VTAYANGDHAV	RKNGKRVIQLSRKT	RKNGKRVIQLSRK	Muscle	
	TVKDAKF	F	TF	T-Coffe	
	IVVYKGDVYNM	TYSDPLALREFKEF	TYSDPLALREFKE	Clustal	25 %
	DYPPFGAGRP	AAGRRSVSGD	FAAGRRSVSGD	Muscle	
E1	GQFGDI				
	FGCQIATNPVR	HGGMLVRNPLSR	HGGMLVR	Clustal	25 %
	A		NPLSR	Muscle	
	ATAMSWVQKIT	TARATWATNIQVAI	TARATWATNIQVAI	Muscle	14.19%
	GGVGLVVAVAA	NQVRRRLIGNENYLD	NQVRRRLIGNENYL	T-Coffe	
		YMTSMKR	DYMTSMKR		

	LILIVLCVSFSR H				
E2	KELPCSTYVQS NAATAEEIEVH M	YISTRVGM GEAAAIFM	YISTRVGMGEAAAI FM	Clustal Muscle	18.75%
	SYRSMGEEP NQEEWV	VRNPLSRNSTHEM YVW	VRNPLSRNSTHEM YVW	Muscle T-Coffe	12.5%
	QLSANGTAHG HPHEI	VKPSGSAS SMVNGV	VKPSGSASSMVN GV	Muscle T-Coffe	21.43%
	ILYYYELYPTMT VVV	WDVIPMTQI	WDVIPMTQI	Muscle T-Coffe	20%
	VVSVASFILLSM VGMAVGCMCMC AR	IMEVTAKWLWGFLS RNKKPRICTR	IMEVTAKWLWGFL SRKKPRICTR	Muscle T-Coffe	25%

Tabla 9.-Péptidos obtenidos a partir de las proteínas no estructurales de CHIKv

Proteína CHIKv	Péptido CHIKv	Secuencia DENV	Secuencia ZIKv	Programas	Porcentaje de similitud
nsP1	QRAYPMFEVE PRQVTSNDHA NARAFS	PTLDIELLKTEV TNPVLR	PTLDIELLKTE VTNPV	Muscl T-Coffe	21.05%
	AEDPERLANYA RKLASAAGKVL DRNISGK	TEQYKFQADSP KRLSAAIGKAW EEGVCG	TEQYKFQADS PKRLSAAIGK AWEEGVCG	Clustal Muscle T-Coffe	25 %
	SGKIGDLQAVM AVP	TVVVGDVSGIL AQG	TVVVGDVSGI LAQG	Clustal Muscle T-Coffe	14.29 %
nsP2	LHHIAMHGPA NTDEES	VDVLEHGSCV TTMAKD	VDVLEHGSC VTTMAKD	Muscle T-Coffe	17.65 %
nsP3	RDKEWEKKISE AIQMRTQV	KNETWKLARAS FIEVKTCV	KNETWKLARA SFIEVKTCV	Muscle T-Coffe	21.05 %
	RLRMNHVTNII VCSS	TRVGMGEAAAI FMTATPP	TRVGMGEAA AIFMTATPP	Clustal T-Coffe	16.67 %
	KVMLFDHNVP SRVSP	KMLLDNINTPE GIIPALFEPE	KMLLDNINTP EGIIPALFEPE RE	Clustal Muscle	21.74 %
	APALEPALDDG AVHTLPTIIGNL AAVS	PMMRHTIENTT ANISLTAIANQA AIL	MMRHTIENTT ANISLTAIANQ AAIL	Muscle T-Coffe	22.22 %
nsP4	GYIFSSDTGPG HL	TFHLTTRGGEP HM	TFHLTTRGGE PHM	Muscle T-Coffe	23.08 %
	RSNFEKLRGP VVTLYGGPK	ATNIQVAINQV RRLIG	ATNIQVAINQV RRLIG	Muscle T-Coffe	18. 75%

5. Predicción de epítomos.

La predicción de los epítomos de todas las proteínas de CHIKv se realizó en tres servidores diferentes (EMBOSS antigenc, Bepipred y Bcell Epitope Prediction). Los servidores que mostraron mayor número de regiones coincidentes fueron Bepipred y Bcell Epitope Prediction, en las Figuras 12,13, 14 y 15 se presentan graficadas en color amarillo las regiones altamente propensas a formar parte de un epítomo para cada una de las proteínas estructurales y en las Figuras 16, 17, 18 y 19 las gráficas para las proteínas no estructurales.

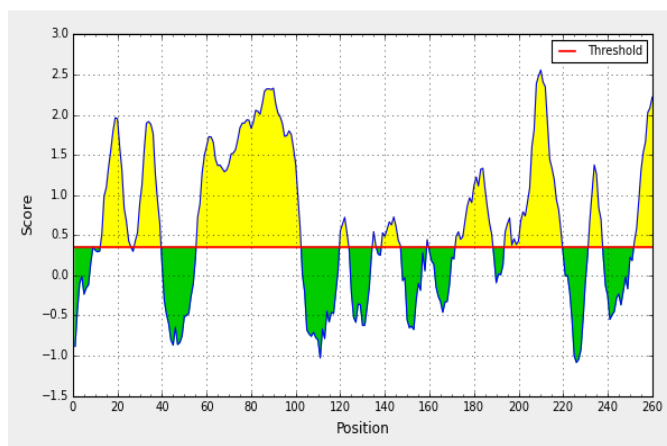


Figura 12.- Regiones antigénicas de la proteína C de CHIKv

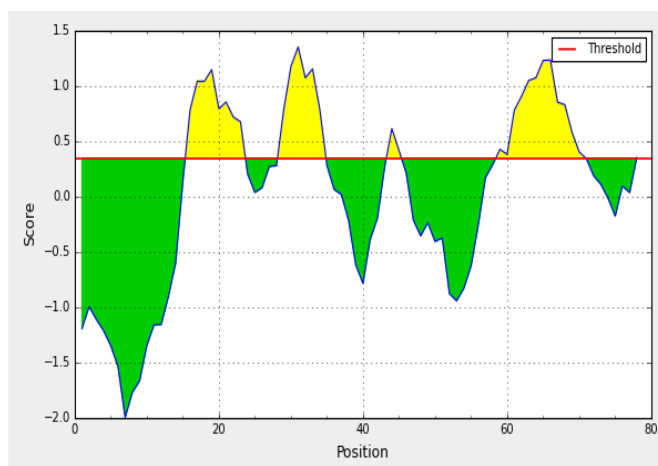


Figura 13.- Regiones antigénicas de la proteína E3 de CHIKv

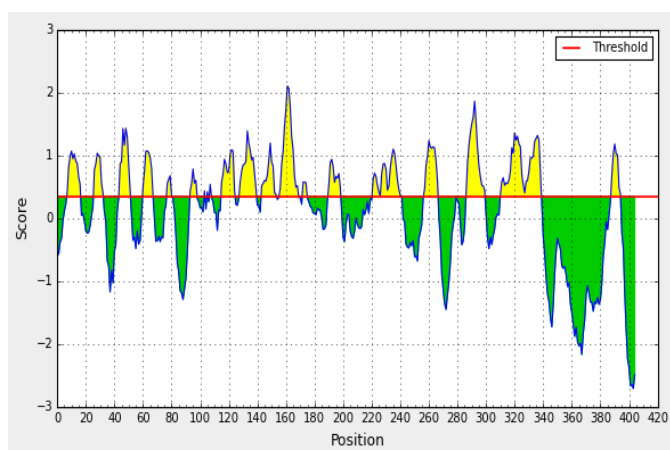


Figura 14.- Regiones antigénicas de la proteína E2 de CHIKv

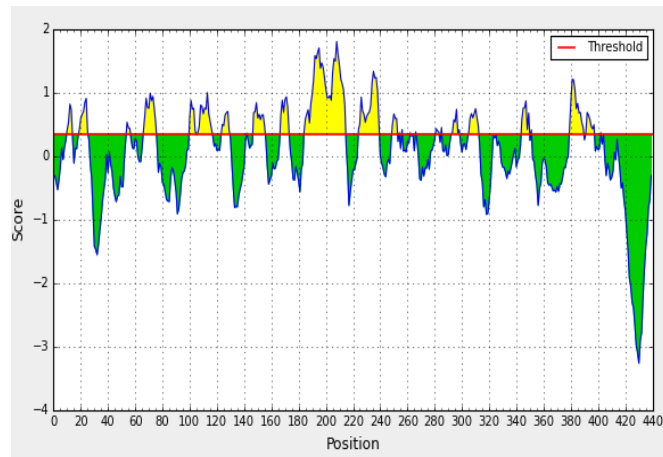


Figura 15.- Regiones antigénicas de la proteína E1 de CHIKV

Figuras 12-15 Regiones antigénicas de las proteínas estructurales de CHIKV. - Se muestran graficadas las regiones altamente antigénicas (Amarillo) de las proteínas estructurales de CHIKV. En el eje de las ordenadas se encuentra el puntaje o Score que agina el servidor al aminoácido tomando en cuenta un punto de corte el cual fue de **0.35** para todas las proteínas. Los Aminoácidos que logran superar este punto de corte son considerados para formar parte de un epítomo.

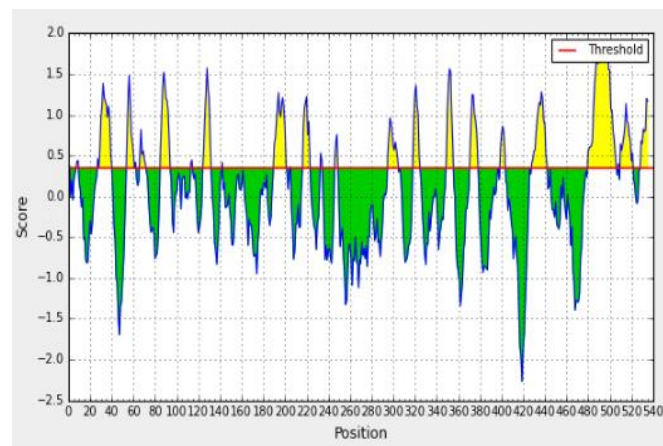


Figura 16.- Regiones antigénicas de la proteína nsP1 de CHIKV

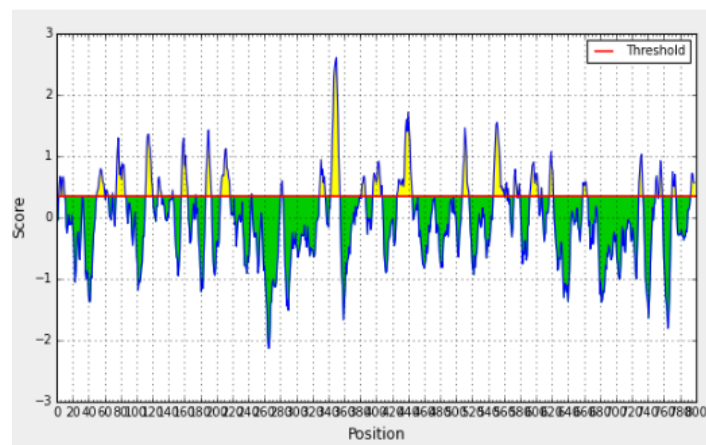


Figura 17.- Regiones antigénicas de la proteína nsP2 de CHIKV

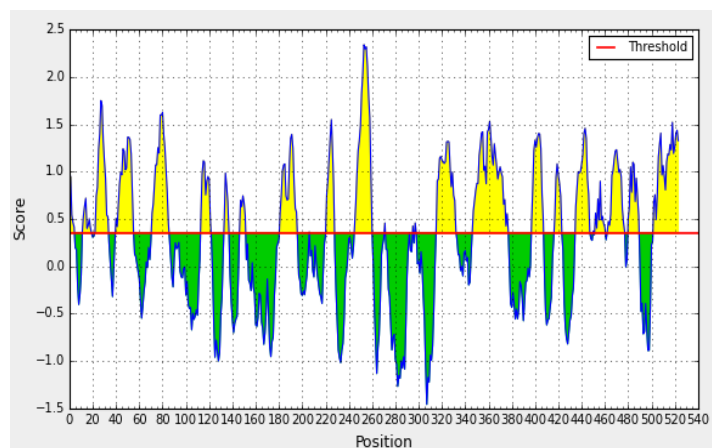


Figura 18.- Regiones antigénicas de la proteína nsP3 de CHIKv

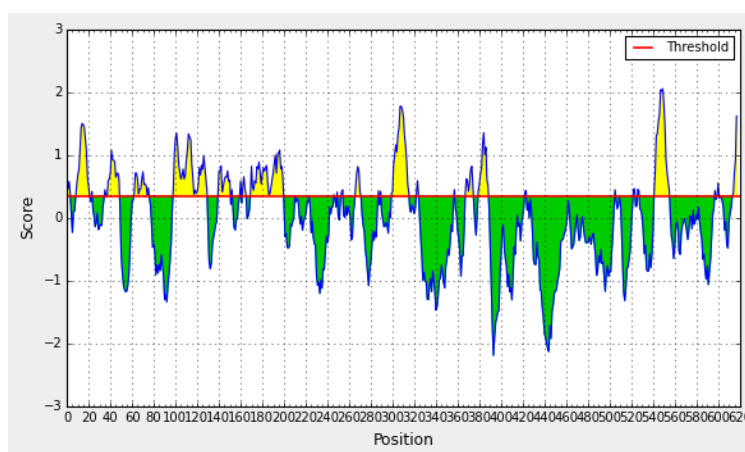


Figura 19.- Regiones antigénicas de la proteína nsP4 de CHIKv

Figuras 16-19 Regiones antigénicas de las proteínas no estructurales de CHIKv. - Se muestran graficadas las regiones altamente antigénicas (Amarillo) de las proteínas no estructurales de CHIKv. En el eje de las ordenadas se encuentra el puntaje o Score que asigna el servidor al aminoácido tomando en cuenta un punto de corte el cual fue de **0.35** para todas las secuencias. Los Aminoácidos que logran superar este punto de corte son considerados para formar parte de un epítipo.

6. Selección de epítipos

Los péptidos obtenidos y reportados en las Tablas 7 y 8, para proteínas estructurales y no estructurales respectivamente, fueron buscados en las regiones antigénicas mostradas en las Figuras 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19 para seleccionar aquellos péptidos que formaran parte de un epítipo según los servidores Bepipred y Bcell Epitope Prediction. Los péptidos que se encontraron en las regiones inmunogénicas se presentan en la Tabla 10 para las proteínas estructurales y 11 para las proteínas no estructurales, con un total de 13 péptidos, de los cuales 6 pertenecen a las proteínas estructurales; 3 para la glicoproteína E1 y 3 para la glicoproteína E2. Los 7 restantes son de las proteínas no estructurales: 2 para NSP1, 1 para NSP2, 2 para NSP3 y 2 para NSP4. Se reporta para cada epítipo en la última columna su puntaje asignado por los dos servidores.

Tabla 10.- Epítomos obtenidos a partir de las proteínas estructurales de CHIKV

Proteína	Epítopo	Lugar	Puntuación
E1	LRVLYQGNNITVTAYANGDHAVTVKDAKF	133-161	0.848
	IVVYKGDVYNMDYPPFGAGRPGQFGDI	178-203	1.713
	TVHVPYSQAPSG	228-239	1.344
E2	KELPCSTYVQSNAATAEEIEVHM	136-158	1.202
	SYRSMGEEPNYQEEWV	283-298	1.87
	QLSANGTAHGHPHEI	328-342	1.341

Tabla 11.- Epítomos obtenidos a partir de las proteínas no estructurales de CHIKV

Proteína	Epítopo	Lugar	Puntuación
nsP1	QRAYPMFE VEPRQVTSNDHAN ARAFS	19-44	1.383
	AEDPERL ANYARKLASAAGKVLDRNISGK	87-115	1.521
nsP2	LHHIAMH GPALNTDEES	103-119	1.363
nsP3	RD KEWEKKISEAIQMRTQV	144-162	0.745
	APALEPALDDGAVH TLPTIIGNLAAVSD	364-391	1.201
	VPS RVSPREYRSS QESVR	315-332	1.321
nsP4	GYI FSSDTGPGHL	006-018	1.512

7. Búsqueda de los péptidos en el IEDB

Con el objetivo de dar mayor veracidad a los resultados obtenidos anteriormente, se buscaron los epítomos en la base de datos IEDB, encontrando fragmentos de los tres péptidos obtenidos para la proteína E1 y el péptido 1 de la proteína no estructural NSP3 en esta base de datos la cual asigna un número de identificación a cada péptido reportado junto con la bibliografía donde es reportado este péptido. El péptido 1-E2 (KELPCSTYVQSNAATAEEIEVHM) se reporta con el número: **226466**(Kam et al., 2014) , el péptido 2-E2 (SYRSMGEEPNYQEEWV) se reporta con el numero; **237912**(Her et al., 2015), el péptido3-E2 (QLSANGTAHGHPHEI) con el numero; **558258**(Chua, Sam, Merits, & Chan, 2016). En IEDB también se encontró reportado un fragmento del péptido 1-nsP3 (RDKEWEKKISEAIQMRTQV) con el numero: 226480(Kam et al., 2014).

4. DISCUSIÓN

Durante el año 2015 el virus Chikungunya protagonizó uno de los principales brotes en América del sur y México presentando una tasa de mortalidad baja (Ministerio de salud, 2014), su importancia se enfoca en el área económica, al incapacitar al hospedero debido a los fuertes dolores articulares, provocando pérdidas económicas para los países donde se presentan mayor número de casos. Chikungunya fue la segunda enfermedad viral transmitida por vector después de dengue(Cardenas-Marrufo & Arias-León, 2015).

El diagnóstico basado en la sintomatología clínica es inexacto ya que no existe algún signo patognomónico y queda a criterio de la experiencia del médico tratante, por lo que el diagnóstico definitivo requiere de técnicas de laboratorio basadas principalmente en pruebas moleculares y serológicas (Burt, Rolph, Rulli, Mahalingam, & Heise, 2012) dentro de las cuales se encuentran los ensayos de ELISA e Inmunofluorescencia, las cuales detectan de anticuerpos IgM inicialmente ya que suelen aparecer dentro de los primeros 4 a 6 días y posteriormente de 6 a 7 días son detectables los anticuerpos IgM (Campion, Weaver, & Lecuit, 2015). La técnica de ELISA es una técnica simple y rápida, sin embargo, sus principales inconvenientes son falsos positivos debido a la reactividad cruzada con otros alfavirus(Pialoux, Gauzere, Jaureguiberry, & Strobel, 2007) y a que presenta una baja sensibilidad en sueros recogidos durante la fase aguda de la infección, comercialmente esta prueba disponible muestra una sensibilidad del 82-88% y una especificidad del 82-97% (Yap et al., 2010).

Debido a lo anterior el presente trabajo plantea identificar péptidos a partir de las proteínas que constituyen al virus Chikungunya que puedan ser utilizados como epítomos para el diseño de un método

diagnostico serológico que pueda ser utilizado en laboratorios menos equipados con un menor costo y de manera más rápida.

La identificación de los epítomos fue realizada mediante el uso de programas Bioinformáticos a partir de las secuencias consenso de las proteínas estructurales y no estructurales del virus obtenidas a partir de todas las secuencias reportadas de manera completa en la base de datos NCBI hasta el mes de agosto del 2016.

Cada alineamiento fue realizado por triplicado en diferentes programas dando robustez al estudio. Por el contrario, detectar un péptido únicamente en un programa puede indicar una secuencia mal alineada por el programa.

Finalizados los alineamientos se recolectaron aquellos péptidos provenientes de las proteínas de CHIKv que alinearon con alguna secuencia de Dengue o Zika. El número total de péptidos obtenidos en los tres programas para cada proteína se muestran en la Tabla 6 donde podemos observar que se obtuvieron un menor número en el programa Clustal W comparándolos con MUSCLE y T-Coffee, ya que los péptidos obtenidos por Clustal W presentan un mayor tamaño reduciendo así el número final obtenido. Los programas T-Coffee y Clustal W presentan algoritmos similares, sin embargo, T-Coffee hace un análisis más profundo y cauteloso de las secuencias dando como resultado un mayor número de péptidos como se muestra en la Tabla 6.

Con todos los péptidos obtenidos en los alineamientos se seleccionaron aquellos que fueron detectados cuando más en 2 o 3 programas por las razones anteriormente mencionadas, observando que este número de péptidos disminuye drásticamente, pero a pesar de ser programas diferentes con algoritmos diferentes fue posible detectar péptidos que cumplieran con este criterio.

Ya contando con péptidos que cumplieran con el primer criterio de selección, fueron seleccionados aquellos péptidos que presentaron un porcentaje de menor al 25% valor que fue asignado de manera arbitraria en base al número más bajo de porcentajes de similitud obtenidos ya que no se reporta en alguna bibliografía un porcentaje de similitud óptimo para este tipo de péptidos.

No fue posible obtener péptidos a partir de las proteínas C y E3 ya que los valores de porcentaje de similitud rebasaban el 30% por lo que su similitud con Dengue y/o Zika ya era alta.

A partir de tres diferentes servidores (EMBOSS antigenc, Bepipred y Bcell Epitope Prediction) fue posible predecir regiones antigénicas dentro de las secuencias de las proteínas de CHIKv, la mayoría de las regiones antigénicas fueron detectadas por los dos servidores: Bepipred y Bcell Epitope Prediction; y debido a su amplio uso se decidió trabajar con los resultados obtenidos por estos dos servidores. Las gráficas que proporcionan estos servidores (Figuras 12-19) ilustran de color amarillo las regiones más antigénicas de la secuencia proteica con base a un puntaje que el servidor le asigna a cada uno de los aminoácidos tomando en cuenta varios criterios como aminoácidos adyacentes, tamaño del aminoácido, hidrofobicidad, disposición en el espacio, etc; se observa que las proteínas que muestran más regiones antigénicas son E2 (Figura 14) y E1 (Figura 15) aunque estas son de menor tamaño a comparación de las regiones que presenta la proteína de cápside C (Figura 14). Lo anterior podría explicarse tomando en cuenta la función de las dos glicoproteínas E2 y E1. La segunda es responsable de la fusión con la membrana celular de la célula infectada mientras E2 está involucrada en la unión al receptor celular (Solignat, Gay, Higgs, Briant, & Devaux, 2009) por lo tanto no se descarta que estas glicoproteínas posean regiones altamente antigénicas. Recientes estudios establecen diversos epítomos presentes en la proteína E2 de CHIKv y propone a esta proteína como el candidato más indicado para el desarrollo de técnicas diagnósticas y vacúnales (Kam et al., 2012; Verma et al., 2014) (Tripathi, Priya, & Shrivastava, 2014) por lo tanto se espera obtener importantes resultados a partir de estas dos glicoproteínas. Con respecto a los resultados de las proteínas no estructurales de CHIKv (Figuras 16-19) se observa un número importante de regiones antigénicas a lo largo de la

secuencia peptídica, la predicción de epítomos lineales para células B a partir de proteínas no estructurales de virus no se encuentra ampliamente reportada ya que se le da prioridad a las proteínas estructurales debido a la disposición de estas, las proteínas no estructurales se encuentran más relacionados con epítomos conformacionales los cuales no son lineales y por lo tanto requiere un análisis más detallado mediante estudios de cristalografía, no obstante, algunos epítomos conformacionales pueden llegar a presentar pequeñas secuencias lineales en su estructura, aun sabiendo esto el análisis de las proteínas no estructurales fue el mismo que el realizado en las proteínas estructurales del virus.

Las únicas proteínas estructurales que presentaron péptidos fueron las glicoproteínas, como se mencionó anteriormente, se esperaban resultados importantes de estas dos proteínas, los seis péptidos (tres de E1 y tres de E2) que coincidieron con las regiones antigénicas detectadas por los servidores, muestran algunos residuos de aminoácidos de color rojo ya que esta secuencia es la que el servidor detecto con valores más elevados en toda la secuencia. Por otra parte, en la Tabla 11 se encuentran los péptidos coincidentes con las regiones antigénicas obtenidos a partir de las proteínas no estructurales de CHIKv donde fue posible obtener péptidos lineales altamente antigénicos.

El servidor **IEDB** es una base de datos utilizado para catalogar y reportar epítomos obtenidos experimentalmente de células B y T, por lo que muestra epítomos obtenidos en otras investigaciones y proporciona una importante herramienta para comparar los resultados obtenidos entre diferentes estudios realizados (Potocnakova, Bhide, & Pulzova, 2016).

El encontrar fragmentos de los epítomos reportados en una base de datos como IEDB dan una mayor veracidad a los resultados obtenidos ya que existen diferentes métodos de predicción de epítomos lineales por lo que el encontrar un epítomo no únicamente una vez habla de una verdadera antigenicidad por parte de ese epítomo.

Se reportó la predicción de 7 epítomos a partir de la glicoproteína E1 de CHIKv tomando en cuenta los criterios anteriores. Los epítomos 1-E1 (LRVLYQGNNITVTAYANGDHAVTVKDAKF) y 2-E1 (IVVYKGDVYNMDYPPFGAGRPGQFGDI) coinciden con los epítomos 4 y 6 reportados en la bibliografía (Yathi, Bhasker, & Chinnamma, 2013) en los cuales al epítomo 4 se le determinaron regiones hidrofóbicas, polares y una región con tendencia a formar una alfa hélice, mientras que el epítomo 6 se le determinaron las mismas regiones a excepción de una región con tendencia a una alfa hélice. En base a la información anterior los epítomos 1-E1 y 2-E1 representan verdaderamente un resultado adecuado para la detección de CHIKv.

El uso de MAPs o Múltiples Péptidos Antigénicos en español representa una alternativa importante en el desarrollo de técnicas diagnósticas en base de péptidos lineales para células B, en 2014 se reportó el desarrollo de una técnica diagnóstica en base a múltiples péptidos de la proteína E2 de CHIKv en la cual se obtuvieron diferentes epítomos los cuales fueron probados en grupos de 4 péptidos, probando su sensibilidad para detectar inmunoglobulinas IgM e IgG en 45 sueros de pacientes presuntamente diagnosticados con CHIKv, de los cuales 25 resultaron positivos para CHIKv y 20 sueros positivos para DENv (Bhatnagar et al., 2014). Ninguno de los grupos de MAP estudiados presento alguna reacción cruzada con las muestras positivas de DENv. Nuevamente los epítomos 1-E2, 2-E2 y 3-E2 coinciden con los resultados obtenidos en el estudio anteriormente mencionado, mostrando un % de sensibilidad del 91.1% para el epítomo 1-E2, una sensibilidad del 97.7 para el péptido 2-E2 y una sensibilidad de un 100% para el péptido 3-E2. Estos % de sensibilidad no pueden ser asignados en su totalidad a los epítomos obtenidos en este estudio ya que estos % fueron obtenidos en conjunto con otros 3 péptidos, sin embargo, aporta información importante de su antigenicidad de los epítomos obtenidos. El no presentar reacción cruzada con ninguna de las muestras positivas para DENv en el estudio anterior con sus epítomos reportados, indica que se realizó una correcta selección de los epítomos obtenidos, puesto que a pesar de que se presentaba mínimas coincidencias entre unos cuantos aminoácidos no son suficientes para presentar una reacción cruzada entre virus.

Como ya se ha observado con base a los resultados obtenidos y a la bibliografía reportada debido al constante reporte de péptidos a partir de la proteína E2, la proteína E2 es la candidata indicada para el desarrollo de una nueva técnica diagnóstica con un buen porcentaje de sensibilidad, además de ser la proteína viral más inmunodominante ya que induce una fuerte respuesta de anticuerpos durante la fase aguda de la enfermedad (Kam et al., 2012) además de inducir una respuesta inmune duradera la cual es detectable incluso después de 2 años de pos-infección (Kam et al., 2014).

En cuanto a los epítomos obtenidos a partir de las proteínas no estructurales no fue posible encontrar epítomos en alguna bibliografía enfocada a la predicción de epítomos lineales a excepción del epítomo 1 de la proteína NSP3 el cual fue detectado en la base de datos IEDB, pero el no haber encontrado reporte de algún epítomo a partir de las proteínas no estructurales, no garantiza la eficiencia de los epítomos obtenidos en este estudio, pero tampoco descarta su uso tal vez de manera sola o combinada con algún epítomo proveniente de alguna proteína estructural para aumentar su eficacia.

5. CONCLUSIONES

- Fue posible identificar un total de 13 péptidos provenientes de las proteínas que constituyen al virus Chikungunya
- Con base a los epítomos reportados en las diferentes bases de datos los candidatos más factibles a formar parte de una prueba diagnóstica son los epítomos obtenidos a partir de las glicoproteínas E1 y E2.
- Aunque la bioinformática es un conjunto de técnicas que nos permite acelerar el trabajo en cuanto al análisis de macromoléculas como las proteínas, nunca debe descartarse el trabajo de laboratorio.

6. REFERENCIAS

- Barba Evia, J. R. (2015). Fiebre chikungunya. ¿Es acaso la próxima amenaza? *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*, 62(1), 20–32.
- Bertha, G., & Robledo, V. (2009). Artemisa Antígenos e inmunógenos. *Medigraphic*, 52(1), 41–42.
- Bhatnagar, S., Kumar, P., Mohan, T., Verma, P., Parida, M. M., Hoti, S. L., & Rao, D. N. (2014). Evaluation of Multiple Antigenic Peptides Based on the Chikungunya E2 Protein for Improved Serological Diagnosis of Infection. *Viral Immunology*, 00(00), 1–6. <https://doi.org/10.1089/vim.2014.0031>
- Bleijs, P. D. A. (2016). Chikungunya Virus. Retrieved from www.chikungunyavirusnet.com
- Burt, F. J., Rolph, M. S., Rulli, N. E., Mahalingam, S., & Heise, M. T. (2012). Chikungunya: a re-emerging virus. *The Lancet*, 379(9816), 662–671. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60281-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60281-X)
- Campion, E. W., Weaver, S. C., & Lecuit, M. (2015). Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. *New England Journal of Medicine*, 372(13), 1231–1239. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1406035>
- Cardenas-Marrufo, M. F., & Arias-León, J. J. (2015). La fiebre Chikungunya (CHIK). *Ciencia Y Humanismo En La Salud*, 2(1), 27–34.
- Casal, P. E., Chouhy, D., Bolatti, E. M., Perez, G. R., Stella, E. J., & Giri, A. A. (2015). Evidence for homologous recombination in Chikungunya Virus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 85, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.01.016>
- Cdc. (2014). Chikungunya Información para el público. Boletín, (información para el público Chikungunya), 246206.
- CDC, & Organización Panamericana de la. (2011). Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus chikungunya en las Américas. Organización Panamericana de la Salud. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(10\)70505-0](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(10)70505-0)

- Chua, C.-L., Sam, I.-C., Merits, A., & Chan, Y.-F. (2016). Antigenic Variation of East/Central/South African and Asian Chikungunya Virus Genotypes in Neutralization by Immune Sera. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(8), e0004960. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004960>
- Eugenia, C. A. (2015). Revisión Chikungunya : un virus que nos acecha. *Acta Médica Costarricense*, 57, 7–15.
- Fernández, L. M., & Navarro, Y. P. T. (2015). Fiebre Chikungunya. *Revista Cubana de Medicina*, 54(1), 74–96.
- Grandadam, M., Caro, V., Plumet, S., Thiberge, J. M., Souar??s, Y., Failloux, A. B., ... Despr??s, P. (2011). Chikungunya virus, Southeastern France. *Emerging Infectious Diseases*, 17(5), 910–913. <https://doi.org/10.3201/eid1705.101873>
- Hasebe, F., Parquet, M. C., Pandey, B. D., Mathenge, E. G. M., Morita, K., Balasubramaniam, V., ... Igarashi, A. (2002). Combined detection and genotyping of Chikungunya virus by a specific reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology*, 67(3), 370–374. <https://doi.org/10.1002/jmv.10085>
- Her, Z., Teng, T.-S., Tan, J. J., Teo, T.-H., Kam, Y.-W., Lum, F.-M., ... Ng, L. F. (2015). Loss of TLR3 aggravates CHIKV replication and pathology due to an altered virus-specific neutralizing antibody response. *EMBO Molecular Medicine*, 7(1), 24–41. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404459>
- Kam, Y.-W., Lee, W. W. L., Simarmata, D., Le Grand, R., Tolou, H., Merits, A., ... Ng, L. F. P. (2014). Unique Epitopes Recognized by Antibodies Induced in Chikungunya Virus-Infected Non-Human Primates: Implications for the Study of Immunopathology and Vaccine Development. *PLoS ONE*, 9(4), e95647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095647>
- Kam, Y.-W., Lum, F.-M., Teo, T.-H., Lee, W. W. L., Simarmata, D., Harjanto, S., ... Ng, L. F. P. (2012). Early neutralizing IgG response to Chikungunya virus in infected patients targets a dominant linear epitope on the E2 glycoprotein. *EMBO Molecular Medicine*, 4(4), 330–343. <https://doi.org/10.1002/emmm.201200213>
- Lo Presti, A., Ciccozzi, M., Cella, E., Lai, A., Simonetti, F. R., Galli, M., ... Rezza, G. (2012). Origin, evolution, and phylogeography of recent epidemic CHIKV strains. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 392–398. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.015>
- Miembros, E., Martin, S., Maarten, S., Unidos, E., & Lanka, S. (2013). *Alerta Epidemiológica*, 1–5.
- Ministerio de salud. (2014). Lineamientos para la Vigilancia Epidemiológica y Diagnóstico por Laboratorio de Fiebre Chikungunya, (2), 2–3. Retrieved from http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/lineamientos/chikungunya/Lineamientos_Chikungunya_25nov14.pdf
- Panning, M., Wichmann, D., Grywna, K., Annan, A., Wijesinghe, S., Kularatne, S. A. M., & Drosten, C. (2009). No evidence of chikungunya virus and antibodies shortly before the outbreak on Sri Lanka. *Medical Microbiology and Immunology*, 198(2), 103–106. <https://doi.org/10.1007/s00430-009-0110-0>
- Parashar, D., & Cherian, S. (2014). Antiviral perspectives for chikungunya virus. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/631642>
- Pialoux, G., Gauzere, B. A., Jaureguiberry, S., & Strobel, M. (2007). Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet Infect. Dis.*, 7, 319–327. Retrieved from [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70107-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70107-X)
- Potocnakova, L., Bhide, M., & Pulzova, L. B. (2016). An Introduction to B-Cell Epitope Mapping and In Silico Epitope Prediction. *Journal of Immunology Research*, 2016, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/6760830>
- Solignat, M., Gay, B., Higgs, S., Briant, L., & Devaux, C. (2009). Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. *Virology*, 393, 183–197.

- Staples, J. E., & Fischer, M. (2014). Chikungunya Virus in the Americas — What a Vectorborne Pathogen Can Do. *New England Journal of Medicine*, 371(10), 887–889. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1407698>
- Tripathi, N. K., Priya, R., & Shrivastava, A. (2014). Immunogenicity of Escherichia coli expressed envelope 2 protein of Chikungunya virus. *Bioengineered*, 5(3), 198–203. <https://doi.org/10.4161/bioe.28336>
- Verma, P., Bhatnagar, S., Kumar, P., Chattree, V., Parida, M. M., Hoti, S. L., ... Rao, D. N. (2014). Analysis of antibody response (IgM, IgG, IgG3) to Chikungunya virus using panel of peptides derived from envelope protein for serodiagnosis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 52(2). <https://doi.org/10.1515/cclm-2013-0363>
- Wauquier, N., Becquart, P., Nkoghe, D., Padilla, C., Ndjoyi-Mbiguino, A., & Leroy, E. M. (2011). The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. *Journal of Infectious Diseases*, 204(1), 115–123. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq006>
- Yap, G., Pok, K.-Y., Lai, Y.-L., Hapuarachchi, H.-C., Chow, A., Leo, Y.-S., ... Ng, L.-C. (2010). Evaluation of Chikungunya Diagnostic Assays: Differences in Sensitivity of Serology Assays in Two Independent Outbreaks. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(7), e753. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000753>
- Yathi, K. K., Bhasker, S., & Chinnamma, M. (2013). Determination of B cell epitopes and evaluation of antigen capture ELISA for the earlier diagnosis of CHIK virus using anti-rCHIK E1 rabbit antibodies. *Journal of Immunological Methods*, 393(1–2), 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2013.04.005>

Este artículo puede citarse de la siguiente forma:

Citación estilo APA sexta edición

Medina Gómez, M., García Machorro, J. & Correa Basurto, J. (septiembre-diciembre de 2020). Búsqueda de Epítomos de Chikungunya para Inmunodiagnóstico. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, 6(3), 7-30.

Citación estilo Chicago decimoquinta edición

Medina Gómez, Miguel, García Machorro, Jazmín & Correa Basurto, José. Búsqueda de Epítomos de Chikungunya para Inmunodiagnóstico. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, 6 No. 3 (septiembre-diciembre de 2020): 7-30.

Citación estilo Harvard Anglia

Medina Gómez, M., García Machorro, J. & Correa Basurto, J. 2020. Búsqueda de Epítomos de Chikungunya para Inmunodiagnóstico. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, 6(3), pp. 7-30.

Citación estilo IEEE

[1] M. Medina Gómez, J. García Machorro y J. Correa Basurto. Búsqueda de Epítomos de Chikungunya para Inmunodiagnóstico. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, vol. 6 No. 3, pp. 7-30, septiembre-diciembre de 2020.