



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

INFORME DE INVESTIGACIÓN SOBRE:
“DISEÑO IN SILICO DE PROTEÍNA MULTIEPITOPOS ESPECÍFICA DE
OROPOUCHE PARA INMUNODIAGNÓSTICO DIFERENCIAL EN ZONAS
ENDÉMICAS”

Requisito previo para optar por el Título de Licenciada en Laboratorio Clínico

Autora: Pilla Barroso, Annette Margarita

Tutor: PhD. Salazar Garcés, Luis Fabián

Ambato – Ecuador

Julio 2026

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutor del Proyecto de Investigación con el tema: **DISEÑO IN SILICO DE PROTEÍNA MULTIEPITOPOS ESPECÍFICA DE OROPOUCHE PARA INMUNODIAGNÓSTICO DIFERENCIAL EN ZONAS ENDÉMICAS**, de la Srta. Pilla Barroso Annette Margarita estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Técnica de Ambato. Considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación por el jurado examinador designado por el Honorable Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias de la Salud.

Ambato, Julio, 2026

EL TUTOR

PhD. Salazar Garcés, Luis Fabián

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Los criterios emitidos en el Trabajo de Investigación sobre:

“DISEÑO IN SILICO DE PROTEÍNA MULTIEPÍTOPOS ESPECÍFICA DE OROPOUCHE PARA INMUNODIAGNÓSTICO DIFERENCIAL EN ZONAS ENDÉMICAS” como también los contenidos, ideas, objetivos y futura aplicación del trabajo de investigación son de exclusiva responsabilidad de mi persona, como autora de este trabajo de grado.

Ambato, Julio, 2026

LA AUTORA

Pilla Barroso, Annette Margarita

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de esta tesis o parte de ella un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación.

Cedo los derechos en línea patrimonial de mi tesis con fines de difusión pública: además apruebo la reproducción de este proyecto de investigación, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autora.

Ambato, Julio, 2026

LA AUTORA

Pilla Barroso, Annette Margarita

APROBACIÓN DEL JURADO EXAMINADOR

Los miembros del Tribunal Examinador aprueban el Informe de Investigación, sobre el tema: **“DISEÑO *IN SILICO* DE PROTEÍNA MULTIEPÍTOPOS ESPECÍFICA DE OROPOUCHE PARA INMUNODIAGNÓSTICO DIFERENCIAL EN ZONAS ENDÉMICAS”** de Pilla Barroso Annette Margarita estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico.

Ambato, Julio, 2026

Para constancia firman:

PRESIDENTE

1er VOCAL

2do VOCAL

DEDICATORIA

Dedico este trabajo, en primer lugar, a Dios, por ser mi guía, mi fortaleza y mi refugio en los momentos de dificultad. Gracias por acompañarme a lo largo de este camino, por darme la sabiduría, la perseverancia y la oportunidad de culminar una de las etapas más importantes de mi vida.

A mi mamá, Antonieta, por ser el pilar fundamental de mi vida. Gracias por tu amor incondicional, por estar siempre presente en cada paso que he dado, por sostenerme en los momentos difíciles y por celebrar conmigo cada logro alcanzado. Tu apoyo emocional, tus consejos y cada sacrificio que has realizado han sido esenciales para que hoy pueda alcanzar esta meta. Este logro también es tuyo.

A mi papá, Luis, por su dedicación, esfuerzo y trabajo constante. Gracias por cada sacrificio realizado para contribuir a mi educación que me permitió continuar avanzando hacia mis objetivos. Este logro es también el resultado de todo lo que has hecho por mí.

A mi persona favorita, Luis, quien ha formado parte de este trayecto, brindándome apoyo y amor incondicional. Gracias por tu paciencia, por impulsarme a seguir adelante cuando el cansancio y las dificultades aparecían, y por creer en mí incluso cuando yo misma llegaba a dudar.

Pilla Barroso Annette Margarita

AGRADECIMIENTO

A Dios, por acompañarme en cada etapa de este camino, por brindarme fortaleza, sabiduría y perseverancia para superar los desafíos que se me presentaron. Gracias por permitirme alcanzar esta importante meta y por guiar cada uno de mis pasos.

A mis padres, por ser mi mayor fuente de apoyo y motivación. Gracias por su amor incondicional, por los sacrificios realizados a lo largo de los años y por brindarme siempre las herramientas necesarias para seguir adelante. Su esfuerzo, confianza y respaldo fueron fundamentales para culminar mi formación profesional y alcanzar este logro.

A mi tutor, PhD. Fabián Salazar, por su apoyo y dedicación durante el desarrollo de esta investigación. Agradezco profundamente el tiempo brindado, la generosidad al compartir sus conocimientos y, sobre todo, la paciencia con la que orientó cada etapa de este proceso.

A Carmen y Alexandra, las amigas que la universidad me regaló. Gracias por cada momento compartido a lo largo de estos años. Su amistad hizo que esta etapa fuera mucho más especial y significativa.

Finalmente, agradezco a todas las personas que, de una u otra manera, formaron parte de este camino y contribuyeron a mi crecimiento personal y académico. En especial, a Karen, Celeste, Sandra, José, Gaby y Lesly, por su cariño, confianza y apoyo constante a lo largo de esta etapa.

Pilla Barroso Annette Margarita

ÍNDICE GENERAL

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL JURADO EXAMINADOR	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO	vii
RESUMEN	xii
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	3
1.1. Antecedentes investigativos	3
1.1.1. Virus Oropouche: estructura, genoma y transmisión	3
1.1.2. Relevancia clínica y complicaciones asociadas a la infección por OROV	4
1.1.3. Epidemiología regional y situación del OROV en Ecuador.....	5
1.1.4. Diagnóstico del OROV y limitaciones serológicas en zonas endémicas	6
1.1.5. Proteínas Gn, Gc y NSm como blancos antigénicos	7
1.1.6. Inmunoinformática aplicada al diseño de epítomos	8
1.1.7. Constructos multiepítomos para inmunodiagnóstico	9
1.1.8. Modelado estructural y validación computacional.....	11
1.1.9. Optimización génica y expresión heteróloga	12
1.1.10. Pertinencia del diseño <i>in silico</i> de una proteína multiepitépica específica de OROV	13
1.2. Objetivos.....	15
1.2.1. Objetivo General:	15
1.2.2. Objetivos específicos	15
CAPITULO II	16
2.1. Materiales	16
2.1.1. Recursos humanos.....	16
2.1.2. Recursos tecnológicos	16
2.1.3. Recursos institucionales	16
2.1.4. Recursos económicos	16
2.2. Métodos	17
2.2.1. Enfoque y tipo de investigación	17
2.2.2. Aspectos éticos.....	17

2.2.3.	Variables de la investigación	18
2.2.4.	Hipótesis del estudio	20
2.2.5.	Descripción de los procedimientos	20
CAPITULO III.....		28
3.1.	Análisis De Resultados.....	28
3.1.1.	Recuperación de la proteína de interés.....	28
3.1.2.	Evaluación de la proteína completa	28
3.1.3.	Predicción y selección de epítomos B.....	29
3.1.4.	Evaluación de antigenicidad de epítomos de 16 aa y fragmentos de 12 aa.....	30
3.1.5.	Evaluación de alergenicidad de epítomos candidatos	33
3.1.6.	Evaluación de toxicidad	38
3.1.7.	Filtrado final de fragmentos de 12 aa.....	38
3.1.8.	Epítomos incorporados en el constructo multiepitópico final.....	42
3.1.9.	Diseño del constructo multiepitópico.....	42
3.1.10.	Análisis fisicoquímico del constructo	43
3.1.11.	Modelado estructural del constructo	44
3.1.12.	Refinamiento y validación estructural	45
3.1.13.	Optimización génica y diseño plasmídico	47
3.1.14.	Evaluación de estructuras de ARNm	48
3.1.15.	Análisis de similitud proteica mediante BLASTp y alineamiento global	49
3.2.	Discusión	50
3.3.	Verificación de hipótesis.....	57
CAPITULO IV.....		59
4.1.	Conclusiones.....	59
4.2.	Recomendaciones	60
Referencias Bibliográficas		61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados del análisis antigénico y alergénico de la poliproteína del segmento M de OROV	29
Tabla 2. Epítomos B lineales de 16 aa con mayor puntuación predichos mediante ABCPred29	
Tabla 3. Análisis de antigenicidad de epítomos B lineales de 16 aa	31
Tabla 4. Análisis de antigenicidad de fragmentos iniciales de 12 aa.....	31
Tabla 5. Análisis de antigenicidad de fragmentos finales de 12 aa	32
Tabla 6. Análisis de alergenidad de epítomos B lineales de 16 aa.....	34
Tabla 7. Análisis de alergenidad de fragmentos iniciales de 12 aa.....	35
Tabla 8. Análisis de alergenidad de fragmentos finales de 12 aa	36
Tabla 9. Análisis de toxicidad de fragmentos d erivados de la poliproteína del segmento M de OROV mediante ToxinPred	38
Tabla 10. Epítomos iniciales de 12 aa seleccionados tras el proceso de validación.....	39
Tabla 11. Epítomos finales de 12 aa seleccionados tras el proceso de validación.....	40
Tabla 12. Epítomos incorporados en el constructo multiepitópico final	42
Tabla 13. Evaluación de las propiedades físicoquímicas del constructo multiepitópico mediante ProtParam	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flujo de trabajo para la predicción, evaluación y selección de epítomos B lineales.	22
Figura 2. Secuencia proteica del segmento M de OROV recuperada desde NCBI Protein mediante el código de acceso UYI36405.....	28
Figura 3. Representación esquemática del constructo multiepitópico diseñado.....	43
Figura 4. Modelo 3D del constructo multiepitópico predicho mediante ColabFold.....	45
Figura 5. Gráficos generados por AlphaFold.....	45
Figura 6. Puntuaciones obtenidas para los cinco modelos generados por GalaxyRefine	46
Figura 7. Estructura tridimensional predicha del constructo multiepitópico, generada con AlphaFold y refinada con GalaxyRefine	46
Figura 8. Resultados generados por SAVES.....	47
Figura 9. Optimización de codones del constructo multiepitópo para Escherichia coli K12 mediante JCat. Se muestra el ADN optimizado, el valor CAI y el contenido GC.....	47
Figura 10. Inserción in silico del gen optimizado en el vector de expresión pET28a(+)	48
Figura 11. Gráficos generados por RNAfold.	49
Figura 12. Análisis de similitud del constructo proteico multiepitópo mediante BLASTp en el servidor NCBI BLAST	49
Figura 13. Reactividad cruzada frente a Arbovirus emergentes en el servidor BLAST Global Alignment	50

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

“DISEÑO IN SILICO DE PROTEÍNA MULTIEPITOPOS ESPECÍFICA DE OROPOUCHE PARA INMUNODIAGNÓSTICO DIFERENCIAL EN ZONAS ENDÉMICAS”

Autora: Pilla Barroso, Annette Margarita

Tutor: PhD. Salazar Garcés, Luis Fabián

Fecha: Julio 2026

RESUMEN

El virus Oropouche (OROV) constituye un arbovirus emergente de creciente relevancia sanitaria en la Región de las Américas debido a su expansión geográfica, reemergencia en países sudamericanos y reciente detección en Ecuador. Su similitud clínica con otras arbovirosis como dengue, Zika y Chikungunya dificulta el diagnóstico diferencial, favorece el subregistro de casos y limita la vigilancia epidemiológica, especialmente en zonas endémicas con acceso restringido a pruebas específicas. En este contexto, la presente investigación se desarrolló dentro de la línea de investigación de inmunoinformática aplicada al diagnóstico de enfermedades infecciosas.

El objetivo fue diseñar y validar *in silico* una proteína multiepítomos específica del virus Oropouche con potencial aplicación en inmunodiagnóstico diferencial. Se realizó un estudio cuantitativo de tipo experimental *in silico*, utilizando herramientas bioinformáticas e inmunoinformáticas. A partir de la secuencia de la poliproteína codificada por el segmento M del OROV (UYI36405), recuperada de NCBI Protein, se predijeron epítomos B lineales mediante ABCPred y se aplicaron filtros de antigenicidad, alergenicidad y toxicidad utilizando VaxiJen v2.0, AllerTOP v2.1 y ToxinPred. Posteriormente, se efectuó el ensamblaje del constructo, modelado estructural tridimensional, validación computacional y optimización genética para expresión heteróloga en *Escherichia coli*.

Como resultado, se obtuvo un constructo compuesto por seis epítomos seleccionados, con características favorables de antigenicidad, estabilidad estructural, ausencia de toxicidad y baja similitud frente a arbovirus cocirculantes. La novedad científica del estudio radica en la propuesta de una proteína multiepítomos específica de OROV como candidato antigénico computacional para el desarrollo futuro de inmunoensayos diferenciales, contribuyendo al fortalecimiento del diagnóstico y vigilancia de esta arbovirosis emergente.

PALABRAS CLAVES: VIRUS OROPOUCHE, INMUNOINFORMÁTICA, PROTEÍNA MULTIEPÍTOPOS, INMUNODIAGNÓSTICO DIFERENCIAL, DISEÑO IN SILICO.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

“IN SILICO DESIGN OF A MULTIEPITOPE PROTEIN SPECIFIC TO
ORPOUCHE VIRUS FOR DIFFERENTIAL IMMUNODIAGNOSIS IN
ENDEMIC AREAS”

Authora: Pilla Barroso Annette Margarita

Tutor: PhD. Salazar Garcés Luis Fabián

Date: July 2026

SUMMARY

Oropouche virus (OROV) is an emerging arbovirus of increasing public health concern in the Americas due to its geographic expansion, reemergence in several South American countries, and recent detection in Ecuador. Its clinical manifestations closely resemble those of other arboviral infections, including dengue, Zika, and Chikungunya, making differential diagnosis challenging and contributing to underreporting, particularly in endemic regions with limited access to specific diagnostic tools. In this context, the present study was conducted within the research field of biotechnology and immunoinformatics applied to infectious disease diagnosis.

The objective of this study was to design and validate in silico a multiepitope protein specific to Oropouche virus with potential application in differential immunodiagnosis. A quantitative in silico experimental approach was employed using bioinformatics and immunoinformatics tools. The amino acid sequence of the OROV M-segment polyprotein (accession number UYI36405) was retrieved from the NCBI Protein database. Linear B-cell epitopes were predicted using ABCPred and subsequently filtered according to antigenicity, allergenicity, and toxicity criteria through VaxiJen v2.0, AllerTOP v2.1, and ToxinPred. The selected epitopes were assembled into a multiepitope construct, followed by structural modeling,

computational validation, and codon optimization for heterologous expression in *Escherichia coli*.

The resulting construct contained six selected epitopes and exhibited favorable antigenicity, structural stability, non-toxic properties, and low similarity to other co-circulating arboviruses. The scientific novelty of this research lies in the proposal of a computationally designed OROV-specific multiepitope protein as a potential antigenic candidate for the future development of differential immunoassays, contributing to improved diagnosis and epidemiological surveillance of this emerging arboviral disease.

KEYWORDS: *OROPOUCHE VIRUS, IMMUNOINFORMATICS, MULTIEPITOPE PROTEIN, DIFFERENTIAL IMMUNODIAGNOSIS, IN SILICO DESIGN.*

INTRODUCCIÓN

El virus Oropouche (OROV) es un arbovirus emergente perteneciente al género *Orthobunyavirus* y a la familia *Peribunyaviridae*, transmitido principalmente por artrópodos hematófagos como *Culicoides paraensis* (1,2). A nivel genómico, este agente se caracteriza por presentar un ARN monocatenario de sentido negativo distribuido en tres segmentos específicos: L, M y S, los cuales codifican proteínas estructurales y no estructurales, cuyo rol resulta esencial para los procesos de replicación, el ensamblaje viral y la mediación del contacto con la célula hospedera (3,4).

La infección por Oropouche generalmente se presenta como un cuadro febril agudo de carácter inespecífico con manifestaciones tales como fiebre, cefalea, mialgias, artralgias y malestar general, lo que obstaculiza su correcta distinción respecto a otras patologías causadas por otros arbovirus cocirculantes como dengue, Zika y Chikungunya (2,5). Además, se han descrito complicaciones neurológicas y posibles afectaciones durante el embarazo, por lo que su identificación oportuna representa una necesidad dentro de la vigilancia clínica y epidemiológica (1,6).

El diagnóstico diferencial del virus Oropouche continúa siendo limitado, especialmente en zonas endémicas donde la sintomatología se superpone con otras arbovirosis y la disponibilidad de pruebas específicas no siempre es accesible (7,8). A esto se suma la posibilidad de reactividad cruzada en ensayos serológicos, situación que puede comprometer la especificidad diagnóstica cuando existen infecciones previas o simultáneas por otros virus transmitidos por vectores (9,10).

En los últimos años, el OROV ha presentado una expansión importante en la Región de las Américas, con incremento de casos, aparición en nuevas áreas geográficas y reportes de desenlaces fatales, lo que ha generado preocupación por su potencial epidémico (11). Los informes emitidos por la OPS a lo largo de 2024 y 2025 documentan un patrón de reemergencia de la enfermedad en Brasil y otros países del continente sudamericano, este escenario es respaldado por la notificación de miles de casos confirmados y subraya la urgencia de optimizar los sistemas de vigilancia diagnóstica (2). En el territorio ecuatoriano no solo se confirmaron infecciones durante 2024, sino que además existen registros de circulación viral correspondientes a

periodos previos, lo que plantea la posibilidad de un subregistro continuo de la patología, principalmente por la estrecha similitud clínica que comparte con otras arbovirosis endémicas y por las restricciones actuales en el acceso a herramientas de diagnóstico diferencial. (12,13).

Ante esta problemática, la inmunoinformática permite seleccionar regiones antigénicas con potencial utilidad diagnóstica mediante herramientas computacionales de predicción, filtrado y validación. En el caso del OROV, el segmento M constituye una región de interés porque codifica las glicoproteínas Gn y Gc, relacionadas con la superficie viral y el reconocimiento inmunológico, las cuales han sido señaladas como blancos antigénicos relevantes en estudios previos (14,15).

Por ello, la presente investigación tuvo como finalidad diseñar y validar *in silico* una proteína multiepitopos específica del virus Oropouche con potencial aplicación en inmunodiagnóstico diferencial en zonas endémicas. Para este propósito se aplicaron herramientas de inmunoinformática, análisis de antigenicidad, alergenidad y toxicidad, evaluación de similitud frente a arbovirus cocirculantes, modelado estructural, validación tridimensional y optimización genética para expresión heteróloga en *Escherichia coli*, con la finalidad de proponer un candidato antigénico computacional que pueda servir como base para futuras etapas de producción recombinante y validación inmunológica.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Virus Oropouche: estructura, genoma y transmisión

El virus Oropouche (OROV) es un arbovirus perteneciente al género *Orthobunyavirus*, familia *Peribunyaviridae* (1). Su transmisión hacia el ser humano ocurre principalmente mediante la picadura de artrópodos hematófagos infectados, siendo el díptero *Culicoides paraensis* el principal vector reconocido en ambientes tropicales; no obstante, también se han descrito otros posibles vectores secundarios que podrían participar en la transmisión del virus bajo determinadas condiciones ecológicas (1,2). Esta característica vectorial contribuye a que el OROV mantenga relevancia epidemiológica en regiones tropicales y subtropicales, donde la presencia de vectores, la movilidad poblacional y las condiciones ambientales favorecen la circulación de arbovirus.

Desde el punto de vista molecular, el genoma de OROV está constituido por ARN monocatenario de sentido negativo, organizado en tres segmentos denominados L, M y S, los cuales codifican proteínas estructurales y no estructurales implicadas en la replicación viral, ensamblaje, interacción con la célula hospedera y modulación de la respuesta inmune (3). El segmento L codifica la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), enzima esencial para la replicación y transcripción del genoma viral. Por su parte, el segmento M codifica la poliproteína precursora de las glicoproteínas de superficie Gn y Gc, además de la proteína no estructural NSm, mientras que el segmento S codifica la proteína de la nucleocápside (N) y la proteína no estructural NSs (4,16).

La organización segmentada del genoma del OROV es relevante para el análisis bioinformático, debido a que cada segmento codifica proteínas con funciones biológicas diferenciadas y con distinto potencial antigénico. En particular, el segmento M resulta de interés para estudios de inmunoinformática, ya que contiene la información necesaria para la síntesis de las glicoproteínas Gn y Gc, proteínas de superficie involucradas en la interacción viral con la célula hospedera y

potencialmente expuestas al reconocimiento inmunológico (4,16). Esta característica convierte al segmento M en una región estratégica para la identificación de epítomos con posible utilidad diagnóstica, especialmente cuando se busca diseñar antígenos recombinantes capaces de ser reconocidos por anticuerpos específicos contra OROV.

1.1.2. Relevancia clínica y complicaciones asociadas a la infección por OROV

Desde el punto de vista clínico, la enfermedad por OROV se manifiesta típicamente como un síndrome febril agudo, caracterizado por síntomas inespecíficos como fiebre, mialgias, artralgias, cefalea y malestar general (5). Esta presentación clínica dificulta su diferenciación frente a otras arbovirosis endémicas, particularmente dengue, Zika y Chikungunya, las cuales pueden presentar cuadros iniciales similares en regiones donde existe cocirculación viral (2,5). En consecuencia, la clasificación clínica basada únicamente en signos y síntomas puede conducir a subregistro, diagnóstico tardío o decisiones clínicas no específicas, lo que resalta la necesidad de métodos diagnósticos diferenciales.

Más allá de sus manifestaciones iniciales, la infección por OROV puede asociarse a complicaciones de mayor gravedad clínica (2). Durante el embarazo, se ha descrito evidencia clínica que sugiere la capacidad del virus para atravesar la barrera placentaria y producir infección congénita, con desenlaces que incluyen muerte fetal, aborto espontáneo microcefalia y anomalías estructurales cerebrales, especialmente cuando la infección ocurre durante el primer trimestre de gestación (1,6). El conjunto de estas observaciones subraya la relevancia del OROV como un patógeno emergente con un potencial impacto materno-fetal, particularmente en aquellas áreas geográficas que continúan enfrentando limitaciones críticas, tanto en sus redes de vigilancia epidemiológica como en el acceso a pruebas diagnósticas específicas.

Además de sus implicaciones durante el periodo de gestación, el virus ha demostrado capacidad para comprometer el sistema nervioso central, en el ámbito neurológico la literatura documenta el desarrollo de complicaciones tales como el síndrome de Guillain-Barré, la meningitis aséptica y la meningoencefalitis, manifestaciones que aunque exhiben una baja incidencia, constituyen variantes severas de la infección, cuyo riesgo de aparición tiende a exacerbarse en la población pediátrica y en individuos con compromiso inmunológico (1,6). Estas complicaciones refuerzan la

necesidad de fortalecer la identificación etiológica del virus, ya que la superposición clínica con otras arbovirosis puede limitar la vigilancia adecuada de los casos y de sus desenlaces.

1.1.3. Epidemiología regional y situación del OROV en Ecuador

En los últimos años, el OROV ha mostrado una expansión geográfica significativa en la Región de las Américas. La Organización Mundial de la Salud reportó en 2024 un aumento sostenido de casos, incluyendo notificación en nuevas áreas geográficas y ocurrencia de desenlaces fatales, lo que generó preocupación sobre su potencial epidémico (11). De manera concordante, la Organización Panamericana de la Salud informó durante 2024 y 2025 actualizaciones epidemiológicas que evidencian la reemergencia del virus en Brasil y otros países sudamericanos, con miles de casos confirmados y necesidad de fortalecer la vigilancia diagnóstica (2).

Estudios epidemiológicos recientes publicados en *The Lancet Infectious Diseases* describen la reemergencia del OROV entre 2023 y 2024 en Brasil como un evento de relevancia regional, destacando su rápida diseminación y la necesidad de fortalecer la vigilancia diagnóstica (17). Este escenario epidemiológico demuestra que el OROV no debe considerarse únicamente un virus limitado a brotes aislados, sino un arbovirus emergente con capacidad de expansión en territorios donde existen condiciones ecológicas, entomológicas y sociales favorables para su circulación.

En el contexto nacional, la OPS reportó que en 2024 se confirmaron tres casos de Oropouche en Ecuador, detectados mediante análisis retrospectivo de muestras negativas a dengue por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), en las provincias de Morona Santiago, Bolívar y Los Ríos, sin que ninguno requiriera hospitalización (12). No obstante, durante 2025 no se han registrado casos confirmados de Oropouche en el país (12). La ausencia de notificaciones recientes no descarta circulación viral subdiagnosticada, especialmente si se considera la superposición clínica con otras arbovirosis y la limitada disponibilidad de métodos diagnósticos diferenciales en algunas zonas.

Asimismo, Wesselmann et al. (2024) evidenciaron la circulación del OROV en Ecuador desde 2016 en la provincia de Esmeraldas, lo que sugiere una expansión geográfica progresiva y poco documentada (13). Posteriormente, Romero-Alvarez et

al. (2025) determinaron que el caso detectado en Bolívar pertenece a un linaje endémico distinto al de la cepa epidémica brasileña, lo que indica una posible circulación independiente del virus en el país (18,19). Además, estos autores señalaron la ausencia del vector principal *Culicoides paraensis* en las provincias afectadas, aspecto que refleja limitaciones en la vigilancia entomológica y plantea la posibilidad de otros vectores involucrados en la transmisión local (18,19).

1.1.4. Diagnóstico del OROV y limitaciones serológicas en zonas endémicas

Ante la situación epidemiológica del OROV, las opciones terapéuticas y preventivas continúan siendo limitadas (20). En la actualidad, el manejo clínico se basa principalmente en tratamiento sintomático, debido a que no existen vacunas ni antivirales específicos aprobados para su uso clínico (20). Files et al. (2022) y Cain y Ly (2024) coinciden en señalar que el OROV representa un patógeno emergente subestimado, con potencial epidémico y con importantes limitaciones en el desarrollo de vacunas, terapias antivirales y métodos diagnósticos accesibles (8,20). Este escenario se ve exacerbado por la carencia de pruebas diagnósticas que cuenten con validación comercial, un factor que obstaculiza significativamente la detección oportuna del patógeno tanto en áreas endémicas como en aquellas con recursos sanitarios restringidos (21).

Frente a esta realidad, las pruebas serológicas se construyen como un recurso indispensable para la vigilancia epidemiológica de las arbovirosis, su utilidad destaca particularmente en situaciones donde no se dispone de metodologías de diagnóstico molecular, o bien cuando la ventana de viremia del paciente ya ha concluido, no obstante la implementación de estos ensayos debe sortear un obstáculo metodológico importante siendo este la reactividad cruzada que ocurre entre distintos virus transmitidos por vectores, un fenómeno derivado de similitudes antigénicas y estructurales presentes en sus proteínas virales. (22). Esta limitación puede comprometer la especificidad diagnóstica, particularmente en áreas donde circulan simultáneamente diferentes arbovirus con manifestaciones clínicas similares.

Revisiones recientes han demostrado que la complejidad creciente de la serología en arbovirus responde, en parte, a similitudes estructurales entre proteínas virales, lo que puede generar anticuerpos con reconocimiento cruzado y afectar la interpretación

diagnóstica de los resultados (10). Asimismo, diversas investigaciones de carácter estructural señalan que el grado de homología antigénica tiene el potencial de comprometer la precisión al interpretar los ensayos inmunológicos, principalmente en zonas endémicas donde existe la circulación simultánea de distintos arbovirus (10). Frente a esta problemática, el desarrollo de antígenos más específicos representa una necesidad metodológica para perfeccionar la capacidad de diagnóstico diferencial del OROV, frente a otros arbovirus como dengue, Zika y Chikungunya.

La escasez de metodologías diagnósticas específicas en escenarios con restricciones de recursos pone de manifiesto la urgencia de diseñar alternativas que destaquen por ser accesibles, reproducibles y que sean adaptables a laboratorios clínicos. En este escenario, el diseño *in silico* de una proteína multiepitópica específica del OROV se plantea como una estrategia de bajo costo para orientar el desarrollo de inmunoensayos diferenciales. Esta aproximación no sustituye la validación experimental, pero permite priorizar candidatos antigénicos antes de su producción recombinante y evaluación inmunológica.

1.1.5. Proteínas Gn, Gc y NSm como blancos antigénicos

El segmento M del OROV codifica proteínas de interés para el diseño de antígenos recombinantes, debido a que produce la poliproteína precursora de las glicoproteínas Gn y Gc, además de la proteína no estructural NSm (4,16). Las glicoproteínas Gn y Gc participan en la interacción del virus con la célula hospedera y se consideran proteínas relevantes para el reconocimiento inmunológico, por su localización y función en la superficie viral (4,16). Esta característica las convierte en blancos de interés para la predicción de epítomos y para el diseño de constructos con potencial aplicación diagnóstica o vacunal.

Thomas (2025) desarrolló una investigación orientada a caracterizar molecularmente las principales proteínas estructurales del virus Oropouche mediante modelado estructural y predicción de epítomos, con fines diagnósticos y vacunales (14). En dicho estudio, las secuencias proteicas del OROV fueron recuperadas de NCBI y analizadas mediante herramientas bioinformáticas para predicción de estructuras tridimensionales y epítomos de células B y T. Los resultados evidenciaron que las glicoproteínas Gn y Gc contienen epítomos B conservados, superficialmente expuestos y con alto potencial

antigénico, lo que permite considerarlas blancos prometedores para el desarrollo vacunal y para aplicaciones diagnósticas con mínima reactividad cruzada (14).

La selección del segmento M como blanco analítico principal se justifica tanto en su relevancia biológica y antigénica, la presencia de epítomos potencialmente conservados y con exposición superficial en glicoproteínas Gn y Gc sienta las bases para la estructuración de una proteína multiepitópica específica, centrada en las regiones que sean capaces de ser reconocidas por anticuerpos. Además, el estudio de la proteína NSm ofrece perspectivas valiosas sobre regiones no estructurales presentes en la poliproteína precursora, aunque la selección final de epítomos debe depender del cumplimiento de criterios computacionales de antigenicidad, alergenicidad, toxicidad y especificidad diagnóstica frente a otros arbovirus.

La evidencia experimental también respalda la utilidad de antígenos recombinantes del OROV. Merchant et al. (2025) realizaron un estudio utilizando antígenos recombinantes correspondientes a la nucleoproteína (N) y a la glicoproteína Gc, evaluados en modelos animales, cultivos celulares y muestras séricas de pacientes con infección aguda confirmada por RT-qPCR (15). Los resultados demostraron que los antígenos recombinantes permitieron detectar anticuerpos específicos mediante ELISA indirecto y que los nanocuerpos desarrollados lograron reconocer antígenos virales en muestras clínicas humanas (15). Además, la proteína Gc indujo una fuerte respuesta neutralizante y mostró potencial como candidato para inmunodiagnóstico y desarrollo vacunal, lo que respalda la importancia de las glicoproteínas del segmento M como blancos antigénicos (15).

1.1.6. Inmunoinformática aplicada al diseño de epítomos

Frente a las limitaciones diagnósticas del OROV, la inmunoinformática ha adquirido relevancia como estrategia para el diseño racional de antígenos y vacunas. Esta disciplina se fundamenta en la utilización de herramientas computacionales orientados a la identificación de epítomos inmunodominantes, lo que permite evaluar detalladamente su capacidad antigénica y jerarquizar los dominios proteicos como paso previo a la validación experimental (23). Esta estrategia cobra particular relevancia en el contexto de los arbovirus emergentes donde suele prevalecer la

escasez tanto de antígenos comerciales como de plataformas diagnósticas especializadas.

Mediante el uso de plataformas inmunoinformáticas es factible escrutar una serie de parámetros críticos inherentes a los epítomos, como antigenicidad, alergenidad y toxicidad, así como su grado de conservación, exposición superficial y estabilidad estructural, estas características son esenciales cuando se busca diseñar un antígeno recombinante destinado a fines diagnósticos, debido a que no basta con seleccionar regiones inmunogénicas, sino también se exige mitigar activamente cualquier probabilidad de reactividad cruzada y descartar aquellas secuencias que arrojen proyecciones desfavorables. En este contexto, la predicción y filtrado de epítomos constituye una fase fundamental para disminuir el número de candidatos y focalizar el modelado hacia los dominios que exhiban el mayor índice de viabilidad inmunológica.

El trabajo de Thomas (2025) es relevante dentro de este enfoque, debido a que combinó modelado estructural y predicción de epítomos para caracterizar proteínas del OROV con fines diagnósticos y vacunales (14). Los hallazgos de dicho estudio evidenciaron la presencia de epítomos B conservados, superficialmente expuestos y con alto potencial antigénico en las glicoproteínas Gn y Gc, lo que respalda la utilidad de estas proteínas como base para el desarrollo de antígenos específicos (14). Esta evidencia fundamenta el uso de herramientas computacionales para seleccionar regiones antigénicas del OROV antes de su validación experimental.

Asimismo, los análisis computacionales recientes han mostrado que la evaluación *in silico* de antigenicidad, alergenidad y estabilidad estructural es fundamental para priorizar candidatos antes de su evaluación en laboratorio (24). Esta aproximación permite disminuir costos, reducir tiempos de análisis y evitar el uso inicial de reactivos o muestras clínicas, sin reemplazar la necesidad de una fase experimental posterior. Por ello, en el presente estudio, la inmunoinformática se plantea como una fase de diseño y priorización de epítomos, cuyos resultados deberán ser confirmados mediante expresión recombinante y ensayos inmunológicos futuros.

1.1.7. Constructos multiepítomos para inmunodiagnóstico

Los constructos multiepítomo consisten en proteínas sintéticas diseñadas mediante el ensamblaje de múltiples regiones antigénicas en una sola secuencia recombinante. Este

tipo de estrategia permite integrar epítomos seleccionados racionalmente, con la finalidad de mejorar la capacidad de reconocimiento inmunológico y optimizar la sensibilidad diagnóstica potencial (25). En comparación con el uso de proteínas completas, los constructos multiepítopo pueden reducir la inclusión de regiones no específicas o conservadas que podrían contribuir a la reactividad cruzada, siempre que la selección de epítomos se realice con criterios de especificidad.

Diversos estudios han demostrado que el diseño de constructos multiepítopo, al integrar múltiples regiones antigénicas en una sola proteína recombinante, puede mejorar la capacidad de reconocimiento inmunológico y optimizar el desempeño de plataformas diagnósticas o vacunales (25). En el caso del OROV, esta estrategia resulta pertinente debido a la necesidad de diferenciarlo de otros arbovirus cocirculantes, cuyas manifestaciones clínicas pueden solaparse y dificultar la identificación etiológica.

Naveed et al. (2026) diseñaron y evaluaron computacionalmente un constructo vacunal multiepítopo dirigido contra la poliproteína de envoltura del virus Oropouche mediante herramientas de inmunoinformática y modelado molecular (26). Bajo un diseño *in silico* descriptivo y predictivo, los autores identificaron y filtraron epítomos T por antigenicidad, alergenidad y toxicidad con VaxiJen, AllerTOP y ToxinPred, respectivamente, además de caracterizar las propiedades fisicoquímicas del constructo resultante mediante ProtParam (26). Los resultados indicaron que el constructo de 241 aminoácidos fue estable, hidrofílico y con amplia cobertura poblacional global, mientras que las simulaciones inmunes predijeron respuestas robustas y duraderas (26).

Aunque el estudio de Naveed et al. (2026) estuvo orientado al desarrollo vacunal, sus hallazgos respaldan el uso de herramientas inmunoinformáticas para el diseño racional de constructos multiepítopo del OROV (26). Este antecedente fundamenta metodológicamente el enfoque adoptado en la presente investigación, ya que el diseño de una proteína multiepitópica con potencial diagnóstico también requiere filtrar epítomos por antigenicidad, alergenidad, toxicidad, estabilidad estructural y especificidad molecular.

Dentro del ámbito del inmunodiagnóstico diferencial, la finalidad primordial de diseñar un constructo multiepítopo no es inducir protección inmunológica, su verdadero propósito radica en actuar como un antígeno recombinante susceptible de ser detectado por los anticuerpos específicos que el hospedero genera durante el curso de la infección. Bajo esta premisa, la selección de epítomos exige priorizar regiones con potencial antigénico y con un mínimo grado de homología respecto a otros arbovirus. En este sentido, el modelo multiepitépico desarrollado a lo largo de esta investigación constituye una propuesta predictiva, cuya viabilidad analítica y clínica quedará sujeta a una rigurosa validación experimental en etapas posteriores.

1.1.8. Modelado estructural y validación computacional

Como parte fundamental del diseño racional de proteínas recombinantes, el modelado tridimensional permite analizar la estabilidad, accesibilidad superficial y organización espacial de los epítomos seleccionados (24). Esta etapa es especialmente importante en constructos multiepítomos, debido a que la secuencia primaria no garantiza que las regiones antigénicas queden expuestas o disponibles para el reconocimiento por anticuerpos. En consecuencia, la predicción estructural resulta un procedimiento crucial para estimar la viabilidad conformacional del constructo, erigiéndose como una evaluación indispensable antes de proceder hacia las fases de síntesis o expresión recombinante.

Un avance determinante en este campo fue la introducción de AlphaFold, sistema fundamentado en inteligencia artificial capaz de predecir estructuras proteicas con un nivel de exactitud que en múltiples escenarios equipara a los métodos empíricos tradicionales (27). Su implementación ha transformado la biología estructural y ha optimizado el análisis preliminar de proteínas diseñadas *in silico*, permitiendo evaluar la conformación general, la topología de los segmentos peptídicos y la plausibilidad estructural antes de la producción experimental (27). En estudios de proteínas artificiales, la predicción estructural opera como un riguroso filtro de control de calidad computacional, aunque sus resultados deben interpretarse estrictamente como evidencia predictiva.

La validación informática del modelo consolida la propuesta tridimensional al someterla a de parámetros de calidad conformacional, herramientas como ERRAT,

Verify3D, PROCHECK y otros módulos de validación estructural es factible analizar la compatibilidad entre la secuencia y el entorno tridimensional predicho, así como detectar eventuales zonas con posible inestabilidad o baja calidad en su estructura. Estos análisis no demuestran funcionalidad diagnóstica, pero aportan criterios objetivos para decidir si un constructo puede continuar hacia fases de optimización génica y evaluación experimental.

En relación con la validación experimental de avances computacionales, Merchant et al. (2025) demostraron que antígenos recombinantes del OROV, particularmente la nucleoproteína N y la glicoproteína Gc, pueden ser utilizados para detectar anticuerpos específicos mediante ELISA indirecto y para reconocer antígenos virales en muestras clínicas humanas mediante nanocuerpos (15). Estos hallazgos muestran que las proteínas diseñadas o seleccionadas computacionalmente deben avanzar hacia fases experimentales que permitan confirmar su utilidad real como herramientas diagnósticas. Por tanto, el modelado estructural y la validación computacional deben entenderse como pasos preliminares dentro de un proceso que culmina en la validación inmunológica.

1.1.9. Optimización génica y expresión heteróloga

El diseño de un constructo multiepitópico con potencial diagnóstico no concluye con la selección de epítomos ni con la predicción estructural. Para proyectar su aplicación experimental, es necesario considerar la posibilidad de expresión heteróloga en un sistema recombinante, especialmente considerando que los antígenos recombinantes han sido propuestos como herramientas útiles para el inmunodiagnóstico del OROV (23). En este sentido, la optimización génica permite adaptar la secuencia codificante del constructo al organismo hospedero, con el propósito de favorecer su expresión proteica y facilitar su posterior purificación y evaluación inmunológica, como parte del tránsito entre el diseño computacional y la validación experimental de candidatos antigénicos (10,23).

La expresión heteróloga en *Escherichia coli* representa una alternativa frecuente para la producción de proteínas recombinantes debido a su bajo costo, facilidad de manejo y disponibilidad en laboratorios de biología molecular. Para ello, la secuencia proteica diseñada debe retrotraducirse y optimizarse de acuerdo con el uso preferencial de

codones del hospedero. Parámetros como el índice de adaptación de codones (CAI), el contenido de guanina-citosina (GC) y la presencia de estructuras secundarias en el ARNm son relevantes para estimar la factibilidad teórica de expresión, criterios que se integran dentro del análisis computacional previo a la validación experimental de constructos multiepitopo (10,14).

En el marco de esta investigación, la optimización génica se relaciona directamente con la posibilidad de trasladar el diseño *in silico* hacia una fase experimental futura. El análisis de codones, la evaluación del ARNm y el diseño plasmídico permiten anticipar posibles dificultades en la expresión recombinante, aunque no garantizan por sí mismos la producción exitosa de la proteína. Por ello, estos análisis deben considerarse como una etapa preparatoria, orientada a generar un candidato compatible con futuras fases de síntesis, clonación, expresión, purificación y validación inmunológica, tal como se ha planteado en estudios que integran diseño computacional, caracterización fisicoquímica y evaluación posterior de antígenos recombinantes (14,23).

La integración de inmunoinformática, modelado estructural y optimización génica permite construir un flujo de trabajo coherente para el diseño racional de proteínas multiepitópicas. En el caso del OROV, este enfoque resulta pertinente debido a la limitada disponibilidad de métodos diagnósticos específicos, la cocirculación con otros arbovirus y la necesidad de herramientas accesibles para la vigilancia epidemiológica en zonas endémicas (12,18,20). No obstante, la utilidad diagnóstica final del constructo dependerá de su validación experimental mediante inmunoensayos y paneles serológicos caracterizados, debido a que las predicciones computacionales permiten priorizar candidatos, pero no sustituyen la comprobación experimental de especificidad y desempeño diagnóstico (10,23).

1.1.10. Pertinencia del diseño *in silico* de una proteína multiepitópica específica de OROV

En conjunto, los antecedentes revisados evidencian la relevancia clínica y epidemiológica del virus Oropouche como un arbovirus emergente con potencial epidémico, cuya expansión regional ha sido reportada en la Región de las Américas y en países sudamericanos durante los últimos años (2,11,17). Su cocirculación con otros

arbovirus en regiones tropicales y subtropicales genera un escenario diagnóstico complejo, donde la diferenciación serológica específica del OROV adquiere especial importancia (2,5,20). La inespecificidad clínica, las limitaciones en la disponibilidad de pruebas diagnósticas validadas y la posibilidad de reactividad cruzada en ensayos serológicos justifican la búsqueda de alternativas diagnósticas más específicas y accesibles (12,18,20).

En este contexto, la limitada disponibilidad de métodos diagnósticos en entornos con recursos restringidos resalta la necesidad de desarrollar alternativas basadas en antígenos recombinantes específicos (18,23). El diseño *in silico* de una proteína multiepitópica específica del OROV se plantea como una estrategia innovadora, reproducible y de bajo costo, que podría fortalecer el diagnóstico diferencial y contribuir a la vigilancia epidemiológica de este arbovirus emergente en zonas endémicas, en concordancia con estudios que han aplicado inmunoinformática, predicción de epítomos y modelado molecular para priorizar candidatos antigénicos del OROV (10,14,21). Esta aproximación permite priorizar epítomos con potencial antigénico, evaluar su especificidad frente a otros arbovirus, analizar la estabilidad estructural del constructo y proyectar su expresión heteróloga, aspectos descritos como relevantes en el diseño computacional de constructos multiepitopo y proteínas recombinantes (14,22,23).

No obstante, los resultados derivados de la inmunoinformática deben interpretarse como predicciones computacionales. El constructo diseñado no puede considerarse una prueba diagnóstica validada hasta que sea producido experimentalmente y evaluado frente a muestras clínicas o paneles serológicos caracterizados, debido a que el desempeño inmunodiagnóstico requiere confirmación mediante ensayos experimentales específicos (10,23). Por tanto, el presente estudio constituye una fase inicial de diseño y validación computacional, orientada a proponer un candidato antigénico que sirva como base para futuros análisis experimentales de expresión recombinante, inmunogenicidad, especificidad y desempeño diagnóstico (14,23).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General:

Diseñar y validar *in silico* una proteína multiepitopos específica del virus Oropouche con potencial aplicación en inmunodiagnóstico diferencial en zonas endémicas, mediante herramientas de inmunoinformática, modelado estructural y optimización genética.

1.2.2. Objetivos específicos

- Identificar y seleccionar regiones antigénicas conservadas del virus Oropouche mediante análisis de secuencias, alineamiento múltiple y predicción de epítomos B, aplicando criterios de antigenicidad, alergenidad y toxicidad.
- Evaluar la especificidad de los epítomos seleccionados mediante análisis comparativo (BLAST) para descartar similitud significativa con otros arbovirus cocirculantes y reducir el riesgo de reactividad cruzada.
- Diseñar y caracterizar un constructo multiepítomos optimizado, incluyendo análisis fisicoquímico, modelado estructural tridimensional y optimización del gen sintético para expresión heteróloga en *Escherichia coli*.

CAPITULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Recursos humanos

El equipo estuvo conformado por la tesista responsable del diseño y ejecución de los análisis bioinformáticos, bajo la supervisión académica del tutor que cuenta con experiencia previa en biología molecular y biotecnología aplicada. El acompañamiento metodológico aseguro la correcta aplicación de herramientas inmunoinformáticas, análisis estructural y optimización genética.

2.1.2. Recursos tecnológicos

Se requirió un equipo de cómputo con procesador de capacidad media o superior, memoria RAM mínima de 8 GB y conexión estable a internet de banda ancha. La investigación utilizó principalmente plataformas web de acceso libre, entre ellas NCBI, ABCPred, VaxiJen, AllerTOP, Allergen FP, AlgPred, ToxinPred, BLASTp, ProtParam, ColabFold, GalaxyRefine, SAVES, JCat, NEBcutter, Benchling y RNAfold. El uso de estas herramientas no implica costos de licencia, ya que la mayoría dispone de versiones académicas gratuitas.

2.1.3. Recursos institucionales

La investigación contó con el respaldo de la Facultad de Ciencias de la Salud y la Carrera de Laboratorio Clínico, incluyendo acceso a biblioteca virtual institucional, bases de datos científicas suscritas y espacios físicos para reuniones académicas.

2.1.4. Recursos económicos

Al tratarse de un estudio computacional, no se requirieron reactivos de laboratorio ni insumos clínicos. Los costos se limitaron a servicios básicos (electricidad, conectividad) y eventual impresión o encuadernación de documentos finales, lo que convirtió a esta investigación en viable y de bajo costo operativo.

2.2. Métodos

2.2.1. Enfoque y tipo de investigación

El presente estudio se desarrolló bajo un enfoque cuantitativo, debido a que emplea herramientas bioinformáticas que permiten la obtención, procesamiento y análisis de datos biológicos de manera objetiva y medible. Asimismo, correspondió a una investigación experimental *in silico*, ya que se basa en la manipulación y evaluación computacional de secuencias y estructuras proteicas mediante diferentes servidores y plataformas de inmunoinformática, sin intervención experimental directa, con el propósito de diseñar y validar una proteína multiepítopo específica para el virus Oropouche con potencial aplicación en el inmunodiagnóstico diferencial.

2.2.2. Aspectos éticos

En el presente proyecto de investigación no se generaron datos de pacientes, ni fue necesario el contacto con participantes humanos o la recolección de muestras biológicas, ya que el estudio se realizó exclusivamente mediante el análisis bioinformático de secuencias obtenidas de bases de datos públicas.

2.2.3. Variables de la investigación

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	TÉCNICA E INSTRUMENTO
VARIABLE DEPENDIENTE					
Potencial de inmunodiagnóstico diferencial de la proteína multiepitópos, evaluado a través de parámetros computacionales de antigenicidad, especificidad, estabilidad estructural y ausencia de reactividad cruzada frente a otros arbovirus cocirculantes.	Capacidad predictiva de una proteína diseñada para ser reconocida como antígeno específico del virus Oropouche y diferenciarse de otros arbovirus que pueden circular en zonas endémicas.	Se evaluó mediante parámetros bioinformáticos obtenidos en servidores especializados, considerando antigenicidad, alergenicidad, toxicidad, calidad estructural, estabilidad fisicoquímica y similitud proteica frente a virus Zika y Chikungunya.	• Antigenicidad predictiva. • Seguridad inmunológica. • Estabilidad estructural. • Especificidad molecular. • Potencial de expresión recombinante.	• Puntuación de antigenicidad en VaxiJen v2.0. • Clasificación de alergenicidad en AllerTOP v2.1. • Resultado de toxicidad en ToxinPred. • Índice de inestabilidad, pI, peso molecular y GRAVY en ProtParam. • Porcentaje de residuos favorecidos en Ramachandran Plot. • Porcentaje de identidad frente a Zika y Chikungunya mediante BLASTp y alineamiento global.	Técnica: análisis bioinformático e inmunoinformático. Instrumento: ficha de registro de resultados obtenidos en VaxiJen v2.0, AllerTOP v2.1, ToxinPred, ProtParam, ColabFold, GalaxyRefine, SAVES, BLASTp y Global Alignment.
VARIABLE INDEPENDIENTE					

Diseño <i>in silico</i> de una proteína multiepítomos específica del virus Oropouche, mediante herramientas de inmunoinformática, modelado estructural y optimización genética.	Proceso computacional mediante el cual se seleccionan, filtran, ensamblan y validan epítomos antigénicos del virus Oropouche para construir una proteína sintética con posible aplicación diagnóstica.	Se operacionalizó mediante la recuperación de la secuencia proteica del segmento M de OROV, predicción de epítomos B lineales, selección de fragmentos antigénicos no alergénicos y no tóxicos, ensamblaje del constructo con enlazadores, modelado tridimensional, validación estructural y optimización génica para expresión en <i>Escherichia coli</i>.	• Recuperación y curaduría de secuencia. • Predicción de epítomos B lineales. • Filtrado de epítomos. • Ensamblaje del constructo. • Modelado y validación estructural. • Optimización genética y diseño plasmídico.	• Código de acceso de la proteína en NCBI. • Número de epítomos predichos por ABCPred. • Número de epítomos seleccionados tras filtrado. • Secuencia final del constructo. • Uso de enlazador GPMPG, metionina inicial y cola 6xHis. • Modelo tridimensional generado y refinado. • Valores de CAI y contenido GC. • Inserción <i>in silico</i> en vector pET28a(+).	Técnica: diseño computacional <i>in silico</i>. Instrumento: ficha de registro metodológico y resultados generados en NCBI Protein, ABCPred, VaxiJen v2.0, AllerTOP v2.1, ToxinPred, ColabFold, GalaxyRefine, SAVES, JCat, NEBcutter y Benchling.
--	---	--	---	---	---

2.2.4. Hipótesis del estudio

Hipótesis alternativa

El diseño *in silico* de la proteína multiepítomos específica del virus Oropouche presenta un adecuado potencial para el inmunodiagnóstico diferencial, mejorando la antigenicidad y la especificidad frente a otros virus cocirculantes.

Hipótesis nula

El diseño *in silico* de la proteína multiepítomos específica del virus Oropouche no presenta un adecuado potencial para el inmunodiagnóstico diferencial, ya que no mejora la antigenicidad ni la especificidad frente a otros virus cocirculantes.

2.2.5. Descripción de los procedimientos

Selección de la proteína de interés

Se seleccionó la secuencia completa del segmento M de OROV, correspondiente a la poliproteína precursora que codifica las glicoproteínas estructurales Gn y Gc, así como la proteína no estructural NSm (4,16). Esta selección se realizó debido a la importancia biológica y antigénica de estas proteínas en el ciclo viral, en la interacción con la célula huésped y en el reconocimiento inmunológico (14). Además, estudios previos han reportado que las glicoproteínas Gn y Gc poseen epítomos de células B y T con potencial inmunogénico, por lo que constituyen blancos relevantes para el diseño de antígenos recombinantes con potencial aplicación diagnóstica. (14,28).

Recuperación y curaduría de secuencias

La secuencia aminoacídica de la poliproteína del segmento M de OROV fue recuperada desde la base de datos pública NCBI Protein (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>), mediante el código de acceso **UYI36405** y descargada en formato FASTA para los análisis posteriores. La fecha de consulta y descarga fue [18/03/2026].

Para garantizar la trazabilidad metodológica del análisis, se registraron el código de acceso, nombre de la proteína, organismo de origen, longitud de la secuencia, base de

datos consultada, fecha de descarga y archivo FASTA utilizado. La secuencia obtenida se sometió a una revisión para confirmar que no presentara caracteres no estándar, espacios intermedios, residuos ambiguos o signos de puntuación que pudieran interferir con los servidores bioinformáticos.

Evaluación de la proteína completa

Previo a la predicción de epítomos, la secuencia completa de la poliproteína fue evaluada mediante servidores bioinformáticos para determinar si cumplía con las características mínimas de antigenicidad y seguridad predictiva.

La antigenicidad se determinó mediante VaxiJen v2.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>), con fecha de consulta y descarga el [18/03/2026], empleando el modelo viral y un umbral de aceptación de 0,5 (29). Se consideró como antígeno probable toda secuencia con valor igual o superior a 0,5, mientras que valores inferiores fueron clasificados como probable no antígeno. La alergenidad de la proteína completa fue evaluada mediante AllerTOP v2.1 (https://www.ddg-pharmfac.net/allertop_test/), AllergenFP v1.1 (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllergenFP>), y AlgPred (<http://crdd.osdd.net/raghava/algpred/>) (30–32). La fecha de consulta y descarga fue el [18/03/2026].

Para esta evaluación inicial, los resultados fueron registrados de forma comparativa, sin excluir la proteína completa del análisis, debido a que el objetivo de esta etapa fue caracterizar el perfil global de la secuencia antes de la selección de epítomos. Los resultados de antigenicidad y alergenidad fueron registrados en una tabla resumen, indicando el servidor utilizado, versión, parámetro aplicado y clasificación obtenida.

La toxicidad fue evaluada mediante ToxinPred; sin embargo, no fue posible analizar la proteína completa debido a su gran tamaño y a las limitaciones del servidor para procesar secuencias largas. Por ello, la secuencia fue dividida en segmentos más cortos con el fin de realizar el análisis correspondiente.

Predicción y selección de epítomos B

La predicción de epítomos B lineales se realizó empleando ABCPred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/abcpred/>), herramienta basada en redes neuronales artificiales (33). Se analizaron epítomos con longitudes de 16 y 12 aminoácidos (aa) y

se seleccionaron las veinte secuencias con mayor puntuación predictiva. La selección inicial se basó en la puntuación generada por el servidor, considerando que valores más altos indican mayor probabilidad de que la región peptídica actúe como epítipo B lineal. La fecha de consulta y descarga fue [20/03/2026].

Como criterio de aceptación para esta primera fase, se conservaron los veinte epítopos de 16 aa con mayor puntuación. Se rechazaron secuencias duplicadas, péptidos con residuos no estándar o secuencias que no pudieran ser trazadas dentro de la proteína original UYI36405. Para cada epítipo se registró la secuencia, posición inicial, longitud, puntuación ABCPred y fragmento de origen dentro de la poliproteína.

Segmentación de epítopos de 16 aa a 12 aa

Cada epítipo inicial de 16 aa fue segmentado en dos fragmentos derivados de 12 aa: un fragmento correspondiente a los 12 residuos iniciales y otro correspondiente a los 12 residuos finales de la secuencia original. Este procedimiento permitió analizar regiones internas más cortas al interior de cada epítipo candidato, con el objetivo de detectar aquellos segmentos con mejor perfil de antigenicidad, menor riesgo alérgico y ausencia de toxicidad.

La segmentación se justificó debido a que los epítopos B lineales pueden estar contenidos dentro de regiones peptídicas cortas y el análisis de fragmentos de 12 aa permite discriminar si la región inicial o final del péptido de 16 aa conserva propiedades predictivas más favorables. A partir de los veinte epítopos iniciales de 16 aa se generaron cuarenta fragmentos de 12 aa, los cuales fueron evaluados individualmente. El procedimiento utilizado para la predicción, evaluación y selección de epítopos B lineales se resumen en la **Figura 1**.

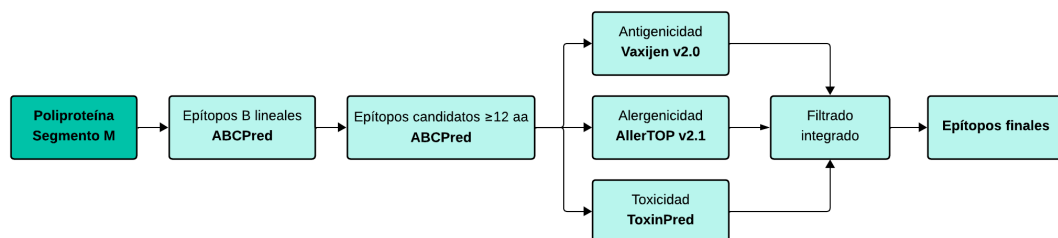


Figura 1. Flujo de trabajo para la predicción, evaluación y selección de epítopos B lineales.

Elaborado por: Pilla Barroso Annette Margarita

Filtrado por antigenicidad

La antigenicidad de los epítomos de 16 aa y de los fragmentos derivados de 12 aa fue evaluada mediante VaxiJen v2.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>), con fecha de consulta y descarga el [20/03/2026], utilizando el modelo viral y un umbral de aceptación de 0,5 (29). Se consideraron aptos aquellos péptidos clasificados como antígeno probable, con puntuación igual o superior a 0,5. Los péptidos con valores inferiores fueron clasificados como probable no antígeno y no fueron considerados para el ensamblaje del constructo final.

Para la trazabilidad del proceso, cada resultado de VaxiJen fue registrado con la secuencia evaluada, longitud del péptido, puntuación obtenida, clasificación generada por el servidor y decisión metodológica: aceptado o rechazado.

Filtrado por alergenidad

La alergenidad se evaluó mediante un criterio jerarquizado de consenso, adaptado a la longitud de los péptidos analizados. Para los epítomos originales de 16 aa, se utilizaron tres herramientas: AllerTOP v2.1 (https://www.ddg-pharmfac.net/allertop_test/), AllergenFP v1.1 (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllergenFP>), y AlgPred (<http://crdd.osdd.net/raghava/algpred/>) (30–32) con fecha de consulta y descarga el [01/04/2026]. En esta fase, un epítopo fue considerado con perfil alergénico aceptable cuando al menos dos de las tres herramientas lo clasificaron como no alergénico o probablemente no alergénico. Si dos o más herramientas clasificaron el péptido como alergénico, este fue considerado no apto como secuencia completa de 16 aa.

Para los fragmentos de 12 aa, el análisis se realizó mediante AllerTOP v2.1 y AlgPred, debido a que AllergenFP v1.1 requiere una longitud mínima de 16 aa y no permite procesar secuencias más cortas, durante esta fase, AllerTOP v2.1 se utilizó como herramienta primaria de decisión, mientras que AlgPred se registró como herramienta complementaria de alerta, la adopción de esta estrategia se fundamentó debido a que AlgPred mostró una propensión a catalogar como alergénicos a la gran mayoría de fragmentos cortos, lo que disminuyó su capacidad discriminativa para la selección

final. Por tanto, se aceptaron para el diseño del constructo solamente los fragmentos de 12 aa clasificados por AllerTOP v2.1 como probablemente no alergénicos, siempre que también cumplieran con un perfil antigénico positivo y la confirmación absoluta de ausencia de toxicidad.

Los resultados de AlgPred en fragmentos de 12 aa fueron conservados como información complementaria para la discusión de limitaciones y para orientar la validación experimental futura, pero no se utilizaron como criterio excluyente en esta etapa.

Filtrado por toxicidad

La toxicidad se evaluó mediante ToxinPred (https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/prot_test.php) (34), con fecha de consulta y descarga el [02/04/2026], empleando un umbral de 0,4. Debido a que el servidor permite procesar secuencias de longitud limitada, la poliproteína completa fue dividida en fragmentos compatibles con el tamaño aceptado por la plataforma. De acuerdo con el manuscrito original, la secuencia completa se fragmentó en dos segmentos de 500 aa y un fragmento final de 419 aa, registrándose las regiones tóxicas identificadas por el servidor.

Para los epítomos candidatos, se aceptaron únicamente aquellos clasificados como no tóxicos. Los péptidos con predicción de toxicidad positiva fueron excluidos del constructo, independientemente de su puntuación de antigenicidad o clasificación alérgica. Para cada péptido se registró la secuencia, resultado de ToxinPred, clasificación final y decisión metodológica.

Criterio final de selección de epítomos

El criterio final para incorporar epítomos al constructo multiepitópico fue el cumplimiento simultáneo de tres condiciones: puntuación de antigenicidad igual o superior a 0,5 en VaxiJen v2.0, clasificación de probablemente no alergénico en AllerTOP v2.1 y clasificación de no tóxico en ToxinPred.

Los epítomos que no cumplieron al menos uno de estos criterios, fueron descartados del constructo final, aunque sus resultados se conservaron en las tablas de análisis para garantizar transparencia metodológica.

Diseño del constructo multiepitopos

El constructo multiepitópico fue ensamblado a partir de los epítomos de 12 aa que cumplieron los criterios de selección definidos. Las secuencias peptídicas seleccionadas fueron unidas mediante el enlazador flexible GPGPG, utilizado para separar las regiones antigénicas y favorecer su independencia estructural dentro de la proteína sintética.

La disposición de los epítomos al interior del constructo se determinó tomando como criterio principal la puntuación de antigenicidad obtenida en VaxiJen v2.0, los epítomos que obtuvieron las valoraciones más altas fueron posicionados en la región central del constructo, mientras que aquellos con menor valoración se colocaron hacia los extremos, al inicio de la secuencia se incorporó una metionina (M) como aminoácido inicial y al extremo carboxilo se añadió una cola de seis histidinas (HHHHHH) como etiqueta de purificación.

Una vez ensamblado el constructo, se reevaluó mediante VaxiJen v2.0, AllerTOP v2.1 y ToxinPred, con el fin de confirmar que la proteína diseñada mantuviera antigenicidad predictiva, clasificación probablemente no alergénica y ausencia de toxicidad. Se registró la secuencia completa del constructo, número total de aminoácidos, número de epítomos incluidos, número de enlazadores, presencia de metionina inicial, presencia de etiqueta 6xHis y resultados de validación del constructo completo.

Análisis fisicoquímico

Las propiedades fisicoquímicas del constructo validado fueron evaluadas mediante ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>), disponible en el servidor ExPASy (Expert Protein Analysis System) (35). Se registraron los siguientes parámetros: número de aminoácidos, peso molecular, punto isoelectrico teórico, fórmula molecular, vida media estimada en reticulocitos de mamíferos *in vitro*, levadura *in vivo* y *Escherichia coli in vivo*, e índice de inestabilidad. La fecha de consulta y descarga fue el [24/04/2026].

Como criterio de interpretación preliminar, un índice de inestabilidad inferior a 40 fue considerado compatible con estabilidad teórica. Estos resultados fueron utilizados

únicamente como predicciones computacionales y no como evidencia experimental de estabilidad o solubilidad.

Modelado y refinamiento estructural de la proteína diseñada

El modelo tridimensional del constructo fue predicho mediante ColabFold v1.6.1: AlphaFold2 using MMseqs2, disponible en entorno Google Colab (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb#scrollTo=kOblAo-xetgx>) (36), con fecha de consulta y descarga el [29/04/2026]. Se utilizó como entrada la secuencia aminoacídica completa del constructo en formato FASTA. Se generaron los modelos tridimensionales disponibles en la plataforma y se registraron los archivos de salida, incluyendo los modelos en formato PDB, los valores de confianza estructural por posición y las gráficas de cobertura de secuencia.

El modelo tridimensional seleccionado fue refinado mediante GalaxyRefine (<https://galaxy.seoklab.org/>) (37), con fecha de consulta y descarga el [21/05/2026]. Entre los modelos refinados generados por el servidor, se seleccionó el modelo con mejores parámetros globales de calidad estructural, de acuerdo con las puntuaciones proporcionadas por la plataforma. El archivo refinado fue conservado como modelo estructural final para validación posterior.

Validación estructural de la proteína diseñada

La calidad del modelo refinado fue evaluada mediante el servidor SAVES (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) con fecha de consulta y descarga el [21/05/2026]. Se usaron las herramientas ERRAT, Verify3D y Ramachandran Plot, según disponibilidad de la plataforma. ERRAT se usó para analizar la calidad de interacciones no enlazantes del modelo, Verify3D facilitó estimar la compatibilidad entre la secuencia aminoacídica y el entorno tridimensional proyectado, Ramachandran Plot, generado mediante PROCHECK fue usado para analizar la calidad estereoquímica de la estructura.

Optimización génica y diseño plasmídico

La secuencia proteica del constructo final fue retrotraducida y optimizada para expresión heteróloga en *Escherichia coli* cepa K12 mediante JCat (<https://www.jcat.de/>) (38), con fecha de consulta y descarga el [22/05/2026]. Se registraron como parámetros principales el índice de adaptación de codones (CAI) y el contenido de guanina-citosina (GC), con la finalidad de obtener una secuencia codificante compatible con el sistema de expresión bacteriano.

Posterior a esto, se analizaron sitios de restricción en NEBcutter (<https://nc3.neb.com/NEBcutter/>). El gen optimizado se insertó *in silico* en un vector de expresión utilizando Benchling (<https://www.benchling.com/>), generando el mapa plasmídico final. Este procedimiento permitió obtener un candidato antigénico validado computacionalmente, listo para futuras fases experimentales. Estos servidores fueron utilizados con fecha de consulta y descarga el [28/05/2026]

Evaluación de estructura secundaria del ARNm

La secuencia nucleotídica optimizada fue analizada mediante RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) (39), con fecha de consulta y descarga el [28/05/2026], con el propósito de estimar el plegamiento secundario teórico del ARNm y la energía libre mínima. Se registraron la estructura secundaria predicha, el valor de energía libre mínima en kcal/mol, la estructura centroide, la diversidad del conjunto si estuvo disponible, y la representación gráfica generada por el servidor.

Análisis de similitud proteica mediante BLASTp y BLAST Global Alingment

La secuencia proteica del constructo multiepitópico fue evaluada mediante análisis comparativo frente a proteínas de otros arbovirus cocirculantes, particularmente virus Zika (ALL27019) y virus Chikungunya, E1 (NP_690589.2) y E2 (AHK22766.1), con el propósito de estimar la similitud de secuencia y reducir el riesgo de reactividad cruzada en futuros inmunoensayos.

Para esta fase se utilizó BLASTp cuando la comparación se realizó entre secuencias aminoacídicas. Cuando se comparó el constructo frente a secuencias específicas de referencia, se empleó Global Alignment como comparación pareada.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis De Resultados

3.1.1. Recuperación de la proteína de interés

La secuencia proteica de interés fue recuperada desde la base de datos pública NCBI Protein, utilizando el código de acceso **UYI36405**, correspondiente a la poliproteína del segmento M del virus Oropouche. La secuencia con una longitud de 1419 aminoácidos (aa), fue descargada en formato FASTA y empleada como entrada para los análisis bioinformáticos posteriores. La recuperación de la secuencia se muestra en la **Figura 2**.

The screenshot displays the NCBI Protein database entry for the protein UYI36405. The header identifies it as a glycoprotein from Orthobunyavirus oropoucheense. The FASTA sequence is shown in a monospaced font. On the right side, there are several interactive links and tools available for the user, such as 'Run BLAST', 'Identificar dominios conservados', and 'Información relacionada'. The bottom right corner shows a list of recent activities related to the protein.

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Proteína:

FASTA

glicoproteína [Orthobunyavirus oropoucheense]
GenBank: UYI36405.1
[Gráficos](#) [de proteínas idénticas](#) [de GenPept](#)

>glicoproteína UYI36405.1 [Orthobunyavirus oropoucheense]
MANLIIISNHLGIAYGHLSTSQLGDRCFAGGSLFKEHMLSVGLGEICKDOIISIVKSTAFSKNALALE
ATTKPYRSFIVKDWSECHNPVLDKFGNPNVLNVDQNGHLPKMYTCRAACDRLNKNDAEITLSTKLHMF
EIVGTSTSGHFNKNTIINLHETCEHVTNICKQSKVFKHACFRHSCIRFFKGTYPYSPYIEAKCVNIE
LIILTYIFAATIFALITKSYIAYLLPLFYPVTNLVGYKYKRINCPNCLLASHPFTSCPKICICGSR
FSCTEALKVHRMGKDLGYKSLSKARQCKSKSFTAAIITGLIHEFVSPTAGERVNYKEELADYIE
LAEQWILGKEKILKQSIIVMLAAILILLSENIIFNLYNTLYRSCMGLTHYRGLKVDLTNTKNC
GSCICGFDEQSSGFYEVFLDMHMQRESCKFPRVNHFRNTKILLFTAIACASFYTVYADECLSKNI
RITYQELHSCGPHIGDTCMSKSELYSDLLSKNLIETVKKYFEPDTVNDQFNKIEFAQDAHRMILLER
ILYKTECEMLSLKNSGPNVNAVRTYLNHNIIDLCRHNMYKICQCINTSHMCKNTIDFNKEIETYYKA
NAAAYRSDFNITIDLTAFRGLTKVLIENYIEKDDOALKALFSNISDSQNNYQWGVKLFASKLNT
SLGRTTRSAQHSIMTNEIPKSNPFTDYSVSVNIKECHSPESLFCFKKRDSPAPHTNHLCKIDNKYKAFD
WPEIETVQGGKQLCLGDHCHNLEFATAIDKINSITNCKESFTAQPADMQTGKCKSADEIGECMTLED
KSNPITVFCGDKYVYSEGEHAKDGSINNYCLANKSEQRFPKHMFKCKNMDKTHKEFTTMRQNYNDI
TSYKAEISEIGDLMTHHYKPTKNLPHVPRYHSIDVQGETESTEGINGFQNTIPASGLGVGYHLGF
KGNQLFDIVFVKKAVYKQYQVYTTGPSISINIEHNEKCTGHCEKIPAKEGMLTFSEKHTSSWGCEE
YGLAIDTGLYVSCQVIRPELDIYKIGSEASLIEICITLPHETVCNDMDLEPIIGDKLSASFQNTQ
TNQLPHLMAYKKGKVTYGTQINDGNITLQCGSIQVWNGSTIGSGNPKFDYICHAMRRKDVIRKCFNDNY
QSCRLNPRNDLIPYKGDIEISKTGSMGQNTFKIELGDINIKFTKSVDLQMSGVCAEGICAEIGIS
CSINADVSATVCHCKTNCEDFSNIVISPOIKTYNIKVKCKSKEKITANICGRNIDQLTVKPYNQKI
DLSQLEDSENYKEEDLQCGTWLCKVQKQEGIDIVFKGLFSGLGKYNAILIYSIIGVIVILLIYVLPJGR
LLKAFLLKNEIETMEQKIK

Analiza esta secuencia

Información relacionada

Actividad reciente

glicoproteína [Orthobunyavirus oropoucheense] Proteína
Prueba de tolerancia a la glucosa - StatPearls

Figura 2. Secuencia proteica del segmento M de OROV recuperada desde NCBI Protein mediante el código de acceso UYI36405

3.1.2. Evaluación de la proteína completa

Antes de iniciar la predicción de epítomos B lineales, la secuencia completa de la poliproteína fue evaluada mediante herramientas bioinformáticas para determinar su antigenicidad y alergenicidad predictiva. La antigenicidad se evaluó mediante VaxiJen v2.0, utilizando un umbral de 0,5. La alergenicidad se analizó mediante AllerTOP v2.1, AllergenFP v1.1 y AlgPred. La toxicidad se evaluó mediante ToxinPred; sin embargo,

no fue posible analizar la proteína completa debido a las limitaciones del servidor para procesar secuencias largas. Por ello, la secuencia fue dividida en segmentos más cortos con el fin de realizar el análisis correspondiente.

La proteína completa obtuvo una valoración de antigenicidad de 0,5041 en VaxiJen v2.0, valor que permitió catalogarla como antígeno probable, en la evaluación de alergenicidad, AllerTOP v2.1 y AllergenFP v1.1 proyectaron la secuencia como probablemente no alergénica, mientras que AlgPred la clasificó como alérgeno. Los resultados se presentan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Resultados del análisis antigénico y alergénico de la poliproteína del segmento M de OROV

Parámetro	Herramienta	Resultado
Antigenicidad	VaxiJen v2.0	0,5041; antígeno probable
Alergenicidad	AllerTOP v2.1	Probablemente no alergénico
Alergenicidad	AllergenFP v1.1	Probablemente no alergénico
Alergenicidad	AlgPred	Alérgeno

Elaborado por: Pilla Barroso Annette Margarita

3.1.3. Predicción y selección de epítomos B

La predicción de epítomos B lineales se realizó mediante ABCPred, utilizando secuencias peptídicas de 16 aminoácidos (aa). Se seleccionaron las veinte secuencias con mayor puntuación predictiva, considerando que valores más altos indican mayor probabilidad de comportamiento como epítomo B lineal.

Las secuencias con mayor puntuación fueron GHLVPKMYTCRAACDI y CLAIDTGCLYGSCQDV, ambas con un puntaje de 0,94. También se identificaron epítomos con puntuaciones de 0,92, 0,91, 0,90, 0,89, 0,88, 0,87 y 0,86, conforme se detalla en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Epítomos B lineales de 16 aa con mayor puntuación predichos mediante ABCPred

Rango	Secuencia	Posición inicial	Puntaje
1	GHLVPKMYTCRAACDI	106	0,94

1	CLAIDTGCLYGSCQDV	1052	0,94
2	CGDKYYYSEGKEHAKD	847	0,92
2	LIEICITLPHETYCND	1084	0,92
3	HSCIGPHIMGDTCMSK	497	0,91
3	RESCKFGPRVNHFRNT	447	0,91
3	GPSISINIEHNEKCTG	1007	0,91
4	NKEIETYYKANAAAYR	620	0,90
5	SFIVKDWSECNPVLDK	78	0,89
5	FEIVGTTSTSGWFKNT	140	0,89
5	LEPIIGDKLSASFQNT	1103	0,89
5	LPHETYCNDMDILEPI	1091	0,89
6	CGLIHYRPGLKVDLTK	400	0,88
6	AGERMYKLEELADDYI	334	0,88
6	TVCHCKTNCEDFISNI	1270	0,88
6	RKCFNDNYQSCTRLNP	1182	0,88
7	QRFPIHKNWFKKCNWD	877	0,87
7	CNLEFTAITADKIMSL	789	0,87
8	IESEIGTDLMTHHYKP	916	0,86
8	EGKEHAKDGSINNYCL	855	0,86

Elaborado por: Pilla Barroso Annette Margarita

3.1.4. Evaluación de antigenicidad de epítomos de 16 aa y fragmentos de 12 aa

Los veinte epítomos de 16 aa fueron evaluados mediante VaxiJen v2.0, utilizando un umbral de aceptación de 0,5. De las veinte secuencias analizadas, ocho fueron clasificadas como antígeno probable: RESCKFGPRVNHFRNT con 1,1355; GPSISINIEHNEKCTG con 0,9703; FEIVGTTSTSGWFKNT con 0,6525; LEPIIGDKLSASFQNT con 0,7363; CGLIHYRPGLKVDLTK con 0,7908; RKCFNDNYQSCTRLNP con 0,5400; CNLEFTAITADKIMSL con 1,0627; y EGKEHAKDGSINNYCL con 1,0675. Las demás secuencias presentaron valores inferiores a 0,5 y fueron clasificadas como probables no antígenos. Los resultados se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Análisis de antigenicidad de epítomos B lineales de 16 aa

Secuencia	Predicción general para el antígeno
GHLVPKMYTCRAACDI	0,1722 (probable NO ANTÍGENO)
CLAIDTGCLYGSCQDV	0,4744 (probable NO ANTÍGENO)
CGDKYYYSEGKEHAKD	-0,0057 (probable NO ANTÍGENO)
LIEICITLPHETYCND	0,3338 (probable NO ANTÍGENO)
HSCIGPHIMGDTCMSK	0,1658 (probable NO ANTÍGENO)
RESCKFGPRVNHFRNT	1,1355 (ANTÍGENO PROBABLE)
GPSISINIEHNEKCTG	0,9703 (ANTÍGENO PROBABLE)
NKEIETYYKANAAAYR	0,2135 (probable NO ANTÍGENO)
SFIVKDWSECNPVLDK	0,0648 (probable NO ANTÍGENO)
FEIVGTTSTSGWFKNT	0,6525 (ANTÍGENO PROBABLE)
LEPIIGDKLSASFQNT	0,7363 (ANTÍGENO PROBABLE)
LPHETYCNDMDILEPI	0,2441 (probable NO ANTÍGENO)
CGLIHYRPGLKVDLTK	0,7908 (ANTÍGENO PROBABLE)
AGERMYKLEELADDYI	0,2585 (probable NO ANTÍGENO)
TVCHCKTNCEDFISNI	0,1840 (probable NO ANTÍGENO)
RKCFNDNYQSCTRLNP	0,5400 (ANTÍGENO PROBABLE)
QRFPIHKNWFKKCNWD	-0,4298 (probable NO ANTÍGENO)
CNLEFTAITADKIMSL	1,0627 (ANTÍGENO PROBABLE)
IESEIGTDLMTTHYKP	0,1630 (probable NO ANTÍGENO)
EGKEHAKDGSINNYCL	1,0675 (ANTÍGENO PROBABLE)

Elaborado por: Pilla Barroso Annette Margarita

Posteriormente, cada epítopo de 16 aa fue segmentado en dos fragmentos de 12 aa: un fragmento correspondiente a los residuos iniciales y otro a los residuos finales. En los fragmentos iniciales, las secuencias con antigenicidad positiva fueron CLAIDTGCLYGS, RESCKFGPRVNH, GPSISINIEHNE, FEIVGTTSTSGW, LPHETYCNDMDI, CGLIHYRPGLKV, AGERMYKLEELA, TVCHCKTNCEDF, CNLEFTAITADK y EGKEHAKDGSIN. Los resultados se presentan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Análisis de antigenicidad de fragmentos iniciales de 12 aa

Secuencia	Predicción general para el antígeno
-----------	-------------------------------------

GHLVPMYTCRA	-0,1398 (probable NO ANTÍGENO)
CLAIDTGCLYGS	0,8797 (ANTÍGENO PROBABLE)
CGDKYYYSEGKE	-0,4524 (probable NO ANTÍGENO)
LIEICITLPKET	0,4701 (probable NO ANTÍGENO)
HSCIGPHIMGDT	0,1476 (probable NO ANTÍGENO)
RESCKFGPRVNH	1,7180 (ANTÍGENO PROBABLE)
GPSISINIEHNE	0,8568 (ANTÍGENO PROBABLE)
NKEIETYYKANA	0,2296 (probable NO ANTÍGENO)
SFIVKDWSECNP	0,3951 (probable NO ANTÍGENO)
FEIVGTTSTSGW	0,8857 (ANTÍGENO PROBABLE)
LEPIIGDKLSAS	0,4629 (probable NO ANTÍGENO)
LPHETYCNDMDI	0,5365 (ANTÍGENO PROBABLE)
CGLIHYRPGKLV	1,4698 (ANTÍGENO PROBABLE)
AGERMYKLEELA	0,5950 (ANTÍGENO PROBABLE)
TVCHCKTNCEDF	0,6897 (ANTÍGENO PROBABLE)
RKCFNDNYQSCT	0,1534 (probable NO ANTÍGENO)
QRFPIHKNWFKK	-1,3489 (probable NO ANTÍGENO)
CNLEFTAITADK	1,2633 (ANTÍGENO PROBABLE)
IESEIGTDLMTH	-0,2690 (probable NO ANTÍGENO)
EGKEHAKDGSIN	1,1606 (ANTÍGENO PROBABLE)

Elaborado por: Pilla Barroso Annette Margarita

En los fragmentos finales, las secuencias con antigenicidad positiva fueron YYYSEGKEHAKD, KFGPRVNHFRNT, SINIEHNEKCTG, IGDKLSASFQNT, NDNYQSCTRLNP, FTAITADKIMSL y HAKDGSINNYCL. Los resultados se presentan en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Análisis de antigenicidad de fragmentos finales de 12 aa

Secuencia	Predicción general para el antígeno
PKMYTCRAACDI	-0,4117 (probable NO ANTÍGENO)
DTGCLYGSCQDV	0,1031 (probable NO ANTÍGENO)
YYYSEGKEHAKD	0,5881 (ANTÍGENO PROBABLE)

CITLPHETYCND	0,3944 (probable NO ANTÍGENO)
GPHIMGDTCMSK	-0,2123 (probable NO ANTÍGENO)
KFGPRVNHFRNT	0,9979 (ANTÍGENO PROBABLE)
SINIEHNEKCTG	1,3770 (ANTÍGENO PROBABLE)
ETYYKANAAAYR	0,1963 (probable NO ANTÍGENO)
KDWSECNPVLDK	0,0779 (probable NO ANTÍGENO)
GTTSTSGWFKNT	0,2473 (probable NO ANTÍGENO)
IGDKLSASFQNT	0,8341 (ANTÍGENO PROBABLE)
TYCNDMDILEPI	0,2893 (probable NO ANTÍGENO)
HYRPGLKVDLTK	0,4322 (probable NO ANTÍGENO)
MYKLEELADDYI	0,1908 (probable NO ANTÍGENO)
CKTNCEDFISNI	0,2465 (probable NO ANTÍGENO)
NDNYQSCTRLNP	0,6347 (ANTÍGENO PROBABLE)
IHKNWFKKCNWD	-0,1464 (probable NO ANTÍGENO)
FTAITADKIMSL	0,6226 (ANTÍGENO PROBABLE)
IGTDLMTHHYKP	0,1809 (probable NO ANTÍGENO)
HAKDGSINNYCL	1.1800 (ANTÍGENO PROBABLE)

Elaborado por: Pilla Barroso Annette Margarita

3.1.5. Evaluación de alergenidad de epítomos candidatos

La alergenidad de los epítomos de 16 aa fue evaluada mediante AllerTOP v2.1, AllergenFP v1.1 y AlgPred. Los resultados mostraron discrepancias entre herramientas, por lo que se aplicó el criterio metodológico definido para el estudio: en epítomos de 16 aa se consideró aceptable una clasificación no alérgica o probablemente no alérgica en al menos dos de las tres herramientas.

Para los fragmentos de 12 aa se emplearon AllerTOP v2.1 y AlgPred, debido a que AllergenFP v1.1 requiere una longitud mínima de 16 aa. En esta fase, AllerTOP v2.1 fue utilizada como herramienta principal de decisión para la selección final, mientras que AlgPred fue conservada como herramienta complementaria de alerta. Los resultados de los epítomos de 16 aa se presentan en la **Tabla 6**, mientras que los resultados de los fragmentos iniciales y finales de 12 aa se presentan en las **Tablas 7 y 8**, respectivamente.

Tabla 6. Análisis de alergenidad de epítomos B lineales de 16 aa

Secuencia	AllerTOP v2.1	AllergenFP v1.1	AlgPred
GHLVPKMYTCRAACDI	Probablemente NO ALÉRGENO	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
CLAIDTGCLYGSCQDV	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
CGDKYYYSEGKEHAKD	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
LIEICITLPHETYCND	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
HSCIGPHIMGDTCMSK	ALÉRGENO probable	Probablemente NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
RESCKFGPRVNHFRNT	Probablemente NO ALÉRGENO	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
GPSISINIEHNEKCTG	ALÉRGENO probable	Probablemente NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
NKEIETYYKANAAAYR	Probablemente NO ALÉRGENO	Probablemente NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
SFIVKDWSECNPVLDK	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
FEIVGTTSTSGWFKNT	Probablemente NO ALÉRGENO	Probablemente NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
LEPIIGDKLSASFQNT	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
LPHETYCNDMDILEPI	Probablemente NO ALÉRGENO	Probablemente NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
CGLIHYRPGLKVDLTK	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
AGERMYKLEELADDYI	ALÉRGENO probable	Probablemente NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
TVCHCKTNCEDFISNI	Probablemente NO ALÉRGENO	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO

RKCFNDNYQSCTRLNP	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
QRFPIHKNWFKKCNWD	ALÉRGENO probable	Probablemente NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
CNLEFTAITADKIMSL	Probablemente NO ALÉRGENO	Probablemente NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
IESEIGTDLMTTHHYKP	ALÉRGENO probable	Probablemente NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
EGKEHAKDGSINNYCL	Probablemente NO ALÉRGENO	Probablemente NO ALÉRGENO	ALÉRGENO

Elaborado por: Pilla Barroso Annette Margarita

Tabla 7. Análisis de alergenidad de fragmentos iniciales de 12 aa

Secuencia	AllerTOP v2.1	AlgPred
GHLVPKMYTCRA	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
CLAIDTGCLYGS	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
CGDKYYYSEGKE	Probablemente NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
LIEICITLPHET	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
HSCIGPHIMGDT	Probablemente NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
RESCKFGPRVNH	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
GPSISINIEHNE	Probablemente NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
NKEIETYYKANA	Probablemente NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
SFIVKDWSECNP	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO

FEIVGTTSTSGW	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
LEPIIGDKLSAS	Probablemente NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
LPHETYCNDMDI	Probablemente NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
CGLIHYRPGLKV	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
AGERMYKLEELA	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
TVCHCKTNCEDF	Probablemente NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
RKCFNDNYQSCT	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
QRFPIHKNWFKK	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
CNLEFTAITADK	Probablemente NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
IESEIGTDLMTH	Probablemente NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
EGKEHAKDGSIN	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO

Elaborado por: Pilla Barroso Annette Margarita

Tabla 8. Análisis de alergenidad de fragmentos finales de 12 aa

Secuencia	AllerTOP v2.1	AlgPred
PKMYTCRAACDI	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
DTGCLYGSCQDV	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
YYYSEGKEHAKD	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO

CITLPHETYCND	Probablement NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
GPHIMGDTCMSK	Probablement NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
KFGPRVNHFRNT	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
SINIEHNEKCTG	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
ETYYKANAAAYR	Probablement NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
KDWSECNPVLDK	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
GTTSTSGWFKNT	Probablement NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
IGDKLSASFQNT	Probablement NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
TYCNDMDILEPI	Probablement NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
HYRPGLKVDLTK	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
MYKLEELADDYI	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
CKTNCEDFISNI	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
NDNYQSCTRLNP	Probablement NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
IHKNWFKKCNWD	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
FTAITADKIMSL	Probablement NO ALÉRGENO	ALÉRGENO
IGTDLMTHHYKP	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO

HAKDGSINNYCL	ALÉRGENO probable	ALÉRGENO
--------------	----------------------	----------

Elaborado por: Pilla Barroso Annette Margarita

3.1.6. Evaluación de toxicidad

La toxicidad fue evaluada mediante ToxinPred, utilizando un umbral de 0,4. Debido a las restricciones de longitud del servidor, la secuencia completa de la poliproteína fue dividida en tres fragmentos: dos fragmentos de 500 aa y un tercer fragmento de 419 aa.

El primer fragmento de 500 aa no presentó regiones tóxicas. En el segundo fragmento de 500 aa se identificó una región tóxica correspondiente a la secuencia NNYCLANKCS. En el tercer fragmento de 419 aa se identificó una región tóxica correspondiente a la secuencia VCHCKTNDEC. Los resultados se presentan en la **Tabla 9**.

***Tabla 9.** Análisis de toxicidad de fragmentos derivados de la poliproteína del segmento M de OROV mediante ToxinPred*

Fragmentos de secuencia	Regiones tóxicas identificadas
1er fragmento (500 aa)	Ninguna
2do fragmento (500 aa)	1 región toxica NNYCLANKCS
3er fragmento (419 aa)	1 región toxica VCHCKTNDEC

Elaborado por: Pilla Barroso Annette Margarita

3.1.7. Filtrado final de fragmentos de 12 aa

Los fragmentos de 12 aa fueron integrados en un proceso de filtrado basado en tres criterios: antigenicidad probable en VaxiJen v2.0, clasificación probablemente no alergénica en AllerTOP v2.1 y ausencia de toxicidad en ToxinPred. Las **Tablas 10 y 11** presentan el resumen de los fragmentos iniciales y finales de 12 aa validados tras el proceso de filtrado, resaltados de verde. Para la selección final del constructo se consideraron únicamente aquellos péptidos que cumplieron simultáneamente con antigenicidad probable en VaxiJen v2.0, clasificación de probablemente no alergénico

en AllerTOP v2.1 y ausencia de toxicidad en ToxinPred. Los resultados de AlgPred fueron conservados como información complementaria de alerta, pero no se emplearon como criterio excluyente para los fragmentos de 12 aa debido a la tendencia observada de clasificar como alergénicos a la mayoría de secuencias cortas.

Tabla 10. Epítopos iniciales de 12 aa seleccionados tras el proceso de validación

Epítopos	Antigenicidad (Vaxigen v2.0)	Alergenicidad (AllerTOP v2.1)	Toxicidad (ToxinPred)
GHLVPKMYTCRA	-0,1398 (probable NO ANTÍGENO)	ALÉRGENO probable	No Tóxico
CLAIDTGCLYGS	0,8797 (ANTÍGENO PROBABLE)	ALÉRGENO probable	Tóxico
CGDKYYYSEGKE	-0,4524 (probable NO ANTÍGENO)	Probablemente NO ALÉRGENO	No Tóxico
LIEICITLPHET	0,4701 (probable NO ANTÍGENO)	Probablemente NO ALÉRGENO	No Tóxico
HSCIGPHIMGDT	0,1476 (probable NO ANTÍGENO)	Probablemente NO ALÉRGENO	No Tóxico
RESCKFGPRVNH	1,7180 (ANTÍGENO PROBABLE)	ALÉRGENO probable	No Tóxico
GPSISINIEHNE	0,8568 (ANTÍGENO PROBABLE)	Probablemente NO ALÉRGENO	No Tóxico
NKEIETYYKANA	0,2296 (probable NO ANTÍGENO)	Probablemente NO ALÉRGENO	No Tóxico
SFIVKDWSECNP	0,3951 (probable NO ANTÍGENO)	ALÉRGENO probable	No Tóxico
FEIVGTTSTSGW	0,8857 (ANTÍGENO PROBABLE)	ALÉRGENO probable	No Tóxico
LEPIIGDKLSAS	0,4629 (probable NO ANTÍGENO)	Probablemente NO ALÉRGENO	No Tóxico
LPHETYCNDMDI	0,5365 (ANTÍGENO PROBABLE)	Probablemente NO ALÉRGENO	No Tóxico

CGLIHYRPGLKV	1,4698 (ANTÍGENO PROBABLE)	ALÉRGENO probable	No Tóxico
AGERMYKLEELA	0,5950 (ANTÍGENO PROBABLE)	ALÉRGENO probable	No Tóxico
TVCHCKTNCEDF	0,6897 (ANTÍGENO PROBABLE)	Probablemente NO ALÉRGENO	Tóxico
RKCFNDNYQSCT	0,1534 (probable NO ANTÍGENO)	ALÉRGENO probable	No Tóxico
QRFPIHKNWFKK	-1,3489 (probable NO ANTÍGENO)	ALÉRGENO probable	No Tóxico
CNLEFTAITADK	1,2633 (ANTÍGENO PROBABLE)	Probablemente NO ALÉRGENO	No Tóxico
IESEIGTDLMTH	-0,2690 (probable NO ANTÍGENO)	Probablemente NO ALÉRGENO	No Tóxico
EGKEHAKDGSIN	1,1606 (ANTÍGENO PROBABLE)	ALÉRGENO probable	No Tóxico

Elaborado por: Pilla Barroso Annette Margarita

Tabla 11. Epítomos finales de 12 aa seleccionados tras el proceso de validación

Epítomos	Antigenicidad (Vaxigen v2.0)	Alergenicidad (Allertop v2.1)	Toxicidad (Toxinpred)
PKMYTCRAACDI	-0,4117 (probable NO ANTÍGENO)	ALÉRGENO probable	No Tóxico
DTGCLYGSCQDV	0,1031 (probable NO ANTÍGENO)	ALÉRGENO probable	Tóxico
YYYSEGKEHAKD	0,5881 (ANTÍGENO PROBABLE)	ALÉRGENO probable	No Tóxico
CITLPHETYCND	0,3944 (probable NO ANTÍGENO)	Probablemente NO ALÉRGENO	No Tóxico
GPHIMGDTCMSK	-0,2123 (probable NO ANTÍGENO)	Probablemente NO ALÉRGENO	No Tóxico
KFGPRVNHFRNT	0,9979 (ANTÍGENO PROBABLE)	ALÉRGENO probable	No Tóxico

SINIEHNEKCTG	1,3770 (ANTÍGENO PROBABLE)	ALÉRGENO probable	No Tóxico
ETYYKANAAAYR	0,1963 (probable NO ANTÍGENO)	Probablemente NO ALÉRGENO	No Tóxico
KDWSECNPVLDK	0,0779 (probable NO ANTÍGENO)	ALÉRGENO probable	No Tóxico
GTTSTSGWFKNT	0,2473 (probable NO ANTÍGENO)	Probablemente NO ALÉRGENO	No Tóxico
IGDKLSASFQNT	0,8341 (ANTÍGENO PROBABLE)	Probablemente NO ALÉRGENO	No Tóxico
TYCNDMDILEPI	0,2893 (probable NO ANTÍGENO)	Probablemente NO ALÉRGENO	No Tóxico
HYRPGLKVDLTK	0,4322 (probable NO ANTÍGENO)	ALÉRGENO probable	No Tóxico
MYKLEELADDYI	0,1908 (probable NO ANTÍGENO)	ALÉRGENO probable	No Tóxico
CKTNCEDFISNI	0,2465 (probable NO ANTÍGENO)	ALÉRGENO probable	No Tóxico
NDNYQSCTRLNP	0,6347 (ANTÍGENO PROBABLE)	Probablemente NO ALÉRGENO	No Tóxico
IHKNWFKKCNWD	-0,1464 (probable NO ANTÍGENO)	ALÉRGENO probable	No Tóxico
FTAITADKIMSL	0,6226 (ANTÍGENO PROBABLE)	Probablemente NO ALÉRGENO	No Tóxico
IGTDLMTHHYKP	0,1809 (probable NO ANTÍGENO)	ALÉRGENO probable	No Tóxico
HAKDGSINNYCL	1.1800 (ANTÍGENO PROBABLE)	ALÉRGENO probable	No Tóxico

Elaborado por: Pilla Barroso Annette Margarita

3.1.8. Epítopos incorporados en el constructo multiepitópico final

A partir del proceso de filtrado se seleccionaron seis fragmentos de 12 aa para el ensamblaje del constructo multiepitópico. Estos fragmentos cumplieron con los criterios de antigenicidad, alergenicidad según AllerTOP v2.1 y ausencia de toxicidad en ToxinPred. La **Tabla 12** consolida los epítopos finalmente incorporados al constructo.

Tabla 12. Epítopos incorporados en el constructo multiepitópico final

Orden en el constructo	Epítipo	Antigenicidad VaxiJen v2.0	Alergenicidad AllerTOP v2.1	Toxicidad ToxinPred	Decisión
1	LPHETYCNDMDI	0,5365	Probablemente no alergénico	No tóxico	Incluido
2	NDNYQSCTRLNP	0,6347	Probablemente no alergénico	No tóxico	Incluido
3	IGDKLSASFQNT	0,8341	Probablemente no alergénico	No tóxico	Incluido
4	CNLEFTAITADK	1,2633	Probablemente no alergénico	No tóxico	Incluido
5	GPSISINIEHNE	0,8568	Probablemente no alergénico	No tóxico	Incluido
6	FTAITADKIMSL	0,6226	Probablemente no alergénico	No tóxico	Incluido

Elaborado por: Pilla Barroso Annette Margarita

3.1.9. Diseño del constructo multiepitópico

El constructo multiepitópico fue ensamblado a partir de los seis epítopos seleccionados, unidos mediante el enlazador peptídico GPGPG. La disposición de los epítopos se realizó de acuerdo con la puntuación de antigenicidad, ubicando en la región central aquellos con mayor puntuación y en los extremos aquellos con valores inferiores. Además, se incorporó una metionina (M) al extremo N-terminal y una cola de seis histidinas (HHHHHH) al extremo C-terminal.

Con base en el orden representado en la **Tabla 12**, la secuencia aminoacídica final del constructo multiepitópico fue:

MLPHETYCNDMDIGPGPGNDNYQSCTRLNPGPGPGIGDKLSASFQNTGPGPG
CNLEFTAITADKGPGPGPSISINIEHNEGPGPGFTAITADKIMSLHHHHHH

El constructo ensamblado fue reevaluado mediante VaxiJen v2.0, AllerTOP v2.1 y ToxinPred. Los resultados obtenidos fueron: antigenicidad de 0,7579, clasificación como antígeno probable, clasificación como probablemente no alergénico y predicción no tóxica. El diseño esquemático del constructo se muestra en la **Figura 3**.

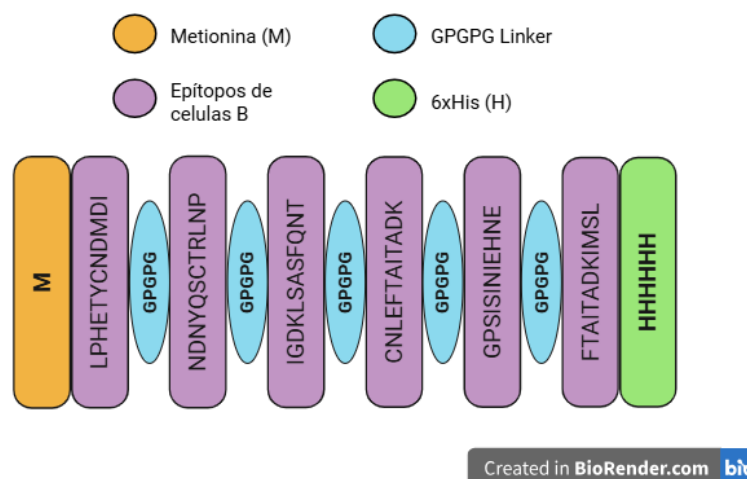


Figura 3. Representación esquemática del constructo multiepitópico diseñado

Elaborado por: Pilla Barroso Annette Margarita

3.1.10. Análisis fisicoquímico del constructo

La secuencia final validada fue evaluada mediante ProtParam del servidor ExPASy. El constructo presentó 104 aminoácidos, un punto isoelectrico teórico de 5,61 y un peso molecular de 10,79189 kDa. La fórmula molecular reportada fue C465H704N136O150S6.

La vida media estimada fue de 30 horas en reticulocitos de mamíferos in vitro, mayor a 20 horas en levadura in vivo y mayor a 10 horas en *Escherichia coli* in vivo. El índice de inestabilidad fue de 29,44, el índice alifático fue de 53,56 y el valor GRAVY fue de -0,636. Los resultados se presentan en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Evaluación de las propiedades fisicoquímicas del constructo multiepitópico mediante ProtParam

Parámetro	Resultado
Número de aminoácidos	104
Punto isoelectrico teórico	5,61
Peso molecular	10,79189
Formula	C ₄₆₅ H ₇₀₄ N ₁₃₆ O ₁₅₀ S ₆
Vida media estimada	30 horas (reticulocitos de mamíferos, in vitro) >20 horas (levadura, in vivo) >10 horas (<i>Escherichia coli</i> , in vivo)
Índice de inestabilidad (II)	29,44
Índice alifático	53,56
Promedio general de hidropatía (GRAVY)	-0,636

Elaborado por: Pilla Barroso Annette Margarita

3.1.11. Modelado estructural del constructo

El modelo tridimensional del constructo multiepitópico fue predicho mediante ColabFold, basado en AlphaFold. El modelo generado permitió visualizar la organización espacial del constructo, como se muestra en la **Figura 4**.

La plataforma también generó un gráfico de cobertura de secuencia, presentado en la **Figura 5A**, y cinco modelos estructurales ordenados según calidad predictiva, mostrados en la **Figura 5B**. Los valores de predicted Local Distance Difference Test (pLDDT) por posición aminoacídica se presentan en la **Figura 5C**, con valores aproximados entre 25 y 60 unidades de pLDDT. Estos parámetros permitieron orientar la selección del modelo más adecuado para análisis posteriores.

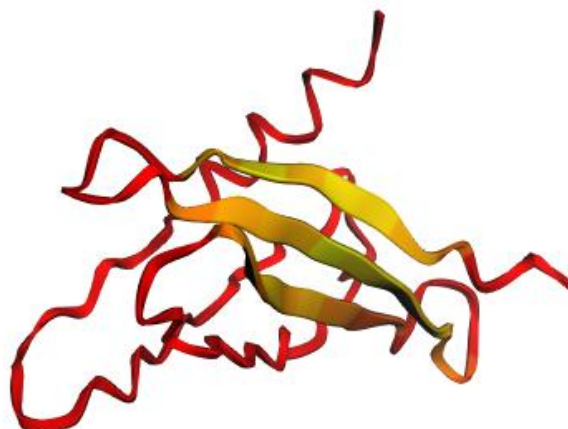


Figura 4. Modelo 3D del constructo multiepitópico predicho mediante ColabFold

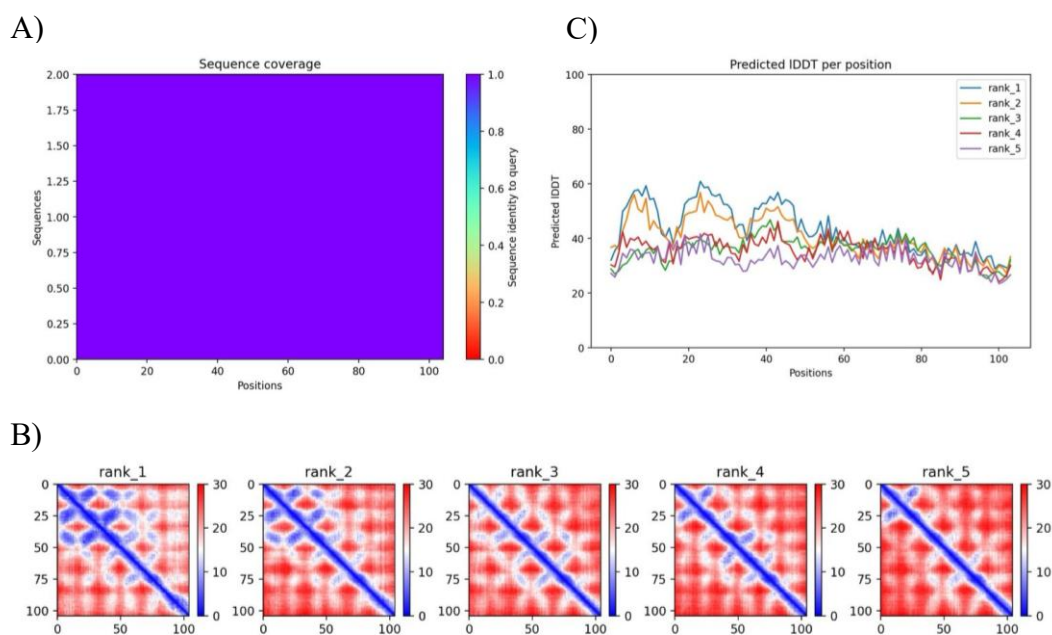


Figura 5. Gráficos generados por Alphafold. **(A)** Gráfico de cobertura de secuencia. **(B)** Modelos predichos y ordenados según calidad estructural. **(C)** Puntuaciones de confianza local por residuo (pLDDT) para los cinco modelos.

3.1.12. Refinamiento y validación estructural

El modelo tridimensional fue refinado mediante GalaxyRefine. Entre los cinco modelos refinados generados por el servidor, se seleccionó el Modelo 1, de acuerdo

con las puntuaciones de calidad estructural proporcionadas por la plataforma, presentadas en la **Figura 6**. La estructura tridimensional refinada se muestra en la **Figura 7**.

Model	GDT-HA	RMSD	MolProbity	Clash score	Poor rotamers	Rama favored
Initial	1.0000	0.000	3.736	71.3	4.9	63.7
MODEL 1	0.9327	0.474	1.591	3.4	2.4	97.1
MODEL 2	0.9447	0.456	1.652	4.1	2.4	97.1
MODEL 3	0.9351	0.480	1.567	6.1	1.2	97.1
MODEL 4	0.9351	0.477	1.362	3.4	1.2	97.1
MODEL 5	0.9255	0.489	1.525	4.1	1.2	96.1

Figura 6. Puntuaciones obtenidas para los cinco modelos generados por GalaxyRefine

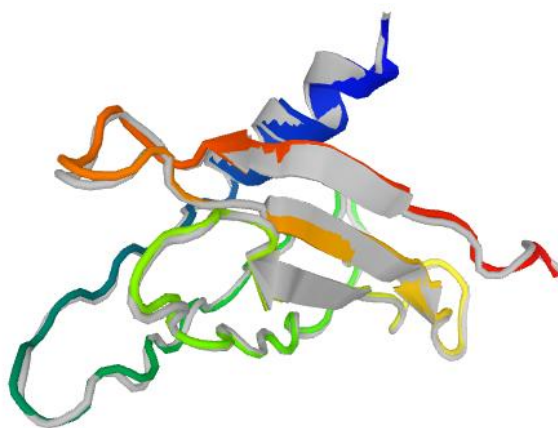


Figura 7. Estructura tridimensional predicha del constructo multiepitópico, generada con AlphaFold y refinada con GalaxyRefine

La calidad estructural del modelo refinado fue evaluada mediante SAVES. En ERRAT se obtuvo un factor de calidad general de 51,7877. En Verify3D se obtuvo 88,54 % de residuos con score $\geq 0,1$. En Ramachandran Plot se obtuvo que el 95.8% de los residuos se localizaron en regiones más favorecidas, mientras que el 4.2% restante se ubicó en regiones adicionalmente permitidas. Estos resultados se presentan en la **Figura 8**.

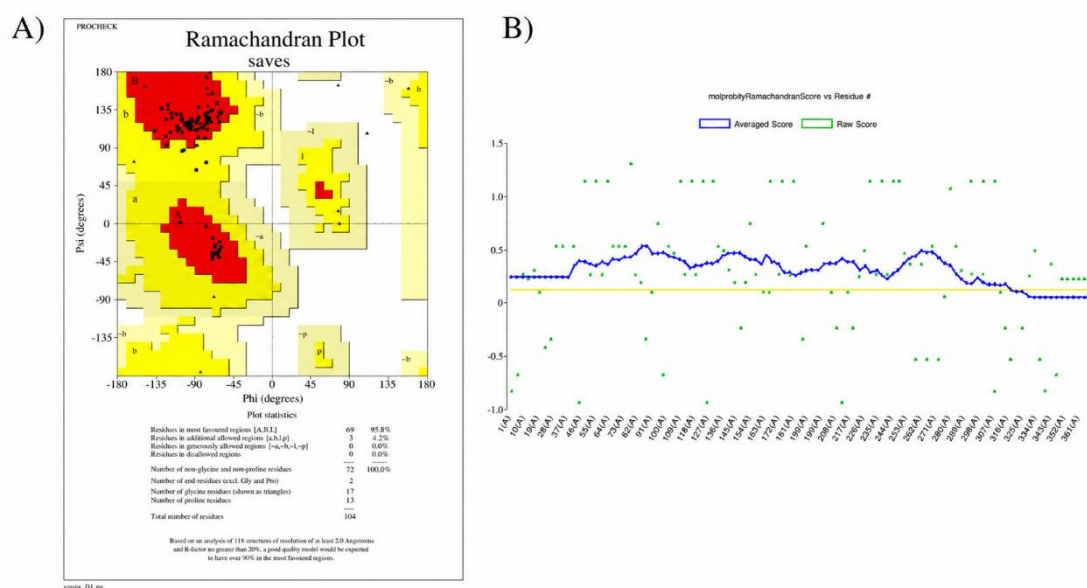


Figura 8. Resultados generados por SAVES. **(A)** Gráfico de Ramachandran Plot. **(B)** Gráfico de Verify3D

3.1.13. Optimización génica y diseño plasmídico

La secuencia proteica del constructo fue retrotraducida y optimizada para expresión heteróloga en *Escherichia coli* cepa K12 mediante JCat. La secuencia optimizada presentó una longitud de 312 nucleótidos, con un índice de adaptación de codones (CAI) de 1,0 y un contenido de GC de 58,01 %. Estos resultados se muestran en la **Figura 9**.

Uso de codones adaptado a <i>Escherichia coli</i> (cepa K12)	
ADN mejorado:	
ATGCTGCCGACGAAACCTACTGCAACGACATGGACATCGTCCGGGTCC	50
GGGTAAACGACAACTACCACTTTGCACCCGCTGAACCCGGGTCCGGTCC	100
CGGGTATCGGTGACAACTGCTGCTTCTTCCAGAACACCGGTCCGGGT	150
CCGGGTGCAACCTGGAATTCACCGCTATCACCCTGACAAAGTCCGGG	200
TCCGGGTGCTCGGTCTATCTCTATCAACATCGAACACAAAGGTCCGG	250
GTCCGGGTTCACCGCTATCACCCTGACAAATCATGTCTGCAACAC	300
CACCAACACAC	
Valor CAI de la secuencia mejorada:	1.0
Contenido de GC de la secuencia mejorada:	58.01282051282052

Figura 9. Optimización de codones del constructo multiepitopo para *Escherichia coli* K12 mediante JCat. Se muestra el ADN optimizado, el valor CAI y el contenido GC.

Posteriormente, se utilizó NEBcutter para identificar los sitios de restricción y después mediante Benchling, el gen optimizado se insertó con éxito en el vector de expresión pET28a(+) utilizando los sitios de restricción NdeI y XhoI, lo que dio como resultado

un plásmido recombinante de 5601 pb, el mapa del plásmido recombinante se muestra en la **Figura 10**.

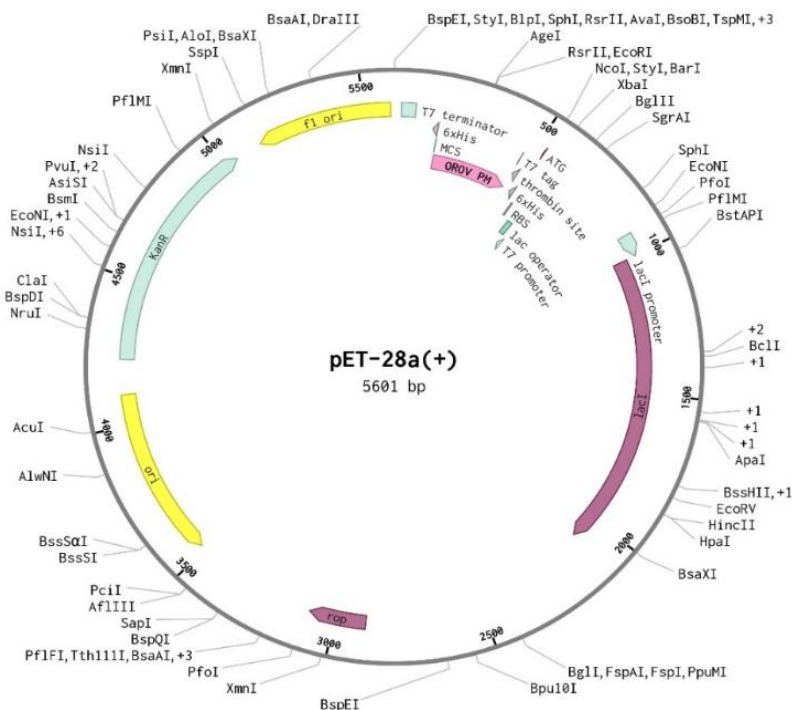


Figura 10. Inserción *in silico* del gen optimizado en el vector de expresión pET28a(+)

3.1.14. Evaluación de estructuras de ARNm

Posteriormente, la secuencia nucleotídica optimizada fue evaluada mediante RNAfold. El análisis reportó una energía libre mínima (MFE) de $-85,50$ kcal/mol. En la predicción del conjunto termodinámico, la energía libre del conjunto fue de $-92,39$ kcal/mol, la frecuencia de la estructura MFE en el conjunto fue de 0,00 %, la diversidad del conjunto fue de 95,76 y la estructura secundaria del centroide presentó una energía libre mínima de $-61,00$ kcal/mol. Las estructuras secundarias MFE y centroide se muestran en la **Figura 11**.

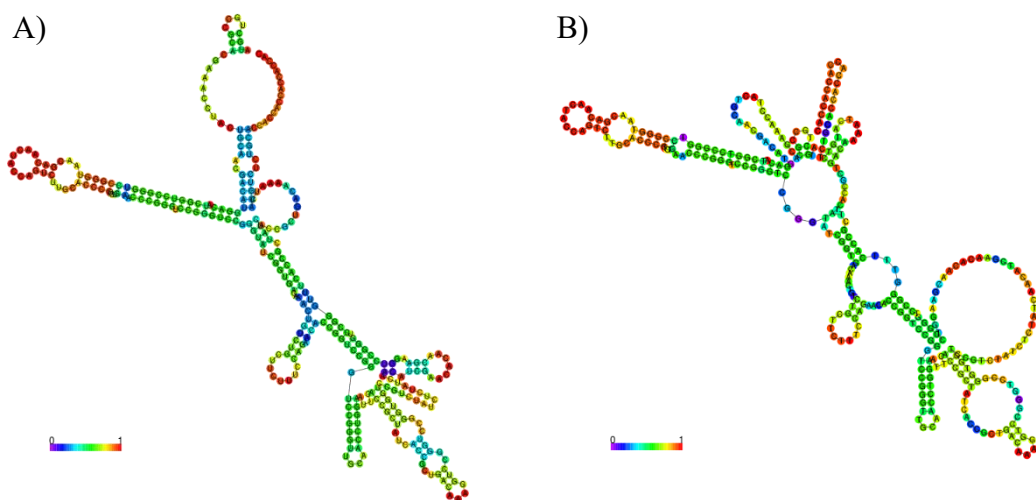


Figura 11. Gráficos generados por RNAfold. **(A)** Gráfico de la estructura de mínima energía libre (MFE). **(B)** Gráfico de la estructura centroide del ARN

3.1.15. Análisis de similitud proteica mediante BLASTp y alineamiento global

Se realizó el análisis utilizando la secuencia proteica del constructo del virus Oropouche mediante BLASTp. Los porcentajes de identidad observados se ubicaron aproximadamente entre 28,57% y 54,35%. Los resultados se presentan en la **Figura 12**.

23/5/26, 11:02

NCBI Blast: Secuencia de proteínas

Composición del clúster ▲ Haz clic en el para ver el contenido del clúster	Ancestro del clúster ▼	Secuencia representativa del clúster ▼	Puntuación máxima ▼	Puntuación total ▼	Portada de la consulta ▼	Valor E ▼	Per. Ident ▼	Longitud de acceso ▼
1miembro(s), 1organismo(s)	other sequences	proteína multiepitopo, parcial [construcción sintética]	48.5	48.5	88%	8e-04	35,92%	431
1miembro(s), 1organismo(s)	high G+C Gram-positive bacteria	proteína hipotética [Arthrobacter ptyocampae]	46.2	46.2	70%	0,007	34,25%	1188
1miembro(s), 1organismo(s)	bloodfluke planorb	Proteína hipotética BgIBS90_022525 [Biomphalaria glabrata]	45.1	45.1	78%	0,014	30,86%	414
3miembro(s), 2organismo(s)	ray-finned fishes	proteína hipotética fugu_007896 [Takifugu bimaculatus]	45.1	89.7	94%	0,014	30,61%	471
1miembro(s), 1organismo(s)	Pacific saury	proteína no caracterizada mtus2a [Cololabis saira]	45.1	45.1	74%	0,017	28,57%	1540
2miembro(s), 1organismo(s)	viruses	poliproteína de membrana parcial [Orthobunyavirus oropoucheense]	44.3	44.3	44%	0,019	54,35%	193
12miembro(s), 1organismo(s)	viruses	poliproteína, parcial [Orthobunyavirus oropoucheense]	43.9	43.9	44%	0,025	54,35%	216
6miembro(s), 1organismo(s)	viruses	polyprotein, partial [Orthobunyavirus oropoucheense]	44.3	44.3	44%	0,025	54,35%	416

Figura 12. Análisis de similitud del constructo proteico multiepitopo mediante BLASTp en el servidor NCBI BLAST

Posteriormente, el constructo proteico multiepitópico fue sometido a análisis de similitud mediante BLAST Global Alignment frente a secuencias de virus Zika y frente a secuencias E1 y E2 del virus Chikungunya. La comparación frente a Zika presentó un 26,00% de identidad, mientras que frente a virus Chikungunya presentó un 14,00% de identidad con E1 y un 13,00% de identidad con E2. Estos resultados se presentan en la **Figura 13**.

A)	Descripción	Puntaje	Porcentaje de identificación	Adhesión
	producto proteico no identificado	109	26,00%	Consulta_6169901

B)	Descripción	Puntaje	Porcentaje de identificación	Adhesión
	producto proteico no identificado	-28.0	14,00%	Consulta_5292689

C)	Descripción	Puntaje	Porcentaje de identificación	Adhesión
	producto proteico no identificado	-49.0	13,00%	Consulta_5508825

Figura 13. Reactividad cruzada frente a Arbovirus emergentes en el servidor BLAST Global Alignment. **(A)** Similitud frente a Zika. **(B)** Similitud frente a E1-CHIKV. **(C)** Similitud frente a E2-CHIKV

3.2. Discusión

En la presente investigación se diseñó una proteína multiepitópos específica del virus Oropouche mediante un enfoque inmunoinformático orientado al inmunodiagnóstico diferencial en zonas endémicas. En este estudio se utilizó la poliproteína codificada por el segmento M. Esta elección fue pertinente, debido a que esta región origina las glicoproteínas Gn y Gc, proteínas relacionadas con la superficie viral y con el reconocimiento inmunológico del hospedero (4,16). Además, está respaldada por estudios como el de Thomas (2025), quien identificó mediante predicción computacional regiones conservadas y superpuestas de Gn y Gc con elevado potencial antigénico para células B, y se refuerza con los hallazgos de Merchant et al. (2025), quienes demostraron que antígenos recombinantes derivados de OROV, especialmente Gc, son reconocidos por anticuerpos durante la infección y pueden emplearse en sistemas de detección basados en proteínas, lo que respalda la elección del segmento

M como punto de partida para el diseño del constructo multiepitópico propuesto (14,15).

En cuanto a la predicción inicial de epítomos, en este estudio se empleó ABCPred como herramienta de tamizaje para identificar epítomos B lineales, utilizando el umbral predeterminado de 0,51 y secuencias peptídicas de 12 aminoácidos, con prioridad en aquellas regiones que presentaron mayor puntuación predictiva. Esta decisión metodológica se sustenta en lo descrito por Ras-Carmona et al. (2022), quienes señalan que los epítomos B son regiones antigénicas reconocidas por receptores de células B o anticuerpos, y que los epítomos lineales, al estar formados por residuos secuenciales, pueden analizarse desde la secuencia primaria y emplearse como fragmentos peptídicos en lugar de la proteína completa (40). Asimismo, el procedimiento aplicado concuerda con Elshafei et al. (2024), quienes utilizaron ABCPred con el mismo umbral de 0,51 y longitud de 12 aminoácidos, indicando que este servidor emplea una red neuronal recurrente entrenada para predecir epítomos B en función de sus puntuaciones (41). Por otro lado, Deepthi et al. (2025) señalan que los epítomos B conformacionales y los epítomos T también son relevantes, los primeros requieren información estructural tridimensional y los segundos se relacionan con la presentación antigénica por moléculas MHC (42), la exclusión de estos respondió a una decisión metodológica enfocada en una alternativa más accesible y coherente con el reconocimiento humoral, como también se observa en enfoques inmunoinformáticos. Por tanto, los epítomos identificados en esta etapa fueron considerados candidatos preliminares y requirieron una depuración posterior mediante criterios de antigenicidad, alergenicidad y toxicidad.

Posterior a la predicción inicial, los epítomos preliminares fueron depurados mediante VaxiJen v2.0, AllerTOP v2.1 y ToxinPred. En la presente investigación, VaxiJen v2.0 se empleó con un umbral de aceptación de 0,5, por lo que solo se consideraron aptos los péptidos con puntuación igual o superior a este valor; este criterio permitió seleccionar fragmentos con probable antigenicidad, considerando que VaxiJen clasifica antígenos a partir de propiedades fisicoquímicas de la secuencia sin depender del alineamiento (43), como describen Zubair et al. (2025). De forma complementaria, AllerTOP v2.1 permitió valorar el riesgo alergénico de los fragmentos, aspecto relevante porque, como señalan Sanami et al. (2023), los componentes de un diseño

multiepitópico deben ser antigénicos y no tóxicos, pero también evitar respuestas alérgicas no deseadas (44). Finalmente, ToxinPred se utilizó para excluir péptidos con predicción tóxica, siguiendo un enfoque similar al reportado por Maleki et al. (2022), quienes evaluaron antigenicidad, alergenicidad y toxicidad antes de seleccionar epítomos para un constructo recombinante (45). Este proceso también concuerda con Naveed et al. (2026), quienes conservaron únicamente epítomos antigénicos, no alergénicos y no tóxicos para el ensamblaje final (46).

El constructo multiepitópico fue ensamblado mediante el enlazador GP GPG, incorporando una metionina inicial en el extremo N-terminal y una cola de seis histidinas en el extremo C-terminal. Esta estrategia fue coherente con el diseño de proteínas multiepitopo descrito por Maleki et al. (2022), quienes señalan que los enlazadores cumplen un papel importante al proporcionar flexibilidad, favorecer el plegamiento, separar dominios peptídicos y disminuir la posible inmunogenicidad generada por la unión directa entre epítomos (45). De forma similar, Zubair et al. (2025) emplearon GP GPG para unir epítomos seleccionados y destacaron que este enlazador contribuye a una mejor presentación de las regiones antigénicas dentro del constructo (43). En el presente estudio, la incorporación de GP GPG resultó pertinente porque permitió separar los epítomos B lineales seleccionados y favorecer su independencia estructural dentro de una proteína sintética orientada al inmunodiagnóstico. Además, la inclusión de la etiqueta 6xHis al final del constructo se justificó por su utilidad en futuros procesos de expresión, identificación y purificación recombinante, como también fue aplicado por Maleki et al. (2022) y Naveed et al. (2026) en constructos multiepitopo (45,46). Tras su ensamblaje, el constructo conservó un perfil favorable, con antigenicidad de 0,7579, clasificación probablemente no alérgica y predicción no tóxica.

El análisis fisicoquímico mediante ProtParam permitió complementar la evaluación del constructo multiepitópico, ya que estos parámetros ofrecen una aproximación inicial sobre su tamaño, estabilidad, carga, hidrofobicidad y posible comportamiento en futuras etapas de expresión recombinante. En la presente investigación, el constructo presentó 104 aminoácidos y un peso molecular de 10,79189 kDa, lo que lo caracteriza como una proteína pequeña, aspecto favorable si se considera que Sanami et al. (2023) señalan que las proteínas menores a 110 kDa suelen ser más fáciles y

rápidas de expresar y purificar que proteínas de mayor tamaño (44). El punto isoelectrico teórico fue de 5,61, indicando una naturaleza ligeramente ácida, por lo que este valor podría orientar posteriormente la selección de condiciones de purificación según el pH del medio, tal como explican Rcheulishvili et al. (2023) al relacionar el pI con las propiedades dependientes del pH de una proteína (47). Además, la vida media estimada de 30 horas en reticulocitos de mamíferos, mayor a 20 horas en levadura y mayor a 10 horas en *Escherichia coli* sugiere una permanencia teórica favorable en sistemas celulares predictivos. El índice de inestabilidad de 29,44, al encontrarse por debajo del punto de corte de 40 descrito por Yang et al. (2021), Rcheulishvili et al. (2023) y Sanami et al. (2023), permite considerar al constructo como teóricamente estable (44,47,48). Por otra parte, el índice alifático de 53,56 sugiere una termoestabilidad moderada, mientras que el valor GRAVY de -0,636 evidencia una naturaleza hidrofílica, lo cual resulta favorable porque, según Yang et al. (2021) y Sanami et al. (2023), los valores negativos se asocian con mayor interacción con moléculas de agua (44,48). En conjunto, estos resultados respaldan que el constructo presenta un perfil fisicoquímico favorable para continuar con análisis estructurales y de expresión, aunque su estabilidad, solubilidad y rendimiento recombinante deberán confirmarse experimentalmente.

En cuanto al modelado tridimensional generado por AlphaFold, permitió obtener una aproximación inicial de la organización espacial del constructo multiepitópico diseñado. El uso de AlphaFold se sustenta en lo descrito por Jumper et al. (2021), quienes demostraron que esta herramienta puede predecir estructuras proteicas a partir de la secuencia aminoacídica mediante modelos de aprendizaje profundo, incorporando información evolutiva, geométrica y estructural para generar coordenadas tridimensionales con estimaciones de confianza por residuo (27). En la presente investigación, el servidor generó cinco modelos estructurales y valores de pLDDT por posición entre aproximadamente 25 y 60, lo que indica una confianza local baja a moderada y obliga a interpretar el modelo como una predicción preliminar, no como una estructura definitiva. Este resultado difiere de lo reportado por Noman et al. (2025), quienes obtuvieron un modelo multiepitópico con pLDDT de 76,5 y lo consideraron confiable para análisis estructurales posteriores (49); por tanto, en este estudio los valores menores pueden atribuirse, de manera probable, a la naturaleza corta, sintética y flexible del constructo. Aun así, la predicción obtenida fue útil para

orientar la selección del modelo más adecuado para refinamiento y validación estructural.

Posterior a la predicción inicial del modelo tridimensional, la estructura del constructo fue refinada mediante GalaxyRefine. Esta etapa fue necesaria porque, como señalan Adiyaman y McGuffin (2019), los modelos proteicos predichos pueden presentar errores locales, contactos irregulares, choques atómicos o geometrías poco favorables, por lo que el refinamiento permite aproximar la estructura inicial hacia una conformación más adecuada mediante estrategias de muestreo y puntuación (50). En la presente investigación, el servidor generó cinco modelos refinados y se seleccionó el Modelo 1 según las puntuaciones de calidad proporcionadas por la plataforma, lo que permitió disponer de una estructura más apropiada para los análisis posteriores. Este procedimiento concuerda con lo reportado por Naveed et al. (2026), quienes también emplearon GalaxyRefine después del modelado con AlphaFold para mejorar la calidad estereoquímica y la geometría general de un constructo multiepitópico dirigido al virus Oropouche (26). No obstante, considerando que el modelo inicial presentó valores de pLDDT bajos a moderados, el refinamiento debe interpretarse como una mejora computacional del modelo predicho y no como una confirmación experimental de su estructura real.

La validación estructural mediante SAVES permitió evaluar la calidad del modelo refinado desde criterios complementarios, en el caso de Ramachandran Plot mostró que el 95,8 % de los residuos se ubicaron en regiones más favorecidas y el 4,2 % en regiones adicionalmente permitidas, sin residuos en zonas desfavorables, lo que indica una conformación estereoquímica aceptable del constructo refinado. Este resultado fue similar o incluso superior en distribución permitida a lo reportado por Shafaghi et al. (2023), quienes obtuvieron 94,2 % de residuos en regiones favorecidas tras el refinamiento, y por Rcheulishvili et al. (2023), quienes consideraron adecuado un modelo con 93,0 % en regiones más favorecidas y 6,3 % en regiones permitidas (47,51). Asimismo, el 88,54 % obtenido en Verify3D sugiere una compatibilidad favorable entre la secuencia aminoacídica y el entorno tridimensional del modelo, comparable con el valor de 83,39 reportado por Shafaghi et al. (2023) en un constructo multiepitópico validado (51). No obstante, el factor de calidad general de ERRAT fue de 51,7877, inferior a los valores superiores al 90 % considerados por Noman et al.

(2025) como indicativos de buena calidad estructural (49), por lo que este parámetro evidencia posibles limitaciones en las interacciones no enlazantes del modelo. En conjunto, la validación respalda una geometría global aceptable y una buena compatibilidad estructural, aunque el valor de ERRAT indica que el modelo debe interpretarse como una predicción computacional preliminar, útil para orientar análisis posteriores, pero no como una estructura experimentalmente confirmada.

La optimización génica y el diseño plasmídico permitieron proyectar la posible expresión heteróloga del constructo multiepitópico en *Escherichia coli* K12. En este estudio, la secuencia proteica fue retrotraducida y optimizada mediante JCat, obteniéndose una secuencia de 312 nucleótidos, un CAI de 1,0 y un contenido GC de 58,01 %, valores que sugieren una alta compatibilidad teórica con el sistema bacteriano seleccionado. Este resultado concuerda con Zubair et al. (2025), quienes consideran que un CAI ideal corresponde a 1,0 y que un contenido GC entre 30 % y 70 % se encuentra dentro de un rango aceptable (43). De forma similar, en estudios recientes con Oropouche, Naveed et al. (2026) también aplicaron retrotraducción, optimización de codones e inserción *in silico* en pET28a(+) mediante NdeI y XhoI, lo que respalda la pertinencia de utilizar estos sitios de restricción y este vector para proyectar la expresión de proteínas multiepitópicas (26). Asimismo, el estudio sobre Batai orthobunyavirus reportó la inserción exitosa de un gen optimizado en pET28a(+) con los mismos sitios de restricción, reforzando la utilidad de esta estrategia en constructos relacionados con virus del orden Bunyvirales (46). En la presente investigación, la clonación *in silico* mediante Benchling permitió insertar el gen optimizado en pET28a(+) usando NdeI y XhoI, generando un plásmido recombinante de 5601 pb; por tanto, estos resultados respaldan la viabilidad computacional del diseño para futuras fases de síntesis, clonación y expresión.

La evaluación de la estructura secundaria del ARNm a través de RNAfold permitió adicionar la optimización génica del constructo, debido a que el plegamiento de la secuencia nucleotídica ofrece una perspectiva predictiva vital respecto a su estabilidad teórica y su posible desempeño en una futura expresión recombinante, en este estudio la secuencia optimizada mostro una energía libre mínima de $-85,50$ kcal/mol y una energía libre del conjunto termodinámico de $-92,39$ kcal/mol, valores negativos que son un indicador un plegamiento energéticamente favorable. Este resultado se

relaciona con lo reportado por Shi et al. (2024), quienes utilizaron RNAfold para predecir la estructura MFE y la estructura centroide de una vacuna multiepítipo de ARNm, señalando que valores menores de energía libre se asocian con mayor estabilidad estructural (52). De forma similar, Mahdeen et al. (2024) evaluaron la estructura secundaria de un constructo de ARNm mediante RNAfold y consideraron que los valores negativos de MFE respaldaban la estabilidad del diseño propuesto (53). Sin embargo, en la presente investigación, la frecuencia de la estructura MFE fue de 0,00 % y la diversidad del conjunto alcanzó 95,76, lo que indica que la estructura de mínima energía no representa una conformación dominante dentro del conjunto termodinámico, sino que la secuencia podría adoptar varias conformaciones alternativas. Esta interpretación es coherente con Binet et al. (2023), quienes señalan que los ácidos nucleicos monocatenarios pueden presentar más de una conformación posible y que las herramientas basadas en energía libre mínima, como RNAfold, deben interpretarse considerando sus límites predictivos (54). En consecuencia, si bien los parámetros energéticos documentados fundamentan una estabilidad secundaria teórica del ARNm optimizado, la marcada diversidad del ensamble termodinámico denota un grado apreciable de flexibilidad estructural, por lo que la estabilidad real y la eficiencia de traducción deberá corroborarse empíricamente en un sistema de expresión heteróloga.

Finalmente, la evaluación de homología proteica permitió analizar de manera preliminar la especificidad del constructo multiepítipo frente a otros arbovirus cocirculantes, los cuales suelen causar cuadros febriles clínicamente parecidos, el análisis usando BLASTp mostró porcentajes de identidad entre 28,57 % y 54,35 %, mientras que el alineamiento global frente a secuencias específicas evidenció una identidad de 26,00 % con Zika, 14,00 % con CHIKV-E1 y 13,00 % con CHIKV-E2, estos valores sugieren una mínima similitud global en comparación a los virus evaluados, de manera particular frente a las glicoproteínas E1 y E2 de Chikungunya, lo que consolida el potencial del constructo como candidato antigénico orientado al inmunodiagnóstico diferencial de OROV. Esta evaluación resulta pertinente, ya que Fischer et al. (2021) señalan que la serología de arbovirus puede verse afectada por la cocirculación de virus relacionados y por anticuerpos de reacción cruzada, lo que compromete la especificidad diagnóstica en zonas endémicas (22). De forma complementaria, Kasbergen et al. (2023) destacan que la interpretación serológica se

vuelve más compleja cuando existen exposiciones previas o simultáneas a distintos arbovirus, por lo que se requieren antígenos más específicos y ensayos mejor estandarizados para diferenciar infecciones (10). En el caso particular de OROV, Merchant et al. (2025) resaltan la necesidad de herramientas proteicas específicas para mejorar su detección, debido a que su presentación clínica puede confundirse con otras arbovirosis y su diagnóstico continúa siendo limitado en entornos endémicos (15). Por tanto, aunque los bajos porcentajes de identidad obtenidos no demuestran por sí solos ausencia total de reactividad cruzada, sí respaldan un riesgo computacionalmente reducido y justifican la continuidad del constructo hacia futuras validaciones experimentales.

3.3. Verificación de hipótesis

La hipótesis alternativa planteó que el diseño *in silico* de una proteína multiepítomos específica del virus Oropouche presenta un adecuado potencial para el inmunodiagnóstico diferencial, al mejorar la antigenicidad y la especificidad frente a otros virus cocirculantes. Con base en los resultados obtenidos, esta hipótesis se acepta desde el enfoque computacional, debido a que el constructo final fue diseñado a partir de seis epítomos B lineales que cumplieron simultáneamente con los criterios de antigenicidad probable, clasificación probablemente no alergénica y ausencia de toxicidad.

El constructo multiepítomico definitivo mostro una antigenicidad de 0,7579 en VaxiJen v2.0, valor superior al umbral establecido para catalogarlo antígeno probable, de manera complementaria fue clasificado como probablemente no alergénico por AllerTOP v2.1 y como no tóxico por ToxinPred, lo que consolida su perfil predictivo favorable como candidato antigénico. Estos resultados permiten demostrar que la selección y unión de los epítomos aumento las características inmunoinformáticas del diseño frente a la evaluación individual de múltiples fragmentos que fueron desestimados durante el proceso de filtrado.

De igual manera, el análisis fisicoquímico apoyó la viabilidad teórica del constructo, ya que presentó 104 aminoácidos, peso molecular de 10,79189 kDa, punto isoelectrico de 5,61, índice de inestabilidad de 29,44 y valor GRAVY de -0,636. Estos parámetros sugieren que la proteína diseñada posee una estabilidad computacional aceptable y una

naturaleza hidrofílica, características favorables para un posible antígeno recombinante. A esto se suma la optimización genética para *Escherichia coli* K12, con un CAI de 1,0 y un contenido GC de 58,01 %, lo que indica compatibilidad teórica con un sistema de expresión bacteriano.

Respecto a la especificidad, los análisis de similitud mostraron bajos porcentajes de identidad frente a arbovirus cocirculantes. El alineamiento global evidenció 26,00 % de identidad con virus Zika, 14,00 % con la proteína E1 del virus Chikungunya y 13,00 % con la proteína E2 del mismo virus. Estos resultados respaldan una baja similitud global frente a los virus comparados y, por tanto, sugieren un riesgo computacionalmente reducido de reactividad cruzada, aspecto importante para su posible aplicación en inmunodiagnóstico diferencial.

En virtud de los hallazgos expuestos se rechaza la hipótesis nula debido a que los resultados obtenidos corroboran que el diseño *in silico* de la proteína multiepítomos específica del virus Oropouche sí exhibe un perfil predictivo favorable de antigenicidad, seguridad, estabilidad y especificidad molecular. Sin embargo, resulta imperativo subrayar que esta comprobación teórica se limita al ámbito bioinformático, por lo que el constructo propuesto no podrá categorizarse como una prueba diagnóstica validada hasta superar satisfactoriamente las etapas de expresión, purificación y sea evaluado experimentalmente mediante inmunoensayos y muestras clínicas caracterizadas.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se diseñó y validó *in silico* una proteína multiepítomos específica del virus Oropouche con potencial aplicación en inmunodiagnóstico diferencial en zonas endémicas. El constructo final presentó características predictivas favorables, al ser clasificado como antígeno probable, probablemente no alergénico y no tóxico, por lo que constituye un candidato antigénico computacional prometedor para futuras etapas de validación experimental.
- Se identificaron y seleccionaron regiones antigénicas conservadas del virus Oropouche a partir de la poliproteína codificada por el segmento M, a partir de la predicción de epítomos B lineales y filtrado por antigenicidad, alergenicidad y toxicidad. En consecuencia, se incorporaron seis epítomos de 12 los cuales satisficieron simultáneamente con los criterios establecidos, lo que permitió obtener una secuencia multiepítópica más específica y depurada.
- Se evaluó la especificidad del constructo mediante análisis comparativo frente a arbovirus cocirculantes, evidenciándose bajos porcentajes de identidad con virus Zika y Chikungunya. Estos resultados sugieren un riesgo computacionalmente reducido de reactividad cruzada, aspecto relevante para su posible uso en el inmunodiagnóstico diferencial del virus Oropouche.
- Se caracterizó el constructo multiepítomos mediante análisis fisicoquímico, modelado tridimensional, validación estructural y optimización genética para expresión heteróloga en *Escherichia coli*. Los resultados obtenidos mostraron estabilidad teórica, naturaleza hidrofílica, compatibilidad genética favorable y posibilidad de clonación *in silico* en el vector pET28a(+), aunque su utilidad diagnóstica real deberá confirmarse mediante expresión recombinante, purificación e inmunoensayos con muestras clínicas caracterizadas.

4.2. Recomendaciones

- Se recomienda realizar la síntesis del gen optimizado y su clonación experimental en el vector de expresión pET28a(+), con el fin de comprobar la factibilidad real del diseño plasmídico propuesto y avanzar hacia la producción recombinante de la proteína multiepítomos.
- Se sugiere llevar a cabo la expresión y purificación del constructo en *Escherichia coli*, en un proceso donde se evalúen parámetros como la cepa bacteriana, la temperatura de inducción, la concentración de IPTG, los tiempos de expresión y la solubilidad de la proteína, ya que los resultados computacionales no aseguran por sí solos una expresión eficiente a nivel de laboratorio.
- Se recomienda validar de manera experimental la antigenicidad y especificidad del constructo a través de inmunoensayos, empleando sueros positivos para Oropouche, además de paneles frente a otros arbovirus cocirculantes, como el dengue, Zika y Chikungunya, con el propósito de comprobar su verdadera utilidad en el inmunodiagnóstico diferencial.

Referencias Bibliográficas

1. Bai F, Denyoh PMD, Urquhart C, Shrestha S, Yee DA. A Comprehensive Review of the Neglected and Emerging Oropouche Virus. *Viruses*. 2025 Mar 1;17(3). doi:10.3390/v17030439 PubMed PMID: 40143366.
2. Pan American Health Organization [PAHO]. Alerta Epidemiológica Oropouche en la Región de las Américas - 9 de mayo del 2024 - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. 2024 [cited 2026 May 8]. Available from: <https://www.paho.org/es/documentos/alerta-epidemiologica-oropouche-region-americas-9-mayo-2024>
3. Sankhe S, Dieng I, Kane M, Diallo A, Ndiaye NA, Top NM, et al. Genomic Insights into Neglected Orthobunyaviruses: Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis. *Viruses* 2025, Vol 17,. 2025 Mar 12;17(3). doi:10.3390/V17030406 PubMed PMID: 40143333.
4. Zhang Y, Liu X, Wu Z, Feng S, Lu K, Zhu W, et al. Oropouche virus: A neglected global arboviral threat. *Virus Res*. 2024 Mar 1;341. doi:10.1016/j.virusres.2024.199318 PubMed PMID: 38224842.
5. Mourão MPG, de Melo GC, Nascimento J, Mwangi VI, Sacchetto L, Gardinassi LG, et al. Clinical and laboratory profiles of Oropouche virus disease from the 2024 outbreak in Manaus, Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2025 Oct 1;19(10):e0013604. doi:10.1371/journal.pntd.0013604 PubMed PMID: 41042827.
6. Scotto G, Fazio V, Massa S. Oropouche Virus: An Emerging Arboviral Threat and Its Implications for Europe. *Life* 2025, Vol 15,. 2025 Oct 26;15(11). doi:10.3390/LIFE15111674
7. Cain M, Ly H. Oropouche virus: Understanding “sloth fever” disease dynamics and novel intervention strategies against this emerging neglected tropical disease. *Virulence*. 2024;15(1). doi:10.1080/21505594.2024.2439521 PubMed PMID: 39670816.
8. Files MA, Hansen CA, Herrera VC, Schindewolf C, Barrett ADT, Beasley DWC, et al. Baseline mapping of Oropouche virology, epidemiology, therapeutics, and vaccine research and development. *npj Vaccines* 2022 7:1. 2022 Mar 17;7(1):38-. doi:10.1038/s41541-022-00456-2
9. Fischer C, Jo WK, Haage V, Moreira-Soto A, de Oliveira Filho EF, Drexler JF. Challenges towards serologic diagnostics of emerging arboviruses. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021 Sep 1;27(9):1221–9. doi:10.1016/J.CMI.2021.05.047 PubMed PMID: 34111589.
10. Kasbergen LMR, Nieuwenhuijse DF, de Bruin E, Sikkema RS, Koopmans MPG. The increasing complexity of arbovirus serology: An in-depth systematic review on cross-reactivity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2023 Sep 1;17(9):e0011651. doi:10.1371/JOURNAL.PNTD.0011651 PubMed PMID: 37738270.

11. World Health Organization [WHO]. Oropouche virus disease - Region of the Americas [Internet]. 2024 [cited 2026 May 8]. Available from: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2024-DON545>
12. Pan American Health Organization. Actualización Epidemiológica Oropouche en la Región de las Américas - 11 de febrero del 2025 - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. 2025 [cited 2026 May 16]. Available from: <https://www.paho.org/es/documentos/actualizacion-epidemiologica-oropouche-region-americas-11-febrero-2025>
13. Wesselmann KM, Postigo-Hidalgo I, Pezzi L, de Oliveira-Filho EF, Fischer C, de Lamballerie X, et al. Emergence of Oropouche fever in Latin America: a narrative review. *Lancet Infect Dis*. 2024 Jul 1;24(7):e439–52. doi:10.1016/S1473-3099(23)00740-5 PubMed PMID: 38281494.
14. Thomas S. Charting the Proteins of Oropouche Virus. *Viruses* 2025, Vol 17,. 2025 Oct 27;17(11). doi:10.3390/V17111434 PubMed PMID: 41305457.
15. Merchant MK, de Paula Souza J, Abdelkarim S, Chakraborty S, Nasser Neto TA, Gutierrez Manchay KI, et al. Protein-based tools for the detection and characterisation of Oropouche virus infection. *EMBO Mol Med*. 2025 Sep 11;17(9):2462–82. doi:10.1038/s44321-025-00291-7 PubMed PMID: 40790101.
16. Lin S, Wang Q, Wang C, Liu Q. Oropouche virus: molecular virological characteristics and research progress of a neglected arbovirus. *Virol J*. 2025 Dec 1;22(1):393. doi:10.1186/S12985-025-03011-2 PubMed PMID: 41361472.
17. Scachetti GC, Forato J, Claro IM, Hua X, Salgado BB, Vieira A, et al. Re-emergence of Oropouche virus between 2023 and 2024 in Brazil: an observational epidemiological study. *Lancet Infect Dis*. 2025 Feb 1;25(2):166–75. doi:10.1016/S1473-3099(24)00619-4 PubMed PMID: 39423838.
18. Romero-Alvarez D, Navarro JC, Gutiérrez-Pallo D, Echeverría-Garcés G, Lara-Cazorla C, Fuertes-Flores B, et al. Genomic evidence of active circulation of Orthobunyavirus in Ecuador. *International Journal of Infectious Diseases*. 2025 Oct 1;159. doi:10.1016/j.ijid.2025.108000 PubMed PMID: 40738216.
19. Rodríguez-Morales AJ, Navarro JC, Romero-Alvarez D, Paniz-Mondolfi A, Forero-Peña DA, Naranjo-Lara L, et al. Reemergence of Oropouche virus infection in Ecuador, 2024: Vectors and cases. *Journal of Infection*. 2025 Aug 1;91(2). doi:10.1016/j.jinf.2025.106544 PubMed PMID: 40578487.
20. Cain M, Ly H. Oropouche virus: Understanding “sloth fever” disease dynamics and novel intervention strategies against this emerging neglected tropical disease. *Virulence*. 2024 Dec 31;15(1). doi:10.1080/21505594.2024.2439521 PubMed PMID: 39670816.
21. Andreolla AP, Borges AA, Nagashima S, Vaz de Paula CB, de Noronha L, Zanchin NIT, et al. Development of monoclonal antibodies against oropouche

- virus and its applicability to immunohistochemical diagnosis. *Virology Journal* 2024 21:1. 2024 Apr 8;21(1):81-. doi:10.1186/S12985-024-02323-Z PubMed PMID: 38589896.
22. Fischer C, Jo WK, Haage V, Moreira-Soto A, de Oliveira Filho EF, Drexler JF. Challenges towards serologic diagnostics of emerging arboviruses. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021 Sep 1;27(9):1221–9. doi:10.1016/j.cmi.2021.05.047 PubMed PMID: 34111589.
 23. Kumar P, Lata S, Shankar UN, Akif M. Immunoinformatics-Based Designing of a Multi-Epitope Chimeric Vaccine From Multi-Domain Outer Surface Antigens of *Leptospira*. *Front Immunol*. 2021 Nov 30;12:735373. doi:10.3389/FIMMU.2021.735373/TEXT PubMed PMID: 34917072.
 24. Hossan MI, Chowdhury AS, Hossain MU, Khan MA, Mahmood T Bin, Mizan S. Immunoinformatics aided-design of novel multi-epitope based peptide vaccine against Hendra henipavirus through proteome exploration. *Inform Med Unlocked*. 2021 Jan 1;25:100678. doi:10.1016/J.IMU.2021.100678
 25. Kaushik V, G SK, Gupta LR, Kalra U, Shaikh AR, Cavallo L, et al. Immunoinformatics Aided Design and In-Vivo Validation of a Cross-Reactive Peptide Based Multi-Epitope Vaccine Targeting Multiple Serotypes of Dengue Virus. *Front Immunol*. 2022 Jun 21;13:865180. doi:10.3389/FIMMU.2022.865180/TEXT PubMed PMID: 35799781.
 26. Naveed M, Athar A, Tariq A, Asim M, Majeed MN, El Hadi Mohamed RA, et al. Immunoinformatics-guided design of a multi-epitope vaccine targeting the envelopment polyprotein of oropouche virus. *Molecular Genetics and Genomics* 2026 301:1. 2026 Feb 18;301(1):43-. doi:10.1007/S00438-026-02376-5
 27. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 2021 596:7873. 2021 Jul 15;596(7873):583–9. doi:10.1038/s41586-021-03819-2 PubMed PMID: 34265844.
 28. Barbosa NS, Concha JO, daSilva LLP, Crump CM, Graham SC. Oropouche Virus Glycoprotein Topology and Cellular Requirements for Glycoprotein Secretion. *J Virol*. 2023 Jan 31;97(1). doi:10.1128/JVI.01331-22;WEBSITE:WEBSITE:ASMJ;ISSUE:ISSUE:DOI PubMed PMID: 36475765.
 29. Doytchinova IA, Flower DR. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics* 2007 8:1. 2007 Jan 5;8(1):4-. doi:10.1186/1471-2105-8-4 PubMed PMID: 17207271.
 30. Dimitrov I, Flower DR, Doytchinova I. AllerTOP - a server for in silico prediction of allergens. *BMC Bioinformatics* 2013 14:6. 2013 Apr 17;14(6):S4-. doi:10.1186/1471-2105-14-S6-S4 PubMed PMID: 23735058.

31. Dimitrov I, Naneva L, Doytchinova I, Bangov I. AllergenFP: allergenicity prediction by descriptor fingerprints. *Bioinformatics*. 2014 Mar 15;30(6):846–51. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTT619 PubMed PMID: 24167156.
32. Saha S, Raghava GPS. AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jul 1;34(suppl_2):W202–9. doi:10.1093/NAR/GKL343 PubMed PMID: 16844994.
33. Saha S, Raghava GPS. Prediction methods for B-cell epitopes. *Methods Mol Biol*. 2007;409:387–94. doi:10.1007/978-1-60327-118-9_29/SAVE-RESEARCH PubMed PMID: 18450017.
34. Gupta S, Kapoor P, Chaudhary K, Gautam A, Kumar R, Raghava GPS. In Silico Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. *PLoS One*. 2013 Sep 13;8(9):e73957. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0073957 PubMed PMID: 24058508.
35. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein Analysis Tools on the ExPASy Server 571 571 From: The Proteomics Protocols Handbook Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server [Internet]. [cited 2026 Jun 3]. Available from: <http://www.expasy.org/tools/>.
36. Abramson J, Adler J, Dunger J, Evans R, Green T, Pritzel A, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature* 2024 630:8016. 2024 May 8;630(8016):493–500. doi:10.1038/s41586-024-07487-w PubMed PMID: 38718835.
37. Blankenberg D, Kuster G Von, Coraor N, Ananda G, Lazarus R, Mangan M, et al. Galaxy: A web-based genome analysis tool for experimentalists. *Curr Protoc Mol Biol*. 2010 Jan 1;89(SUPPL. 89):19.10.1-19.10.21. doi:10.1002/0471142727.MB1910S89;WEBSITE:WEBSITE:CURRENTPROTOCOLS;JOURNAL:JOURNAL:19343647;ISSUE:ISSUE:DOI PubMed PMID: 20069535.
38. Grote A, Hiller K, Scheer M, Münch R, Nörtemann B, Hempel DC, et al. JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. *Nucleic Acids Res*. 2005 Jul 1;33(suppl_2):W526–31. doi:10.1093/NAR/GKI376 PubMed PMID: 15980527.
39. Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neuböck R, Hofacker IL. The Vienna RNA Websuite. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jul 1;36(suppl_2):W70–4. doi:10.1093/NAR/GKN188 PubMed PMID: 18424795.
40. Ras-Carmona A, Lehmann AA, Lehmann P V., Reche PA. Prediction of B cell epitopes in proteins using a novel sequence similarity-based method. *Scientific Reports* 2022 12:1. 2022 Aug 12;12(1):13739-. doi:10.1038/s41598-022-18021-1 PubMed PMID: 35962028.

41. Elshafei SO, Mahmoud NA, Almofti YA. Immunoinformatics, molecular docking and dynamics simulation approaches unveil a multi epitope-based potent peptide vaccine candidate against avian leukosis virus. *Scientific Reports* 2024 14:1. 2024 Feb 4;14(1):2870-. doi:10.1038/s41598-024-53048-6 PubMed PMID: 38311642.
42. Deepthi V, Sasikumar A, Mohanakumar KP, Rajamma U. Computationally designed multi-epitope vaccine construct targeting the SARS-CoV-2 spike protein elicits robust immune responses in silico. *Scientific Reports* 2025 15:1. 2025 Mar 20;15(1):9562-. doi:10.1038/s41598-025-92956-z PubMed PMID: 40108271.
43. Zubair S, Parvaiz F, Abualait T, Al-Regaiey K, Anwar T, Zafar M, et al. Computational design of multi-epitope vaccine against Hepatitis C Virus infection using immunoinformatics techniques. *PLoS One*. 2025 Jan 1;20(1):e0317520. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0317520 PubMed PMID: 39854342.
44. Sanami S, Nazarian S, Ahmad S, Raeisi E, ul Qamar MT, Tahmasebian S, et al. In silico design and immunoinformatics analysis of a universal multi-epitope vaccine against monkeypox virus. *PLoS One*. 2023 May 1;18(5):e0286224. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0286224 PubMed PMID: 37220125.
45. Maleki A, Russo G, Parasiliti Palumbo GA, Pappalardo F. In silico design of recombinant multi-epitope vaccine against influenza A virus. *BMC Bioinformatics* 2022 22:14. 2022 Feb 2;22(14):617-. doi:10.1186/S12859-022-04581-6 PubMed PMID: 35109785.
46. Naveed M, Asim M, Ali A, Amjad S, Majeed MN, Sandrine MNY, et al. Multi-epitope vaccine against nucleoprotein and envelopment polyprotein of Batai orthobunyavirus using molecular docking and molecular dynamics studies. *Scientific Reports* 2026 16:1. 2026 Mar 4;16(1):8973-. doi:10.1038/S41598-026-41964-8 PubMed PMID: 41781575.
47. Rcheulishvili N, Mao J, Papukashvili D, Feng S, Liu C, Yang X, et al. Development of a Multi-Epitope Universal mRNA Vaccine Candidate for Monkeypox, Smallpox, and Vaccinia Viruses: Design and In Silico Analyses. *Viruses*. 2023 May 7;15(5):1120. doi:10.3390/V15051120/S1 PubMed PMID: 37243206.
48. Yang Z, Bogdan P, Nazarian S. An in silico deep learning approach to multi-epitope vaccine design: a SARS-CoV-2 case study. *Scientific Reports* 2021 11:1. 2021 Feb 5;11(1):3238-. doi:10.1038/s41598-021-81749-9 PubMed PMID: 33547334.
49. Noman A Al, Alhudhaibi AM, Sharma PD, Jannati SZ, Akhter T, Siddika S, et al. Computational Development of Multi-Epitope Reovirus Vaccine with Potent Predicted Binding to TLR2 and TLR4. *Pharmaceutics*. 2025 Nov 1;18(11):1632. doi:10.3390/PH18111632 PubMed PMID: 41304878.

50. Adiyaman R, McGuffin LJ. Methods for the Refinement of Protein Structure 3D Models. *Int J Mol Sci.* 2019 May 1;20(9):2301. doi:10.3390/IJMS20092301 PubMed PMID: 31075942.
51. Shafaghi M, Bahadori Z, Madanchi H, Ranjbar MM, Shabani AA, Mousavi SF. Immunoinformatics-aided design of a new multi-epitope vaccine adjuvanted with domain 4 of pneumolysin against *Streptococcus pneumoniae* strains. *BMC Bioinformatics* 2023 24:1. 2023 Feb 24;24(1):67-. doi:10.1186/S12859-023-05175-6 PubMed PMID: 36829109.
52. Shi J, Zhu Y, Yin Z, He Y, Li Y, Haimiti G, et al. In silico designed novel multi-epitope mRNA vaccines against *Brucella* by targeting extracellular protein BtuB and LptD. *Scientific Reports* 2024 14:1. 2024 Mar 27;14(1):7278-. doi:10.1038/s41598-024-57793-6 PubMed PMID: 38538674.
53. Mahdeen AA, Hossain I, Masum MHU, Islam S, Rabbi TMF. Designing novel multiepitope mRNA vaccine targeting Hendra virus (HeV): An integrative approach utilizing immunoinformatics, reverse vaccinology, and molecular dynamics simulation. *PLoS One.* 2024 Oct 1;19(10):e0312239. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0312239 PubMed PMID: 39441880.
54. Binet T, Padiolleau-Lefèvre S, Octave S, Avallé B, Maffucci I. Comparative Study of Single-stranded Oligonucleotides Secondary Structure Prediction Tools. *BMC Bioinformatics* 2023 24:1. 2023 Nov 8;24(1):422-. doi:10.1186/S12859-023-05532-5 PubMed PMID: 37940855.