

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Análisis filodinámico de virus Chikungunya aislados
de humanos y mosquitos**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS GENÓMICAS**

P R E S E N T A :

OSCAR ARRIAGA CADENA

DIRECTORA: Dra. Claudia Selene Zárate Guerra

CODIRECTORA: Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy

**POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS**

Ciudad de México, febrero de 2024.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente: Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy,
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Secretario: Dra. Claudia Selene Zárate Guerra,
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Vocal: Dr. Jesús Miguel Torres Flores,
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Plantel de adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTOR

Dra. Claudia Selene Zárate Guerra
Universidad Autónoma de la
Ciudad de México

Índice

Índice.....	1
Índice de Fig.....	5
Índice de tablas.....	8
Abreviaturas.....	9
Resumen.....	11
INTRODUCCIÓN.....	13
Características generales.....	13
Morfología del virus Chikungunya.....	13
Genoma del virus Chikungunya.....	14
Genes y Proteínas.....	15
Clasificación.....	17
Epidemiología.....	18
Transmisión del virus del Chikungunya.....	20
Patogénesis.....	26
ANTECEDENTES PARTICULARES.....	29
Mecanismos de la evolución.....	29
Cuellos de botella.....	30
Selección natural.....	31
A) Selección positiva.....	32
B) Selección negativa.....	35
CHIKV en México.....	37
Diagnóstico y vacunas.....	41
Hipótesis.....	45
JUSTIFICACIÓN.....	43
OBJETIVOS.....	46
Objetivo general.....	46
Objetivos específicos.....	46
Estrategia Experimental.....	47
METODOLOGÍA.....	48

Diseño de primers para E1 y E2	49
Muestras de pacientes	50
Extracción de RNA.....	50
RT-PCR	51
PCR.....	52
Purificación del DNA a partir de gel	54
Secuenciación de las muestras.....	55
Obtención de secuencias.	48
Ensamble de las secuencias.....	48
Alineamiento de secuencias.....	48
Genotipificación	55
Eliminación de las secuencias redundantes.	56
Análisis filodinámicos.	56
Red de haplotipos.	56
Análisis comparativo basado en metadatos (Meta-CATS).....	57
RESULTADOS.....	58
Extracción de RNA de las muestras de pacientes humanos y mosquitos.....	58
Obtención de amplicones.	58
Ensamble y alineamiento de las secuencias de pacientes.....	61
Genotipificación	62
Limpieza de las secuencias redundantes.....	64
Reconstrucción de la filogenia.....	64
Red de haplotipos	66
Determinación de los polimorfismos	70
DISCUSIÓN	70
CONCLUSIÓN	76
BIBLIOGRAFÍA.....	77
ANEXOS.....	90

Índice de Figuras.

Fig. 1. Esquema de la conformación de la partícula viral del virus Chikungunya.

Fig. 2. Organización del genoma del CHIKV.

Fig. 3. Genotipos del CHIKV

Fig. 4 CHIKV en el hemisferio occidental: Reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Fig. 5. Países y territorios donde se han notificado casos de CHIKV, casos de CHIKV autóctonos.

Fig. 6. Ciclos de transmisión del CHIKV y sus agentes transmisores.

Fig. 7. Distribución geográfica de los genotipos de CHIKV durante 1952–2020 y la de sus principales vectores.

Fig. 8. Ciclo de vida de los arbovirus en mosquitos.

Fig. 9. Replicación de CHIKV en el mosquito.

Fig. 10. El papel del microbioma del intestino medio en la infección por CHIKV en el vector Aedes.

Fig. 11. Ciclo replicativo del CHIKV en células de mamíferos.

Fig. 12. Mecanismos involucrados en la selección natural.

Fig. 13. Mecanismo de cuello de botella.

Fig. 14. Mapa que muestra las sustituciones de glicoproteínas de la envoltura que afectan la capacidad de transmisión del CHIKV.

Fig. 15. Las glicoproteínas de la envoltura del CHIKV de genotipo asiático. La proteína E1 está en azul claro, la proteína E2 está en rojo claro y la proteína E3 está en amarillo.

Fig. 16. Epidemiología molecular del CHIKV visualizada en Nexstrain 3.0

Fig. 17. Filogenia de máxima credibilidad del clado construida con 59 secuencias de CHIKV junto a cuatro secuencias obtenidas al comienzo del brote México durante el brote de 2014-2016 y 48 secuencias de otras partes del mundo.

Fig. 18. Estrategia experimental.

Fig. 19. Mapa de las regiones amplificadas de los genes que codifican para las proteínas E1 y E2 de CHIKV. Las posiciones se refieren al genoma de referencia con número de acceso AM258990.1.

Fig. 20. Proceso para la secuenciación de Sanger. La técnica de secuenciación enzimática Sanger-capilar implica la realización de una reacción de secuencia mediante termo-ciclaje con ddNTPs marcados con fluorocromos.

Fig. 21 Separación por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. En este gel, se cargaron las muestras correspondientes a los genes E1.

Fig 22. Separación por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. En este gel, se cargaron las muestras correspondientes a los genes E2.

Fig. 23. Alineamiento de las muestras del presente estudio con las secuencias mexicanas como referencia utilizando el programa AliView, usando el fragmento E2.

Fig. 24. Electroferogramas de la muestra M5 visualizado en el Software 4Peaks

Fig. 25. Genotipificación de secuencias de CHIKV de muestras mexicanas, usando una reconstrucción filogenética mediante el método de Neighbor-Joining, y 1000 réplicas de bootstrap.

Fig. 26. Árbol filogenético obtenido por Máxima Verosimilitud realizado en IQ-Tree2

Fig. 27. Red de Haplotipos Generada en PopArt mediante el Método de TCS Network. La red de haplotipos contiene secuencias de 15 países de 4 continentes y un rubro de secuencias de origen desconocido basada en las secuencias del gen E1 y E2 del genoma de CHIKV (n = 892 ; 1444 pb).

Fig. 28 Red de Haplotipos Generada en PopArt mediante el Método de TCS Network. La red de haplotipos contiene secuencias de 13 países pertenecientes al continente americano basada en las secuencias del gen E1 y E2 del genoma de CHIKV (n = 102 ; 1444 pb).

Fig. 29. Regiones de las proteínas E1 y E2, donde se encuentran los polimorfismos detectados por Meta-CATS.

Índice de tablas

Tabla 1. Función y localización de las proteínas del CHIKV.

Tabla 2. Manifestaciones típicas y atípicas de la enfermedad CHIKV en pacientes.

Tabla 3. Sustituciones de aminoácidos en OIL CHIKV afectan la transmisión por mosquitos vectores urbanos.

Tabla 4. Cambios de aminoácidos identificados entre las secuencias ECSA, IOL, AUL, caribeño y mexicano.

Tabla 5. Primers utilizados para la amplificación, para los genes E1 y E2.

Tabla 6. Condiciones de la enzima High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.

Tabla 7. Instrucciones de pipeteo dividido por enzimas.

Tabla 8. Instrucciones de ciclaje para la enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase.

Tabla 9. Instrucciones de ciclaje para la enzima Invitrogen™ Platinum™ SuperFi™ II DNA Polymerase

Tabla 10. Concentraciones de RNA de cada una de las muestras de pacientes.

Tabla 11. Muestras de pacientes con las diferentes enzimas utilizadas.

Tabla 12. Niveles de concentración de DNA producto de PCR de los genes E1 y E2.

Tabla 13. Posición de nucleótido en el que se encontraron polimorfismos en las secuencias de E1 y E2.

Abreviaturas

Aa: Aminoácido

AUL: Asian Urban Lineage

BV-BRC: Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center

Cap: Caperuza

CHIKV: Virus del Chikungunya

CHIKF: fiebre del Chikungunya

DENV: Virus del Dengue

dN: Número de sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo

DNA: Deoxyribonucleic Acid

dS: Número de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo

ECSA: East/Central/South African

IOL: Indian Ocean Lineage

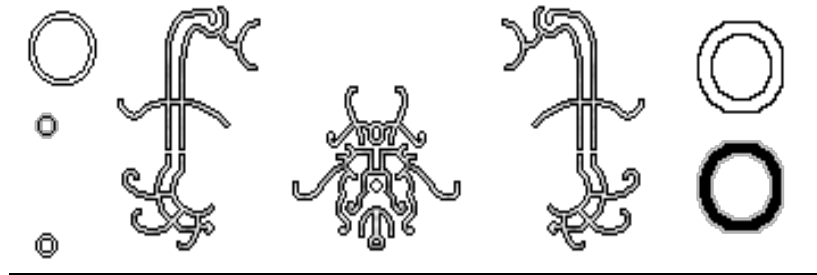
Nsp: No structural protein

OMS: Organización Mundial de la Salud

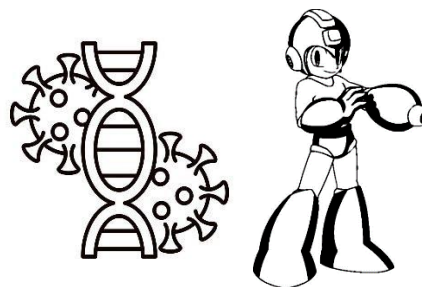
ORF: Open Reading Frame

RNA: Ribonucleic acid

WA: West African.



“Sigo cumpliendo, siempre trato de ser buena persona, y hacer sentir mejor a la gente, pero por alguna razón los sueños que teníamos de niños se volvieron cargas ahora que soy adulto, y espero un final sinvergüenza, sigo cumpliendo para volver a sentirme por solo un momento acompañado. Fuiste el alpha y era un omega, fuiste un hermoso principio, y aceptaste el horrible final, espero que por ahora sea suficiente lo poco que he logrado. Se que no es el final, porque nada está bien y cuando todo estuvo bien fue tu final. Espero volverte a ver y contarte tantas cosas, que la eternidad sea solo nuestra. Un día me despediré y para siempre así será, pero por ahora viviré por aquellos que ya no están”



“Seguimos con los virus, sigo siendo Megaman ya tengo más cosas y los planes siguen en pie, dentro de 2 años te volvere a escribir y te dire que ha pasado”

Agradecimientos

- A mi directora y codirectora la Dra. Claudia Selene Zárate Guerra y Martha Eugenia Yocupicio Monroy, por su infinita paciencia, asesoría y ayuda en todo momento, y demostrarme el nivel del que soy capaz, además el que debo alcanzar. Son una inspiración directa (No entiendo cómo me aguantaron tanto, pero se los agradeceré por siempre, síganme aguantando).
- A los todos doctores del posgrado en ciencias genómicas de la UACM por acompañarme a lo largo de la carrera y ayudarme en momentos específicos para avanzar.
- A las Licenciadas Vivi, Caty y Danna por obligarme en avanzar y la motivación. Además, en todos los tramites del posgrado me demostraron lo valiosas que son.
- A mis amigos de los laboratorios gracias por pasar buenos tiempos y muchas gracias por estar en los tiempos turbios.
- A mi familia, gracias por tanto y perdonen por tan poco (A mis hermanos que son las personas más fuertes, a quienes deberé enfrentar y superar en todo momento, son gigantes en sus áreas y que siempre es divertido estar con ellos, ustedes si me caen bien, soy la pica).
- Este trabajo fue financiado por los proyectados CONAHCyT (302979) y UACM CCYT-2023-IMP-08.
- Gracias a la UACM por la beca para la realización de tesis y financiar por 9 meses este trabajo.

Resumen

El virus Chikungunya (CHIKV) es un arbovirus reemergente que provoca una enfermedad musculoesquelética inflamatoria en humanos, caracterizada por fiebre, poliartralgia, mialgia, erupción cutánea y dolor de cabeza. En este estudio, se realizó un análisis usando la secuencia parcial de los genes que codifican para las proteínas E1 y E2, obtenidas a partir de muestras de pacientes mexicanos, complementadas con secuencias de todo el continente americano. Se construyó un árbol filogenético escalado por fecha de colecta y una red de haplotipos para inferir las relaciones evolutivas y de dispersión de estas secuencias. Se encontró que algunas de las secuencias de pacientes mexicanos se encuentran en el mismo clado que varias de Nicaragua y de Ecuador, como es de esperarse dada la cercanía geográfica y lo reportado para otros arbovirus. El hecho de que las secuencias mexicanas no formen un grupo monofilético evidencia varias introducciones a nuestro país, mientras que las ramas más largas señalan que ha ocurrido un proceso de diversificación dentro de México. Estos hallazgos no solo contribuyen a la comprensión de la dinámica evolutiva de CHIKV en diferentes poblaciones, sino que también proporcionan información valiosa para el diseño futuro de estrategias de control y prevención y vigilancia de este virus.

INTRODUCCIÓN

Características generales

Los alfavirus constituyen un género de la familia *Togaviridae*, que son virus de RNA monocatenario de sentido positivo. Por otro lado, los alfavirus también son considerados como arbovirus, es decir, virus transmitidos por artrópodos hematófagos a hospederos vertebrados que causan artritis y encefalitis en humanos y animales (Wang, 2019).

El virus Chikungunya (CHIKV) es un alfavirus perteneciente al grupo que se le denomina del Viejo Mundo que incluyen a especies como el virus Sindbis (SINV), el virus del bosque Barmah (BFV), el virus O'nyong'nyong (ONNV), el virus del río Ross (RRV) y el virus del bosque Semliki (SFV) (Fros, 2016). Aunque los ciclos de transmisión ocurren por lo general en ambientes selváticos, los vectores y especies de hospederos reservorios varían, por lo cual tienen potencial para entrar en contacto con humanos e infectarlos, generando un brote epidémico.

El CHIKV es un virus transmitido por mosquitos del género *Aedes* que se distribuye en regiones cálidas, y es responsable de brotes periódicos de una enfermedad febril conocida como fiebre chikungunya (CHIKF) (Constant, 2021). Esta enfermedad se caracteriza por producir poliartritis grave que en ocasiones puede prolongarse durante varios meses. El término 'chikungunya', que fue adoptado para denominar a esta enfermedad, proviene del idioma Kimakonde también llamado makonde o chimakonde, que se habla en regiones de Tanzania y Mozambique particularmente entre las tribus bantú de la costa este de África central, y su significado se traduce como "lo que se dobla", ya que provoca una postura encorvada y una marcha rígida de los individuos infectados (Silva, 2017).

Morfología del virus Chikungunya

Los viriones maduros del virus del CHIKV son esféricos y miden de entre 60 a 70 nm de diámetro (Fig. 1A). El virión está constituido por una sola copia del RNA

genómico de aproximadamente 11.4 kb empaquetado por 240 copias de la proteína C que forman la nucleocápside. Esta capa está rodeada por una membrana lipídica procedente de la célula hospedera, donde se anclan las glicoproteínas E1 y E2. Estas glicoproteínas se conforman en 80 espículas triméricas, cada una formada por tres heterodímeros de E1/E2 (ver Fig.1B). E1 y E2 son proteínas transmembranales que poseen regiones citoplasmáticas que interaccionan con la nucleocápside y que se ordenan en forma icosaédrica con una simetría $T = 4$ (Calvo *et al*, 2021; Liodelvio s. f.; Sharma *et al*, 2018).

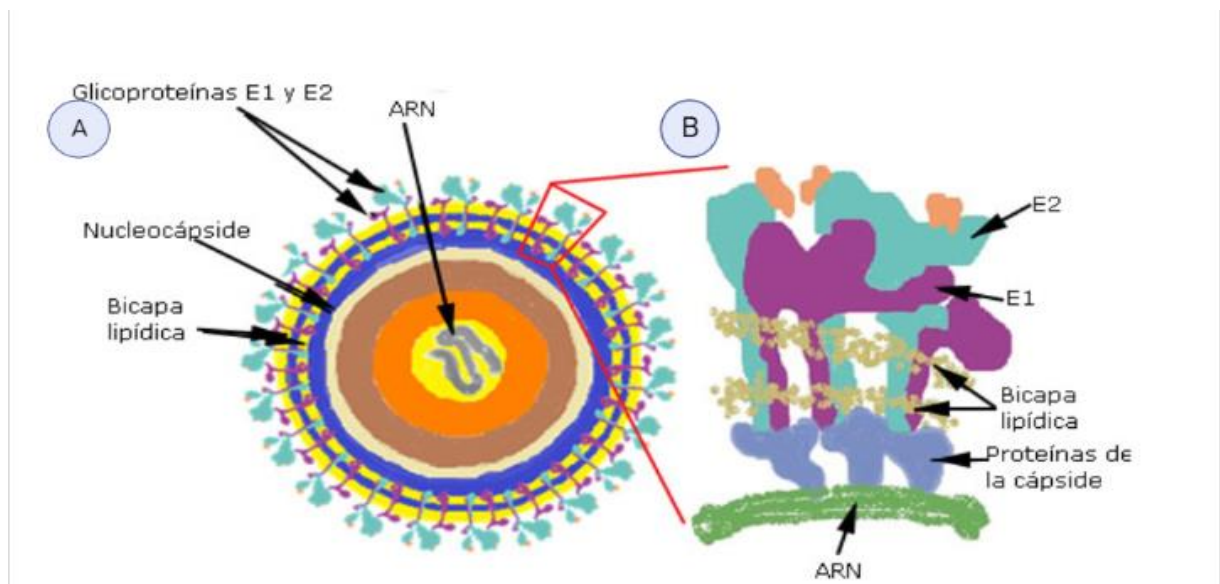


Fig. 1. Esquema de la conformación de la partícula viral del virus Chikungunya (A) Estructura de la partícula viral vista como una sección transversal del virus. (B) Visualización de las espículas proteicas de las glicoproteínas E1 y E2 de la envoltura. Imagen tomada y modificada de Liodelvio s. f.

Genoma del virus Chikungunya

Como se mencionó anteriormente, el CHIKV tiene un genoma de RNA monocatenario de sentido positivo con un tamaño de 11.8 kb. El genoma comprende dos marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés), ORF1 y ORF2, flanqueados por una estructura de caperuza (cap) en el extremo 5' no traducido (UTR) y una cola poliadenilada en el extremo 3' UTR, en la Fig. 2 se puede observar la organización del genoma. El ORF1 codifica para una poliproteína de 2,424 aminoácidos

que da lugar a las proteínas no estructurales responsables de la replicación del genoma. El ORF2 codifica para una poliproteína de 1,244 aminoácidos, que da lugar a las proteínas estructurales. (Calvo *et al*, 2021; Holmes *et al*, 2020; Liodelvio s. f.).

Genes y Proteínas

A partir de la poliproteína codificada por el ORF1 se generan cuatro proteínas no estructurales (nsP, por sus siglas en inglés) que se denominan nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4. En el caso del ORF2 se producen cinco proteínas estructurales: la proteína de cápside (C), y las proteínas de envoltura E3, E2, 6K y E1 (Fig.2) (Holmes *et al*, 2020; Khongwichit *et al*, 2021). En la tabla 1 se describen las funciones más importantes de las proteínas virales del CHIKV.

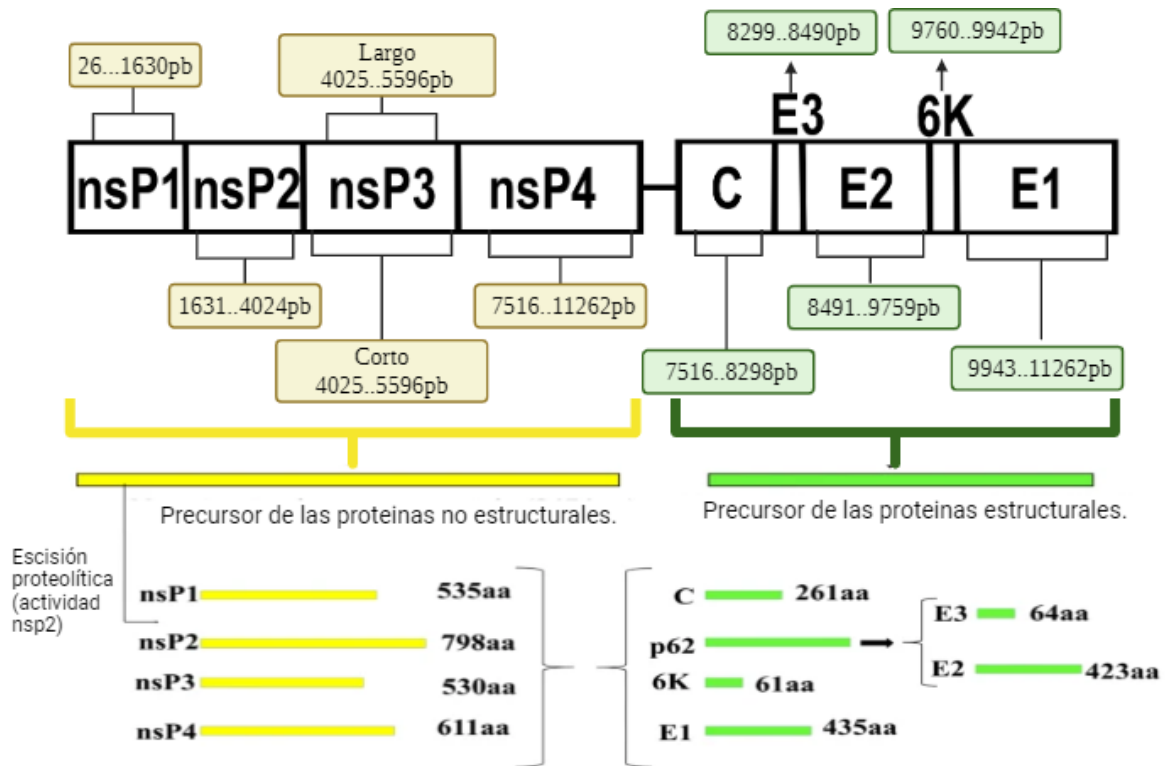


Fig. 2. Organización del genoma del CHIKV. La organización del genoma y productos proteicos generados después del procesamiento se muestran mediante un esquema. La posición de los genes se refiere a la cepa 05-115 con el No. de acceso AM258990.1. Imagen tomada y modificada de Noranate *et al*, 2014 y Singh *et al*, 2018.

Tabla 1. Función y localización de las proteínas del CHIKV

Proteína	Funciones
nsP1	Conformada por 535 aminoácidos (aa), tiene actividad de metiltransferasa y guaniltransferasa para la modificación del RNA viral, que evita su detección y degradación por el sistema inmunológico formando el cap (Calvo <i>et al</i> , 2021; Rupp <i>et al</i> , 2015).
nsP2	Conformada por 798 aa. Contiene un dominio trifosfatasa de RNA que está involucrado en la formación del cap. Además, es un nucleótido trifosfatasa (NTPasa) que aumenta la actividad de la RNA helicasa. También posee un dominio de proteasa en su extremo C-terminal que es responsable de la escisión autocatalítica de las poliproteínas no estructurales nsP123 y nsP1234. Por último, tiene un dominio similar al de metiltransferasa cuya función no se ha descrito (Bouraï <i>et al</i> , 2012).
nsP3	Conformada por 530 aa consta de tres dominios: el macrodominio N-terminal, el dominio único del alfavirus central (AUD) y el dominio hipervariable C-terminal (HVD). Las funciones de nsP3 en la replicación de alfavirus no se comprenden bien, Sin embargo, esta proteína es esencial para la replicación del RNA viral (Meshram <i>et al</i> , 2018).
nsP4	Conformada por 611 aa, es una polimerasa de RNA dependiente de RNA que contiene el dominio central RdRp, y suprime la fosforilación de la serina-51 del factor de iniciación de la traducción eucariota, subunidad alfa (eIF2 α), esta supresión refleja que la rama PERK de la vía UPR, ya que parece funcionar sinérgicamente con reguladores negativos de la fosforilación de eIF2 α (Rathore <i>et al</i> , 2013).
Proteína C	Conformada por 261 aminoácidos y dos dominios: el dominio C-terminal tiene actividad de serin-proteasa lo que permite su escisión de la poliproteína, mientras que el N-terminal interactúa con el RNA viral, permitiendo el empaquetamiento del genoma y la formación de la nucleocápside (Calvo <i>et al</i> , 2021; Lulla <i>et al</i> , 2013)
E3	Conformada por 64 aa, es un producto de la escisión de la glicoproteína precursora p62á. Esta proteína promueve la heterodimerización de E1-p62 y evita que E1 se exponga a un ambiente ácido, lo que provocaría una activación fusogénica prematura (Yap <i>et al</i> , 2017).
E2	Conformada por 423 aa, es un producto de la escisión de la glicoproteína precursora p62. Es una proteína de membrana tipo I y forma heterodímeros con la proteína E1. La glicoproteína E2 interactúa con los receptores del hospedero facilitando el reconocimiento del receptor (Calvo <i>et al</i> , 2021; Yap <i>et al</i> , 2017).
6K	Es un polipéptido hidrofóbico de 66 aa que está acilado con ácidos grasos, y puede formar canales iónicos que se asocian principalmente con las membranas del retículo endoplásmico (ER) lo que facilita la entrada, replicación y salida del virus (Dey <i>et al</i> , 2019).
E1	Conformada por 435 aa, es una proteína de membrana tipo I que se deriva de un precursor de la poliproteína estructural, participa en la fusión del endosoma, facilitando la entrada del virus a la célula vía endocitosis. Forma un heterodímero con E2 y en conjunto permiten el proceso de salida del virus (Voss <i>et al</i> , 2010)

Clasificación

El virus CHIKV se ha clasificado en tres genotipos con base en sus relaciones filogenéticas (Fig. 3). Estos genotipos tienen una distribución geográfica diferencial y se nombran de acuerdo con esta distribución. Los genotipos principales son el de África Occidental (WA), Sudáfrica Central Oriental (ECSA) y Linaje Urbano Asiático (AUL) (Spicher *et al*, 2021). El genotipo WA está aislado geográficamente y comparte una ancestría profunda con los otros genotipos. El genotipo ECSA se ha diversificado y se clasifica en tres linajes epidémicos que difieren en su distribución geográfica, estos son: el linaje de África Central (MAL), que posteriormente dio lugar a brotes epidémicos en América del Sur y Haití formando el Linaje Sudamericano (SAL), y el Linaje de África Oriental (EAL) que dio origen al Linaje del Océano Índico (IOL) (Morrison, 2014; Spicher *et al*, 2021; Volk *et al*, 2010).

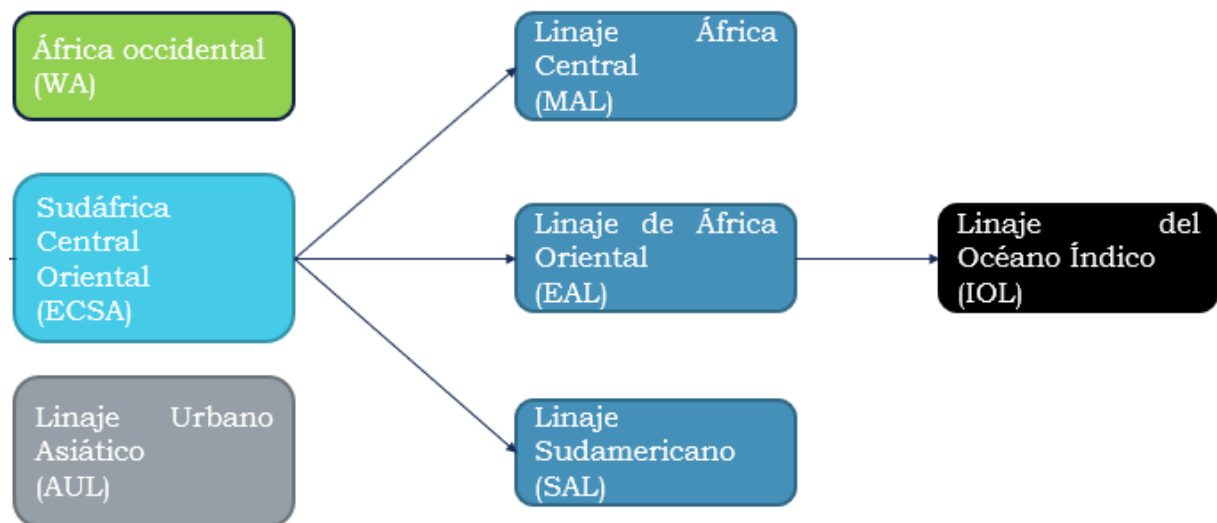


Fig. 3. Esquema en el que se representa la relación entre los genotipos del CHIKV.

La diversificación del CHIKV ocurre por la presencia de mutaciones, y se ha observado que algunas de estas son adaptativas y le confieren distintas características fenotípicas, antigénicas, infectividad y han favorecido la diseminación de CHIKV entre los vectores responsables de transmitir este virus. Por ejemplo, las mutaciones no sinónimas E1:A226V y E2:L210Q incrementan el número de hospederos que diseminan este virus, pues le permiten usar de manera eficiente a *Ae. albopictus* como vector (Rodríguez-Aguilar *et al*, 2022). Asimismo, las mutaciones conducen a diferencias en el perfil

antigénico, pues anticuerpos neutralizantes muestran diferencias significativas, de 4 a 8 veces, en la capacidad de neutralización se caracterizó los sueros inmunes humanos recolectados durante dos brotes independientes en Malasia del genotipo WA en 2006 y del genotipo ECSA en 2008-2010 (Chua, 2016).

Epidemiología

En el año de 1823 se registraron los primeros casos de una enfermedad similar a CHIKF, en Zanzíbar, África, seguido del reporte de una epidemia similar en la isla de St. Thomas, en el Caribe, durante los años 1827 y 1828. Desde entonces no se tiene un registro de alguna enfermedad similar, hasta que en 1952 se reportó el caso de un hombre perteneciente a la tribu Makondo, ubicada en Tanzania, a partir del cual se aisló el CHIKV y se caracterizó como un arbovirus ya que en esta misma epidemia se aisló el virus en mosquito (Constant, 2021; Da Costa & Saivish, 2023). Desde su primer registro, se han reportado brotes epidémicos esporádicos de CHIKV en varios países africanos y asiáticos.

En abril de 2005, se confirmó que el CHIKV era el causante de una epidemia en las Islas Comoras, al norte de Mozambique; lo que constituyó el primer reporte de CHIKV en la zona suroeste del Océano Índico (Morrison, 2014). En este brote más de una tercera parte de la población de dicha isla se infectó, con un promedio de 40.000 casos nuevos por semana y 284 muertes (Constant, 2021).

La propagación de los casos por CHIKV fue en aumento, con reportes de casos en las localidades de Mayotte, Mauricio y la isla francesa de La Reunión. En estas áreas los casos aumentaron de manera preocupante, con tasas de ataque que llegaban al 75% (Morrison, 2014).

A lo largo del 2005 y 2006, la India reportó casos de CHIKV en múltiples estados, y el registro oficial llegó a más de 11.3 millones de casos (Acosta-Reyes *et al.*, 2015). Se piensa que durante este periodo personas con altos niveles de viremia introdujeron el CHIKV en países donde no es endémico, como: Bután, Francia, Italia, Nueva Caledonia, Papúa Nueva Guinea, Yemen y EEUU (Morrison, 2014).

En diciembre del 2013, la OMS informó del primer caso de transmisión local de CHIKV en el hemisferio occidental, específicamente en la isla caribeña de San Martín. Para el 18 de julio del 2014, CHIKV ya había ocasionado más de 440,000 casos de la enfermedad en más de 20 países de las regiones del Caribe, América Central y América del Sur (Fig. 4). También, los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) informaron de 230 casos importados de CHIKF en Estados Unidos, así como de casos adquiridos localmente en Florida (Morrison, 2014).



Fig. 4. CHIKV en el hemisferio occidental. Reporte de la OMS de la primera transmisión local en diciembre de 2013, ocurrida en la isla de San Martín. Imagen tomada de Morrison, 2014.

Para el 2015, la presencia de CHIKV se confirmó en 16 países latinoamericanos, incluyendo a México. Los brotes estuvieron asociados en su mayoría con el genotipo AUL (Bettis *et al*, 2022).

Hoy en día el CHIKV se distribuye en casi todos los continentes del mundo, con mayor presencia del virus en América, Asia y África. En la Fig. 5 se muestra un mapa donde se señalan los 128 países con casos autóctonos (anexo I), causando brotes epidémicos. El virus ha estado completamente adaptado a un ciclo de transmisión urbana, lo que representa un grave riesgo para muchas regiones tropicales y templadas (de Lima Cavalcanti *et al*, 2022).

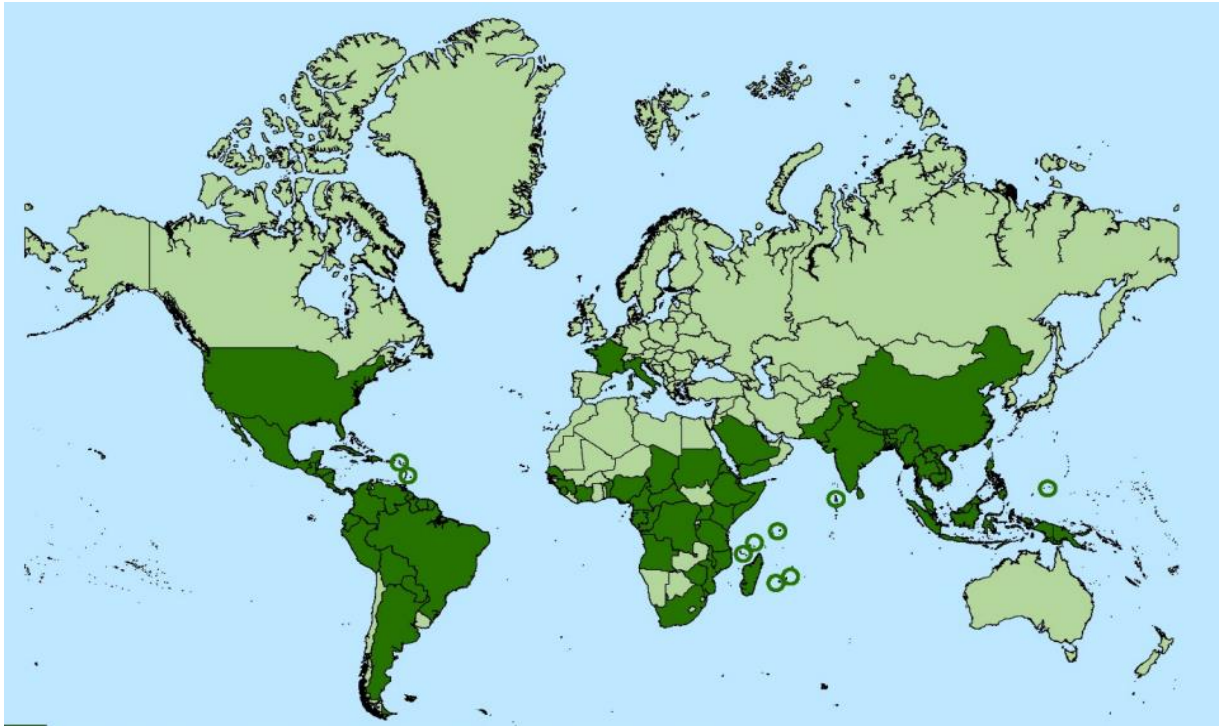


Fig. 5. Países y territorios donde se han notificado casos de CHIKV, (casos de CHIKV autóctonos hasta el 30 de octubre del 2020). Imagen tomada y modificada del Centro de Enfermedades Contagiosas (CDC).

Transmisión del virus del Chikungunya

La transmisión del CHIKV a hospederos vertebrados se produce mediante la picadura de mosquitos *Aedes* (subgénero *Stegomyia*) particularmente por las especies *Ae. aegypti* y el *Ae. albopictus* (Silva, 2017). El CHIKV se involucra en dos ciclos de transmisión: el ciclo selvático/enzoótico y el ciclo urbano epidémico/endémico. (Fernández, 2015) (Fig. 6). En África, el CHIKV circula en un ciclo enzoótico que incluye mosquitos que residen en áreas boscosas y primates no humanos (NHP), donde los NHP sirven como hospederos de amplificación. Estos ciclos dan lugar a la aparición de CHIKV urbano en un ciclo humano-mosquito peridoméstico (Eastwood *et al*, 2017). En el ciclo de transmisión enzoótico se han descrito dos grupos de vectores; uno incluye *Ae. vitatus*, *Ae. dalzieli*, *Ae. furcifer* y *Ae. formosus*, que tienen alta plasticidad ecológica. Dichas especies de mosquitos viven en el bosque, estas especies también son activas

en pueblos cercanos. El segundo grupo incluye *Ae. Africanus*, *Ae. luteocephalus* y *Ae. Taylor*, que están confinados principalmente a los bosques (Weaver *et al*, 2019).

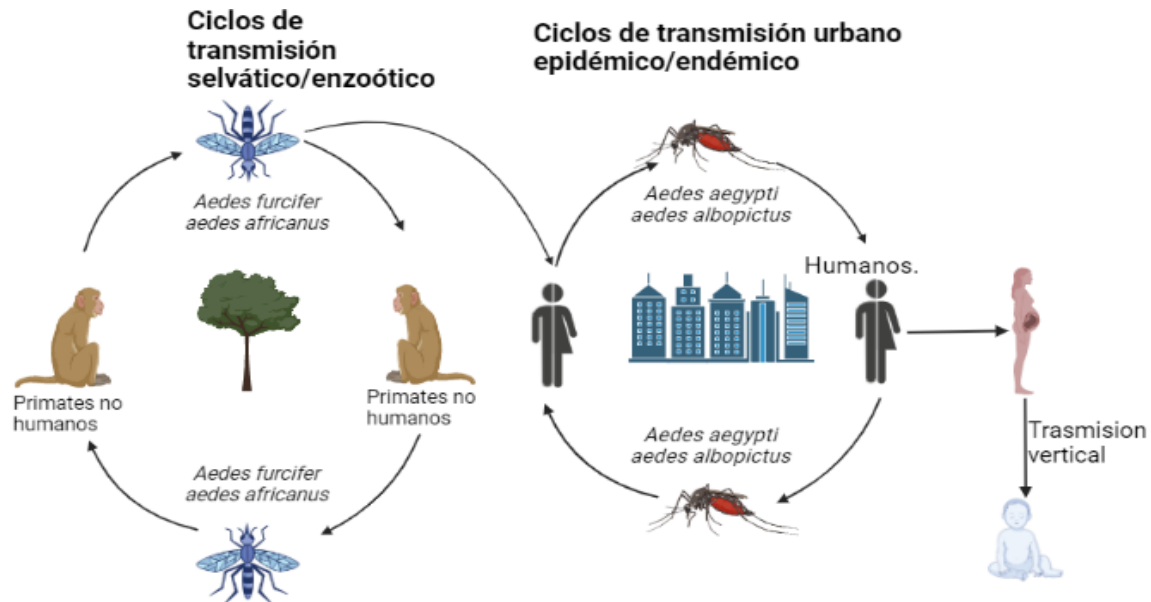


Fig. 6. Ciclos de transmisión del CHIKV y sus agentes transmisores.

Aunque el proceso que inició la transmisión epidémica no se ha dilucidado, podría deberse a humanos o hospederos enzoóticos que introdujeron el virus a las aldeas cercanas después de haberse infectado en el bosque o por el cambio en el rango de los mosquitos del bosque.

La transmisión en entornos urbanos es facilitada principalmente por los mosquitos *Ae. aegypti* o *Ae. albopictus*, en un ciclo de transmisión que involucra a los seres humanos y los mosquitos de manera continua (Fig. 6). Como podemos observar en la Fig. 7, CHIKV se presenta principalmente en los países cálidos, ya que están presentes ambos mosquitos, además que se ha expandido a países con temperaturas anuales medias más bajas, lo cual seguramente se debe a *Ae. albopictus*.

El mosquito *Ae. Aegypti* es el vector del CHIKV más importante y tiene una amplia distribución mundial, existiendo principalmente en áreas tropicales y subtropicales, mientras que *Ae. albopictus* puede prosperar en regiones templadas (Monteiro *et al*, 2019), y donde los mecanismos empleados para la propagación del CHIKV dependen de las interacciones entre el virus, vector y hospedador (Solis Vidal, 2022).

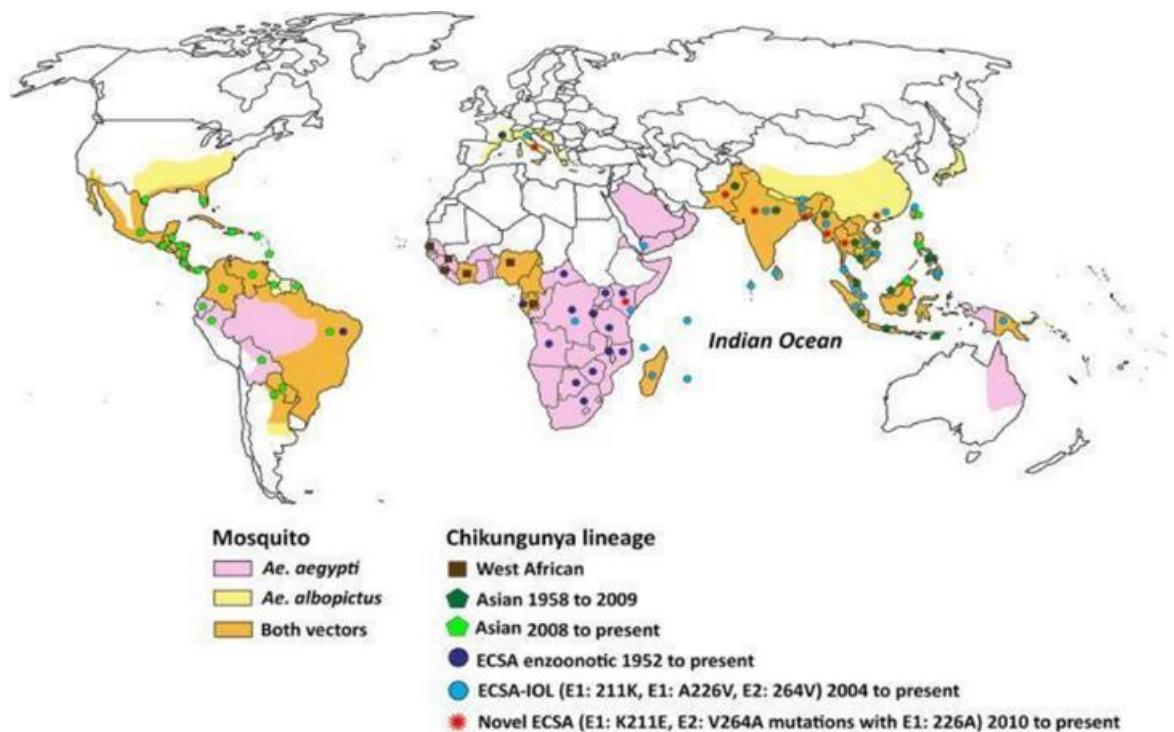


Fig. 7. Distribución geográfica de los genotipos de CHIKV durante 1952–2020 y la de sus principales vectores. Imagen tomada de Khongwichit, 2021.

Dentro de los mecanismos de transmisión del CHIKV se encuentra la transmisión horizontal, en la cual un mosquito infectado transmite el virus a un vertebrado, y este a su vez es picado por otro mosquito durante la fase aguda de la infección, con lo cual el vector se infecta para repetir el ciclo. Además, existen reportes de transmisión vertical, donde un mosquito hembra infectada transmite el virus a su descendencia; asimismo en humanos también se ha reportado transmisión vertical de madre a hijo, lo cual se da con mayor frecuencia durante el parto (Weaver *et al*, 2018).

El proceso de infección en los mosquitos se puede dividir en tres partes: adquisición, diseminación y transmisión (Fig. 8).

Cuando un mosquito no virémico pica a un vertebrado virémico el virus debe pasar las barreras físicas e inmunitarias del mosquito para poder establecer la infección en células de tejido epitelial en el intestino medio.

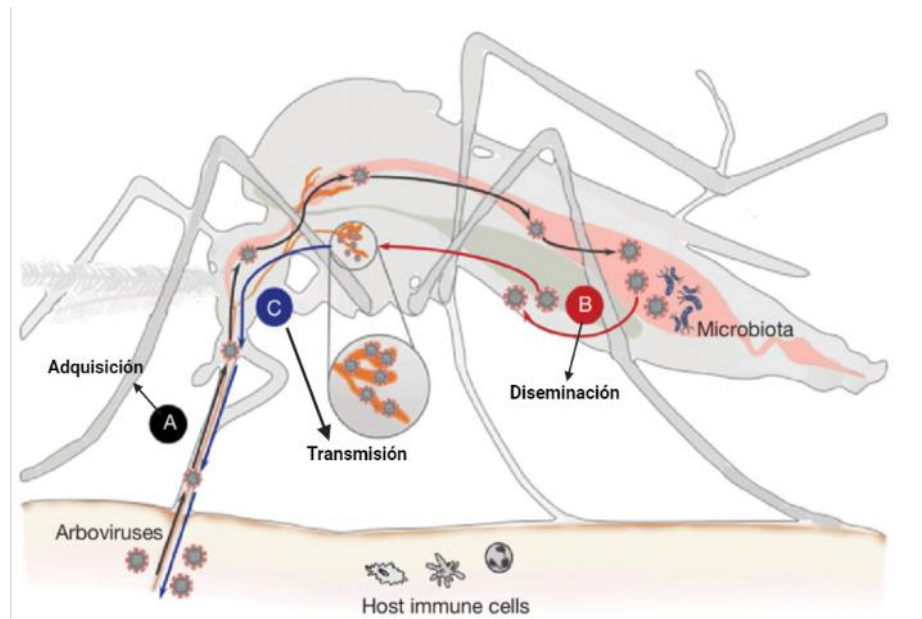


Fig. 8. Ciclo de vida de los arbovirus en mosquitos. Imagen tomada y modificada de Wu, 2019.

Se ha determinado que el tracto digestivo del mosquito es la primera estructura en interactuar con el CHIKV, en este lugar ocurre la primera replicación del CHIKV en el mosquito, proceso que se denomina adquisición (Fig. 9). La diseminación del virus puede ocurrir a partir del tercer día después de la exposición, en esta etapa el virus viaja a través del sistema sanguíneo e infecta a las células del intestino se replica y se dispersa al hemocele que es una cavidad corporal donde se almacena sangre que funciona como parte del sistema circulatorio y eso permite que se disemine otros órganos, como las glándulas salivales.

El CHIKV debe llegar a la lámina basal de las células acinares, replicarse dentro de ellas y llegar a la cara apical, donde se mantiene la saliva del mosquito, esto se debe a que la saliva del mosquito puede llegar a una homeostasis vascular y atenuar la respuesta inmune del huésped; en este punto el mosquito ya es competente para transmitir la infección a un nuevo hospedero vertebrado (Monteiro, 2019; Solís 2022).

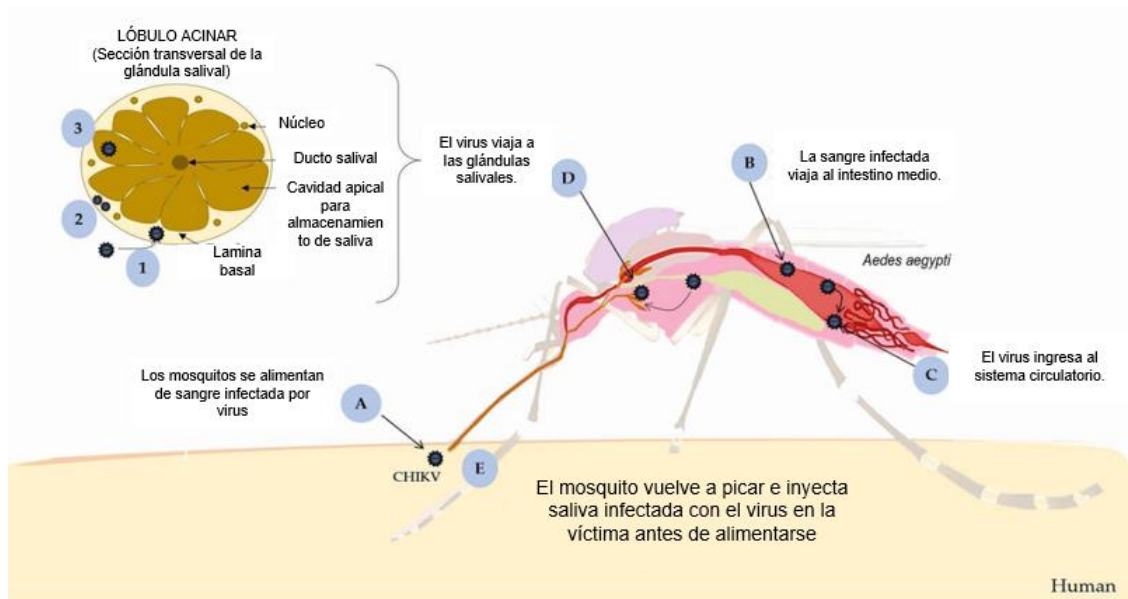


Fig. 9. Replicación de CHIKV en el mosquito. Imagen tomada y modificada de Monteiro, 2019.

En las primeras 24 a 48 horas posteriores a que el mosquito ingiere al virus, la respuesta inmune se activa. Esto incluye la inmunidad intestinal relacionada con la activación de vías de transducción como la Toll y Jak, los mecanismos de RNA de interferencia (RNAi), y los componentes de la hemolinfa como las inmunoglobulinas M y G. Además, el microbioma del mosquito puede influir en el proceso de infección y su establecimiento, como se muestra en la Fig. 10 (Monteiro, 2019; Solis Vidal, 2022; Wu, 2019).

En la figura 10 en el inciso A se observa que la presencia de la bacteria *Wolbachia* en el intestino medio del mosquito disminuye la carga viral en *Aedes sp.* Por otro lado, el inciso B muestra cómo *Serratia odorifera* facilita la entrada de CHIKV en las células del hospedero. El inciso C detalla la interacción directa entre la proteína Cry4B de *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (Bti) y PHB, un receptor de CHIKV en *Aedes sp.*, lo que podría brindar protección al mosquito contra la citotoxicidad de Cry4B. Además, en el inciso D se ilustra cómo *Ascogregarina spp.* contribuye al mantenimiento de CHIKV mediante un mecanismo de transmisión vertical en *Ae. albopictus*. Finalmente, en el

inciso E se señala cómo *Dirofilaria immitis* podría aumentar la transmisión de CHIKV en *Aedes* sp. (Monteiro, 2019).

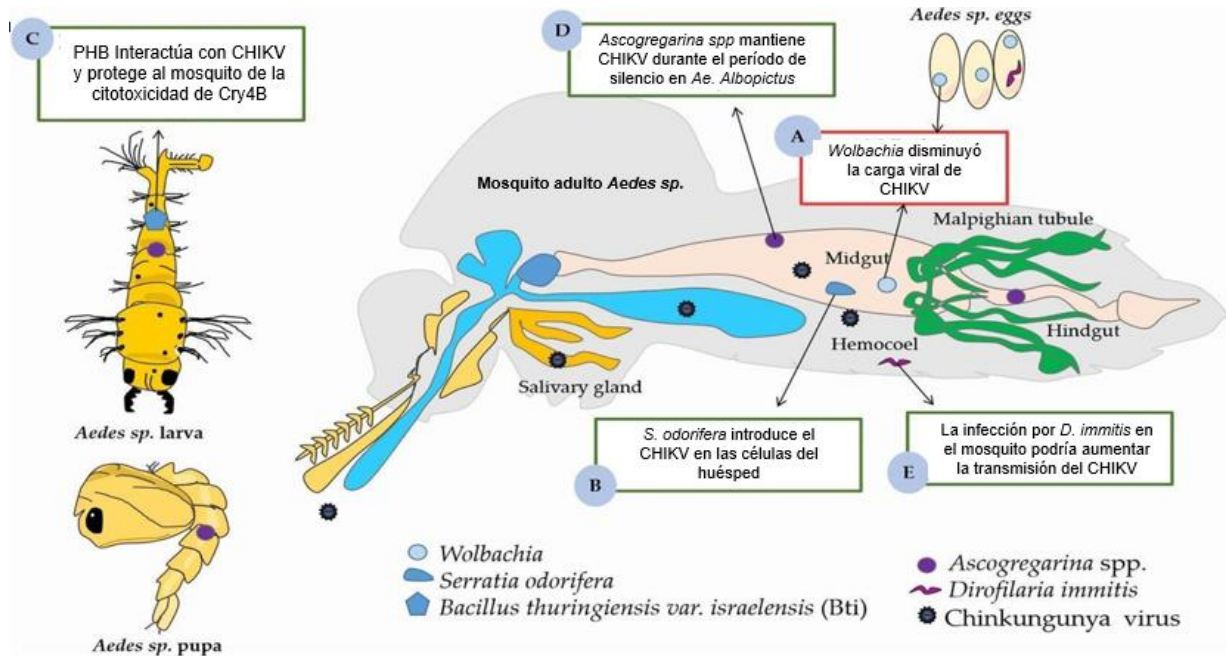


Fig. 10 El papel del microbioma del intestino medio en la infección por CHIKV en el vector *Aedes*. Imagen tomada y modificada de Monteiro, 2019.

En mamíferos, los eventos generales de la replicación de CHIKV son comparables a los de otros alfavirus, pero CHIKV muestra un mayor rango de tropismo, ya que puede replicarse en varias células adherentes humanas, incluidas las células epiteliales y endoteliales, así como los fibroblastos y macrófagos primarios (Silva *et al*, 2017; Sourisseau *et al*, 2007).

La entrada del CHIKV a su célula blanco está mediada por varios receptores. Hasta el momento se han descrito como receptores a la prohibitina (PHB), TIM-1 y otros miembros de la familia TIM, también conocidos como receptores PVEER (receptores para la entrada aumentada de virus mediada por fosfatidilserina), así como glicosaminoglicanos (GAG) como el heparán sulfato y la Mxra8, que también funcionan como receptores de varios alfavirus artrivirales. La unión del virus a la superficie celular está mediada por una hendidura formada por los heterodímeros de E2-E1 del CHIKV. Las partículas unidas al receptor se internalizan mediante endocitosis mediada por clatrina. Los cambios de pH en el compartimento endosomal

provocan cambios conformacionales que generan una infección exitosa. Posteriormente la nucleocápside se libera en el citoplasma, y el genoma viral se traduce para producir la replicasa viral y otras nsps. La replicación del virus genera más copias del genoma viral, así como un RNA subgenómico (26S), el cual codifica para las proteínas estructurales. Por último, las proteínas virales se ensamblan nuevamente en un virión y este se libera fuera de las células infectadas (Fig. 11) (Basore *et al*, 2019; Moneriz *et al.*, 2016; Silva *et al*, 2017).

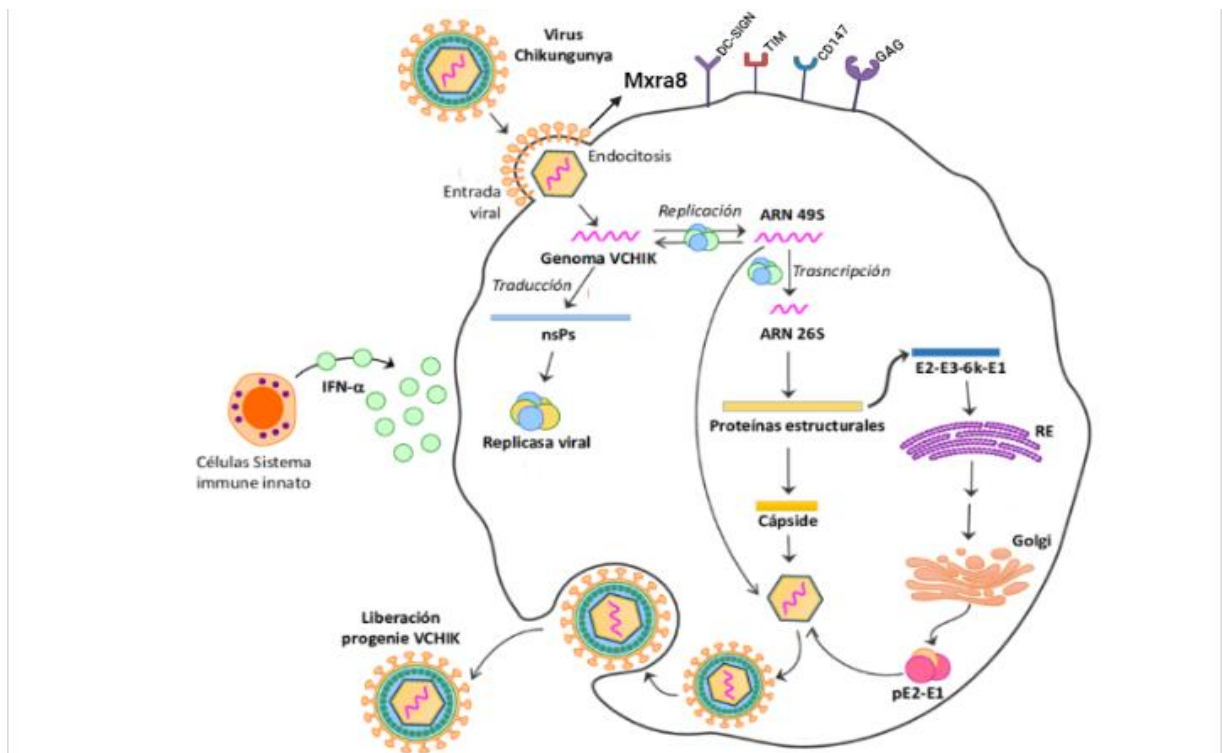


Fig. 11. Ciclo replicativo del CHIKV en células de mamíferos. Imagen tomada y modificada Pretell, 2016.

Patogénesis

El CHIKV se replica en el lugar de la inoculación en fibroblastos y macrófagos. El período de incubación del CHIKV puede oscilar entre 1 y 12 días. La mayoría de las personas infectadas presentan los síntomas indicados en la tabla 2, aunque el 15% de los infectados no desarrollan ningún síntoma (Constant *et al*, 2021).

Tabla 2. Manifestaciones típicas y atípicas de la enfermedad CHIKV en humanos.

Órgano/Sistema	Síntomas típicos	Síntomas atípicos
Sistémico	Fiebre; astenia	Linfadenopatía
Musculoesquelético	Artralgia; artritis; mialgia; edema articular; tenosinovitis; dolor de espalda; poliartralgias persistentes o recurrentes-remitentes	Reumatismo inflamatorio crónico; destrucción articular
Dermatológico	Sarpullido; eritema	Dermatosis ampollosa; hiperpigmentación; estomatitis; xerosis
Neurológico	Dolor de cabeza	Meningoencefalitis; encefalopatía; convulsiones; anomalías neurosensoriales; Síndrome de Guillain-Barré; paresia; parálisis; neuropatía
Gastrointestinal		Náuseas; vómito; dolor abdominal; anorexia; diarrea
Hematológico	Linfopenia; trombocitopenia	Hemorragia
Ocular	Dolor retro-orbitario; fotosensibilidad	Neuritis ópticas; retinitis; uveítis
Cardiovascular		Miocarditis; pericarditis; insuficiencia cardiaca; arritmias; cardiomiopatías
Hepático		Hepatitis fulminante
Pulmonar		Insuficiencia respiratoria; neumonía
Renal		Nefritis; fallo renal agudo

La mayoría de los síntomas de esta enfermedad se resuelven en un período de 7 a 10 días, que corresponde a la fase aguda de la enfermedad; sin embargo, muchas personas

infectadas han informado artralgia prolongada que ha durado semanas o incluso meses y a esto se le conoce como fase crónica o reumatismo inflamatorio crónico post-chikungunya (Vu *et al*, 2017).

ANTECEDENTES PARTICULARES

Mecanismos de la evolución

El estudio de la evolución de los virus es de gran interés multidisciplinario y abarca desde los estudios epidemiológicos hasta el desarrollo de nuevas y mejores estrategias antivirales, y su uso como modelos para estudios sobre los mecanismos de evolución y diversificación de los seres vivos. Los virus de RNA se caracterizan por altas tasas de mutación, debido a que la RNA polimerasa dependiente del RNA viral (RdRP), que replica al genoma viral, ya que la mayoría de estos carecen de actividad de exonucleasa y no es capaz de corregir errores. Además, los tiempos de generación cortos y los grandes tamaños de población contribuyen a que estos virus generen alta diversidad en muy poco tiempo (Ali et al., 2018).

La diversidad genética está definida como el conjunto de variaciones heredables intraespecíficas que están presentes en los individuos de una población (Solis Vidal, 2022).

Existen diversos mecanismos que modulan la diversidad:

- Mutación: Cambio en la secuencia de ADN de un organismo.
- Migración: Intercambio de individuos reproductores entre poblaciones distintas.
- Selección natural: Es el cambio en la frecuencia de variantes de acuerdo a su adecuación.
- Deriva génica: Es el cambio de frecuencias de variantes por procesos aleatorios y actúa disminuyendo la diversidad.

El CHIKV, al igual que otros virus de RNA, genera poblaciones heterogéneas dentro de los organismos hospederos virémicos lo cual les permite soportar eventos de deriva génica extremos e inclusive, les permite responder a las presiones de selección negativa y positiva que les influyen en su adaptabilidad (Fig. 12).

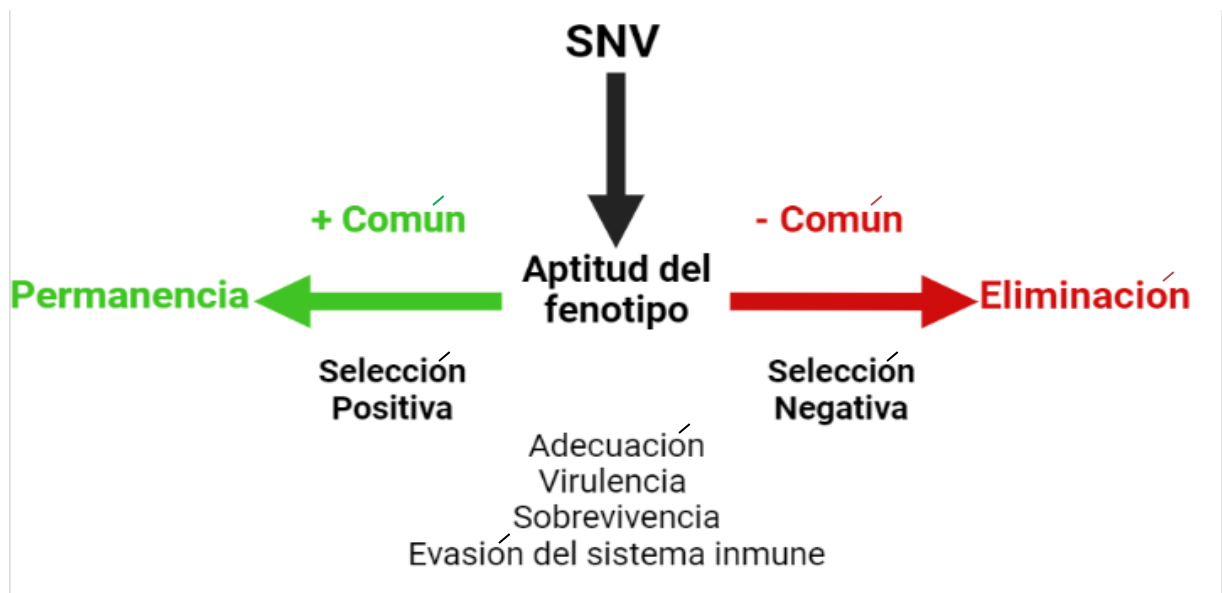


Fig. 12. Mecanismos involucrados en la selección natural.

Cuellos de botella

La tasa de sustitución de nucleótidos de CHIKV de 4.33×10^{-4} sustituciones de nucleótidos por sitio por año (subs/nt/año). Esta tasa relativamente baja, es comparable a la de otro arbovirus como el dengue, y esto se debe a que estos virus deben alternar entre dos hospederos diferentes lo que restringe su evolucionabilidad (Volk *et al.*, 2010). Además, durante los eventos de transmisión entre artrópodos y vertebrados ocurren cuellos de botella que disminuyen la variabilidad genética de la población (Fig. 13), lo que disminuye la variabilidad viral y permite la fijación de mutaciones de manera independiente de su valor selectivo (Solis Vidal, 2022).

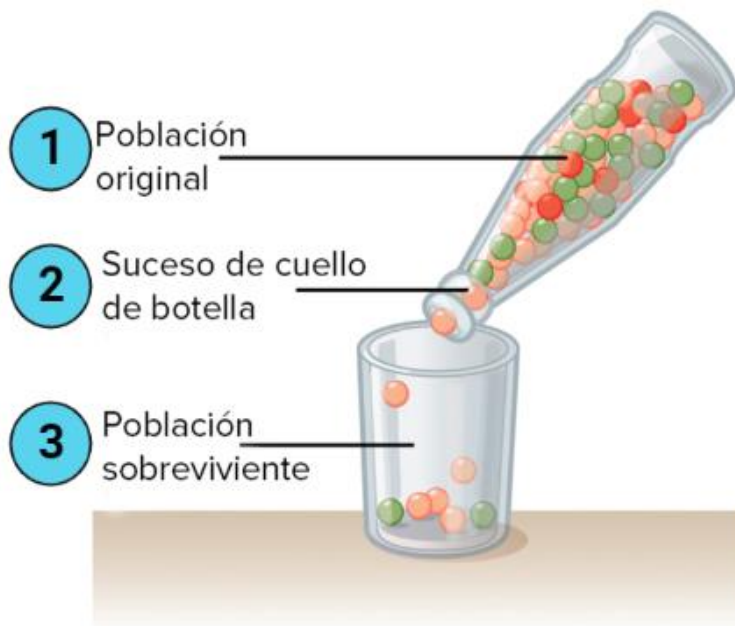


Fig. 13. Mecanismo de cuello de botella. 1) La población original se mantiene en un entorno. 2) Un evento estocástico puede reducir la variabilidad genética dentro de una población, aunque la variabilidad del virus disminuye, se retiene una pequeña cantidad de diversidad viral. 3) La supervivencia estocástica hace que la diversidad de la población del virus cambie significativamente. Imagen tomada y modificada de Khan Academy, Deriva génica.

Selección natural

La evidencia de la selección natural sobre secuencias codificantes puede determinarse comparando el número de mutaciones sinónimas y no sinónimas. Para ello se calcula la relación dN/dS (número de sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo/número de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo). En la genética de poblaciones se encontró que la relación entre la presión de selección y el coeficiente dN/dS difiere en términos cualitativos cuando se estudian en individuos de una sola población en comparación con muestras de genotipos que presentan divergencias. Cuando se comparan genotipos divergentes, es decir, poblaciones que han evolucionado por separado durante un período significativo, la relación entre la presión de selección y el coeficiente dN/dS puede ser más compleja, ya que puede haber cambios en la función de la proteína en diferentes genotipos, lo que podría llevar a valores dN/dS diferentes incluso si hay una presión de selección similar (Kryazhimskiy, *et al* 2008; Solis Vidal, 2022).

A) Selección positiva

A pesar de la baja tasa de mutación de CHIKV, la acumulación gradual de cambios genéticos importantes en virus provenientes de África oriental y central ha impulsado los cambios epidemiológicos de la infección de CHIKV.

En la epidemia del Océano Índico se identificó la mutación en la posición 226 de la glicoproteína que provoca la sustitución de Alanina por Valina (E1-A226V). Se ha demostrado que esta mutación es suficiente para aumentar drásticamente la capacidad de diferentes cepas de CHIKV para infectar *Ae. Albopictus* (Tsetsarkin *et al*, 2011). Esta mutante se transmite más eficientemente por el vector predominante en la isla, el *Ae. Albopictus*. Este cambio de vector permitió que el CHIKV se diseminó de manera acelerada ya que, aunque *Ae. aegypti* se encuentra ampliamente distribuido en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, *Ae. Albopictus* también puede sobrevivir en climas más fríos y, por lo tanto, se encuentra en las regiones templadas de China, las Américas, Europa y el este de Australia (Spicher *et al*, 2021). Además, se han descrito sustituciones epistáticas en E2 y en E3 que pueden proporcionar una ventaja selectiva adicional para la transmisión de CHIKV por *Ae. albopictus* (Fig. 14). La adaptación de CHIKV a *Ae. Albopictus* es epidemiológicamente importante, porque esta especie de mosquito es más exófila y, en algunos lugares, se alimenta de una variedad de animales domésticos y salvajes además de humanos, dándole al virus el potencial de expandir su rango de vectores y hospederos (Acosta *et al*, 2016; Chen *et al*, 2021).

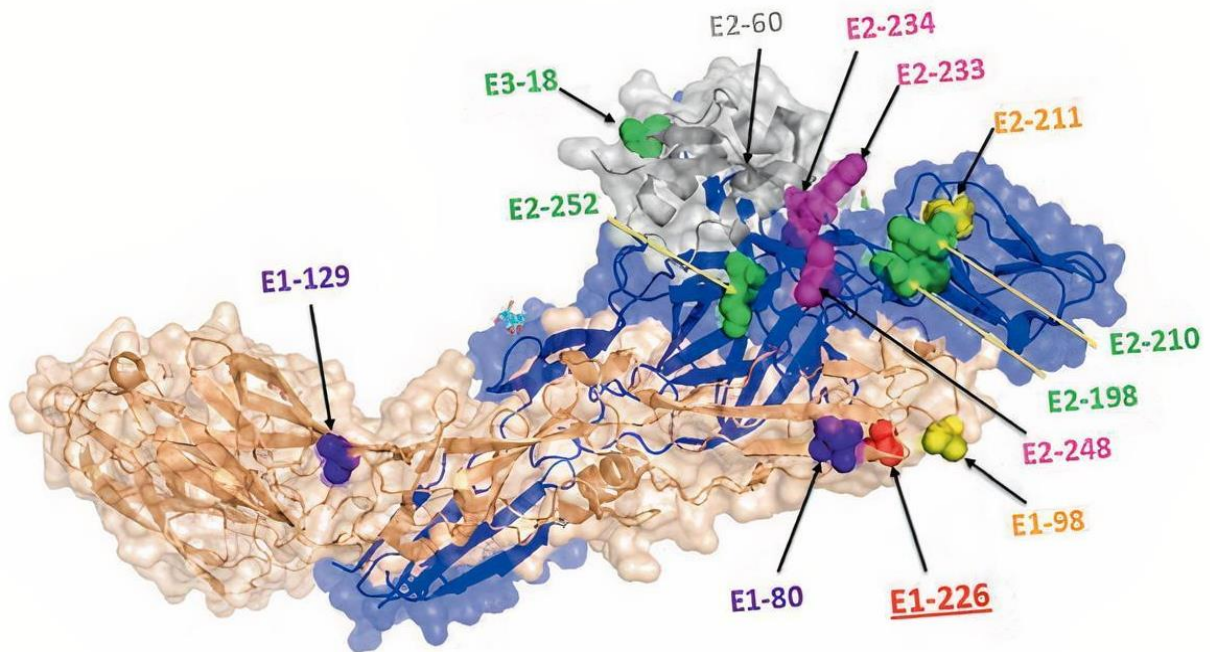


Fig. 14. Mapa que muestra las sustituciones en las glicoproteínas de la envoltura que afectan la capacidad de transmisión del CHIKV por *Ae. albopictus* (modelo 3D del pico E3/E2/E1). La estructura atómica del complejo de glicoproteínas CHIKV E3 (gris), E2 (azul) y E1 (dorado). Imagen tomada y modificada de Weaver, 2015.

Tsetsarkin y colaboradores demostraron que las mutaciones en las posiciones E2-60 y E2-211 tenían un papel crítico en la infección de vectores. Se demostró que E2-D60G produce un cambio importante en la infectividad de CHIKV ya que se determinó que la presencia de este cambio juega en contra de la capacidad infectiva del CHIKV, además que la presencia de E2-D60G genera un impacto negativo en la capacidad de prescindir del colesterol y crecer de manera más eficiente del CHIKV, aptitud ventajosa que le otorgó la mutación E1-A226V. La mutación E2-T211I disminuye hasta casi 50 veces la capacidad del CHIKV de infectar a *Ae. Albopictus* otorgada por la mutación E1-A226V (Tsetsarkin *et al* 2009).

Aunque el estudio de estos cambios ha sido intenso, aún no se comprende en su totalidad el efecto que tiene sobre la capacidad de infectar a los vectores, en la tabla 3 se muestra un resumen de lo que se conoce acerca del efecto de las sustituciones de aa en la capacidad de trasmisión del virus por el mosquito vector.

Tabla 3. Sustitución de aminoácidos que han demostrado que en IOL CHIKV afectan la transmisión por mosquitos vectores urbanos. Tabla tomada y modificada de Weaver 2020.

Sustitución	Proteína	Año de detección	Genotipo de CHIKV	Efecto de la aptitud de transmisión en <i>Ae. Albopictus</i>	Efecto de la aptitud de transmisión en <i>Ae. aegypti</i>
A226V	E1	2005	IOL	Aumento de 40 veces	Ligera disminución
			AUL	Ninguno detectado	Ninguno detectado
K252Q	E2	2007	IOL	Aumento de 8 veces	Ninguno detectado
			AUL	Ninguno detectado	
K233E	E2	2008	IOL	Aumento de 6 veces	Ninguno detectado
			AUL	Ninguno detectado	
R198Q/S18f	E2/E3	2008	IOL	Aumento de 16 veces	Ninguno detectado
			AUL	Ninguno detectado	
L210Q	E2	2009	IOL	Aumento de 5 veces	Ninguno detectado
			AUL	Ninguno detectado	
K211E/V264A	E1/E2	2010	IOL	Ninguno detectado	Pequeño incremento
I211T ¹	E2	Desconocido	ECSA	Ninguno detectado*	Ninguno detectado

¹ La treonina se encuentra solo en cepas de genotipo AUL y se cree que es el resultado de un efecto fundador cuando se introdujo una cepa ECSA ancestral en algún lugar de Asia.

*Epistático, treonina permite la penetración de E1-A226V.

Como podemos observar, algunos genotipos pueden haber experimentado eventos de selección positiva, ya que si el valor de dN/dS es >1 habrá evidencia de selección positiva y si es <1 indicará la acción de la selección negativa. En caso de que el coeficiente sea igual a 1 tendremos presencia de neutralidad y esto se da cuando las mutaciones son sinónimas y en algunos casos en mutaciones no sinónimas (Kryazhimskiy, *et al* 2008; Solis Vidal, 2022).

B) Selección negativa

Al igual que los procesos epistáticos pueden expandir la gama de vectores de CHIKV también existen eventos que redujeron significativamente la aptitud del CHIKV para infectar vectores (Fig.15).

Chen y colaboradores han señalado las mutaciones E2-198Q, E2-233E y E2-252Q en el genotipo AUL como perjudiciales para la replicación del virus en *Ae. Albopictus*. Esto se demostró cuando introdujeron las mutaciones adaptativas E2 en la cepa Mal06 del genotipo AUL. En el caso de la mutación E2-198Q, se observó una disminución de aproximadamente dos veces en la aptitud replicativa, aunque no alcanzó significancia estadística, sugiriendo un cambio casi neutro. E2-252Q también mostró un impacto negativo, reduciendo la aptitud en siete hasta trece veces. Sin embargo, la mutación más deletérea resultó ser E2-233E, que disminuyó la aptitud entre 50 y 100 veces. En dicho trabajo, los autores demostraron que las mutaciones anteriormente mencionadas no están presentes en el genotipo AUL, no solo por la incapacidad del genotipo para adquirir la mutación E1-226V, sino más bien que las mutaciones en E2 mencionadas previamente pueden ser neutras o tener un efecto perjudicial en esta aptitud. Esto subraya cómo las mutaciones en las proteínas E2 y E3 pueden influir de manera crítica en la adaptación del CHIKV a sus vectores.

Existe un caso específico en la proteína E3 donde E3-K33E tiene su interacción con E2-198Q, mientras su interacción con E3-33K no mostró un cambio que afectara la aptitud del virus, la dinámica fue diferente en el contexto de E3-33E mutante. En este caso, la mutación E3-33E resultó perjudicial, ocasionando una disminución de ocho veces en la

aptitud replicativa. Además, E2-233E, que ya se consideraba deletérea en combinación con E3-33K, resultó en una disminución en la adecuación del virus, y al observarse junto con la mutación E3-33E, produjo una disminución hasta de 33 veces de su capacidad en adecuarse al vector (Chen *et al* 2021).

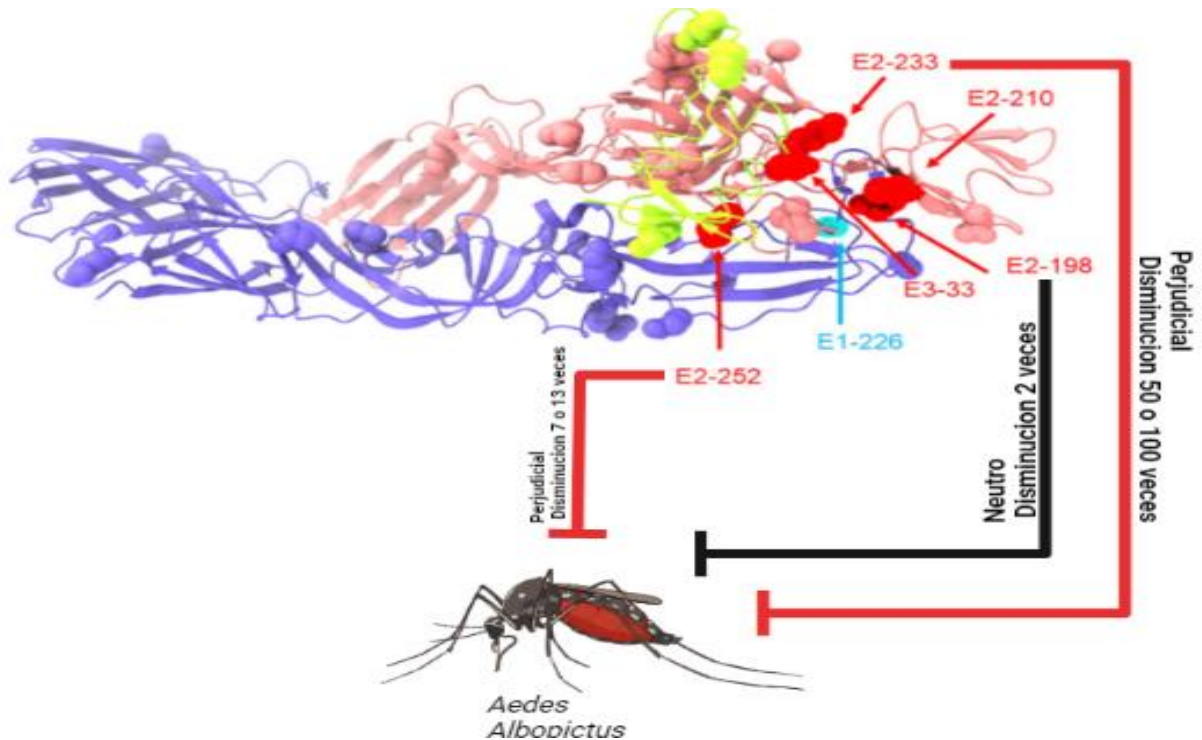


Fig. 15. Las glicoproteínas de la envoltura del CHIKV de genotipo asiático. La proteína E1 está en azul claro, la proteína E2 está en rojo claro y la proteína E3 está en amarillo. La imagen muestra los cambios de aminoácidos que perjudican la aptitud replicativa de la cepa asiática en *Ae. Albopictus*. Imagen tomada y modificada de Chen, 2021

Riemersma y Coffey en el 2019 demostraron que las poblaciones de CHIKV están sujetas a una selección negativa en mosquitos con una conservación sustancial de la secuencia en regiones no codificantes. Además, CHIKV se somete a una selección purificadora a medida que infecta y se disemina en *Ae. aegypti*. En este estudio, se exploró la dinámica de las poblaciones del CHIKV en mosquitos para lo que se llevó a cabo la secuenciación y caracterización detallada de poblaciones de CHIKV aisladas de mosquitos infectados con la variante tipo salvaje (WT) que es el CHIKV rescatado de un clon infeccioso que se pasó en pases en serie en cultivos de células de mosquitos veinte veces en presencia o ausencia de antiviral.

Se determinó la competencia del vector de la cepa 06-049 del brote de IOL CHIKV a los 5 y 12 días después de la alimentación (dpf). Durante este periodo, se evaluaron las tasas de infección, diseminación y transmisión del virus, proporcionando un análisis de la transmisión de la cepa en relación con la alimentación de los mosquitos. La diversidad de variaciones genéticas en las muestras de sangre fue menor en las poblaciones del CHIKV, es decir disminuyó significativamente y también su frecuencia de sustitución. (Riemersma *et al*, 2019).

Estos cambios se manifiestan en la variabilidad de sus genotipos a nivel global, por lo que se han hecho esfuerzos para continuar la vigilancia del CHIKV para monitorear procesos de adaptación y cambios en su capacidad de transmisión, utilizando la herramienta Nexstrain (Fig. 16). En la imagen podemos ver que los genotipos más representativos en América, son ECSA y AUL, siendo México nuestro lugar de interés.

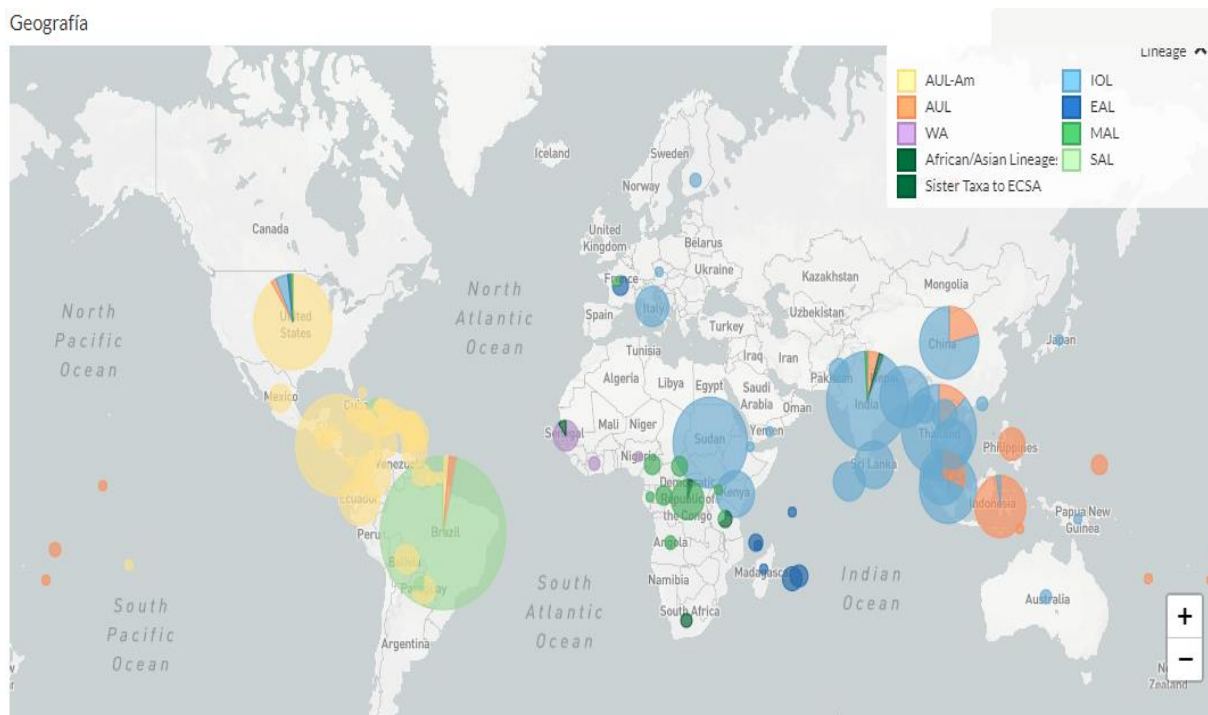


Fig.16. Epidemiología molecular del CHIKV visualizada en Nexstrain 3.0.

CHIKV en México

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), las infecciones por CHIKV notificadas en las Américas disminuyeron de más de 2.5 millones de casos

entre 2013 y 2017 a menos de 800 000 casos entre 2018 y 2022. Sin embargo, este número puede ser erróneo, ya que es difícil discriminar entre CHIKF y otras enfermedades producidas por otros arbovirus debido a la similitud de sus manifestaciones clínicas o posibles coinfecciones (Zurbia-Flores *et al*, 2023).

En 2014 se detectó CHIKV por primera vez en México, y se acumularon 13,569 casos confirmados en los siguientes tres años. Un estudio identificó a la cepa circulante en México como parte del genotipo AUL, y se agrupó filogenéticamente con genotipos de las cepas del Caribe (Rodríguez-Aguilar *et al.*, 2021). La mayoría de los estudios sobre la diversificación molecular de CHIKV en México se enfocaron en regiones geográficas limitadas del país, generalmente en las fronteras de Chiapas y Tamaulipas o investigaron sólo el gen estructural E1 del virus, lo cual limitaba los estudios (Galán-Huerta *et al.*, 2019). Se han extendido estos estudios tomando en cuenta más regiones de México y además otras proteínas estructurales y no estructurales (Tabla 4). Estudios filogenéticos mostraron que el único genotipo circulante era el genotipo asiático (Fig. 17). Las introducciones múltiples del virus al sur de México desde América Central y el Caribe y su propagaron de manera breve y localizada, jugó un papel muy importante en la transmisión del mismo (Galán-Huerta *et al*, 2019; Rodríguez-Aguilar *et al*, 2022)

Tabla 4. Cambios de aminoácidos identificados entre las secuencias ECSA, IOL, AUL, caribeño y mexicano.

Gen	Mutación	Genotipos				
		ECSA	IOL	AUL	AUL-Am (Caribe)	AUL-Am (México)
E1	A226V	A	V	A	A	A
	K211E	E	K	E	E	E
	T145A	T	T	A	A	A
	S225A	A	A	S	S	S
E2	G118S	G	G	S	S	S
	S194G	G	G	S	S	S
	V255I	I	I	V	V	V

	D205G	G	G	D	D	D
	S207N	N	N	S	S	S
	S248L	L	L	S	F*	F*
	K252Q	Q	K	K	K	K
NSP3	I383T	T	T	I	T	T
	I413T	T	T	I	I	I
	Q434L	L	L	Q	Q	Q
	A437V	V	V	A	T	T
	I449M	M	M	I	I	I
	L451F	L	L	L	F	F
	R452Q	Q	Q	R	R	R
	I457T	T	T	I	I	I
	T458A	A	A	T	T	T
	V459T	T	T	V	V	V
	L461P	P	P	L	L	L
	S462N	N	N	S	S	S
	P471S	S	S	P	P	P
	D483N	N	N	D	N	N
D484E	E	E	D	D	D	



Fig. 17. Filogenia de máxima verosimilitud del clado construida con un grupo de 59 secuencias de CHIKV junto a otras cuatro secuencias obtenidas al comienzo del brote México durante el brote de 2014-2016 y otras 48 secuencias de otras partes del mundo. Imagen tomada y modificada de Rodríguez-Aguilar et al, 2022.

Diagnóstico y vacunas

El CHIKV junto con otros arbovirus se considera una amenaza para la salud mundial, además el poder diferenciar las manifestaciones clínicas entre enfermedades arbovirales es un reto para el diagnóstico, más aún cuando circulan en la misma región al mismo tiempo. Además, la fiebre por chikungunya continúa siendo una enfermedad tropical descuidada, en gran medida debido a su epidemiología compleja y a la falta de claridad en cuanto a su incidencia y su impacto en la salud en todo el mundo (Zurbia-Flores et al., 2023).

Debido a que el CHIKV tiene distintas manifestaciones clínicas durante la infección complica la tarea de un diagnóstico de rutina, esto puede solucionarse aplicando diagnósticos moleculares que son más sensibles y rápidos, además de que logran detectar los genotipos del CHIKV, pero muchas veces este tipo de diagnóstico no está al alcance de las regiones afectadas, ya que estas cuentan con recursos limitados, donde la carga económica y la falta de personal médico especializado hace que el CHIKV pase desapercibido y facilite su posible expansión (Montalvo *et al*, 2023; Silva *et al.*, 2018).

Subudhi *et al*, en el 2018 describen las dificultades de que CHIKV sea candidato al uso de antivirales utilizados contra otras enfermedades pues no se tienen evidencias claras de su utilidad contra CHIKV. Además, se debe considerar que son pocos los candidatos con los que se cuenta, lo cual lo hace un desafío mucho más grande. Finalmente, no se tiene un modelo animal adecuado para la infección por CHIKV, de tal manera que los estudios que se pueden hacer son limitados (Subudhi *et al.*, 2018).

Al no ser una enfermedad mortal y ubicarse en regiones geográficas limitadas, hace que el CHIKV sea subestimado, lo cual es un error ya que hay casos en los que se presenta con dolor intenso y puede ser invalidante, a eso se le puede agregar que los casos siguen siendo menores que el Zika y el Dengue, pudiendo ser subdiagnosticados, por lo que los diagnósticos pueden llegar a ser erróneos ya que tienen cuadros clínicos muy similares, lo cual lo hace que se pase desapercibido.

En noviembre del 2023, la FDA aprobó la primera vacuna que previene la infección en contra del CHIKV denominada "Ixchiq" la cual se administra como dosis única mediante una inyección intramuscular. Esta vacuna se basa en la cepa La Reunión (LR2006-OPY1) del genotipo ECSA y se caracteriza por una delección de 61 aminoácidos en la proteína nsp3, codificada por un gen del complejo replicasa viral, que atenúa el virus *in vivo*. Esta vacuna contiene al virus del chikungunya de manera atenuada y puede causar síntomas leves a los que experimentan las personas infectadas de CHIKV. Es un logro importante ya que se puede reducir el número de casos en los mas de 100 países donde el CHIKV está presente (Schneider *et al.*, 2023).

JUSTIFICACIÓN

El CHIKV ha sido históricamente endémico en regiones tropicales y la introducción ocasional del virus en áreas urbanas provoca brotes periódicos de la enfermedad por CHIKV, lo cual ocurre en un ciclo de transmisión humano-mosquito. CHIKV es una enfermedad reemergente que al aumentar su rango de vectores aumentó su velocidad de dispersión dando lugar a su resurgimiento reciente y la propagación mundial. Estos factores hacen que CHIKV sea de importancia para la salud pública. Aunque esta enfermedad no tiene tasas de mortalidad muy altas, causa una enfermedad inflamatoria musculoesquelética incapacitante que puede persistir durante meses o años después de la infección aguda. El tener un mayor conocimiento sobre los patrones de distribución y diversidad de este virus nos permitirá proponer mejores estrategias terapéuticas contra él, ya que en la actualidad no existe una terapia dirigida autorizada para la infección por CHIKV.

El estudio de la epidemiología de dichos virus y la identificación de variantes virales que conduzcan a este patógeno a ocasionar infecciones con mayor gravedad o que se puedan transmitir con mayor facilidad es de suma importancia en términos de salud pública. Además, es indispensable contar con un sistema de diagnóstico rutinario que permita realizar el diagnóstico diferencial para CHIKV y DENV (cuyos cuadros clínicos son muy similares).

La inclusión de secuencias derivadas de mosquitos en este estudio es de particular importancia, ya que nos brinda una visión completa del ciclo de transmisión del CHIKV. Además de que nos permitirá analizar la variabilidad genética y evolución en secuencias provenientes de pacientes y por otro lado de mosquitos, el inferir los patrones de distribución del virus y la construcción de una red de haplotipos, nos va a proporcionar un entendimiento más profundo de estas relaciones entre las secuencias de pacientes y mosquitos.

Los análisis filodinámicos nos conducirán a comprender los procesos epidemiológicos de los virus, ya que nos permitirá estimar el tamaño de la población de determinada variante haciéndonos notar el crecimiento del número de infecciones efectivas a lo largo del tiempo (Federico, 2016). Esto nos ayudarán a entender los patrones de

acumulación de mutaciones en las muestras de CHIKV obtenidas de humanos y mosquitos. Los resultados de los análisis mencionados nos permitirán:

- Comparar los genomas de CHIKV obtenidos de muestras de humanos y de mosquitos.
- Inferir los patrones de distribución del virus.
- Construir una red de haplotipos que permita realizar un análisis de las relaciones entre secuencias de pacientes y mosquitos.

Hipótesis

Las secuencias del genoma viral de aislados mexicanos de CHIKV obtenidas a partir de pacientes infectados en 2015 presentan mutaciones únicas que reflejan su circulación local.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar los patrones de distribución geográfica y diversidad de virus Chikungunya aislado de humanos y mosquitos de secuencias del continente americano.

Objetivos específicos

- Obtener las secuencias parciales del genoma de CHIKV a partir de muestras colectadas en México.
- Obtener la reconstrucción filodinámica de CHIKV de secuencias americanas.
- Determinar los patrones de polimorfismos diferenciales de secuencias de virus obtenidos en humanos y mosquitos.
- Identificar la distribución geográfica y por hospedero de los haplotipos observados de CHIKV en América.

Estrategia Experimental

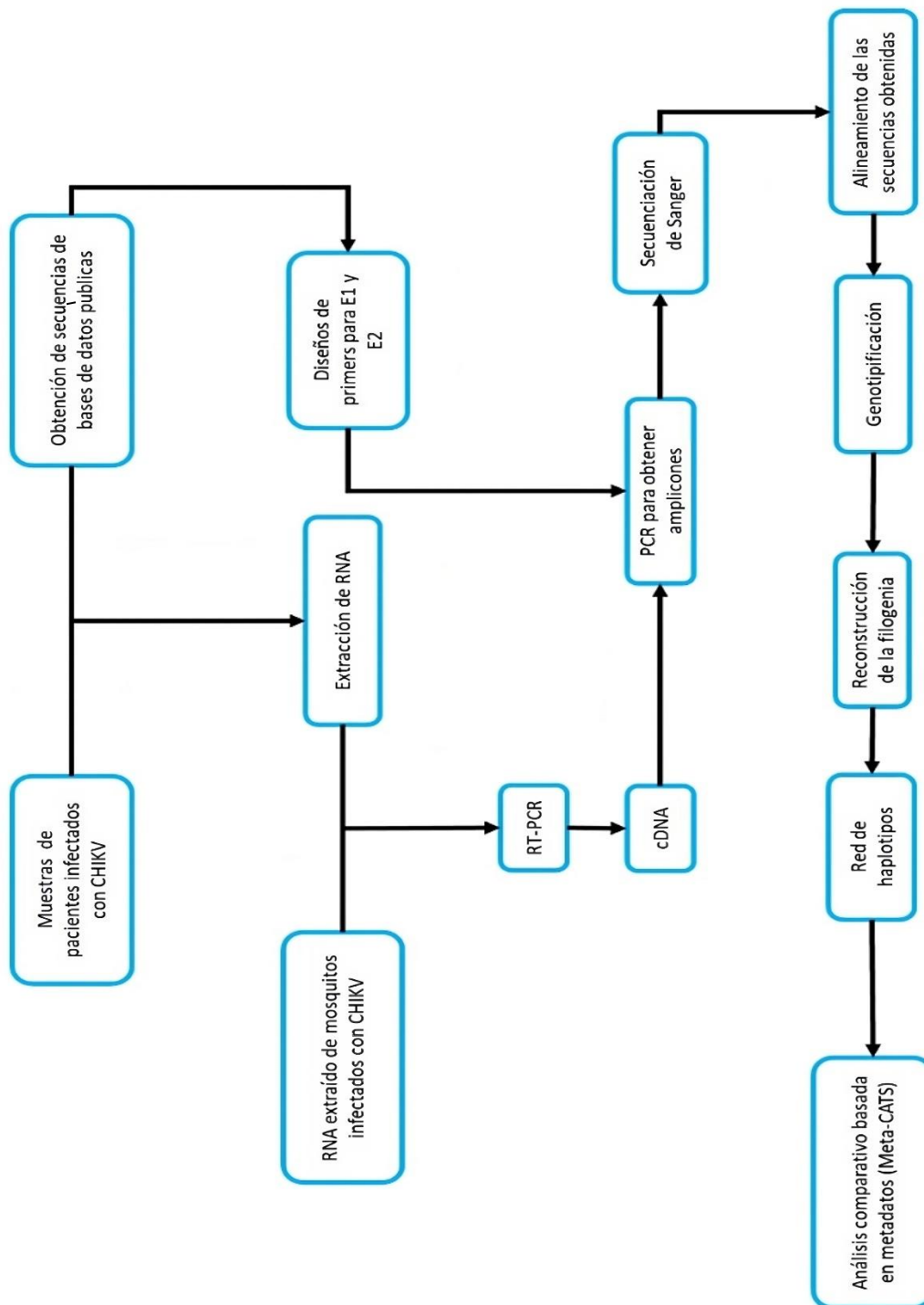


Fig. 18. Estrategia experimental.

METODOLOGÍA

Obtención de secuencias.

Las secuencias parciales de E1 y E2 del genoma del CHIKV se obtuvieron de la base de datos pública Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC) (<https://www.bv-brc.org/>). Los criterios de búsqueda de las secuencias fueron por especie: Chikungunya virus. Los filtros usados fueron: genoma completo, regiones de Norte y Sudamérica y hospederos humanos y mosquitos. Las secuencias que cumplían con estos criterios se descargaron el día 12 de junio del 2023 en formato FASTA.

Ensamble de las secuencias

Los archivos Forward y Reverse, resultado de la secuenciación, fueron ensamblados realizando la visualización de las secuencias y edición de las mismas en Aliview (Larsson, 2014), y los electroferogramas en el Software 4Peaks.

Alineamiento de secuencias.

Después de obtener las secuencias de las regiones E1 y E2 de las muestras de pacientes, procedimos a alinearlas junto con las obtenidas de la base de datos utilizando MAFFT v7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/algorithms/algorithms.html>). (Kato & Standley, 2013). Luego, con el editor de alineamientos AliView, delimitamos las secuencias descargadas a las regiones amplificadas, obteniendo dos alineamientos correspondientes a los segmentos de E1 y E2.

Para aumentar la cantidad de sitios informativos, los alineamientos se concatenaron mediante un script de Python3, cuyo código se reporta en el Anexo II. El código se ejecutó con el siguiente comando:

```
$python3 concatenar.py
```

Posteriormente, volvimos a realizar el alineamiento de las secuencias concatenadas utilizando MAFFT v7. Finalmente, para visualizar los resultados se utilizó AliView.

Diseño de primers para E1 y E2

Para diseñar los primers se usó la herramienta PrimerDesign-M, en el servidor HIV sequence database (https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/PRIMER_DESIGN/primer_design.html), utilizando como input, un alineamiento que fue generado, tomando en cuenta las ocho secuencias mexicanas de CHIKV completas mediante el software MAFFTv7, buscando amplicones de un tamaño de 700pb, sin adaptador, sin ningún tag, con un tamaño máximo de 25pb y con un tamaño mínimo de 20pb, además con una diferencia máxima de $T_m=1$.

Los primers seleccionados se muestran en la Tabla 6, y las regiones que se amplificaron y el tamaño del amplicón se pueden observar en la Fig. 19.

Tabla 5. Primers utilizados para la amplificación, para los genes E1 y E2.

Nombre del primer	Tamaño del amplicón	Secuencia de 5' a 3'
E1Fw 9991-10009	18pb	GTA ACA GTG ATC CCG AAC
E1Rev 10759-10777	18pb	CGG GTT TGT TGC TAT TTG
FwE2 8490	18pb	TCC TTA ACA TGT TCT CCC
RvE2 9223	18pb	TTT TTG TGA TTG GTG ACC

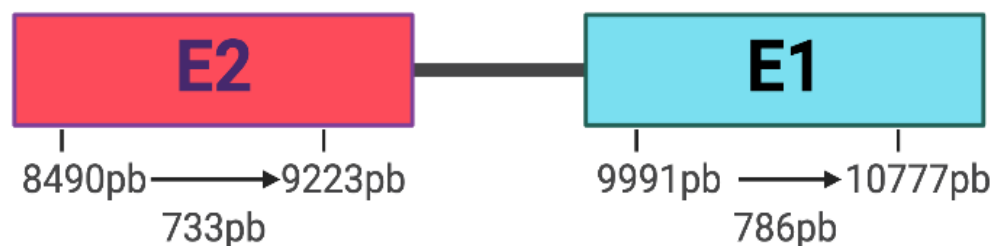


Fig. 19. Mapa de las regiones amplificadas de los genes que codifican para las proteínas E1 y E2 de CHIKV. Las posiciones se refieren al genoma de referencia con número de acceso AM258990.1.

Muestras

Las cinco muestras de pacientes infectados con CHIKV fueron obtenidas del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, y fueron donadas por la Dra. Rosalía Lira Carmona de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, IMSS. Estas muestras se obtuvieron de pacientes infectados con CHIKV en Veracruz en el año 2015. Además, se obtuvo una muestra proveniente de un paciente de Guerrero en el mismo año.

Las muestras de mosquitos fueron obtenidas a partir de pools de Aedes o Culex colectados en el mismo año en áreas urbanas de los estados de una de Guerrero y otra de Veracruz.

Extracción de RNA

El proceso de extracción de RNA de las muestras de pacientes se realizó en el Laboratorio de Virología del Posgrado en Ciencias Genómicas (PCG), usando el kit de extracción QIAamp Viral RNA Kit siguiendo las instrucciones del fabricante.

De cada muestra de suero se tomaron 140µL, a los que se añadieron 560µL del buffer AVL-carrier RNA; la mezcla se incubó a temperatura ambiente por 10 min.

Pasado ese tiempo se añadieron 560µL de etanol grado molecular (100%). Posteriormente se transfirieron 630µL de la mezcla a una columna de colección de 2ml y se centrifugó a 8000 rpm (6000 xg) por 1 min. Terminada la centrifugación se descartó el contenido del filtrado. Se repitió la transferencia de los 630µL de la mezcla en la misma columna de colección de 2ml y se centrifugó a 8000 rpm (6000 xg) por 1 min. Terminada la centrifugación se descartó el contenido del filtrado. Se agregaron 500µL de buffer AW1 y se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto, se descartó el contenido del filtrado. Posteriormente se agregaron 500µL de buffer AW2 y se centrifugo a 14000 rpm (20000 xg) por 3 min. Después de la centrifugación se descarta el contenido del filtrado, se cambió el filtro a una columna nueva y vuelve a centrifugar a 14000 rpm por 1 min, esto para descartar cualquier residuo del buffer AW2.

Por último, el filtro se pasó a un tubo de microcentrífuga de 1.5ml y se agregaron 60 μL de buffer AVE, se incubó por 3 min y se centrifugó a 14000 rpm por 3 min. Finalmente se midió la concentración del extracto de RNA en un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 y se almacenaron las muestras a -70°C . La extracción de RNA de las muestras de mosquitos positivos a CHIKV se había realizado previamente por la M. en C. Mónica Izquierdo en el Laboratorio de Virología del PCG.

RT-PCR

Se realizó la síntesis de cDNA a partir de las muestras de pacientes y de mosquitos utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para ello en un tubo para PCR de 0.2 ml se preparó la reacción de acuerdo con lo indicado en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de la enzima High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.

Reactivos	Volumen
10x RT-Buffer	2.0 μL
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8 μL
10X RT Random Primers	2.0 μL
MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/ μL)	1.0 μL
Inhibidor de RNAsas 20 U/ μl	1.0 μL
Molde RNA	Variable*
Agua libre de nucleasas.	c.b.p. 20 μL
Total de la reacción	20.0 μL

*El volumen de cada muestra fue diferente ya que sus concentraciones eran distintas, para cada muestra se utilizó el volumen suficiente para alcanzar una concentración de 1000ng en cada reacción.

Los tubos en los que se prepararon las reacciones se mezclaron brevemente en el vortex y se centrifugaron. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador ABI Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 Thermocycler 96 Well Silver con las siguientes

condiciones: 10 min a 25 °C, 120 min a 37 °C, 5 min a 85 °C. Posteriormente, las muestras pueden ser usadas o almacenadas a -20°C.

PCR

La amplificación de los fragmentos de interés a partir de las muestras de pacientes y mosquitos se realizó con 2 enzimas diferentes: la enzima Phusion® High-Fidelity (New England Biolabs) y la Invitrogen™ Platinum™ SuperFi™ II DNA Polymerase (Thermo Fisher), siguiendo las instrucciones de los fabricantes, las mezclas de reacción se prepararon de acuerdo con lo reportado en la Tabla 7.

Tabla 7. Instrucciones de pipeteo.

Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase		Invitrogen™ Platinum™ SuperFi™ II DNA Polymerase	
Reactivos	Volumen	Reactivos	Volumen
2X Phusion Master Mix	5.0 µL	5X Superfi Buffer	5.0 µL
2 µM Forward Primer	0.5 µL	2 µM Forward Primer	1 µL
2 µM Reverse Primer	0.5 µL	2 µM Reverse Primer	1 µL
DMSO 100%	0.3 µL	Platinum Superfi DNA Polymerase (2 U/µl)	0.2µL
Molde de DNA	2µL	Molde de DNA	2µL
Agua libre de nucleasas	c.b.p. 10 µL	Agua libre de nucleasas	c.b.p. 10 µL
Total de la reacción	10.0 µL	Total de la reacción	10.0 µL

El uso de dos enzimas diferentes fue por cuestiones del desempeño de las enzimas con los diferentes pares de primers, ya que los primers de E1 solo produjeron un amplicón del tamaño esperado con la enzima Invitrogen™ Platinum™ SuperFi™ II DNA Polymerase; mientras que en los primers de E2, solo amplificaron un fragmento del tamaño predicho con la enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo usando las condiciones mostradas en las tablas 8 y 9.

Tabla 8. Instrucciones de ciclaje para la enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase.

Desnaturalización inicial	98°C	30 seg	1 ciclo
Desnaturalización	98°C	10 seg	45 ciclos
Alineamiento	52°C	30 seg	
Extensión	72°C	45 seg	
Extensión final	72°C	5 min	1 ciclo
	4°C	∞	

Tabla 9. Instrucciones de ciclaje para la enzima Platinum™ SuperFi™ II DNA Polymerase.

Desnaturalización inicial	98°C	30 seg	1 ciclo
Desnaturalización	98°C	10 seg	45 ciclos
Alineamiento	60°C	10 seg	
Extensión	72°C	30 seg	
Extensión final	72°C	5 min	1 ciclo
	4°C	∞	

Al terminar la PCR, se verificó el tamaño del producto en un gel de agarosa al 0.8%. La electroforesis se realizó usando buffer TBE al 0.5% a 110 volts por 25 min.

El gel se visualizó en un fotodocumentador ChemiDoc XRS+ de Bio-Rad, la banda de interés se cortó y se almacenó a -20 °C hasta su purificación.

Purificación del DNA a partir de gel

La purificación del producto de PCR a partir de gel se realizó con el kit QIAEX® II Gel Extraction Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. Al fragmento de gel que contiene nuestro amplicón se le añade buffer QX1 de acuerdo con el tamaño del amplicón. Luego se agregaron a la muestra 30 μ L de QIAEX II (previamente homogenizado) durante 15 s.

Después de mezclarla por 15 s la muestra se incubó a 50°C por 10 min, cada 2 min se mezcló en el vortex por 10 s, en total se hizo 5 veces en 10 min. Enseguida se centrifuga la muestra a 13,000rpm por 1 min para después quitar el sobrenadante con la ayuda de una micropipeta. Posteriormente se agregaron 500 μ L de buffer QX1 al pellet, re-suspenderemos esto mezclando en el vortex de 10 a 15 s y después centrifugamos a 13,000rpm por 1 min, y se retirare el sobrenadante. En seguida se agregaron 500 μ L de buffer PE para resuspender el pellet la mezcla se agito en el vortex de 10 a 15 s y finalmente se realizó una centrifugación a 13,000rpm por 1 min, se retiró el sobrenadante y se dejó secar el pellet al aire dejando el tubo abierto, esto se lleva alrededor de 30 min; pasado el tiempo se eluyó el DNA, agregando 20 μ L de buffer TE (10mM Tris-Cl, 1nM EDTA, pH 8.0), re-suspendiendo el pellet mezclando en el vortex de 10 a 15 seg e incubando por 5 min a temperatura ambiente. Por último, pasado el tiempo se centrifugó a 13,000rpm por 1 min y el sobrenadante conteniendo el DNA se colocó en un tubo nuevo, se cuantificó su concentración usando el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 y se almacenó a -20°C hasta su uso. El DNA purificado se cargó y se separó en gel de agarosa para corroborar que el tamaño del DNA obtenido correspondía al que se pretendía aislar.

Secuenciación de las muestras

Las muestras obtenidas tanto de pacientes humanos, como de mosquitos, fueron secuenciadas en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de método de Sanger, que se explica en la Fig. 20.

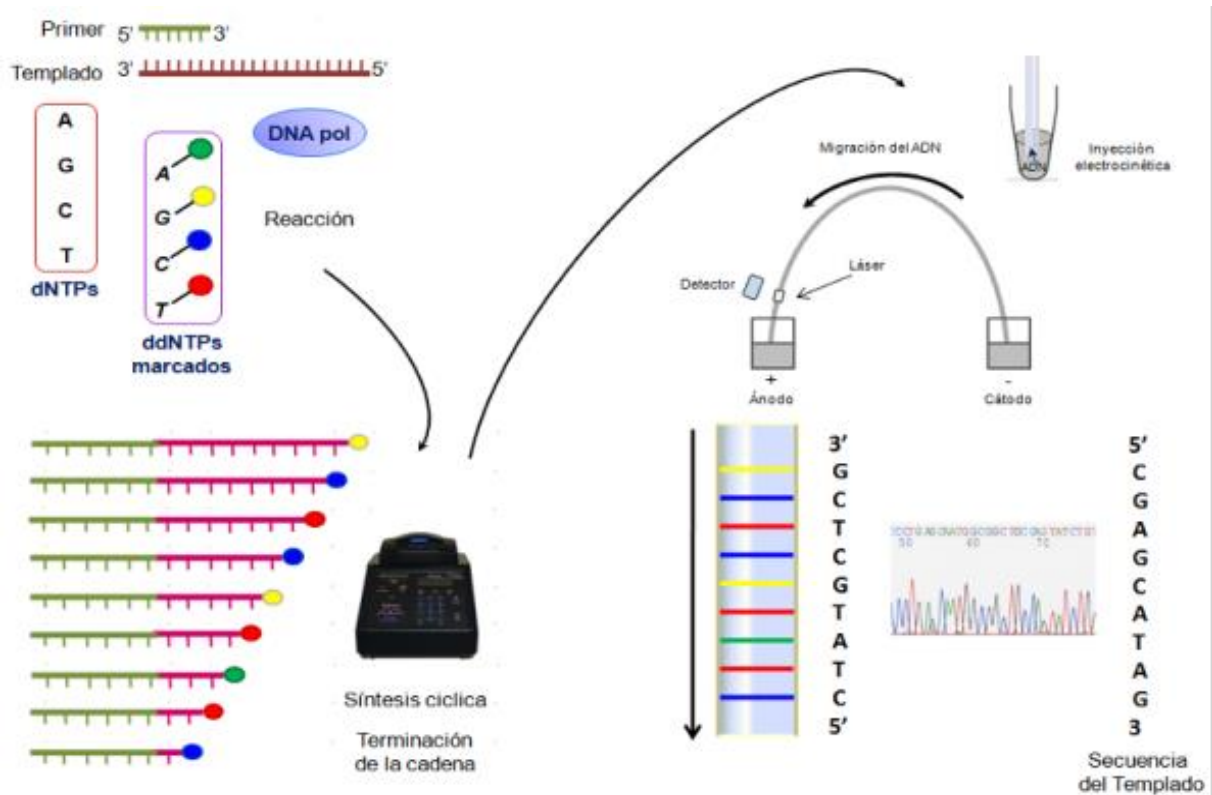


Fig. 20. Esquema del proceso para la secuenciación de Sanger. La técnica de secuenciación enzimática Sanger-capilar implica la realización de una reacción de secuenciación en la que se usan ddNTPs marcados con diferentes fluorocromos. Estos ddNTPs funcionan como bloqueadores, lo que da como resultado fragmentos de ADN de diferentes longitudes. Estos fragmentos se introducen en capilares mediante electroinyección y se separan mediante electroforesis capilar. A medida que las moléculas pasan a través de la ventana de detección, se detecta la fluorescencia, lo que permite determinar la secuencia. El resultado de esta secuenciación se representa en forma de un electroferograma. Imagen tomada y modificada de Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, 2023.

Genotipificación

La genotipificación de las secuencias de CHIKV se realizó mediante la construcción de árboles filogenéticos que incorporan secuencias de referencia

específicas de cada genotipo de CHIKV. Para llevar a cabo la construcción del árbol, se obtuvieron 102 secuencias de cada genotipo y se alinearon con nuestras muestras problema. Posteriormente se construyó una filogenia con el método de Neighbor Joining, con 1000 réplicas de bootstrap utilizando el software SeaView v5.0.4 (Galtier *et al.*, 1996).

Eliminación de las secuencias redundantes.

Para eliminar las secuencias duplicadas de nuestro alineamiento, empleamos el software Jalview (Waterhouse *et al.*, 2009), usando la función “Redundancy” este se abre ingresando de esta manera Edit » Remove Redundancy con un valor de corte del 100%, lo que resultó en la eliminación de todas las secuencias duplicadas.

Análisis filodinámicos.

El análisis filodinámico se realizó con el propósito de identificar relaciones evolutivas de las secuencias teniendo en cuenta el contexto temporal de las mismas. El programa de iq-tree2 (Minh *et al.*, 2020), es uno de los paquetes de software de código abierto que se usan con más frecuencia para la inferencia filogenética utilizando el criterio de máxima verosimilitud, con el modelo de sustitución GTR (Tavare, 1986), escalado por fechas en las que fueron colectadas. Además, este árbol se visualizó con ggtree en R y las hojas se colorearon por país de colecta, usando el sistema hexadecimal, el script está en el Anexo III.

Red de haplotipos.

Con el mismo alineamiento, procedimos a crear una red de haplotipos con el propósito de obtener una representación visual de las relaciones genéticas entre las secuencias analizadas. Para llevar a cabo este análisis, utilizamos el software PopART (Population Analysis with Reticulate Trees) (Leigh & Bryant, 2015), ampliamente reconocido por su utilidad en estudios relacionados con relaciones genéticas, evolución, detección de patrones de dispersión, entre otros usando el algoritmo TCS (Clement *et al.*, 2002) y los nodos de la red se colorearon de acuerdo con el país de

colecta. Previo a los análisis se llevó a cabo la conversión de los archivos en formato FASTA a formato .phylip. El formato phylip tiene restricciones en el número de caracteres que pueden tener los nombres, por lo que se tuvo que realizar un cambio en el nombre de las secuencias. Para realizar este cambio se programó un script en Python que se encuentra en el anexo IV, que se ejecutó de la siguiente manera:

```
$python3 phylip.py
```

Análisis comparativo basado en metadatos (Meta-CATS).

Para determinar los patrones de polimorfismos diferenciales de secuencias de virus obtenidos en humanos y mosquitos, usamos el alineamiento donde están incluidas las secuencias de humanos y mosquitos y lo subimos a BV-BRC, ya que tiene una herramienta llamada meta-CATS (Metadata-driven Comparative Analysis Tool), que nos ayudaría a obtener este análisis.

RESULTADOS

Extracción de RNA de las muestras de pacientes humanos y mosquitos

Las muestras de suero de 6 individuos infectados con CHIKV fueron obtenidas en 2016 en el Estado de Veracruz. En el caso de las muestras de mosquitos, éstas fueron obtenidas a partir de pools de *Aedes* o *Culex* colectados en el mismo año en áreas urbanas de los estados de una de Guerrero(22G1228) y otra de Veracruz (6LG1230), conteniendo alrededor de 250ng de RNA por microlitro de muestra.

En primer lugar, se realizó la extracción de RNA viral usando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription, como se describe en la sección de metodologías. Las concentraciones de RNA para cada muestra de suero de pacientes se encuentran en la tabla 10.

Tabla 10. Concentraciones de RNA de cada una de las muestras de pacientes.

M1 (Veracruz)	159.3ng/ μ l
M2 (Veracruz)	60.3ng/ μ l
M3 (Veracruz)	131.4ng/ μ l
M4 (Veracruz)	48.7ng/ μ l
M5 (Veracruz)	136.8ng/ μ l
M6 (Guerrero)	132.1ng/ μ l

Obtención de amplicones.

Para sintetizar el cDNA se usó el kit Multiscribe Reverse Transcriptase y posteriormente se obtuvieron los amplicones utilizando dos enzimas de alta fidelidad, a saber, la enzima Invitrogen™ Platinum™ SuperFi™ II DNA Polymerase y la enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase. Esto fue porque los fragmentos de El amplificaron con la enzima Invitrogen™ Platinum™ SuperFi™ II DNA Polymerase,

pero no los fragmentos de E2, estos amplificaron por la enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase, pero no los fragmentos de E1.

Para corroborar que se hubieran obtenido los amplicones esperados se corrió un gel de agarosa al 0.8%. Los resultados nos indicaron que los fragmentos de E1 amplificados por la enzima Invitrogen™ Platinum™ SuperFi™ II DNA Polymerase y E2 amplificados por la enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerases tenían los tamaños esperados (Fig.21 y Fig 22).

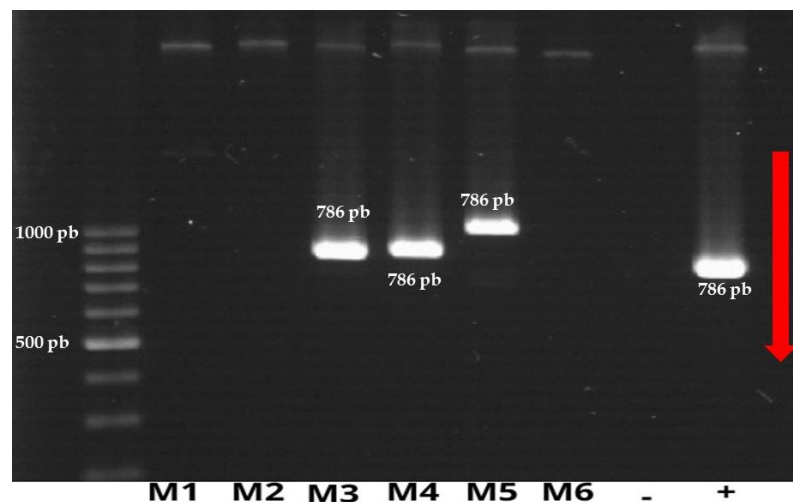


Fig 21. Separación por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. En este gel, se cargaron las muestras correspondientes a los genes E1. En la parte inferior de la Fig. se indican las muestras cargadas en cada carril, así como el control negativo y positivo de la reacción. En el extremo izquierdo se cargó el marcador de tamaño molecular GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher).

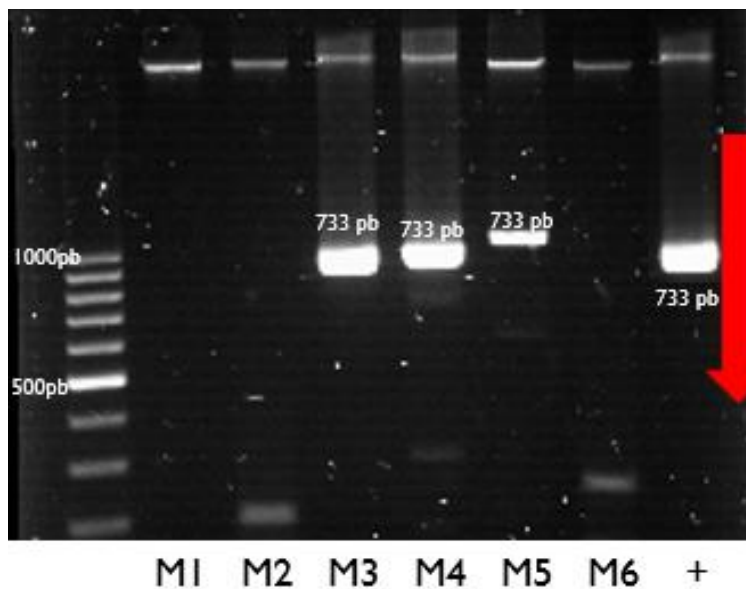


Fig 22. Separación por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. En este gel, se cargaron las muestras correspondientes a los genes E2. En la parte inferior de la Fig. se indican las muestras cargadas en cada carril. En el extremo izquierdo se cargó el marcador de tamaño molecular GeneRuler 100 bp DNA Ladder Thermo Fisher.

Al no amplificar la región de interés en las muestras M1, M2 y M6 provenientes de humano y las muestras 22G1228 y 6LG1230 en mosquito, se decidió continuar con las muestras de pacientes M3, M4 y M5. Esto se resumen en la tabla 11.

Tabla 11. Muestras de pacientes con las diferentes enzimas utilizadas.

Muestras	M1	M2	M3	M4	M5	M6	22G1228	6LG1230	Control
E1 (Phusion)	-	-	+	+	+	-	-	-	+
E2 (Superfi)	-	-	+	+	+	-	-	-	+

Con el objetivo de obtener suficiente DNA para realizar la secuenciación se realizaron reacciones de amplificación por quintuplicado de las muestras M3, M4 y M5. Los amplicones obtenidos se separaron en geles de agarosa y las bandas de interés se cortaron y purificaron con el kit de extracción QIAEX® II Gel Extraction Kit (Qiagen). El DNA resultante se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 y los resultados se muestran en la tabla 12. Los productos de PCR se enviaron al Instituto de Fisiología Celular UNAM para su secuenciación

Tabla 12. Concentración de DNA correspondiente a los amplicones de los genes E1 y E2.

Muestras	Concentración E1	Concentración E2
M3	23 ng/μl	24.6ng/μl
M4	19.1ng/μl	22.3ng/μl
M5	15.3ng/μl	24.7ng/μl

Ensamble y alineamiento de las secuencias de pacientes.

Para ensamblar los fragmentos secuenciados se utilizó el programa AliView como base y los genomas de referencia de México con los números de acceso GB (GBAccessions) KP851709, KP851710, KT327163, KT327164, KT327165, KT327166, KT327167 y MG921596 (Fig. 23). Además, como referencia, también empleamos los electroferogramas utilizando el software 4peaks (Fig. 24)

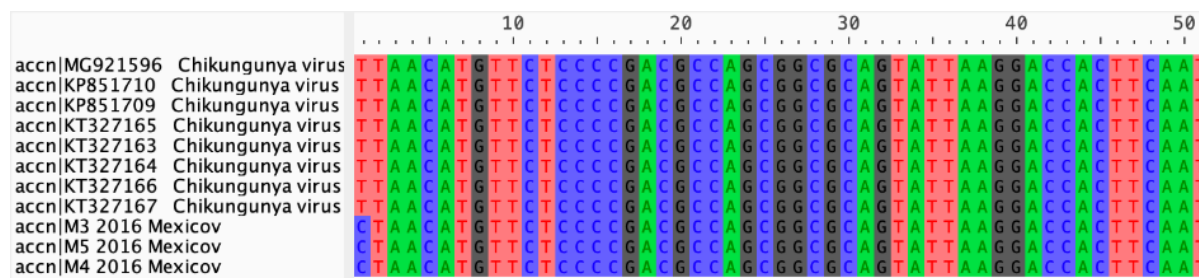


Fig 23. Alineamiento de las muestras del presente estudio con las secuencias mexicanas como referencia utilizando el programa AliView, usando el fragmento E2.

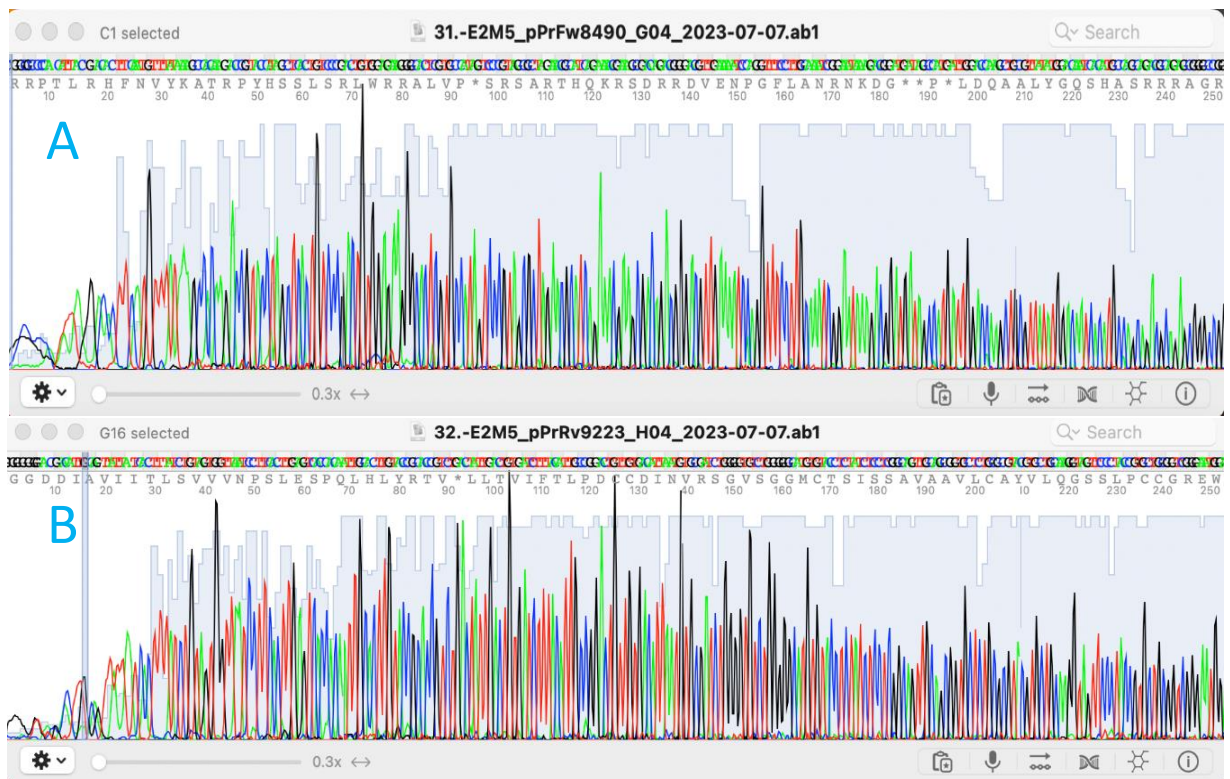


Fig 24. Electroferogramas de la muestra M5 visualizados en el Software 4Peaks. A) electroferograma en el sentido Forward. B) Electroferograma en el sentido Reverse.

Al ensamblar las secuencias de pacientes, se procedió a realizar un alineamiento múltiple con las secuencias con las descargadas utilizando MAFFT v7 colocando como input los archivos fasta.

Se llevó a cabo el alineamiento de 892 secuencias de todo el mundo, sin embargo, los resultados obtenidos eran pocos informativos pues los árboles realizados eran poco concisos, entonces para genotipificar se eliminaron las secuencias que no fueran del continente americano de tal manera que se incluyeron sólo 404 secuencias.

Genotipificación

Con el objetivo de identificar las diferentes variantes genéticas del virus que pueden estar circulando en una población o área geográfica e identificar a qué variante pertenece nuestro grupo de secuencias, se realizó la genotipificación de las secuencias de pacientes humanos y secuencias de mosquitos descargados de la base de datos (Fig. 25). Los resultados nos muestran que nuestras secuencias se agrupan en el clado

perteneciente al genotipo AUL (color azul), donde se localiza un gran grupo de secuencias de humanos y mosquitos de países vecinos. Mientras que el genotipo ECSA (color verde), agrupa secuencias de países que están ubicados en Sudamérica; cabe mencionar que las muestras obtenidas de mosquitos se encuentran en el mismo clado y solo un pequeño grupo pertenece al genotipo WA (color morado).

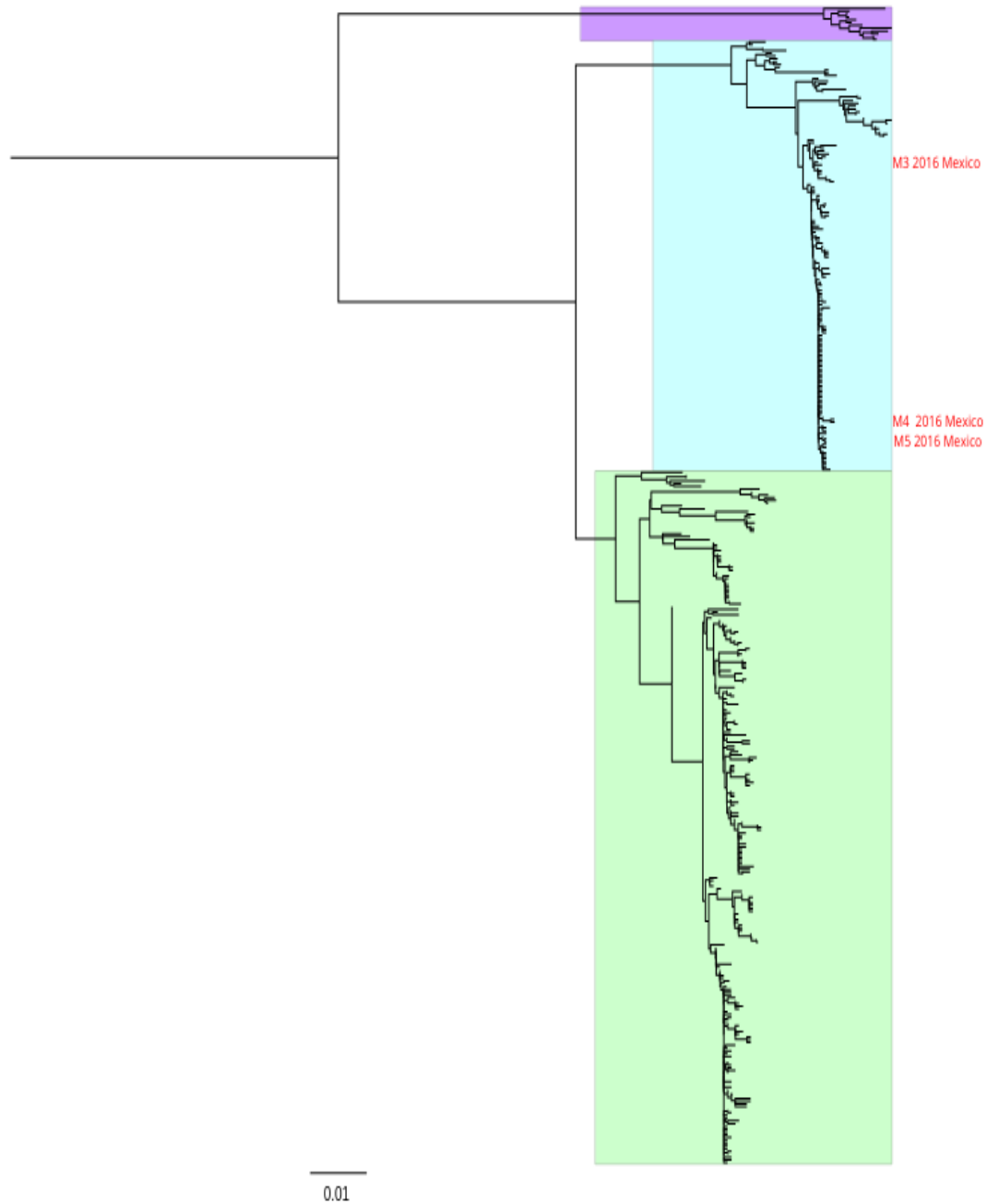


Fig. 25. Genotipificación de secuencias de CHIKV bajadas de BV-BRC de humano y mosquito de diferentes partes del mundo y de nuestras muestras mexicanas, usando una reconstrucción filogenética mediante el método de Neighbor-Joining, y 1000 réplicas de bootstrap.

Limpieza de las secuencias redundantes

Se obtuvieron 404 secuencias de la base de datos BV-BRC, de las cuales cumplían con los criterios de búsqueda mencionados en la metodología. Para eliminar la redundancia en el conjunto de datos y garantizar una diversidad representativa, se empleó la herramienta Jalview con un valor de corte de identidad del 100%. Este proceso de filtrado resultó en la eliminación de secuencias duplicadas. Después de aplicar el filtro se mantuvieron 102 secuencias únicas en el set de datos.

Reconstrucción de la filogenia

Con el alineamiento de 102 secuencias, que incluyen secuencias procedentes de Norte y Sudamérica y de nuestras tres secuencias procedentes del país de México. Con el alineamiento concatenado se realizó una reconstrucción filogenética de máxima verosimilitud, escalada por fecha de colecta, el árbol resultante fue visualizado en R usando la librería ggtree, donde las hojas fueron coloreadas por país de colecta.

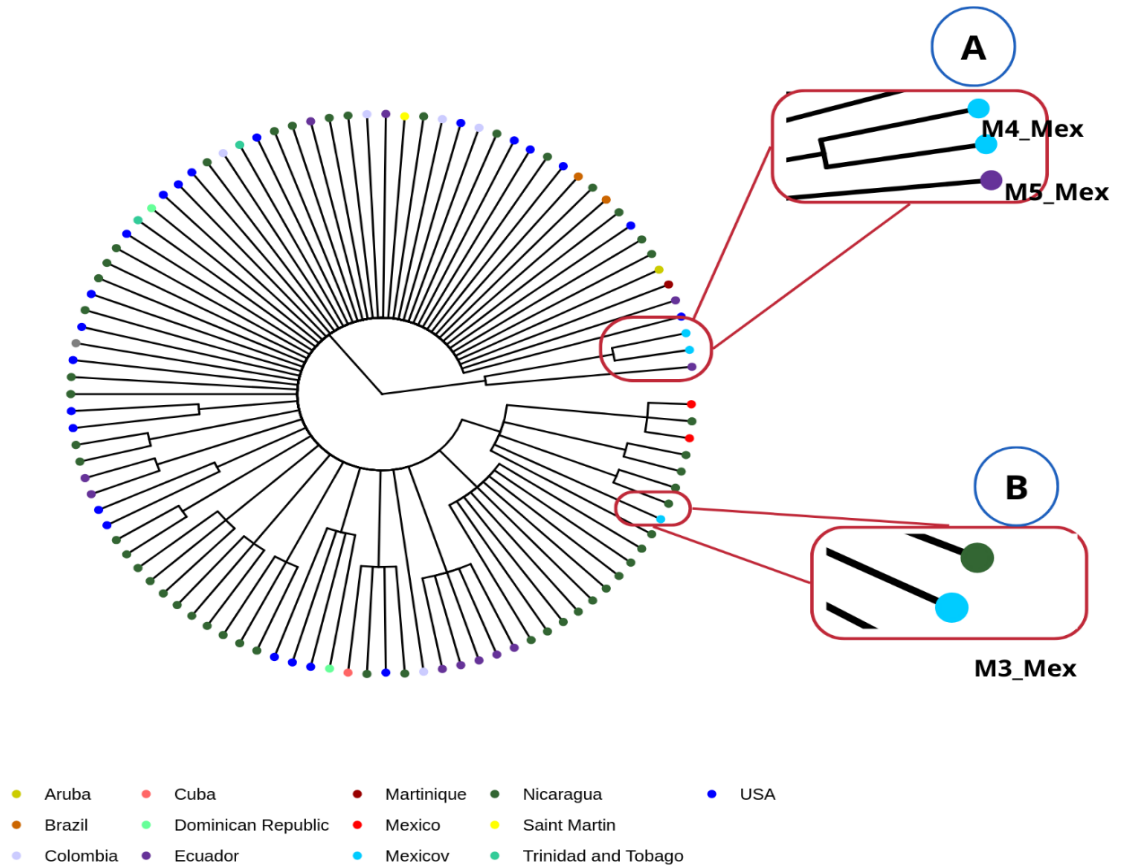


Fig. 26. Árbol filogenético obtenido por Máxima Verosimilitud realizado en IQ-Tree2. En la Fig. A se observan las secuencias M4 y M5, agrupadas con secuencias ecuatorianas, mientras que en la Fig. B podemos ver a la secuencia M3 se agrupa con secuencias nicaragüenses. La escala representa distancias temporales donde fueron colectadas.

El árbol nos muestra una división en dos ramas, en una de éstas se encuentran presentes secuencias mexicanas (azul claro) y una ecuatoriana (morada) en la otra rama se agrupan todas las demás secuencias, donde podemos ver que se agrupan secuencias provenientes de Sudamérica. Hay grupos dentro de esta segunda rama, las secuencias nicaragüenses (verdes) y ecuatorianas (moradas) forman grupos monofiléticos, al igual que algunas secuencias estadounidenses (azul fuerte) aunque estos grupos están compuestos de pocas secuencias o comparten secuencias con otros países como Trinidad y Tobago, lo cual no es tan representativos (Verde claro).

Esto nos revela las relaciones evolutivas entre las secuencias del CHIKV obtenidas de diferentes regiones de Norte y Sudamérica en las cuales podemos destacar las relaciones de las secuencias mexicanas.

Las secuencias M4 y M5 se agrupan con secuencias procedentes de Ecuador, lo cual sugiere una relación cercana y un posible ancestro en común entre las secuencias. Mientras que la secuencia M3 se agrupa con secuencias de Nicaragua.

Todo lo anterior nos sugiere que las secuencias de los pacientes mexicanos tienen una relación filogenética cercana, estas agrupaciones podrían implicar una fuente común de infección o una conexión epidemiológica entre las muestras y las regiones de Ecuador y Nicaragua, las cuales son por el comercio que tiene México con estos países por el TLC de ambos países.

Red de haplotipos

Se utilizó el alineamiento que contenía todas las secuencias de genomas completos, es decir que no pasaron por los filtros señalados en la metodología. El alineamiento se compone de 892 secuencias, de las cuales 37 secuencias provenientes de mosquitos y 855 de humanos incluidas las tres muestras de nuestro estudio, con el cual se generó una red de haplotipos en la que se utilizó el software PopArt para inferir los patrones de dispersión de dichas secuencias, usando el método de TSC Network como se muestra en la Fig. 27.

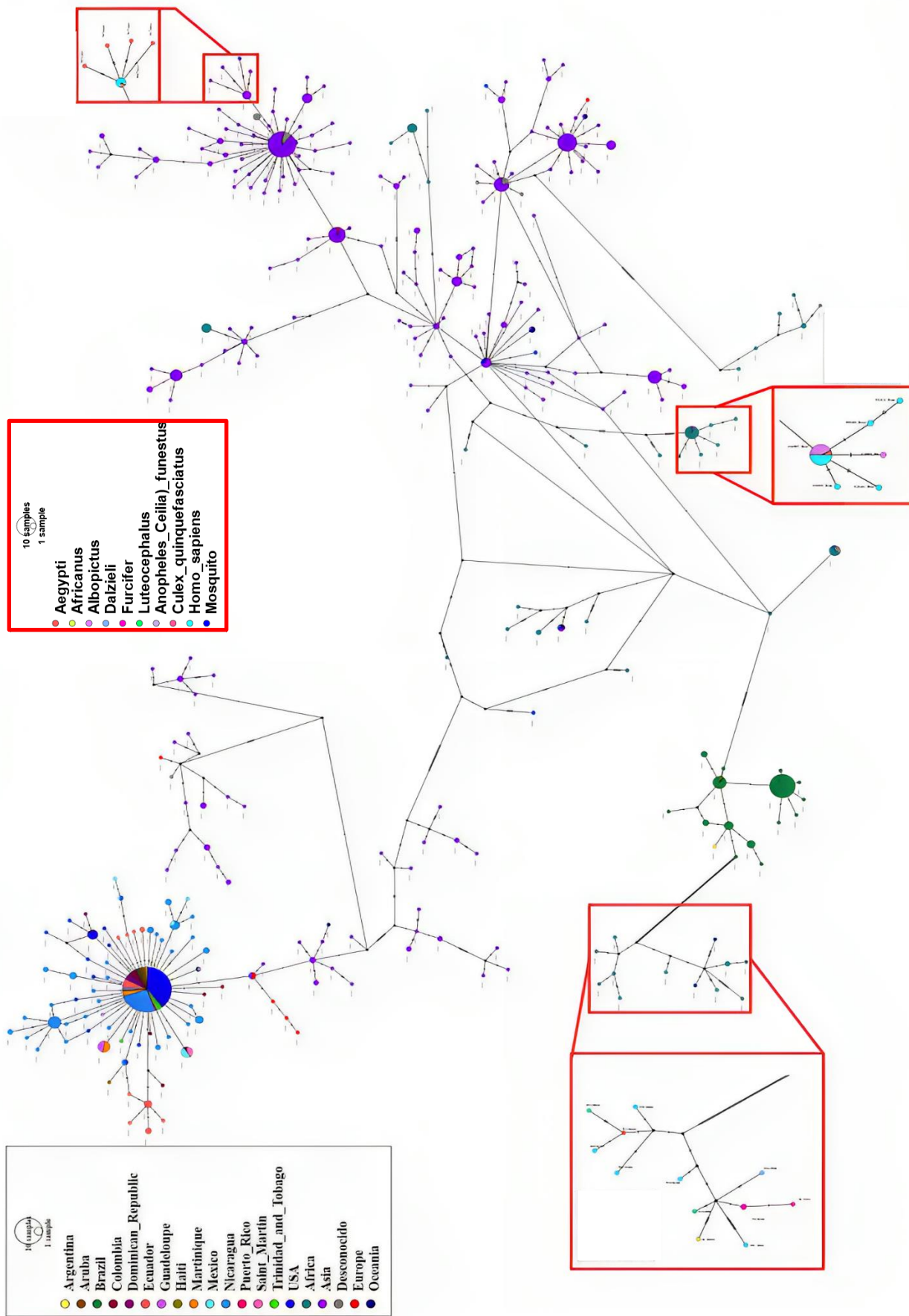


Fig. 27. Red de Haplotipos Generada en PopArt mediante el Método de TCS Network. La red de haplotipos contiene secuencias de 15 países de 4 continentes y un rubro de secuencias de origen desconocido basada en las secuencias del gen E1 y E2 del genoma de CHIKV (n = 892 ; 1444 pb). Cada uno de los círculos en el gráfico representa un haplotipo único, y el tamaño de estos círculos refleja cuántas secuencias están asociadas a cada haplotipo. Las diferencias en la secuencia de nucleótidos se muestran a través de marcas de sombreado que atraviesan las líneas que conectan los haplotipos, donde cada marca de sombreado indica una variación de nucleótido particular. Los círculos más oscuros y sin etiquetar se utilizan para representar nodos ancestrales que se han inferido en el análisis. Además, se utiliza un código de colores para identificar el país de origen de cada haplotipo. En los recuadros rojos se muestra un zoom y una visualización de estos haplotipos que corresponden a las secuencias de mosquitos, tienen un código de colores que representa la especie del mosquito.

En esta red podemos visualizar tres grandes grupos de haplotipos, donde uno se destaca por contener solo secuencias brasileñas (verde oscuro), en este haplotipo podemos ver que está presente secuencias de humano y mosquito *Ae. Albopictus* lo que nos dice que comparte haplotipo en Brasil, además de esta red se desprende un pequeño grupo de haplotipos autónomos donde podemos ver que existen secuencias provenientes de mosquitos de otras especies, el que no se vea esto podrá deberse a un sesgo por la falta de vigilancia activa de vectores en gran parte de México. Por otro lado, hay un haplotipo donde se encuentran las secuencias del continente asiático (morado) y aquí la especie más representativa es *Ae. Albopictus* y *Ae. Aegypti* mientras que las secuencias *Ae. Aegypti* comparten haplotipo con los humanos, y *Ae. Albopictus* son haplotipos individuales no muy alejados del haplotipo más representativo, además este grupo tiene una relación muy cercana con haplotipos más pequeños que contiene secuencias africanas y europeas que solo son, aunque estas no forman un grupo y se pueden visualizar de manera aislada; por último, se identificó un haplotipo del continente americano, se trata de un grupo de secuencias muy extendido en Estados Unidos y Nicaragua. Este haplotipo tiene una correlación con secuencias asiáticas, que tiene solo dos mutaciones que los diferencian, mientras que en otros haplotipos que tienen mayor representatividad podemos ver mayor número de mutaciones que la separan (Fig 27).

Para ver con más detalle esta sección se decidió usar el alineamiento que ya había sido usado para el árbol filogenético. Dicho alineamiento concatenado se utilizó para generar una red de haplotipos con el software PopArt con la finalidad de inferir los patrones de dispersión de estas secuencias y método de TSC Network (Fig. 28). Ambas redes, coloreados por País/Continente y por Especie se encuentra en el Anexo V.

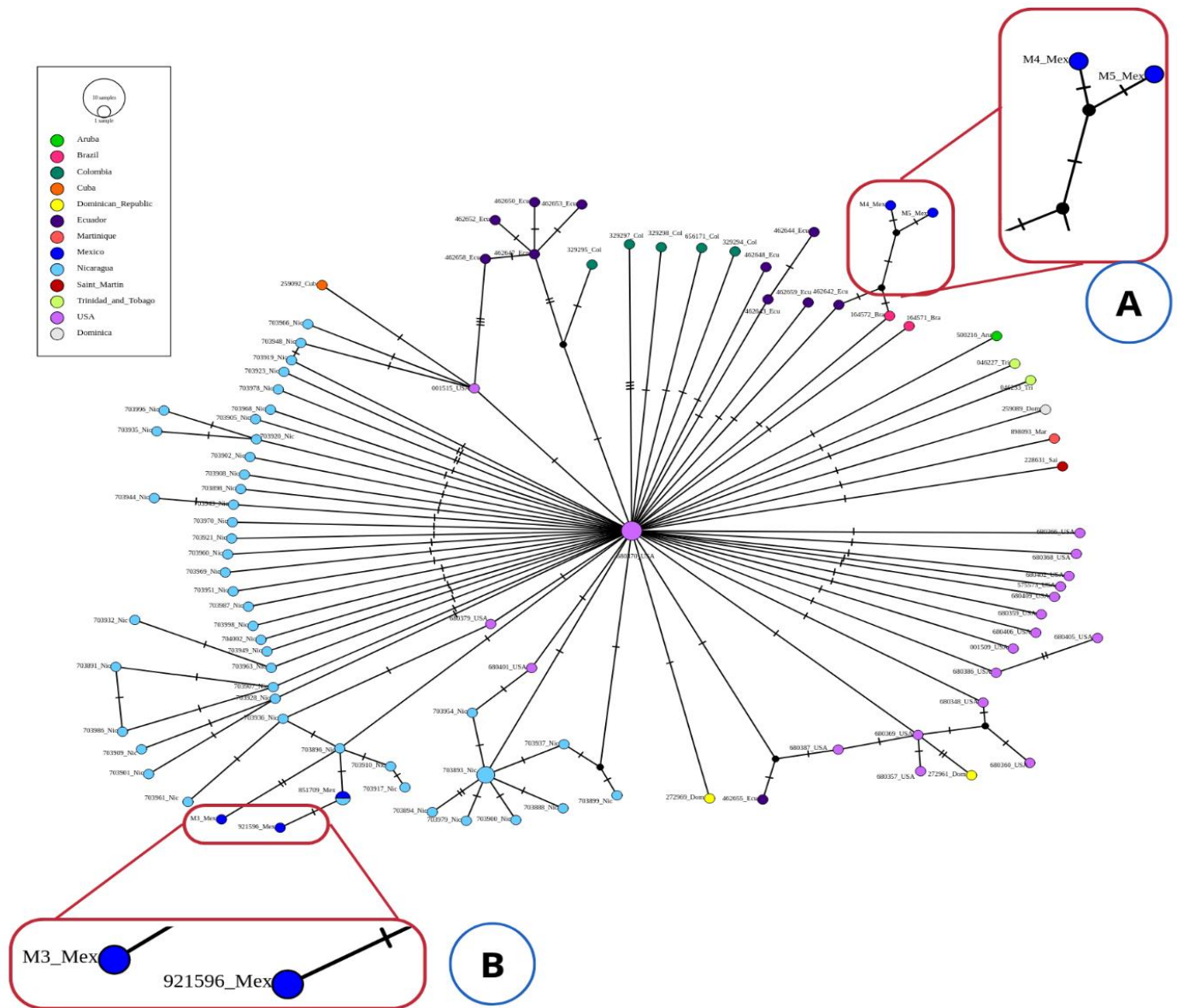


Fig. 28. Red de Haplotipos Generada en PopArt mediante el Método de TCS Network. La red de haplotipos contiene secuencias 13 países pertenecientes al continente americano basada en las secuencias del gen E1 y E2 del genoma de CHIKV (n = 102; 1444 pb). Cada uno de los círculos en el gráfico representa un haplotipo único, y el tamaño de estos círculos refleja cuántas secuencias están asociadas a cada haplotipo. Las diferencias en la secuencia de nucleótidos se muestran a través de marcas de sombreado que atraviesan las líneas que conectan los haplotipos, donde cada marca de sombreado indica una variación de un nucleótido particular. Los círculos más oscuros y sin etiquetar se utilizan para representar nodos ancestrales que se han inferido en el análisis. Además, se utiliza un código de colores para identificar el país de origen de cada haplotipo.

En esta red se puede visualizar que el haplotipo más representativo está compuesto en su totalidad de secuencias estadounidenses (violeta) ubicada en el centro, y alrededor podemos ver haplotipos únicos de diferentes países, que se alejan del centro con un máximo de cuatro mutaciones, podemos ver que la mayor parte de secuencias presentes son de países como Nicaragua (azul claro), Estados Unidos (rosa) y Ecuador (morado). El haplotipo estadounidense muestra esta forma estrellada, con múltiples haplotipos autónomos a su alrededor, lo cual sugiere que hay una gran y rápida difusión de esta población.

En la Fig. 28A, las secuencias correspondientes a las muestras M4 y M5 se agrupan directamente con un ancestro no muestreado, representado por círculos negros que no permite que se identifique la relación inmediata de su país de origen más cercano. Sin embargo, es interesante destacar que después de estas secuencias no muestreadas, se observa una relación con secuencias procedentes de Ecuador y Brasil, lo que sugiere la posibilidad de conexiones epidemiológicas más amplias.

Mientras que, en la Fig. 28B, la secuencia M3 se agrupa con secuencias de Nicaragua incluidas en este estudio, donde su relación genética más cercana está separada por 2 mutaciones de la secuencia nicaragüense.

Determinación de los polimorfismos

Al no contar con las secuencias de mosquitos de este estudio, se decidió ver los cambios polimórficos de las secuencias de mosquitos que si esta presentes en bases de datos, y al pertenecer al linaje ECSA solo nos centraremos en los países con secuencias de este genotipo, que son Brasil, Colombia y Ecuador.

Los resultados del Meta-CATS son resumidos en la tabla 13 y las regiones se verán en la figura 29, este tiene análisis fue evaluado con un valor de $p=0.05$.

Tabla 13. Posición del nucleótido en el que se encontraron polimorfismos en las secuencias de E1 y E2. El número indica la posición nucleotídica con respecto al inicio de cada gen.

E2	53	374	539	562	692	698
E1	901	962	1434	1446		

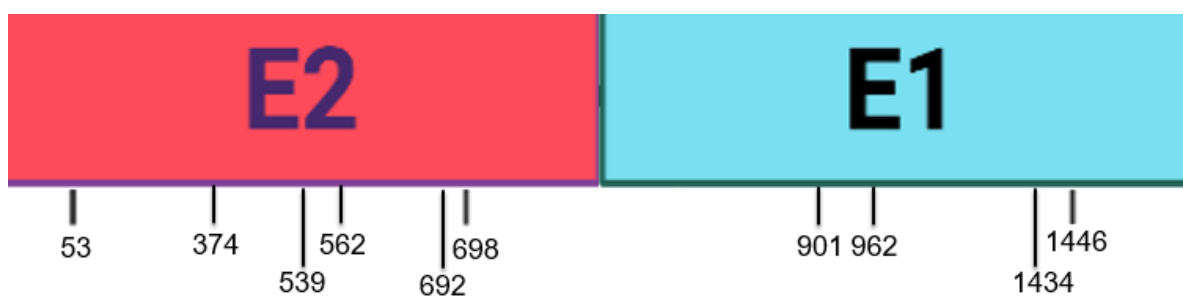


Fig. 29. Regiones de las proteínas E1 y E2, donde se encuentran los polimorfismos detectados por Meta-CATS.

Los resultados nos muestran 10 polimorfismos que son significativos, seis se encuentran en la región de la proteína E2, y cuatro en la proteína E1, en ciertas posiciones lo que nos podría indicar adaptaciones genómicas del virus a los diferentes ambientes de los huéspedes humanos y mosquitos. Puede ser que estos cambios permitan que haya una mayor facilidad para la infección del virus para sus respectivos hospederos.

DISCUSIÓN

En este estudio se estimó la diversidad genética de la población del CHIKV en función de muestras obtenidas de pacientes y las secuencias de los genes E1 y E2. En este trabajo se utilizaron varios grupos de datos que nos permitieron llevar a cabo un análisis filodinámicos con resultados interesantes.

La aplicación de análisis individuales para cada gen puede generar incongruencias en los resultados; en este sentido, se encontraron estudios que demostraron que usar secuencias combinadas pueden eliminar estos sesgos. Por lo anterior, la estrategia de concatenar las secuencias E1 y E2 y eliminar las secuencias redundantes permitió dar una mejor resolución de ramas internas del árbol filogenético. Por otro lado, la estrategia seleccionada para este estudio se basó en la amplificación de únicamente dos regiones del genoma viral, las cuales son altamente variables, lo que implica necesariamente una pérdida de datos. Sin embargo, a pesar de esta limitación, este trabajo nos permitió confirmar otros hallazgos muy relevantes en el contexto de la epidemiología del CHIKV (Rodríguez-Aguilar *et al*, 2022).

Nuestros análisis genotípicos respaldan las observaciones previamente mencionadas por Galán-Huerta *et al.* (2018), quienes establecieron una asociación entre los brotes en América Latina y el genotipo AUL del virus, la cual también se puede ver en el mapa de Nextrain (Figura 16). Nuestras muestras se agruparon dentro de este clado, confirmando así esta conexión genética con el genotipo asiático. Aunque también pudimos observar un grupo de secuencias ECSA generalmente compuestas por secuencias pertenecientes a Sudamérica en específico Brasil, que tuvo una introducción por parte de África a mediados del 2014, además se encontró correlación con haplotipos de secuencias africanas, vista en la red de haplotipos, y un pequeño grupo presente del genotipo WA.

En este proyecto se ha descrito por primera vez la red de haplotipos del CHIKV con un enfoque que considera dos ángulos, el primero tomando todas las secuencias del mundo, de lo cual cabe resaltar que el grupo perteneciente al continente americano

estaba muy extendido, lo que puede indicar una larga historia de diversificación dentro el continente. En la segunda red de haplotipos, que se centra en el continente americano, se aprecia que existen una gran cantidad de haplotipos individuales, lo que sugiere una alta tasa mutacional que podría deberse a que hay una rápida expansión de la población con un bajo nivel de divergencia entre las secuencias. En ambas redes se corroboró que, como se esperaba, las muestras secuenciadas en este estudio se mantienen juntas en el árbol filogenético.

Otro de los hallazgos que resulta interesante es que las secuencias M4 y M5 se relacionan con secuencias ecuatorianas y brasileñas lo que concuerda con estudios realizados por Nunes et al. (2015) donde detectaron por primera vez la transmisión continua del genotipo ECSA CHIKV en las Américas, específicamente en Brasil, cabe mencionar que la obtención de las muestras de suero conteniendo al virus fue en la misma época de la epidemia en estos países. Sin embargo, que dichas muestras tengan ancestros no muestreados, nos impide trazar una ruta de transmisión. Por otro lado, el árbol filogenético muestra que M4 y M5 comparten grupo con secuencias ecuatorianas, de tal manera que se establece la posibilidad de que el país de introducción sea Ecuador, aunque no se puede asegurar.

La secuencia M3, aunque filogenéticamente poco relacionada con M4 y M5 presenta una relación esperada y también ya señalada por Galán-Huerta et al. (2018), en cuyo trabajo observaron que los virus aislados en Chiapas se agruparon con otros aislados que continuaron circulando en el Caribe y fueron detectados en Nicaragua y Cuba. Inclusive se menciona que es posible que Chiapas haya tenido una tercera introducción de CHIKV durante 2015, esta vez desde Nicaragua ya que secuencias obtenidas en Tapachula están agrupadas con secuencias de Nicaragua que fueron obtenidas durante el 2014 y 2015, lo que coincide con la gran epidemia que aconteció en esos años.

En nuestro estudio, hemos observado que nuestras muestras no forman un grupo monofilético, lo que sugiere la presencia de múltiples introducciones del virus del CHIKV a nuestro país, siendo Ecuador y Nicaragua los países de origen más probables,

aunque también se deba a que nuestra N, es muy pequeña, lo cual podría dejar fuera a las muestras de un grupo representativo. Además, la longitud de las ramas en el árbol filogenético indica que la transmisión dentro de México ha permitido un proceso de diversificación del virus.

Algo que nos muestra la red de haplotipos es que el haplotipo más representado es el de secuencias de Estados Unidos, y de este se generan haplotipos únicos que indican una alta propagación, pero baja divergencia. Teniendo en cuenta esto, parece tener sentido con los resultados de un estudio en 2007 (Lanciotti *et al*, 2007), donde la epidemia generalizada de CHIKV en el sur de la India ha infectado a viajeros estadounidenses teniendo pacientes en Carolina del Sur y Luisiana donde hay presencia de mosquitos *Ae. albopictus* y los cuales podría haber tenido un papel importante en la distribución del CHIKV.

Las secuencias no muestreadas son incógnitas que al esclarecerlas podrían ayudarnos a entender la ruta en como del norte llegaron al sur, y posteriormente al centro de América. Estas secuencias desconocidas desempeñan un papel crucial en la comprensión de los patrones de dispersión del CHIKV en la región, ayudándonos a trazar el camino que estas variantes genéticas siguieron a lo largo de su evolución.

La identificación de polimorfismos en las regiones de E1 y E2 nos permite discernir que los fragmentos de E1 y E2 contengan cuatro y seis polimorfismos respectivamente, señalando las regiones como un hotspot de variabilidad genética. En estos podemos especular que puede ser de ayuda para que el virus tenga una mayor capacidad de diseminarse en diferentes vectores y hospederos ya que recordemos que las proteínas que codifican estos genes son importantes para la interacción celular.

El CHIKV es uno de los arbovirus que pertenece a un grupo de importancia médica a nivel mundial, considerado un peligro de diferentes índoles, causando daños graves, hasta provocar consecuencias físicas en corto, mediano, largo plazo y, en algunos casos, provocar la muerte.

La vacuna Ixchiq, basada en el virus atenuado del genotipo ECSA, emerge como una opción para reducir el número de casos de gravedad, especialmente en el contexto de la abundancia de secuencias que, como revela este estudio, pertenecen mayoritariamente a la variante ECSA y se espera que tenga una buena capacidad de combatir los diferentes genotipos ya que la diversidad filogenética identificada en este trabajo sugiere que las cepas analizadas se ramifican significativamente dentro de este genotipo.

Además de tomar en cuenta los cambios que sufren, no solo para replicarse en humanos, sino que además que permiten aumentar su habilidad de reproducirse en mosquitos que, por la densidad poblacional nos pone en contacto con estos potenciales vectores.

También se busca determinar una mejor comprensión de la dinámica del virus ya que este conocimiento nos permitirá desarrollar mejores herramientas de diagnóstico, que aportaran en una manera más eficaz de identificar el CHIKV por que muchas veces se pierde información cuando los brotes se dan en regiones desatendidas y no se tienen una vigilancia epidemiológica a la altura.

CONCLUSIÓN

En este estudio se ha utilizado un enfoque de análisis filogenético basado en secuencias del virus CHIKV obtenidas de diferentes regiones de América. La concatenación de secuencias E1 y E2, junto con la eliminación de secuencias redundantes, ha permitido obtener árboles filogenéticos más resolutivos.

Nuestros resultados respaldan la observación previa de que los brotes de CHIKV en América Latina están asociados con el genotipo asiático del virus, y nuestras muestras se agrupan en este clado, lo que confirma esta conexión genética.

En nuestro análisis, hemos establecido las relaciones entre nuestras muestras y las muestras de países sudamericanos, lo que sugiere que esta región es la fuente más probable de introducción del virus en nuestro país, esto debido a las múltiples rutas de intercambios que existen, y a su vez estos también comparten rutas con países asiáticos, lo que permite otra entrada del genotipo asiático, además de la migración tan presente en nuestros días. Además, hemos observado procesos de diversificación del virus dentro de México, lo que indica la adaptación continua del virus a nuevas condiciones locales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta-Reyes, J., Navarro, É., & Martínez-Garcés, J. C. (2015). Chikungunya fever: History and Epidemiology. *Salud*, 31(3), 621-630. <https://doi.org/10.14482/sun.31.3.7486>
2. Ali, S. M., Amroun, A., De Lamballerie, X., & Nougairède, A. (2018). Evolution of chikungunya virus in Mosquito cells. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34561-x>
3. Basore, K., Kim, A. S., Nelson, C. A., Zhang, R., Smith, B. K., Uranga, C., Vang, L., Cheng, M., Gross, M. L., Smith, J., Diamond, M. S., & Fremont, D. H. (2019). Cryo-EM structure of chikungunya virus in complex with the MXRA8 receptor. *Cell*, 177(7), 1725-1737.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.006>
4. Bettis, A. A., Jackson, M. L., Yoon, I. K., Breugelmans, J. G., Goios, A., Gubler, D. J., & Powers, A. M. (2022). The Global Epidemiology of Chikungunya from 1999 to 2020: A Systematic literature review to inform the development and introduction of vaccines. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 16(1), e0010069. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010069>
5. Bouraï, M., Lucas-Hourani, M., Gad, H. H., Drosten, C., Jacob, Y., Tafforeau, L., Cassonnet, P., Jones, L., Judith, D., Couderc, T., Lecuit, M., André, P., Kümmerer, B. M., Lotteau, V., Desprès, P., Tangy, F., & Vidalain, P. (2012). Mapping of chikungunya virus interactions with host proteins identified NSP2 as a highly connected viral component. *Journal of Virology*, 86(6), 3121-3134. <https://doi.org/10.1128/jvi.06390-11>

6. Calvo, E., Archila, E. D., López, L. S., & Castellanos, J. E. (2021). Reconociendo el virus del chikunguña. *Biomedica*, 41(2), 353-373. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5797>
7. Chen, R., Plante, J. A., Plante, K. S., Yun, R., Shinde, D. P., Liu, J., Haller, S. L., Mukhopadhyay, S., & Weaver, S. C. (2021). Lineage divergence and Vector-Specific adaptation have driven chikungunya virus onto multiple adaptive landscapes. *MBio*, 12(6). <https://doi.org/10.1128/mbio.02738-21>
8. Chikungunya Virus: Viral Features and Genetic Evolution. (2015). *Revista Salud Uninorte*, 32(2), ISSN 2011-7531. <https://doi.org/10.14482/sun>
9. Chua, C. L., Sam, I., 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>
10. Clement, M. J., Snell, Q., Walker, P., & Crandall, K. A. (2002). TCS: Estimating Gene Genealogies. *ResearchGate*. https://www.researchgate.net/publication/220950274_TCS_Estimating_Gene_Genealogies
11. Constant, L. E. C., Rajsfus, B. F., Carneiro, P. H., Sisnande, T., Mohana-Borges, R., & Allonso, D. (2021). Overview on Chikungunya virus infection: From epidemiology to State-of-the-Art Experimental models. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.744164>

12. Da Costa, V. G., & Saivish, M. V. (2023). Plant-derived compounds as potential treatment for arboviruses. En Elsevier eBooks (pp. 51-61). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91942-5.00008-2>
13. De Bernardi Schneider, A., Ochsenreiter, R., Hostager, R., Hofacker, I. L., Janies, D., & Wolfinger, M. T. (2019). Updated phylogeny of chikungunya virus suggests Lineage-Specific RNA architecture. *Viruses*, 11(9), 798. <https://doi.org/10.3390/v11090798>
14. De Lima Cavalcanti, T. Y. V., Pereira, M. R., De Paula, S. O., & De Oliveira França, R. F. (2022). A review on chikungunya virus epidemiology, pathogenesis and current vaccine development. *Viruses*, 14(5), 969. <https://doi.org/10.3390/v14050969>
15. Dey, D., Siddiqui, S., Mamidi, P., Ghosh, S., Kumar, C. S., Chattopadhyay, S., Ghosh, S., & Banerjee, M. (2019). The effect of amantadine on an ion channel protein from chikungunya virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(7), e0007548. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007548>
16. Eastwood, G., Sang, R., Guerbois, M., Taracha, E., & Weaver, S. C. (2017). Enzootic circulation of chikungunya virus in East Africa: Serological evidence in non-human Kenyan primates. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(5), 1399-1404. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0126>
17. Federico, G. G. (2016). Las herramientas de análisis filogenético para el estudio de la propagación de la epidemia de VIH-1 en Andalucía Oriental. Dialnet. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=56162>

18. Fros, J. J., & Pijlman, G. P. (2016). Alphavirus infection: host cell Shut-Off and inhibition of antiviral responses. *Viruses*, 8(6), 166. <https://doi.org/10.3390/v8060166>
19. Galán-Huerta, K., Martínez-Landeros, E. A., Delgado-Gallegos, J. L., Caballero-Sosa, S., Malo-García, I. R., Fernández-Salas, I., Ramos-Jiménez, J., & Rivas-Estilla, A. M. (2018). Molecular and clinical characterization of chikungunya virus infections in Southeast Mexico. *Viruses*, 10(5), 248. <https://doi.org/10.3390/v10050248>
20. Galán-Huerta, K., Zomosa-Signoret, V., Vidaltamayo, R., Caballero-Sosa, S., Fernández-Salas, I., Ramos-Jiménez, J., & Rivas-Estilla, A. M. (2019). Genetic variability of chikungunya virus in Southern Mexico. *Viruses*, 11(8), 714. <https://doi.org/10.3390/v11080714>
21. Galtier, N., Gouy, M., & Gautier, C. (1996). SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Bioinformatics*, 12(6), 543-548. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/12.6.543>
22. Holmes, A. C., Basore, K., Fremont, D. H., & Diamond, M. S. (2020). A Molecular understanding of alphavirus entry. *PLOS Pathogens*, 16(10), e1008876. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008876>
23. Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772-780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
24. Khongwichit, S., Chansaenroj, J., Chirathaworn, C., & Poovorawan, Y. (2021). Chikungunya virus infection: molecular biology, clinical characteristics, and

- epidemiology in Asian countries. *Journal of Biomedical Science*, 28(1).
<https://doi.org/10.1186/s12929-021-00778-8>
25. Khongwichit, S., Chansaenroj, J., Thongmee, T., Benjamanukul, S., Wanlapakorn, N., Chirathaworn, C., & Poovorawan, Y. (2021). Large-scale outbreak of chikungunya virus infection in Thailand, 2018–2019. *PLOS ONE*, 16(3), e0247314. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247314>
26. Kryazhimskiy, S., & Plotkin, J. B. (2008). The Population Genetics of DN/DS. *PLOS Genetics*, 4(12), e1000304. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000304>
27. Kuo, S., Chen, Y., Wang, Y., Tsui, P., Kuo, M., Wu, T., & Lo, S. J. (2012). Cell-based analysis of chikungunya virus E1 protein in membrane fusion. *Journal of Biomedical Science*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-44>
28. Lanciotti, R. S., Kosoy, O., Laven, J., Panella, A. J., Velez, J. O., Lambert, A. J., & Campbell, G. L. (2007). Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerging Infectious Diseases*, 13(5), 764-767. <https://doi.org/10.3201/eid1305.070015>
29. Larsson, A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, 30(22), 3276-3278. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
30. Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). PoPart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110-1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.12410>
31. Liodelvio, M. F. (s. f.). *Fiebre chikungunya*. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232015000100008.

32. Lulla, V., Kim, D., Frolova, E. I., & Frolov, I. (2013). The Amino-Terminal domain of alphavirus capsid protein is dispensable for viral particle assembly but regulates RNA encapsidation through cooperative functions of its subdomains. *Journal of Virology*, 87(22), 12003-12019. <https://doi.org/10.1128/jvi.01960-13>
33. Meshram, C. D., Agback, P., Shiliaev, N., Urakova, N., Mobley, J. A., Agback, T., Frolova, E. I., & Frolov, I. (2018). Multiple host factors interact with the hypervariable domain of chikungunya virus NSP3 and determine viral replication in Cell-Specific mode. *Journal of Virology*, 92(16). <https://doi.org/10.1128/jvi.00838-18>
34. Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New models and Efficient Methods for phylogenetic inference in the Genomic Era. *Molecular Biology and Evolution*, 37(5), 1530-1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
35. Moneriz, C., Serranao, L. N. R., & Salgado, C. C. (2016). Nuevos enfoques prometedores en el tratamiento frente al virus Chikungunya. *ResearchGate*. https://www.researchgate.net/publication/313891679_Nuevos_enfoques_prometedores_en_el_tratamiento_frente_al_virus_chikungunya
36. Monteiro, V. S., Navegantes-Lima, K. C., De Lemos, A. B., Da Silva, G. L., De Souza Gomes, R., Reis, J. F., Rodrigues, L. C., Da Silva, O. S., Romão, P. R. T., & Monteiro, M. C. (2019). Aedes-Chikungunya virus interaction: Key role of vector midguts microbiota and its saliva in the host infection. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00492>

37. Morrison, T. E. (2014). Reemergence of chikungunya virus. *Journal of Virology*, 88(20), 11644-11647. <https://doi.org/10.1128/jvi.01432-14>
38. Noranate, N., Takeda, N., Chetanachan, P., Sittisaman, P., A-Nuegoonpipat, A., & Anantapreecha, S. (2014). Characterization of chikungunya Virus-Like particles. *PLOS ONE*, 9(9), e108169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108169>
39. Nunes, M. R. T., Faria, N. R., De Vasconcelos, J. M., Golding, N., Kraemer, M. U. G., De Oliveira, L. F., Da Silva Azevedo, R. D. S., Da Silva, D. E. A., Da Silva, E. V. P., Da Silva, S. P., Carvalho, V. L., Coelho, G. E., Cruz, A. C. R., Rodrigues, S. G., Da Silva Gonçalves Vianez, J. L., Nunes, B. T. D., Cardoso, J. F., Tesh, R. B., Hay, S. I., . . . Da Costa Vasconcelos, P. F. (2015). Emergence and potential for spread of chikungunya virus in Brazil. *BMC Medicine*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0348-x>
40. Rathore, A. P. S., Ng, M., & Vasudevan, S. G. (2013). Differential unfolded protein response during chikungunya and Sindbis virus infection: CHIKV NSP4 suppresses EIF2A phosphorylation. *Virology Journal*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1743-422x-10-36>
41. Riemersma, K. K., & Coffey, L. L. (2019). Chikungunya virus populations experience diversity- dependent attenuation and purifying intra-vector selection in Californian aedes aegypti mosquitoes. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(11), e0007853. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007853>
42. Rodríguez-Aguilar, E. D., Martínez-Barnetche, J., González-Bonilla, C. R., Téllez-Sosa, J., Argotte-Ramos, R., & Rodríguez, M. H. (2021). Genetic diversity

- and spatiotemporal dynamics of chikungunya infections in Mexico during the outbreak of 2014–2016. *Viruses*, 14(1), 70. <https://doi.org/10.3390/v14010070>
43. Rupp, J., Sokoloski, K. J., Gebhart, N. N., & Hardy, R. W. (2015). Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *Journal of General Virology*, 96(9), 2483-2500. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000249>
44. Schneider, M., Narciso-Abraham, M., Hadl, S., McMahon, R. P., Toepfer, S., Fuchs, U., Hochreiter, R., Bitzer, A., Kosulin, K., Larcher-Senn, J., Mader, R. M., Dubischar, K., Zoihsel, O., Jaramillo, J., Eder-Lingelbach, S., Buerger, V., & Wressnigg, N. (2023). Safety and immunogenicity of a single-shot live-attenuated chikungunya vaccine: a double-blind, multicentre, randomised, placebo-controlled, Phase 3 trial. *The Lancet*, 401(10394), 2138-2147. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(23\)00641-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(23)00641-4)
45. Sharma, R., Kesari, P., Kumar, P., & Tomar, S. (2018). Structure-function Insights into chikungunya Virus Capsid protein: Small molecules targeting Capsid Hydrophobic pocket. *Virology*, 515, 223-234. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.020>
46. Silva, J. V., Ludwig-Begall, L. F., De Oliveira-Filho, E. F., Oliveira, R. A. D. S., Durães-Carvalho, R., Lopes, T. R. R., Silva, D. E., & Gil, L. H. V. G. (2018). A scoping review of chikungunya virus infection: epidemiology, clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. *Acta Tropica*, 188, 213-224. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.09.003>

47. Silva, L. A., & Dermody, T. S. (2017). Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *Journal of Clinical Investigation*, 127(3), 737-749. <https://doi.org/10.1172/jci84417>
48. Singh, A., Kumar, A., Yadav, R., Uversky, V. N., & Giri, R. (2018). Deciphering the dark proteome of chikungunya virus. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23969-0>
49. Solis Vidal, S. (2022). *Caracterización De Las Secuencias De Los Virus Zika Y Dengue Obtenidas De Mosquitos Aedes Aegypti* [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma de la Ciudad de México.
50. Sourisseau, M., Schilte, C., Casartelli, N., Trouillet, C., Guivel-Benhassine, F., Rudnicka, D., Sol-Foulon, N., Roux, K. L., Prévost, M., Fsihi, H., Frenkiel, M., Blanchet, F. P., Afonso, P. V., Ceccaldi, P., Ozden, S., Gessain, A., Schuffenecker, I., Verhasselt, B., Zamborlini, A., . . . Schwartz, O. (2007). Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLOS Pathogens*, 3(6), e89. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030089>
51. Spicher, T., Delitz, M., De Bernardi Schneider, A., & Wolfinger, M. T. (2021). Dynamic molecular epidemiology reveals Lineage-Associated Single-Nucleotide variants that alter RNA structure in chikungunya virus. *Genes*, 12(2), 239. <https://doi.org/10.3390/genes12020239>
52. Subudhi, B. B., Chattopadhyay, S., Mishra, P., & Kumar, A. (2018). Current strategies for inhibition of chikungunya infection. *Viruses*, 10(5), 235. <https://doi.org/10.3390/v10050235>

53. Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. (2023, 17 mayo). *Mensaje Bioquímico XLV 2021 | Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM*. Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM | TAB. <http://biosensor.facmed.unam.mx/tab/index.php/mensaje-bioquimico-xlv-2021/>
54. Tavaré S. Miura RM. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences, *Lectures on mathematics in the life sciences*, 1986, vol. Volume 17 Providence (RI) American Mathematical Society (pg. 57-86)
55. Teppor, M., Žusinaite, E., & Merits, A. (2021). Phosphorylation sites in the hypervariable domain in chikungunya virus NSP3 are crucial for viral replication. *Journal of Virology*, 95(9). <https://doi.org/10.1128/jvi.02276-20>
56. Tsetsarkin, K. A., Chen, R., Sherman, M. B., & Weaver, S. C. (2011). Chikungunya virus: evolution and genetic determinants of emergence. *Current Opinion in Virology*, 1(4), 310-317. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.07.004>
57. Tsetsarkin, K. A., Chen, R., Yun, R., Rossi, S. L., Plante, K. S., Guerbois, M., Forrester, N. L., Perng, G. C., Sreekumar, E., Leal, G., Huang, J., Mukhopadhyay, S., & Weaver, S. C. (2014). Multi-peaked adaptive landscape for chikungunya virus evolution predicts continued fitness optimization in *Aedes albopictus* mosquitoes. *Nature Communications*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms5084>
58. Tsetsarkin, K. A., McGee, C. E., Volk, S. M., Vanlandingham, D. L., Weaver, S. C., & Higgs, S. (2009). Epistatic roles of E2 glycoprotein mutations in adaption

- of chikungunya virus to *Aedes albopictus* and *AE. aegypti* mosquitoes. *PLOS ONE*, 4(8), e6835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006835>
59. Tsetsarkin, K. A., Vanlandingham, D. L., McGee, C. E., & Higgs, S. (2007). A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLOS Pathogens*, 3(12), e201. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030201>
60. Volk, S. M., Chen, R., Tsetsarkin, K. A., Adams, A., Garcia, T., Sall, A. A., Nasar, F., Schuh, A. J., Holmes, E. C., Higgs, S., Maharaj, P. D., Brault, A. C., & Weaver, S. C. (2010). Genome-Scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. *Journal of Virology*, 84(13), 6497-6504. <https://doi.org/10.1128/jvi.01603-09>
61. Voss, J. E., Vaney, M., Duquerroy, S., Vonrhein, C., Girard-Blanc, C., Crublet, E., Thompson, A., Bricogne, G., & Rey, F. (2010). Glycoprotein organization of chikungunya virus particles revealed by x-ray crystallography. *Nature*, 468(7324), 709-712. <https://doi.org/10.1038/nature09555>
62. Vu, D. M., Jungkind, D., & LaBeaud, A. D. (2017). Chikungunya virus. *Clinics in Laboratory Medicine*, 37(2), 371-382. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.01.008>
63. Wang, P., & Zhang, R. (2019). Chikungunya virus and (Re-) emerging alphaviruses. *Viruses*, 11(9), 779. <https://doi.org/10.3390/v11090779>
64. Waterhouse, A., Procter, J. B., Martin, D., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). JalView Version 2—A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189-1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>

65. Weaver, S. C., Brault, A. C., Kang, W., & Holland, J. J. (1999). Genetic and fitness changes accompanying adaptation of an arbovirus to vertebrate and invertebrate cells. *Journal of Virology*, 73(5), 4316-4326. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.5.4316-4326.1999>
66. Weaver, S. C., Charlier, C., Vasilakis, N., & Lecuit, M. (2018). Zika, chikungunya, and other emerging Vector-Borne viral diseases. *Annual Review of Medicine*, 69(1), 395-408. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050715-105122>
67. Weaver, S. C., Chen, R., & Diallo, M. (2020). Chikungunya virus: Role of vectors in emergence from enzootic cycles. *Annual Review of Entomology*, 65(1), 313-332. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-025207>
68. Weaver, S. C., & Forrester, N. L. (2015). Chikungunya: evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral Research*, 120, 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.04.016>
69. World Health Organization: WHO. (2022, 8 diciembre). *Chikungunya*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya#:~:text=La%20fiebre%20chikungunya%20se%20caracteriza,semanas%2C%20meses%20e%20incluso%20a%C3%B1os>
70. Wu, P., Yu, X., Wang, P., & Cheng, G. (2019). Arbovirus lifecycle in Mosquito: acquisition, propagation and transmission. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 21. <https://doi.org/10.1017/erm.2018.6>
71. Yap, M. L., Klose, T., Urakami, A., Hasan, S. S., Akahata, W., & Rossmann, M. G. (2017). Structural studies of Chikungunya virus maturation. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, 114(52), 13703-13707.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1713166114>

72. Zhang, D., Peng, C., Li, C., Li, Y., Zhang, H., Li, N., & Xiao, P. (2022). Metavirome analysis of *Culex tritaeniorhynchus* reveals novel Japanese encephalitis virus and chikungunya virus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.938576>

73. Zurbia-Flores, G. M., Reyes-Sandoval, A., & Kim, Y. C. (2023). Chikungunya virus: priority pathogen or passing trend? *Vaccines*, 11(3), 568.

<https://doi.org/10.3390/vaccines11030568>

ANEXOS

Anexo I. Países con casos autóctonos de CHIKV.

ÁFRICA	ASIA	AMÉRICA	OCEANÍA E ISLAS DEL PACÍFICO
Angola	Bangladés	Anguila	Samoa Estadounidense
Benín	Bután	Antigua y Barbuda	Islas Cook
Burundi	Camboya	Argentina	Estados Federados de Micronesia
Camerún	China	Aruba	Fiji
República Centroafricana	India	Bahamas	Polinesia Francesa
Chad	Indonesia	Barbados	Kiribati
Comoras	Laos	Belice	Islas Marshall
Costa de Marfil	Malasia	Bolivia	Nueva Caledonia
República Democrática del Congo	Maldivas	Brasil	Papúa Nueva Guinea
Yibuti	Myanmar (Birmania)	Islas Vírgenes Británicas	Samoa
Guinea Ecuatorial	Nepal	Islas Caimán	Tokelau
Eritrea	Pakistán	Colombia	Tonga
Etiopía	Filipinas	Costa Rica	
Gabón	Arabia Saudita	Cuba	
Guinea	Singapur	Curazao	
Kenia	Sri Lanka	Dominica	
Madagascar	Taiwán	República Dominicana	
Malauí	Tailandia	Ecuador	
Mauricio	Timor Oriental	El Salvador	
Mayotte	Vietnam	Guayana Francesa	
Mozambique	Yemen	Granada	
Nigeria	EUROPA	Guadalupe	
Congo	Francia	Guatemala	
Reunión	Italia	Guyana	
Senegal		Haití	
Seychelles		Honduras	
Sierra Leona		Jamaica	

Sudáfrica		Martinica	
Somalia		México	
Sudán		Montserrat	
Tanzania		Nicaragua	
Uganda		Panamá	
Zimbabue		Paraguay	
		Perú	
		Puerto Rico	
		San Bartolomé	
		San Cristóbal y Nieves	
		Santa Lucía	
		San Martín	
		San Vicente y las granadinas	
		San Martín	
		Surinam	
		Trinidad y Tobago	
		Islas Turcas y Caicos	
		Estados Unidos	
		Islas Vírgenes de los Estados Unidos	
		Venezuela	

Anexo II. Código del archivo concatenar.py

```

from Bio import SeqIO

e2_records = SeqIO.to_dict(SeqIO.parse("Rv.fasta", "fasta"))
e1_records = SeqIO.to_dict(SeqIO.parse("Fw.fasta", "fasta"))

concatenated_sequences = {}

for name in e2_records:
    if name in e1_records:
        concatenated_sequence = e2_records[name] + e1_records[name]
        concatenated_sequences[name] = concatenated_sequence

```

```

with open("CHIKV3.fasta", "w") as output_file:
    for name, sequence in concatenated_sequences.items():
        SeqIO.write(sequence, output_file, "fasta")
print("Las secuencias se han concatenado con éxito en el archivo 'CHIKV1.fasta'
manteniendo los nombres de las secuencias.")

```

Anexo III. Script para la visualización del árbol filogenético en el Software R, con el paquete ggtree.

```

library(tidyverse)
library(treeio)
library(ggplot2)
library(ggtree)

tree<-read.tree("pruebav13.fasta.timetree.nwk")
state<- read.csv('ChikPaises.tsv', sep ='\t', head = T)
state$Country<- as.factor(state$Country)
statecolors<- read.csv('paises.tsv', sep ='\t', head = T)
colstate<- statecolors$ID
names(colstate)<- statecolors$Grupos

p3 <- ggtree(tree, size =0.5, color= "grey", layout='circular') + theme_tree() +
    theme(legend.position="bottom") +
    theme(legend.title=element_blank())

p3 <- p3 %<+% state + geom_tippoint(aes(color=Country))+
scale_color_manual(values= colstate)

p3

```

Anexo IV. Código del archivo phylip.py

```

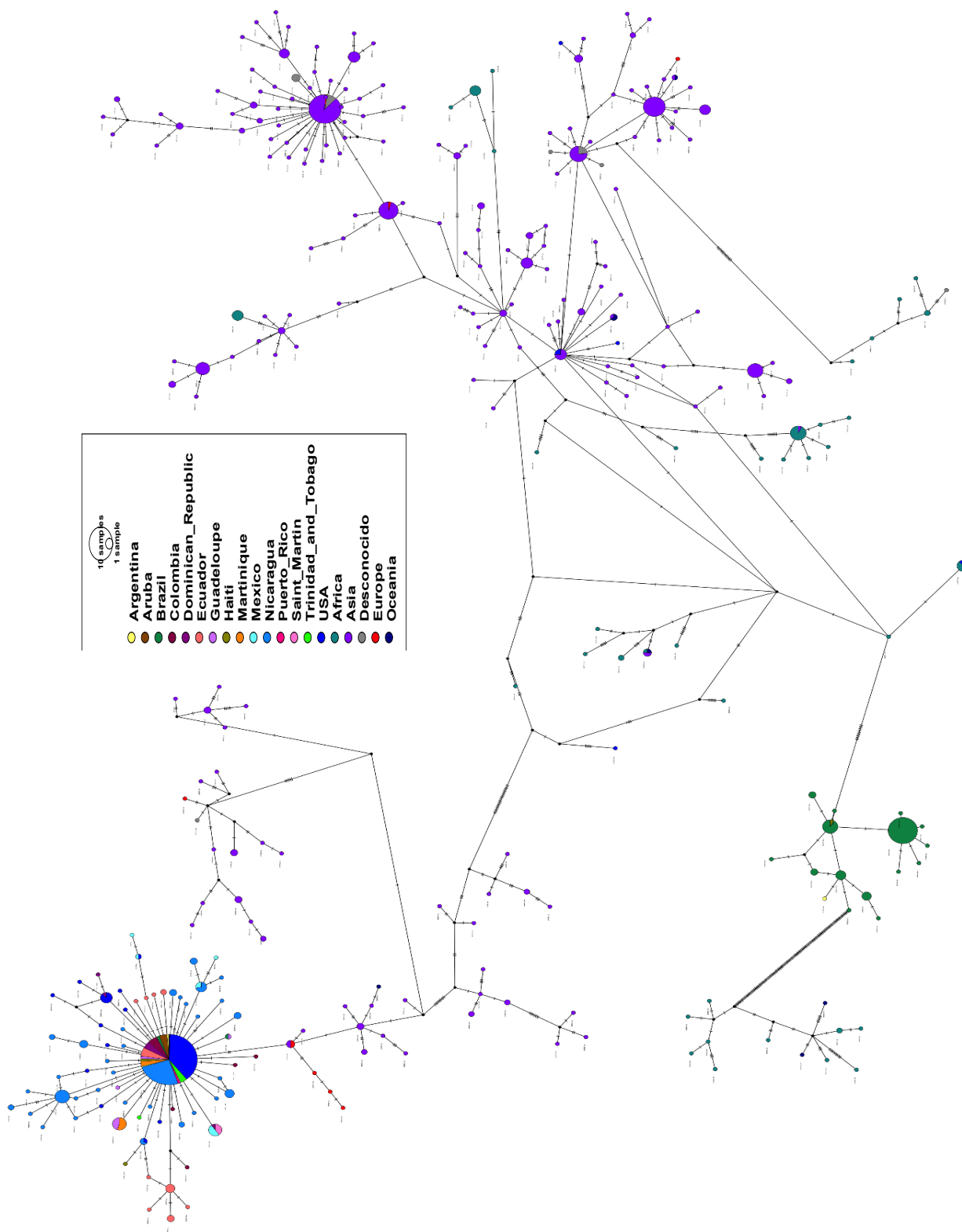
with open('pruebav13.fasta', 'r') as fasta_file:
    lines = fasta_file.readlines()

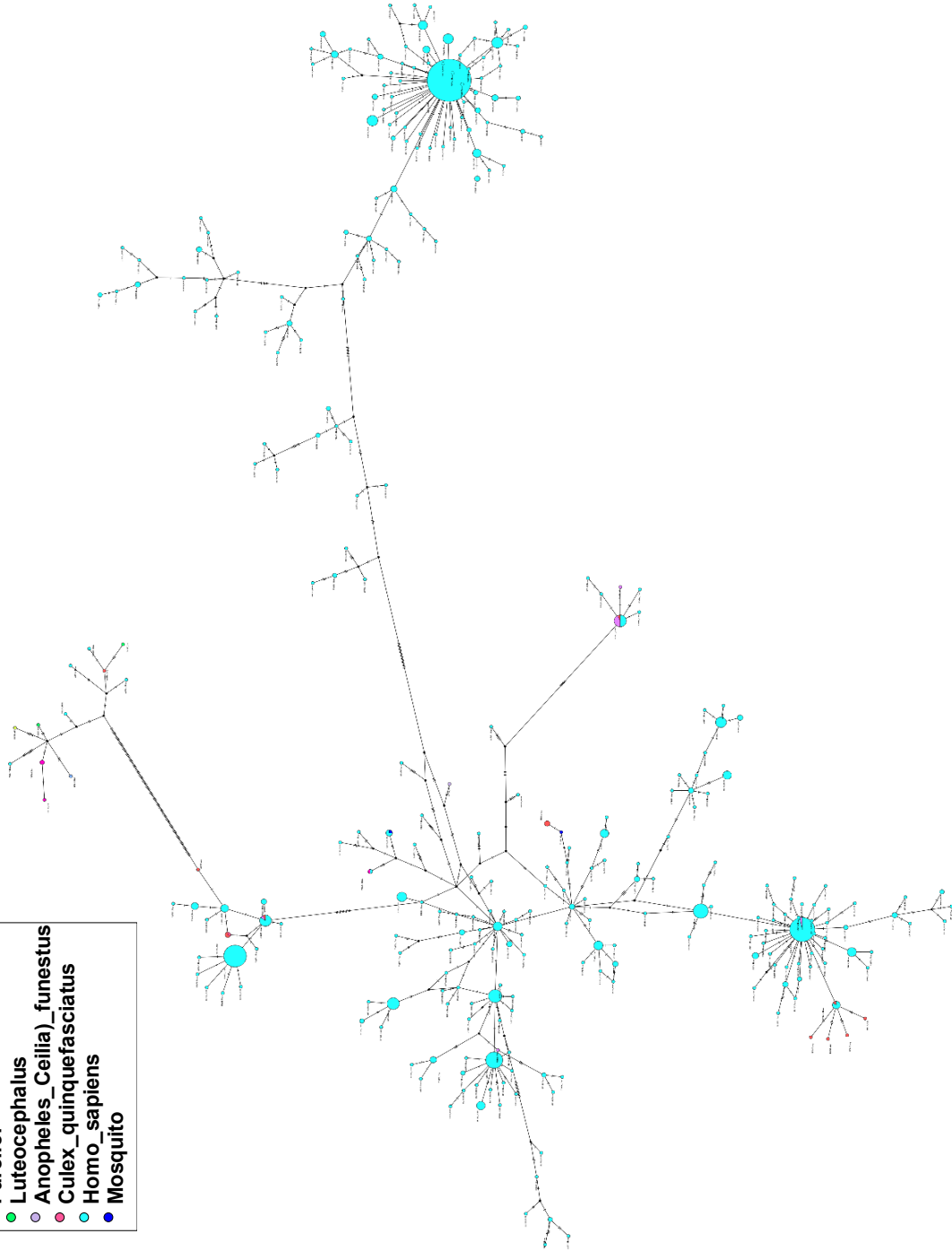
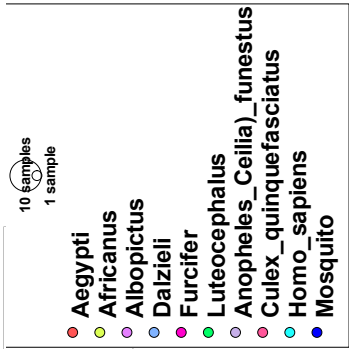
with open('pruebav15.phylip', 'w') as phylip_file:

```

```
num_sequences = len(lines) // 2
alignment_length = len(lines[1].strip())
phylip_file.write(f"{num_sequences} {alignment_length}\n")
for i in range(0, len(lines), 2):
    header = lines[i].strip()
    sequence = lines[i+1].strip()
    parts = header.split('\t')
    accession = parts[0]
    country = parts[-1].split()[-1]
    name_parts = accession.split('|')
    new_name = f"{name_parts[1]}_{country}"
    phylip_file.write(f"{new_name} {sequence}\n")
```

Anexo V. Redes de haplotipos por país/continente y por especie.





Anexo VI. Tabla de resultados del análisis filogenético en meta-CAT.

<input type="checkbox"/>	Position	Chi-square_value	P-value	Degrees_of_freedom	Fewer_5	Unlabeled	Human	Insect
<input type="checkbox"/>	53	59.5922749701454	4.32849633318833e-9	10	Y	2 c, 1 t	171 c	7 c
<input type="checkbox"/>	374	18.9201335873047	0.0412889120310597	10	Y	2 c, 1 t	169 c, 2 t	7 c
<input type="checkbox"/>	539	25.0523114843149	0.00524722729984548	10	Y	3 c	171 c	6 c, 1 t
<input type="checkbox"/>	562	68.1462831833954	1.00860475328065e-11	10	Y	3 g	4 a, 167 g	5 a, 2 g
<input type="checkbox"/>	692	66.1490034910444	1.67051186972569e-9	12	Y	2 g, 1 t	104 a, 67 g	7 a
<input type="checkbox"/>	698	88.9877780697727	8.50051851933485e-11	10	Y	3 c	3 c, 168 t	7 t
<input type="checkbox"/>	901	79.0611723302126	7.66728567856449e-11	10	Y	1 a, 2 g	170 a, 1 g	7 a
<input type="checkbox"/>	962	124.755277354567	6.9398468361519e-21	12	Y	1 c, 2 g	104 a, 67 c	7 a
<input type="checkbox"/>	1434	59.5922749701454	4.32849633318833e-9	10	Y	1 c, 2 g	171 g	7 g
<input type="checkbox"/>	1446	119.808568293933	5.53347105346195e-21	10	Y	1 c, 2 n	171 c	7 c

Anexo VII. Constancias de asistencia y participación en el Congreso Nacional de Virología 2023.



XIII CONGRESO NACIONAL DE VIROLOGÍA OTORGA EL PRESENTE RECONOCIMIENTO A

Oscar Arriaga Cadena

Por asistir XIII Congreso Nacional de Virología
llevado a cabo del 4 de octubre al 7 de octubre del 2023.


 Dra. Miroslava Elmi García Hernández
 Comité organizador


 Dra. Ma. Isabel Salazar Sánchez
 Comité organizador


 Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva
 Comité organizador


 Dr. Joel Vázquez Pérez
 Comité organizador


 Dra. Rosa María Del Ángel N.
 Presidenta de la Sociedad Mexicana de Virología



XIII CONGRESO NACIONAL DE VIROLOGÍA OTORGA EL PRESENTE RECONOCIMIENTO A

Oscar Arriaga Cadena, Martha Yocupicio-Monroy, Rosalía Lira Carmona,
Edgar Sevilla-Reyes y Selene Zárate

Por su ponencia: Phylogenetic analysis of Chikungunya viruses isolated in America.

En el XIII Congreso Nacional de Virología llevado a cabo del 4 de octubre al 7 de octubre del 2023.


 Dra. Miroslava Elmi García Hernández
 Comité organizador


 Dra. Ma. Isabel Salazar Sánchez
 Comité organizador


 Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva
 Comité organizador


 Dr. Joel Vázquez Pérez
 Comité organizador


 Dra. Rosa María Del Ángel N.
 Presidenta de la Sociedad Mexicana de Virología