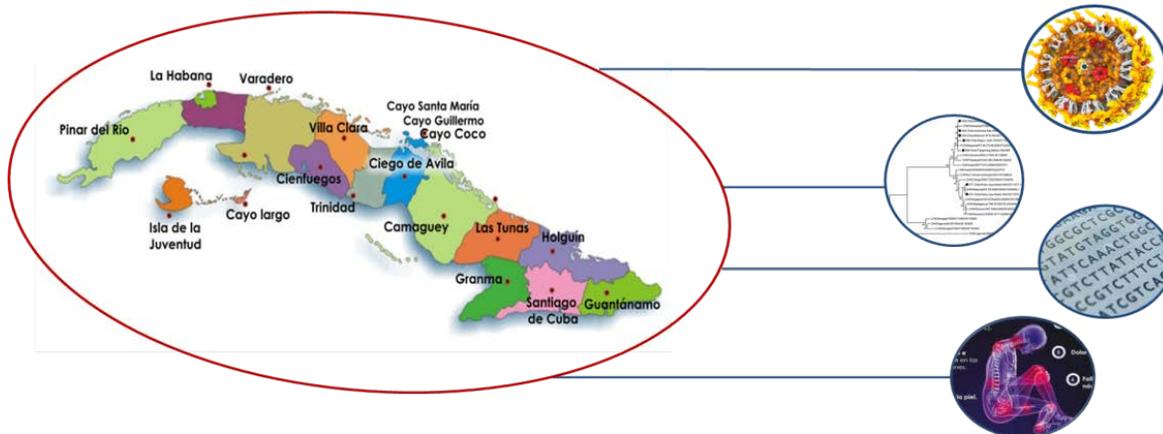


INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”

Epidemiología molecular de casos importados del virus Chikungunya en Cuba, 2014



Autora: Lic. Gisell Díaz Gutierrez

Tutora: Prof. Rosmari Rodríguez Roche, DrC

Asesora: Prof. María G. Guzmán Tirado, DrCs

Tesis en opción del Título de Máster en Virología

La Habana, 2017

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”

Epidemiología molecular de casos importados del virus Chikungunya en Cuba, 2014



Autora: Lic. Gisell Díaz Gutierrez

Tutora: Prof. Rosmari Rodríguez Roche, DrC

Asesora: Prof. María G. Guzmán Tirado, DrCs

Tesis en opción del Título de Máster en Virología

La Habana, 2017

Resumen

La Fiebre de Chikungunya es una enfermedad febril aguda causada por el virus Chikungunya (CHIKV), transmitida al hombre por los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. En 2013, se registró por primera vez la circulación de este virus en las Américas, lo cual expuso a Cuba a un nuevo contexto epidemiológico, ya que posee una población altamente susceptible, la presencia de los vectores principales y mantiene un amplio intercambio con países de la región. De esta forma, se hizo imprescindible instaurar la vigilancia molecular del CHIKV, para conocer los genotipos importados en Cuba, su relación genética, origen y posibles implicaciones epidemiológicas. La estrategia utilizada consistió en la amplificación de la región E1 del genoma viral, a partir de muestras de suero colectadas en 2014, positivas a CHIKV mediante la técnica de PCR en tiempo real. La secuenciación nucleotídica de los productos amplificados mediante la metodología Sanger, permitió la obtención de nueve secuencias provenientes de casos importados. El análisis filogenético se realizó con el programa MEGA 6, y el mismo evidenció que las secuencias obtenidas pertenecían al genotipo Asiático, introducido en las Américas desde el año 2013. La estrecha relación genética observada entre las secuencias de este estudio y otras de la región, constituyó un resultado esperado dado el contexto epidemiológico de la región. Asimismo, se detectaron mutaciones (V226A y K211E) relacionadas con una mejor capacidad replicativa del virus en el mosquito *Aedes aegypti*, el cual constituye el vector principal en Cuba, y con un posible mecanismo de escape a la acción de los anticuerpos neutralizantes.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OBJETIVOS	4
2. REVISION BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. DEFINICIÓN Y DISTRIBUCIÓN HISTÓRICA DE LA FIEBRE DE CHIKUNGUNYA	5
2.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VIRUS CHIKUNGUNYA	7
2.2.1. <i>Clasificación, estructura y organización del genoma</i>	7
2.2.2. <i>Replicación viral</i>	7
2.2.3. <i>Proteínas virales</i>	11
2.2.3.1. <i>Proteínas no estructurales</i>	11
2.2.3.2. <i>Proteínas estructurales</i>	13
2.2.4. <i>Ciclos de transmisión</i>	16
2.3. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS VECTORES DEL VIRUS CHIKUNGUNYA	17
2.3.1. <i>Replicación viral en el mosquito</i>	17
2.4. CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DEL VIRUS CHIKUNGUNYA	18
2.4.1. <i>Origen evolutivo y genotipos del virus Chikungunya</i>	18
2.4.2. <i>Mutaciones adaptativas que permiten una transmisión eficiente por el mosquito Aedes albopictus</i>	20
2.4.3. <i>Mecanismos y fuerzas evolutivas que actúan en el virus Chikungunya</i>	21
2.4.3.1. <i>Heterogeneidad poblacional y selección de los genomas más adecuados en el virus Chikungunya</i>	21
2.4.3.2. <i>Adaptación del virus Chikungunya cuando alterna entre dos hospederos diferentes</i>	22
2.4.3.3. <i>Diversidad intrahospedero y cuellos de botellas en el virus Chikungunya</i>	23
2.5. EPIDEMIOLOGÍA DEL VIRUS CHIKUNGUNYA EN LAS AMÉRICAS	25
2.5.1. <i>Epidemiología del virus Chikungunya en Cuba</i>	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. MUESTRAS EMPLEADAS	27
3.2. EXTRACCIÓN DEL ARN VIRAL DE LOS SUEROS SELECCIONADOS	28
3.3. AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE LA GLICOPROTEÍNA DE LA ENVOLTURA E1	29
3.4. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA RT- PCR	30
3.5. REACCIÓN DE SECUENCIA	30
3.6. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN DE SECUENCIA	31
3.7. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS	31
3.8. CONSIDERACIONES ÉTICAS	32
4. RESULTADOS	33
4.1. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS SECUENCIAS DE CHIKV OBTENIDAS	33
4.2. MUTACIONES EN LA REGIÓN E1 DEL CHIKV CON IMPACTO EN LA EPIDEMIOLOGÍA DE LA CHIKF	35
5. DISCUSIÓN	39
6. CONCLUSIONES	44
7. RECOMENDACIONES	45
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
9. ANEXOS	67

1. Introducción

La Fiebre de Chikungunya (CHIKF, del inglés chikungunya fever) es una enfermedad febril aguda, que inicialmente se registró en el este de África, y que a partir del 2004 se expandió por las Islas del Océano Índico, muchas regiones del sudeste de Asia y las Américas ⁽¹⁾. Esta es causada por el virus Chikungunya (CHIKV), el cual pertenece al género *Alfavirus*, familia *Togaviridae* y se transmite fundamentalmente por los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* ^(2, 3). El CHIKV se puede transmitir mediante ciclos selváticos (enzoóticos) que incluyen mosquitos arbóreos y primates no humanos, o a través de un ciclo urbano donde los mosquitos peridomésticos transmiten la enfermedad a los humanos ⁽⁴⁾.

Los síntomas primarios de la infección por CHIKV son fiebre alta (>38.5°C) y dolor intenso en las articulaciones. Dichos síntomas desaparecen usualmente entre una o dos semanas luego del comienzo de la fiebre, pero una gran proporción de pacientes continúan padeciendo de artralgia y artritis de forma crónica y persistente por varios años ⁽⁵⁾. Actualmente, esta enfermedad no cuenta con una vacuna o una terapia antiviral disponible, por lo que, en el manejo del paciente solo se usan analgésicos y antiinflamatorios para reducir el dolor ⁽⁶⁾.

El CHIKV es un virus envuelto que contiene una cadena positiva de ARN de aproximadamente 11,7 Kb, la cual codifica para cuatro proteínas no estructurales (nsP1- 4) y tres proteínas estructurales principales (cápside y glicoproteínas de la envoltura E1 y E2). Las proteínas nsP son las responsables de la replicación del ARN y de la modulación de la respuesta celular antiviral ⁽⁷⁾, mientras que las proteínas estructurales tienen un papel importante en el ciclo replicativo del CHIKV ⁽⁸⁾ (Anexo 1).

Los estudios filogenéticos realizados a nivel de genoma completo han mostrado la existencia de tres genotipos para el CHIKV: genotipo ECSA (del inglés East-Central-South-African), genotipo Africano Occidental y genotipo Asiático, y dentro del genotipo ECSA existe un linaje denominado Océano Índico (IOL, del inglés Indian Ocean Lineage) ⁽⁹⁾. Los genotipos ECSA y Africano Occidental son endémicos y causan epidemias en ciclos selváticos en África sub-sahariana,

mientras que el genotipo Asiático circula en ciclos de transmisión urbanos en el sudeste de Asia. Por otra parte, el linaje IOL se ha asociado como el responsable de las grandes epidemias ocurridas en las Islas del Océano Índico (principalmente en la Isla francesa La Reunión) y Asia entre 2005 y 2011 ⁽¹⁰⁾. Durante la epidemia en La Reunión se demostró la existencia de cambios nucleotídicos en las cepas del linaje IOL, que propiciaron una mejor adaptación del virus en el mosquito *Aedes albopictus* ⁽¹¹⁾. Por lo tanto, esta nueva habilidad para usar a *Aedes albopictus* como un vector eficiente tuvo grandes implicaciones epidemiológicas ya que le permitió a este virus la propagación hacia regiones templadas donde *Aedes aegypti* no habita de forma natural.

El CHIKV se aisló por primera vez luego de la epidemia ocurrida en las costas de Mawia, Makondo y Rondo (actual Tanzania) durante 1952-1953 ⁽¹²⁾. Desde entonces, se han documentado brotes en África y Asia, incluyendo el subcontinente Indio ⁽¹³⁾. En 2005, el CHIKV emergió desde el este de África causando una explosiva epidemia urbana en importantes destinos turísticos de las Islas del Océano Índico ⁽¹⁴⁾. A finales de 2005 este virus se propagó en el subcontinente Indio afectando a millones de personas ⁽¹⁵⁾. A partir de 2006, dicho virus ha sido importado en Europa y en el Hemisferio Occidental (incluyendo EUA) a través de muchos viajeros infectados, tal es el caso de una epidemia ocurrida en Italia, la cual se inició por un viajero procedente de India ⁽¹⁶⁾.

En diciembre de 2013, se reportó por primera vez la presencia de CHIKV en las Américas, particularmente del genotipo Asiático, en la Isla caribeña de San Martín ⁽¹⁷⁾. Posteriormente, este virus se propagó hacia otras regiones del Caribe, América Central y Suramérica ⁽¹⁸⁾, reportándose en algunas zonas de Brasil transmisión autóctona ⁽¹⁹⁾. Hasta octubre de 2015, en las Américas se habían reportado alrededor de 1 700 000 sospechosos, confirmándose transmisiones autóctonas en 23 territorios de dicha región ^(20, 21).

Cuba al pertenecer a la Américas, no estuvo exenta de esta enfermedad, sobre todo porque poseía una población altamente susceptible y la presencia de los principales vectores que transmiten el CHIKV. Además, el amplio intercambio de la

Isla con los países de la región facilitó la ocurrencia de casos importados del virus, que junto a la circulación existente de los virus del dengue, se generó una situación epidemiológica desfavorable en Cuba. En este contexto, se hizo necesario llevar a cabo la Vigilancia Molecular del CHIKV en Cuba, principalmente para conocer los genotipos importados, su relación genética, posible origen y los impactos que tendrían en la dinámica de transmisión.

1.1. Objetivos

Objetivo general

- Describir la epidemiología molecular del virus Chikungunya en Cuba durante el año 2014.

Objetivos específicos:

- Establecer el origen y la relación genética de los virus Chikungunya circulantes en Cuba durante el período de estudio, mediante análisis filogenéticos.
- Identificar en las cepas cubanas cambios aminoacídicos con posible impacto en la epidemiología de la enfermedad durante el período de estudio.

2. Revisión bibliográfica

2.1. Definición y distribución histórica de la Fiebre de Chikungunya

La CHIKF es una enfermedad febril aguda que es transmitida al hombre principalmente por los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* ^(2, 3). Esta enfermedad no cuenta con una vacuna o terapia antiviral disponible, por lo que, el manejo de los paciente solo se centra en la administración de analgésicos y antiinflamatorios para mitigar los síntomas ⁽⁶⁾.

Desde hace siglos existen varios documentos descriptivos de las epidemias ocurridas en diversas regiones del mundo y que son compatibles con las manifestaciones clínicas de la CHIKF ^(22, 23). Sin embargo, no es hasta la epidemia ocurrida entre 1952-1953 en el suroeste de Tanzania que se identificó por primera vez al CHIKV como agente causal ⁽²⁴⁾. El término Chikungunya proviene del lenguaje Makondo, una lengua hablada por las personas de Tanzania, y que significa “encorvarse”, el cual está referido a la postura que adopta el paciente debido a los fuertes dolores en las articulaciones, síntoma característico de esta enfermedad ⁽¹²⁾.

Poco después de su descubrimiento en el este de África, se detectaron varias infecciones humanas en Uganda, donde el mosquito arbóreo *Aedes africanus* estaba naturalmente infectado con el CHIKV ⁽²⁵⁾. Este hecho constituyó la primera evidencia de su transmisión a través de un ciclo selvático. Posteriormente, el CHIKV se ha mantenido circulando en un ciclo enzoótico entre primates no humanos y mosquitos arbóreos en África ⁽²⁶⁾.

La primera epidemia ocurrida en Asia se evidenció en 1958 en Tailandia ⁽²⁷⁾, donde el CHIKV se ha mantenido históricamente en un ciclo urbano, transmitiéndose a los humanos a través del mosquito *Aedes aegypti*, y en menor medida por el *Aedes albopictus* ⁽²⁸⁾.

En el año 2004, la epidemiología de la CHIKF mostró un cambio dramático con la emergencia de una nueva cepa epidémica en el este de África, específicamente en las costas de Kenia ^(29, 30). En el 2005, el virus se propagó hacia las islas del Océano Índico, donde ocurrieron las mayores epidemias de CHIKF, siendo la

epidemia de la isla francesa La Reunión la mejor estudiada, con un índice de ataque global de aproximadamente 1/3, es decir, un tercio de la población fue infectada ^(31, 32). Los estudios moleculares realizados posteriormente, evidenciaron la circulación de cepas pertenecientes a un nuevo linaje, denominado Océano Índico, por su detección inicial en dicha área geográfica ⁽⁴⁾. Este nuevo linaje presentaba ventajas adaptativas para una transmisión más eficiente del CHIKV en el mosquito *Aedes albopictus* ⁽³³⁾.

Dichas ventajas adaptativas propiciaron la ocurrencia de casos importados en regiones donde anteriormente no se había detectado la circulación del CHIKV, tal es el caso de Francia ⁽³⁴⁻³⁶⁾, Alemania ⁽³⁷⁾, Suiza ⁽³⁸⁾ y Noruega ⁽³⁹⁾. De manera alarmante, en el año 2006 se registraron más de 1000 casos importados en Europa, siendo Italia y Francia los países con mayor riesgo debido al número de visitantes que reciben desde regiones con transmisión activa, principalmente de visitantes virémicos procedentes de la India ⁽⁴⁰⁾. Por consiguiente, en el año 2007 se evidencian los primeros casos autóctonos en Europa, fundamentalmente en Italia, donde la epidemia se inició a partir de un individuo que regresaba a Europa luego de un viaje a la India ⁽⁴¹⁾. Posteriormente, en septiembre de 2010 se registró la transmisión autóctona de CHIKV en el suroeste de Francia, con dos casos confirmados ^(36, 42).

Entre el 2006 y 2011, a pesar de contar con abundantes poblaciones de mosquitos *Aedes*, solo se detectaron casos importados de CHIKV en Norteamérica, Canadá, Guyana Francesa, Brasil, Martinica, Guadalupe, Nueva Caledonia y Australia ⁽⁴³⁻⁴⁵⁾. Esto pudo ser debido en parte a la vigilancia activa que se le realizó a cada uno de estos casos importados o a que la dispersión del virus en la población fue impedida por razones entomológicas o ecológicas desconocidas ⁽⁴⁶⁾. Sin embargo, en octubre de 2013 se detecta por primera vez la circulación local del CHIKV en las Américas, inicialmente en la isla de San Martín y posteriormente en el resto de los países del Caribe, en todos los de Centroamérica y en la mayoría de los de Suramérica ⁽⁴⁷⁾.

2.2. Características generales del virus Chikungunya

2.2.1. Clasificación, estructura y organización del genoma

El CHIKV es un virus transmitido por artrópodos (Arbovirus) que pertenece al género *Alfavirus*, familia *Togaviridae* ⁽⁴⁸⁾. Este virus es uno de los miembros del complejo antigénico virus Semliki Forest, junto a otros alfavirus que se encuentran en África (virus O'nyong-nyong), en Suramérica (virus Mayaro) y en la región Australia/Oceanía (virus Ross River), los cuales causan artropatía aguda en humanos ^(49, 50).

El virión tiene una cápside icosaédrica rodeada por una membrana lipídica y un diámetro de 60-70 nm a pH neutro. Es sensible a la desecación y a las temperaturas mayores a los 58 °C ^(51, 52).

El genoma viral está compuesto por una sola cadena de ARN y de polaridad positiva con aproximadamente 12 Kb ⁽⁵²⁾. Dicho genoma consiste de una región no traducible 5' metilada seguida de dos marcos abiertos de lectura independientes (ORFs, del inglés Open-Reading Frames), y de una señal de poliadenilación en el extremo 3'. El ORF 5' es traducido a partir de un ARN genómico y codifica para 4 proteínas no estructurales (nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4), las cuales están involucradas en la replicación viral ⁽⁵³⁾. Por otra parte, el ORF 3' es traducido a partir de un ARN subgenómico 26S, el cual codifica para una poliproteína que es procesada en proteína de la cápside (C), dos glicoproteínas de la envoltura (E1 y E2) y dos péptidos pequeños (E3 y 6k) ^(8, 54). Dichas proteínas estructurales son necesarias para la formación de la cápside y envoltura viral ^(7, 55).

2.2.2. Replicación viral

El ciclo replicativo del CHIKV es rápido ya que tarda alrededor de 4 horas ^(51, 52). El mismo ocurre en el citoplasma tanto de las células de vertebrados como en las de insectos, y en estrecha relación con el aparato de Golgi ⁽⁴⁶⁾.

El primer paso en la infección es la unión del virus a un receptor celular en el hospedero ^(56, 57), el cual debe ser conservado entre las especies que infecta, porque el CHIKV es capaz de replicarse en un amplio rango de tipos celulares tanto *in vivo* como *in vitro*. Dicha unión al receptor es facilitada por la glicoproteína

E2^(58, 59), principalmente por los dominios A y B, los cuales poseen sitios probables de unión al receptor^(8, 60).

Los Alfavirus son generalmente internalizados a través del proceso de endocitosis mediado por vesículas recubiertas de clatrina^(61, 62), el cual es un proceso constitutivo dentro de las células de mamífero^(63, 64), y consiste en una invaginación e incisión de la membrana para formar una vesícula recubierta de clatrina, la cual contiene en su interior al virus⁽⁶⁵⁾. Posteriormente, las vesículas son transportadas al interior de la célula, donde luego las moléculas de clatrina se disocian y el virus es liberado en los endosomas. El ambiente a bajo pH de los endosomas propicia la ocurrencia de cambios conformacionales dentro de las glicoproteínas E1/E2, lo cual permite la fusión de la membrana viral con la membrana endosomal⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾.

Luego de la endocitosis, el virus es liberado en los endosomas tempranos, donde aproximadamente 40% de las partículas se fusionan dentro de los 10 segundos posteriores a la liberación en los endosomas. Más 95% de todos los eventos de fusión del CHIKV ocurren dentro de los compartimentos de los endosomas tempranos⁽⁶⁹⁾. Esto se encuentra en correspondencia con lo evidenciado por otros estudios, los cuales muestran que la infección por el CHIKV es dependiente de los endosomas tempranos pero no de los endosomas tardíos⁽⁷⁰⁾. Sin embargo, en las células de mosquito, la infección del CHIKV es dependiente de la integridad de los endosomas positivos a Rab5 y Rab7, lo cual es indicativo de la ocurrencia de fusión en los endosomas tardíos⁽⁷¹⁾. Una posible explicación a esta discrepancia puede ser la existencia de una variabilidad en el pH endosomal entre las células^(69, 72).

Los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de fusión de membranas se han estudiado bien en los virus Semliki Forest (SFV) y Sindbis (SINV). Dichos estudios sugieren que estos mecanismos moleculares son altamente conservados entre los Alfavirus^(8, 73). Por ejemplo, al igual que el SFV y SINV⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾, el CHIKV se puede fusionar con liposomas libres de receptor, lo cual indica que la fusión es independiente de un receptor proteico^(69, 72).

La desestabilización del heterodímero E2/E1 de los Alfavirus se desencadena una vez que el virus se expone a pH ligeramente ácido en los endosomas ^(8, 77). Las histidinas juegan un papel crítico en este proceso ^(78, 79), y en tal sentido, se han identificado una serie de histidinas altamente conservadas dentro de las glicoproteínas de la envoltura del CHIKV, que controlan los cambios conformacionales dependientes del pH durante la fusión ⁽⁷³⁾. Una vez que las interacciones E2/E1 se debilitan, el dominio B de E2 se mueve para dejar expuesto el lazo de fusión presente en E1 ^(8, 60, 80). A partir de ese momento, la proteína E1 adopta una forma extendida y el lazo de fusión hidrofóbico se inserta en la membrana diana ⁽⁸¹⁻⁸³⁾. Para el caso del SFV, esta interacción se produce a pH ácido y dependiente de colesterol ^(81, 84, 85), donde la presencia de esfingomielinas estimula fuertemente la unión de E1 mediante moléculas de colesterol ^(85, 86). Esas interacciones lipídicas son similares para el CHIKV, donde la presencia de colesterol y esfingomielina en la membrana diana potencian en gran medida la fusión del virus ^(69, 72).

Cuando el péptido fusión se inserta en la membrana diana, E2 continúa en asociación con las moléculas E1, y luego con la disminución del pH, las moléculas de E2 se disocian completamente, permitiendo así, la trimerización de E1 ^(83, 87). Durante esta trimerización es necesario un residuo de histidina altamente conservado y localizado en la posición 3 de E1, el cual actúa como un regulador de la trimerización inducida por pH ácido ^(73, 88, 89). El primer paso en la trimerización de E1 involucra la formación de un núcleo entre DI y DII, el cual es dependiente de pH ácido y de la presencia de colesterol y esfingomielina en la membrana diana ^(81, 85, 90, 91). Luego de la formación y estabilización del núcleo, el dominio III se pliega independientemente del pH hacia el núcleo para formar un homotrímero tipo horquilla ^(81, 90). Este proceso permite acercar las dos membranas opuestas, para luego fusionarlas. Posteriormente, se forma un poro de fusión que libera la nucleocápside, y luego el genoma viral en el citosol de la célula hospedera ^(81, 92). La liberación de la nucleocápside ocurre inmediatamente luego de su penetración en el citoplasma (aproximadamente 1 minuto) ⁽⁹³⁾, donde la

proteína de la cápside interactúa con el ARN ribosomal 60S para facilitar dicha liberación ⁽⁹³⁻⁹⁵⁾.

Luego de la entrada del virus a la célula, el ARN viral de polaridad positiva actúa directamente como ARNm, siendo traducido posteriormente a partir de dos ORFs para generar la poliproteína no estructural (P1234) y estructural ⁽⁹⁴⁾. El proceso de traducción comienza en el extremo 5' para generar las proteínas no estructurales, donde la poliproteína P1234 es cortada para así obtener la poliproteína P123 y la nsP4 ^(96, 97). La poliproteína P123 y la nsP4 forman un complejo inestable de replicación inicial, el cual permite sintetizar ARN de polaridad negativa ^(51, 98-100). Los productos de la poliproteína: nsP1, P23 y nsP4 forman un complejo de replicación dentro de las vacuolas citopáticas inducidas por virus, las cuales son activas en la síntesis de la cadena de ARN de polaridad negativa y del ARN genómico, pero no del ARN subgenómico ⁽¹⁰⁰⁻¹⁰⁴⁾. Luego del corte completo en nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4, la síntesis de la cadena de ARN de polaridad negativa es inactivada y el complejo de replicación se vuelve más estable y cambia hacia la síntesis del ARN de polaridad positiva y subgenómico ^(98, 99).

El corte de la poliproteína estructural ocurre cotraducionalmente, comenzando con el clivaje autoproteolítico de la proteína de la cápside ⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾, donde esta proteína queda disponible para asociarse con moléculas de ARN recién sintetizadas ya que es capaz de reconocer señales de empaquetamiento presentes en la mitad 5' del genoma. De esta manera, solo el ARN genómico es empaquetado en las nucleocápsides ^(108, 109).

Durante la síntesis, el precursor de la glicoproteína E2 (PE2) y las glicoproteínas E1 interactúan entre sí para formar heterodímeros ⁽¹¹⁰⁻¹¹²⁾, los cuales se transportan desde el retículo endoplasmático hacia la superficie celular a través de su paso por el complejo de Golgi ⁽¹¹³⁻¹¹⁵⁾. En un estado más tardío del transporte, el precursor PE2 es cortado en su dominio luminal por proteasas del hospedero tipo furinas para generar las proteínas maduras E2 y E3 ^(113, 115, 116). Este corte induce un cambio conformacional que debilita la interacción E1-E2 ⁽⁷⁷⁾, lo cual prepara al péptido fusión para que se active una vez expuesto a pH ácido ⁽¹¹⁷⁾. Las

interacciones entre la proteína de la cápside y el dominio citoplasmático de la proteína E2 dirigen el proceso de ensamblaje, donde los heterodímeros E2/E1 forman una envoltura alrededor la nucleocápside ⁽¹¹⁸⁻¹²⁰⁾. Durante la liberación de las partículas virales, los viriones adquieren una membrana bicapa derivada de la membrana plasmática de las células del hospedero ⁽¹²¹⁻¹²⁴⁾.

2.2.3. Proteínas virales

2.2.3.1. Proteínas no estructurales

➤ Proteína no estructural 1 (nsP1)

La nsP1 es una proteína viral de aproximadamente 60 kDa y tiene dos funciones principales durante el proceso replicativo. Su dominio N-terminal contiene motivos Metiltransferasa (MTase) que dirigen la reacción de caperuza ⁽¹²⁵⁻¹²⁷⁾. Luego del dominio N-terminal existen regiones en tándem que permiten la asociación de la proteína nsP1 con las membranas del hospedero, principalmente por la palmitoilación (adición de un ácido graso para formar una proteína N-acilada) y por una hélice anfipática que actúan como anclaje para dicha unión ⁽¹²⁸⁻¹³⁰⁾. Durante la replicación, la proteína nsP1 es responsable por la adición de la caperuza 5' en el ARN genómico y subgenómico luego de la preparación de las moléculas de ARN nacientes, debido a la actividad trifosfatasa-positiva de la proteína nsP2 ⁽¹³¹⁾. También se conoce que la proteína nsP1 es importante para la síntesis de las moléculas de ARN de polaridad negativa ^(132, 133).

➤ Proteína no estructural 2 (nsP2)

La nsP2 es una proteína viral de aproximadamente 90 kDa, la cual tiene funciones importantes durante la infección con el CHIKV. En células infectadas esta proteína se puede localizar tanto en el citoplasma como en el núcleo, donde actúa en múltiples actividades como son la de inducir el cese de la transcripción celular e inhibir la respuesta antiviral ^(134, 135). En el contexto de la replicación viral, nsP2 muestra tres importantes funciones: actuando como una helicasa, una trifosfatasa y una proteasa. Además de estos roles, nsP2 está involucrada íntimamente en la supresión de la síntesis macromolecular en el hospedero ⁽¹³⁵⁻¹³⁷⁾.

La proteína nsP2 actúa como una helicasa, la cual funciona como una proteína motor que utiliza la energía derivada de la hidrólisis de dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato) para desenrollar las estructuras secundarias del ARN formadas durante la replicación viral, en sus componente de simple cadena ⁽¹³⁸⁻¹⁴⁰⁾. La actividad helicasa de nsP2 es dependiente de la actividad NTPasa del dominio N-terminal ⁽¹⁴¹⁾. Una segunda actividad de nsP2 que específicamente participa en la replicación viral es la actividad RTPasa con el dominio N-terminal. Dicha actividad es responsable de la eliminación de los C-fosfatos del extremo 5' en las moléculas de ARN nacientes de polaridad positiva, para así obtener un difosfato en ese extremo, lo cual permite que el ARN actúe como un sustrato para la reacción de caperuza mediada por nsP1 ⁽¹³¹⁾. El dominio C-terminal de nsP2 fue identificado genéticamente como la proteasa responsable del procesamiento de la poliproteína no estructural ^(132, 142). Esta función es absolutamente esencial para la replicación del virus ⁽¹⁴³⁾.

➤ **Proteína no estructural 3 (nsP3)**

Históricamente, la importancia funcional de la proteína nsP3 (de aproximadamente 60 kDa) ha sido menos clara y sujeta de una examinación extensiva. La nsP3 es necesaria para la síntesis del ARN, ya que mutaciones en ella han mostrado defectos en la iniciación de la síntesis del ARN de polaridad negativa y subgenómico ^(104, 144, 145). La proteína nsP3 tiene tres dominios: el macrodominio, el dominio único de Alfavirus (AUD) y la región hipervariable. La región N-terminal se conserva entre los Alfavirus y contiene al macrodominio ^(146, 147). El AUD se localiza en la porción central de nsP3, el cual es una región que comparte una fuerte secuencia de homología entre los Alfavirus. Las manipulaciones genéticas realizadas en este dominio han resultado en defectos en la síntesis de ARN de polaridad negativa y subgenómico, en el procesamiento de poliproteínas y en la neurovirulencia ⁽¹⁴⁸⁻¹⁵⁰⁾, pero el mecanismo de estos efectos aún se desconoce. El dominio C-terminal de nsP3 se caracteriza por ser hipervariable, y evidencia una conservación pobre entre los Alfavirus en término de longitud y composición de las secuencias ⁽¹⁵¹⁾. Análisis mutacionales, incluido estudios de deleciones y duplicaciones, han indicado que la región hipervariable es grandemente tolerante

a cambios significativos en este dominio en modelos de cultivo de tejido, sin embargo, estas mutaciones a menudo resultan en la atenuación de la virulencia en ratones ^(148, 150, 152, 153). La proteína nsP3 se conoce por ser multifosforilada ^(154, 155) y los diferentes estados de fosforilación hacen que el dominio hipervariable sea responsable de la formación de complejos especie específica-virus en las células infectadas ⁽¹⁵⁶⁾. Lo anterior sugiere que el dominio hipervariable puede ser un determinante significativo en la patogénesis mediante su interacción con los factores específicos al tipo de célula ⁽¹⁵⁷⁾.

➤ **Proteína no estructural 4 (nsP4)**

Mientras todas las proteínas no estructurales del CHIKV están involucradas en la síntesis del ARN viral, la proteína nsP4 (de aproximadamente 70 kDa) es la única responsable de las propiedades sintetizadoras del ARN del complejo replicasa viral. Dicha proteína contiene el dominio y los motivos del núcleo de la ARN polimerasa ARN-dependiente (RdRp). Aproximadamente 100 residuos del N-terminal son únicos en esta polimerasa, mientras que los 500 residuos restantes evidencian la típica estructura de una RdRp con los dominios dedos, palma y pulgar ^(158, 159). Debido a la presencia de los motivos anteriores y el mapeo de mutantes deficientes en la síntesis de ARN, la proteína viral nsP4 se propuso como una RdRd ⁽¹³²⁾. Por otra parte, los mutantes truncados en el extremo N-terminal han demostrado actividad adeniltransferasa terminal, lo cual indica un posible papel en la poliadenilación ⁽¹⁵⁹⁾. A pesar que la proteína nsP4 es la única proteína viral con actividad RpRd, se conoce que la replicación del CHIKV requiere de la suma de las actividades coordinadas entre las proteínas no estructurales ⁽¹⁵⁷⁾.

2.2.3.2. Proteínas estructurales

➤ **Glicoproteína de la envoltura 1 (E1)**

La membrana viral está cubierta por un enrejado proteico altamente organizado de trímeros del heterodímero E2/E1 ^(160, 161), donde E2 media la unión al receptor, mientras que E1 es una proteína de fusión de membrana clase II ^(161, 162). El ectodominio de E1 está compuesto de tres dominios: el dominio central I (DI), el

dominio II (DII) que contiene el lazo de fusión hidrofóbico, y el dominio III (DIII), el cual es un dominio tipo inmunoglobulina que se conecta al dominio transmembrana mediante una región tallo de 28 residuos ^(8, 60, 78, 163).

Durante la fusión, la proteína E1 se inserta en la membrana diana a través del lazo de fusión, lo cual forma un trímero central compuesto de los DI y DII. Además, esta proteína se pliega en una conformación tipo horquilla, donde el DIII y la región tallo se empaquetan en dirección contraria al trímero central ⁽⁸¹⁾. Esta reacción de plegamiento mueve al dominio transmembrana y al lazo de fusión hacia el mismo lado del trímero, lo cual permite el acercamiento de la membrana diana con la viral, para así, comenzar el proceso de fusión de membrana ^(164, 165).

Existen numerosos estudios que reflejan el papel de esta glicoproteína viral en la respuesta inmune que desencadena el hospedero. Tal es el caso de un estudio que demuestra como el CHIKV afecta la regulación del NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) en las células sinoviales como parte de una posible estrategia para facilitar la infección ⁽¹⁶⁶⁾. Además, en otro estudio más reciente se encontró a la proteína E1 en estrecha unión con la proteína THBS1, la cual es capaz de bloquear la actividad del NF- κ B mediante la unión con su receptor ⁽¹⁶⁷⁾. También se ha encontrado a dicha proteína viral interactuando con varias moléculas capaces de acelerar la ubiquitinación y degradación de las subunidades de NF- κ B ⁽¹⁶⁸⁾. Por lo tanto, estos resultados sugieren la posibilidad de que E1 pudiera estar involucrada en la regulación de la respuesta inmune del hospedero ⁽¹⁶⁹⁾.

El primer análisis filogenético del CHIKV utilizó secuencias nucleotídicas parciales del gen de la glicoproteína E1 de 18 cepas, y el mismo reveló la existencia de dos genotipos principales: uno que incluía a aislamientos de África Occidental y otro que agrupaba a todos los aislamientos de Asia y del sur y este de África ⁽⁴⁹⁾.

➤ **Glicoproteína de la envoltura 2 (E2)**

La glicoproteína E2 es una proteína transmembrana que tiene dos o tres carbohidratos unidos a su extremo N-terminal y contiene los epítopes más

importantes para los anticuerpos neutralizantes. E2 se organiza en tres dominios tipo inmunoglobulina (A, B y C). El dominio A (residuos 1-132) se encuentra en el centro y parte superior del heterotrímero, y tiene los sitios de unión al receptor y a los anticuerpos neutralizantes. Por otra parte, el dominio B está en la punta de la proteína, mientras que el dominio C se ubica hacia la membrana viral, lo cual hace que este dominio no sea accesible para los anticuerpos ^(8, 60). La porción intracitoplasmática interactúa con la cápside y tiene un segundo tramo de aminoácidos hidrofóbicos y sitios de miristoilación que unen a dicha proteína con la superficie interna de la membrana. El dominio B se localiza específicamente en la membrana de la parte distal y forma la punta de la proteína E2. Dicho dominio se conecta con el dominio A a través de un largo conector barril- β ⁽⁸⁾. Por otra parte, un epítoto lineal localizado en el extremo N-terminal de E2 (residuos 1-12) ha sido descrito como diana en la respuesta temprana de anticuerpos IgG neutralizantes en pacientes infectados con CHIKV, ratones y monos ^(170, 171). Este epítoto se ubica próximo a un sitio de corte tipo furina y es expuesto predominantemente en la superficie del virus formando un tallo ⁽¹⁷²⁾.

➤ **Proteína de la cápside (C)**

La proteína de la cápside es multifuncional y juega un papel crucial en el ensamblaje de los Alfavirus. Dicha proteína es capaz de autoclirse antes del reconocimiento y unión del ARN genómico ⁽¹⁷³⁾. Además de su papel principal en la formación de la nucleocápside, la proteína de la cápside ha mostrado funciones regulatorias y/o inhibitorias en relación a la replicación viral, así como en la síntesis de proteínas virales y del hospedero ^(174, 175). Esta proteína viral se organiza en tres regiones separadas (I, II y III) ⁽¹⁷⁶⁾, donde el dominio N-terminal no conservado tiene un alto grado de cargas positivas implicadas en la unión no específica al ARN, mientras que el conservado dominio C-terminal contiene una serin-proteasa tipo quimotripsina globular ⁽¹⁷⁷⁾. Con relación a lo anterior, un estudio reciente realizado por Thomas y colaboradores identificó señales de exportación y localización nuclear dentro de la proteína C; sin embargo, su papel funcional aún se desconoce ⁽¹⁷⁸⁾.

➤ **Glicoproteína de la envoltura 3 (E3)**

La E3 es una glicoproteína pequeña rica en cisteínas que sirve como secuencia señal para el precursor pE2, el cual contiene a la proteína viral E3 y E2. Además, dicha proteína está involucrada en el correcto plegamiento de E2, y es necesaria para la heterodimerización de E2 con E1. Como parte del heterodímero precursor pE2E1, E3 impide la activación prematura de E1⁽⁸⁾. También esta proteína viral es cortada de E2 por una furina en el trans-Golgi, lo cual hace que permanezca asociada con la punta del virión bajo condiciones ácidas, y se libera usualmente cuando los viriones salen de la superficie celular⁽¹⁷⁹⁾.

➤ **Proteína 6K**

La proteína viral 6K sirve como un péptido señal para E1, y es cortada de E1 y E2 por una peptidasa señal. Esta proteína es importante para la salida de los viriones a través de la superficie celular, donde se incorporan cantidades pequeñas de esta proteína en el virus⁽¹⁷⁹⁾.

2.2.4. Ciclos de transmisión

Al igual que el virus de la Fiebre Amarilla, el CHIKV emergió a partir de un ciclo enzoótico, mantenido entre primates no humanos y mosquitos africanos selváticos como el *Aedes furcifer*, *Aedes taylori*, *Aedes africanus*, *Aedes luteocephalus* y *Aedes neoafricanus*⁽¹⁸⁰⁾. El CHIKV es endémico en países de África Subsahariana, India y el sudeste de Asia. El virus circula en África en un ciclo enzoótico entre mosquitos cercanos a viviendas ubicadas en el bosque y primates no humanos⁽²⁶⁾. Los estudios filogenéticos han revelado la existencia de dos linajes enzoóticos en África: el linaje Occidental y el ECSA⁽⁴⁾. En Asia, donde el primer brote se registró en 1958 en Tailandia, el CHIKV se ha mantenido históricamente en un ciclo urbano, transmitido a los humanos a través del mosquito *Aedes aegypti*, y en menor extensión, por el *Aedes albopictus*⁽²⁸⁾.

Los seres humanos sirven como principales reservorios del CHIKV durante los períodos epidémicos, mientras que en África algunos animales (monos, reodores o

aves) constituyen el reservorio viral durante los períodos no epidémicos, y de esta manera se mantiene el virus en la naturaleza en ausencia de casos en humanos (181, 182).

2.3. Características generales de los vectores del virus Chikungunya

Aunque existe un amplio rango de especies de *Aedes* que pueden transmitir el CHIKV en África (180), Asia y el Océano Índico, los principales vectores de este virus son el *Aedes aegypti* y el *Aedes albopictus* (3).

El comportamiento y ecología del *Aedes aegypti* son ideales para la transmisión epidémica del CHIKV, ya que las hembras adultas prefieren alimentarse de humanos, e incluso en ocasiones pueden hacer varias tomas de sangre durante un solo ciclo gonotrófico. También las hembras de *Aedes aegypti* ovipositan en recipientes artificiales y residen dentro de las casas, lo cual hace que tengan acceso total a los humanos (183).

Por otra parte, el mosquito *Aedes albopictus* tiene una distribución geográfica más amplia y puede sobrevivir tanto en ambientes rurales como urbanos. Además tiene una vida relativa larga, perdurando de 4 a 8 semanas, y con un rango de vuelo de 400-600 metros (3). Todas estas cualidades han permitido que *Aedes albopictus* no sólo se convierta en un importante vector para el CHIKV, sino también para otros Arbovirus como los virus del dengue (184).

2.3.1. Replicación viral en el mosquito

El CHIKV infecta a vertebrados e invertebrados, y por ese motivo, el virus ha desarrollado la habilidad para modular diversos ambientes intracelulares y diferentes tipos de respuestas antivirales. La persistencia de la infección viral en un mosquito *Aedes* requiere del paso exitoso entre los diversos tejidos, los cuales se imponen como barrera para los viriones, y de la modulación de la respuesta inmune innata (185, 186).

Lo primero que ocurre durante el proceso infeccioso es que el mosquito ingiere sangre virémica, y luego los virus inician la infección en el intestino medio, el cual

es un órgano inmunocompetente que representa la primera y mayor barrera para el CHIKV ⁽¹⁸⁷⁾. Luego que la replicación viral ocurre en el epitelio del intestino medio, los virus pasan a través de la lámina basal del epitelio del intestino, lo cual hace que los viriones se propaguen hacia otros tejidos mediante la hemolinfa. Dentro de los tejidos susceptibles a la propagación viral se encuentran la tráquea y el cuerpo grueso, los cuales constituyen la segunda barrera para el CHIKV y donde tiene lugar una amplificación secundaria.

Posteriormente, el virus infecta las glándulas salivales, constituyendo las mismas la tercera barrera para el virus. Una vez que la replicación ha ocurrido en las glándulas salivales, el virus se secreta en el conducto salival del mosquito (cuarta barrera) para realizar la transmisión horizontal del CHIKV en un vertebrado no infectado ^(187, 188). Este proceso se conoce como período de incubación extrínseco, el cual puede variar según las condiciones, como son la cepa de mosquito, la cepa viral y la temperatura; no obstante, su rango oscila entre 2 y 6 días, y con altos títulos virales en los mosquitos ^(189, 190).

2.4. Características genéticas del virus Chikungunya

2.4.1. Origen evolutivo y genotipos del virus Chikungunya

Basado en las distribuciones y relaciones filogenéticas entre los Alfavirus CHIKV y O'nyong-nyong (ONNV), y en las reconstrucciones más parsimoniosas de sus movimientos, se cree que ambos virus evolucionaron de África Sub-Sahariana, pero la región exacta aún es ambigua ⁽⁴⁷⁾. El primer análisis filogenético del CHIKV utilizó secuencias nucleotídicas parciales del gen de la glicoproteína E1 de 18 cepas, y reveló la existencia de dos genotipos principales ⁽⁴⁹⁾. Estos resultados apoyaron la hipótesis de que el CHIKV se originó en África y fue introducido en Asia a partir de aislamientos del este de África ⁽²⁸⁾. Posteriores estudios filogenéticos realizados a nivel del genoma completo mostraron la existencia de tres genotipos: el genotipo Asiático, el Africano Occidental y el ECSA, donde todos comparten un ancestro común en África tropical ^(49, 191, 192). Los genotipos Africano Occidental y ECSA circulan como genotipos enzoóticos que involucran a los mosquitos *Aedes* y primates no humanos, mientras que el genotipo Asiático circula

a través de una transmisión endémica/epidémica ^(47, 193). A pesar de estar estrechamente relacionados geográficamente los genotipos Africano Occidental y el ECSA, no están agrupados en un mismo subgrupo independiente, lo cual indica el limitado intercambio genético que existe entre estos dos genotipos de África. Por otra parte, los análisis coalescentes bayesianos han estimado que el genotipo Asiático y el ECSA divergieron hace 100 años atrás ⁽⁴⁾.

El genotipo Africano Occidental agrupa a aislamientos del CHIKV pertenecientes a brotes esporádicos y ocasionales en África y Asia a través de ciclos enzoóticos. Este genotipo agrupa principalmente a aislados de Senegal de los años 1975, 1979, 1983 y 1992 ^(4, 49). La única excepción es una cepa de Senegal de 1963, la cual fue aislada de un murciélago y se agrupa dentro del genotipo ECSA. Esto sugiere que los genotipos Africano Occidental y ECSA se pueden solapar espacialmente en el ciclo enzoótico, al menos de manera ocasional ⁽⁴⁾.

Por otra parte, el genotipo ECSA agrupa a todos los aislados del siglo XX correspondientes a África Sub-Sahariana e involucrados en ciclos enzoóticos con mosquitos arbóreos, fundamentalmente de Uganda, Zimbabwe y Tanzania. Sin embargo, recientemente se identificó por primera vez la presencia de este genotipo en mosquitos *Aedes aegypti* de Brasil, lo cual representa una alerta para el resto de la región de las Américas ⁽¹⁹⁴⁾.

El genotipo Asiático se aisló por primera vez en 1958 y se ha relacionado a brotes en India y el sudeste de Asia durante la década de 1960. Se ha inferido filogenéticamente que este genotipo se derivó del genotipo ECSA, probablemente seguido de su introducción en Asia entre 1879 y 1956 ⁽⁴⁾. Sin embargo, algunos registros históricos sugieren que se introdujo años antes en Asia y América a través de los barcos, al igual que lo hipotetizado sobre la introducción del virus de la fiebre amarilla y los virus del dengue en las ciudades portuarias durante los siglos pasados ^(195, 196). El genotipo Asiático fue el responsable de una segunda re-emergencia del CHIKV, ya que luego de varias décadas con pocos reportes de brotes o casos en Asia, las cepas de este genotipo causaron una serie de epidemias en Malasia (2006) y las Islas del Pacífico (2011- 2015) ⁽¹⁹⁷⁾.

Posteriormente, el genotipo Asiático se detectó en la isla caribeña de San Martín a finales del año 2013 ⁽¹⁷⁾, seguido de una epidemia de gran escala con una dispersión en 26 islas y 14 países del continente Americano en un año. Desde el primer brote del Caribe en 2013, las cepas asiáticas se han mantenido altamente conservadas, lo cual es consistente con una fuente de introducción y sin evidencia de evolución adaptativa del CHIKV ⁽¹⁹⁸⁾.

2.4.2. Mutaciones adaptativas que permiten una transmisión más eficiente por el mosquito *Aedes albopictus*

Los análisis de microevolución del genoma del CHIKV durante la epidemia del Océano Índico en 2005-2006, identificaron una mutación en la posición 226 de la glicoproteína de la envoltura E1 (E1-A226V) en aislados obtenidos durante la epidemia ⁽¹⁹⁹⁾. Inicialmente, se hipotetizó que la mutación E1-A226V podía influir en la infectividad del CHIKV en los vectores ^(199, 200), debido a que estudios anteriores habían identificado que la sustitución de una prolina por una serina en la misma posición del gen E1 en el virus Semliki Forest, era la responsable de los requerimientos de colesterol en las membranas del hospedero para una eficiente replicación viral ⁽²⁰¹⁾. También se había evidenciado que la presencia de esta mutación resultaba en un crecimiento más eficiente del virus Semliki Forest en mosquitos *Aedes albopictus* ⁽²⁰²⁾. Además, en esta región el mosquito *Aedes albopictus* fue el único vector importante epidemiológicamente, y en particular la mutación A226V, solo estuvo ausente en las cepas aisladas durante la fase inicial de la epidemia en la isla La Reunión, ya que apareció en más del 90 % de los aislados posteriores a diciembre de 2005 ⁽¹⁹⁹⁾.

Para dar respuesta a esta hipótesis se realizaron varios estudios, donde se demostró que la presencia de E1-226V estaba asociada con una potenciación en la diseminación del CHIKV y con una carga viral más elevada en *Aedes albopictus* ⁽²⁰³⁾. De igual manera se evidenció que esta mutación resultaba en un incremento de aproximadamente 40 a 100 veces en la infectividad oral del CHIKV en los mosquitos *Aedes albopictus*, y mediaba más eficientemente la transmisión viral en ratones ^(11, 33, 204, 205). Además, estudios posteriores que emplearon partículas

infecciosas del CHIKV ⁽³³⁾ e inyección intratorácica en *Aedes albopictus* ⁽¹⁹⁰⁾, demostraron que dicha mutación actúa primariamente en el aumento de la infectividad oral del virus en las células epiteliales del intestino medio, lo cual propicia una transmisión más eficiente ⁽⁴⁷⁾.

De manera peculiar, la mutación E1-226V nunca se ha evidenciado en las cepas virales que pertenecen al genotipo Asiático, a pesar de su circulación por al menos 50 años en una región autóctona para el mosquito *Aedes albopictus*. Además, estudios de mutagénesis dirigida han fallado en crear un virus Asiático adaptado eficientemente a dicho vector cuando presentan la mutación E1-226V. Lo anterior se puede explicar porque dichas cepas presentan una restricción epistática que les impide adaptarse de manera eficiente en ese mosquito. Es decir, es necesario que las cepas Asiáticas posean la mutación E1-T98A para que la sustitución E1-226 ejerza su fenotipo en *Aedes albopictus* ⁽²⁰⁵⁾.

Por otra parte, estudios genéticos y filogenéticos de cepas del linaje IOL revelaron una serie de mutaciones adicionales que involucraban a la glicoproteína E2 y en un caso en E3 ^(10, 33). Cada una de estas sustituciones potencia la infección inicial en el intestino medio del mosquito y tiene poco o ningún efecto sobre la infección por *Aedes aegypti*. Además, al menos una combinación de estas mutaciones adquiridas independientemente producen una infección más eficiente en *Aedes albopictus* en comparación con alguna cepa natural de CHIKV estudiada hasta el momento, lo cual sugiere que si estas combinaciones se manifiestan en la naturaleza, existirá una evolución adaptativa al vector y una circulación más eficiente en regiones donde este vector es abundante ⁽²⁰⁶⁾.

2.4.3. Mecanismos y fuerzas evolutivas que actúan en el virus Chikungunya

2.4.3.1. Heterogeneidad poblacional y selección de los genomas más adecuados en el virus Chikungunya

Los Alfavirus como el CHIKV existen como poblaciones heterogéneas de ARN viral denominadas mutantes, las cuales se generan a partir de los errores durante la replicación ya que la ARN polimerasa ARN-dependiente no posee actividad correctora de errores. Dado que el genoma del CHIKV es de aproximadamente 12

Kb y existe una frecuencia de mutación de 10^{-4} mutaciones/sitio/año, cada nuevo genoma ARN posee como promedio una mutación ⁽²⁰⁷⁾. La mayoría de los genomas mutantes son perjudiciales, por lo que son eliminados a través de la selección purificadora negativa. En contraste, la selección positiva de un fenotipo adecuado resulta en un incremento en la abundancia de un genotipo en particular. Por consiguiente, un balance en la selección dinámica de mutaciones determina el tamaño y la diversidad genética de un grupo de mutantes. La diversidad genética produce una población menos propensa a las consecuencias negativas de las presiones selectivas una vez que se seleccionan ciertos genotipos, y genera una población con mayores variantes genéticas, las cuales pueden contener ventajas fenotípicas adaptativas, tales como la potenciación de la adaptabilidad. Por ejemplo, una variante de alta fidelidad del CHIKV y que presenta una mutación en la posición aminoacídica 483 (locus que determina la fidelidad de la ARN polimerasa ARN- dependiente) se descubrió experimentalmente luego del tratamiento con mutágenos químicos, donde se evidenció que la misma genera un 30% menos de mutantes en comparación con el virus salvaje y se adapta menos a los modelos de ratón y en mosquitos ^(208, 209). Esta reducida adecuación (del inglés fitness) puede ser el resultado de una población con menor cantidad de mutaciones, y por lo tanto contiene menos genotipos que pueden resistir las presiones evolutivas (selección negativa o cuellos de botella poblacionales). Sin embargo, estudios complementarios con variantes de baja fidelidad del CHIKV que fueron mutadas en el residuo 483 mostraron más errores que las variantes salvajes y eran también atenuadas en células de mosquito y en ratones ⁽²¹⁰⁾. Todos los estudios anteriores indican que el CHIKV mantiene una frecuencia de mutación intermedia que impide la disminución de la adecuación resultante de poblaciones con muy pocos o demasiados genomas mutantes ⁽²⁰⁶⁾.

2.4.3.2. Adaptación del virus Chikungunya cuando alterna entre dos hospederos diferentes

La fuerte selección purificadora en Alfavirus que alternan entre mosquitos y vertebrados resulta en una variación genética menor en comparación con sus tasas mutacionales altas ⁽²¹⁰⁻²¹³⁾. El trabajo con otros Alfavirus, como el virus de la

Encefalitis Equina del Este, el SINV y el virus de la Encefalitis Equina Venezolana muestra que la alternancia entre hospederos impone desafíos contradictorios durante la replicación viral, lo cual puede limitar la adaptación de uno de los hospederos por costos en su adecuación ya que las adaptaciones son antagonistas ^(214, 215). Cuando uno de los hospederos se elimina artificialmente a través de pases seriados, las limitaciones son evidentes porque los virus son más adaptables cuando son pasados solamente de manera seriada en un solo hospedero. Los pases seriados del CHIKV en células de mosquitos y de vertebrados muestran mayores adecuaciones virales cuando ocurren en nuevos tipos celulares, y también evidencian una potenciación en el escape a la neutralización y en la resistencia a compuestos antivirales. Estos cambios se acompañan de un incremento en la diversidad genética. Sin embargo, los pases del CHIKV que alternan entre diferentes tipos celulares, limitan la adecuación viral, lo cual indica que solo se mantienen las mutaciones beneficiosas o neutrales en ambos hospederos ⁽²¹⁶⁾.

2.4.3.3. Diversidad intrahospedero y cuellos de botellas en el virus Chikungunya

La habilidad para burlar los cuellos de botellas dentro y entre ambientes dinámicos (como el cambio entre vectores y vertebrados) impacta en la evolución del CHIKV y es importante en la comprensión de los cambios que ocurren en la dinámica poblacional, que en última instancia causan la enfermedad en humanos. Los cuellos de botellas que reducen el tamaño poblacional de los Arbovirus influyen en la adecuación viral por restricciones en la plasticidad fenotípica, lo cual parece ser producto de la diversidad genética ⁽²¹⁷⁾.

Como se mencionó anteriormente, para que ocurra una transmisión productiva de los Alfavirus, es necesario que los mismos atraviesen satisfactoriamente todas las barreras anatómicas que existen en los mosquitos. Es decir, los Alfavirus presentes en la sangre ingerida por un mosquito deben infectar el epitelio del intestino medio ⁽²¹⁸⁾. Los impedimentos secundarios para la diseminación viral dependen de que el virus fracase en su escape del epitelio del intestino medio, en

su infección de las glándulas salivales o en el escape de dichas glándulas hacia la saliva para su transmisión en los vertebrados. El número de variantes genéticas que atraviesan satisfactoriamente estas barreras durante el escape del intestino medio y en la infección de las glándulas salivales es reducido, en comparación con el total de variantes existentes en la sangre ingerida. Además, una población viral inicial más pequeña en la sangre ingerida, es más propensa a reducir su diversidad genética ⁽²¹⁹⁾, lo cual indica la existencia de un fuerte cuello de botella genético que reduce la diversidad, y por consiguiente cambia el tamaño de la población viral. Sin embargo, estudios con el CHIKV apoyan la idea de que aunque la diversidad poblacional en el intestino medio y en las glándulas salivales es reducida en comparación con la sangre ingerida o con la población total en el intestino medio respectivamente, es recuperada más allá de cada barrera anatómica, permaneciendo la secuencia consenso sin cambios genéticos ⁽²¹⁰⁾.

Por otra parte, estudios experimentales muestran que la alternancia entre diferentes hospederos impone restricciones en los Arbovirus, incluyendo el CHIKV, lo cual indica que la transmisión ineficiente probablemente interrumpe el ciclo natural del virus. Sin embargo, el grado de extinción natural en vertebrados o vectores no ha sido directamente estudiado. No obstante, se piensa que la extinción de un linaje individual mosquito-vertebrado-mosquito es debido probablemente a que la mayoría de los mosquitos no sobreviven mucho tiempo en la naturaleza como para alimentarse más de una vez. Además, el mantenimiento de la estabilidad genética consenso en la naturaleza y en presencia de una intensa circulación puede ser dado a la extinción de la mayoría de los linajes individuales, posiblemente mediante cuellos de botellas en mosquitos individuales. Sin embargo, estas extinciones no deben ser demasiado frecuentes, o de lo contrario el ciclo del CHIKV sería interrumpido ⁽²⁰⁶⁾. En otro sentido, las interrupciones en la transmisión estacional pueden representar otro cuello de botella significativo para el CHIKV, especialmente si el virus es introducido en climas templados ⁽²²⁰⁾, donde la supervivencia y la competencia vectorial pueden disminuir en temperaturas más frías ⁽²²¹⁾, sin embargo, este fenómeno es muy complejo ⁽²²²⁾ y no se ha estudiado extensamente.

2.5. Epidemiología del virus Chikungunya en las Américas

En las Américas, los primeros casos autóctonos se describieron a finales de 2013 en el Caribe, lugar que fue el punto de inicio de una gran epidemia ^(17, 19, 223). Desde diciembre de 2013 hasta agosto de 2014, se registraron cerca de 660 000 casos en el continente Americano, y la transmisión autóctona se confirmó en 33 países y territorios americanos, 27 de ellos correspondientes al Caribe. En Suramérica, solo se reportó transmisión en Guyana Francesa y Brasil ⁽²²³⁾. Si bien en 2014 la epidemia de CHIKV afectaba principalmente al Caribe, en el año 2015 el virus se había identificado en 30 países o territorios de América del Sur y Centro. En 2015, solamente Colombia reportó 51.3% de los 693 000 casos del continente Americano ⁽²²⁴⁾, mientras que en 2016 Suramérica registró 89.2% del total, detectándose la circulación de CHIKV en 42 países, incluyendo Brasil con cerca de 76% de los 347 647 casos sospechosos de la región ⁽²²⁵⁾. Por otra parte, en 2015- 2016 la distribución de los casos del CHIKV se había movido progresivamente hacia áreas selváticas, lo que resultó en un solapamiento significativo con las áreas donde existe transmisión selvática del virus Fiebre Amarilla ⁽²²⁶⁾. Por lo tanto, es posible que las personas que se infectaron con el CHIKV en un ciclo urbano a través del mosquito *Aedes aegypti*, luego fueran picadas por mosquitos selváticos primatófilos en áreas cercanas a los bosques. De esta manera, esos mosquitos se pudieron convertir en especies competentes para transmitir una cepa viral, la cual posteriormente se pudo amplificar por primates no humanos u otros vertebrados de la región de las Américas, iniciándose de esta forma un ciclo selvático para el CHIKV como mismo ocurrió en el pasado con el virus de la Fiebre Amarilla. Esto se puede deber, en parte, a que actualmente los bosque tropicales del continente Americano son más receptivo a la transmisión del CHIKV, ya que ha aumentado la expansión y frecuencia de las olas epidémicas de este agente en zonas aledañas a la selva ⁽²²⁷⁾.

2.5.1. Epidemiología del virus Chikungunya en Cuba

En el caso de Cuba, los primeros casos de CHIKV se detectaron a mediados del año 2014, donde las condiciones climatológicas favorecieron la circulación viral, ya

que los meses de Junio a Noviembre son los meses que comprenden la temporada ciclónica en el Caribe, lo cual se ha visto asociado con un incremento en la reproducción de los mosquitos *Aedes* ⁽²²⁸⁾. Todos los casos que llegaron al Laboratorio Nacional de Referencia de Arbovirus con sintomatología de CHIKF, se les realizó el diagnóstico molecular mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (del inglés Real Time-PCR), como parte de la Vigilancia Viroológica que se lleva a cabo en Cuba.

Todos los casos positivos del año 2014 correspondieron a casos importados, principalmente de Venezuela, Jamaica, República Dominicana y de países no referidos, aunque también se registraron casos procedentes de Nicaragua, San Vicente y las Granadinas, Alemania e Irlanda. Además, la mayoría de los pacientes residían en la provincia de La Habana, y en menor cuantía en Cienfuegos y Sancti Spiritus, no obstante, las provincias de Artemisa, Camagüey, Holguín, Isla de la Juventud, Matanzas, Pinar del Río, Santiago de Cuba, Las Tunas y Villa Clara también registraron casos importados de CHIKV ⁽²²⁹⁾. Sin embargo, dicha circulación viral cesó a finales de 2015 debido a la rápida y oportuna acción del Sistema de Salud Cubano.

3. Materiales y Métodos

3.1. Muestras empleadas

Se estudiaron 53 muestras de suero de las 55 positivas a CHIKV recibidas en el año 2014 como parte de la Vigilancia Viroológica que realiza el Laboratorio Nacional de Referencia de Arbovirus (Instituto de Medicina Tropical ‘‘Pedro Kourí’’), las dos muestras faltantes no se incluyeron en este trabajo por no tener el volumen necesario para los procesamientos posteriores. Las muestras empleadas fueron positivas al CHIKV por la técnica de PCR en tiempo real, y cuyos Ct (del inglés Cycle threshold) oscilaban entre el ciclo 17 y 38. Dichas muestras procedían de pacientes sospechosos de CHIKF, y se colectaron durante la fase aguda de la enfermedad (Tabla 1).

Tabla 1. Muestras empleadas en la caracterización molecular del CHIKV en Cuba durante el año 2014

No. Muestra	Procedencia	Historial de Viaje	Fecha de colecta (año 2014)	Ct obtenido en el PCR en tiempo real
62/14	La Habana	República Dominicana	Julio	32.61
66/14	Holguín	República Dominicana	Julio	30.69
100/14	La Habana	San Vicente y Granadina	Agosto	22.70
110/14	Camagüey	Jamaica	Septiembre	30.02
111/14	Cienfuegos	Venezuela	Septiembre	22.11
112/14	Holguín	Venezuela	Septiembre	25.38
114/14	Cienfuegos	Venezuela	Septiembre	22.61
115/14	Holguín	Venezuela	Septiembre	30.80
120/14	La Habana	Venezuela	Octubre	27.78
121/14	Pinar del Río	Venezuela	Octubre	26.97
122/14	La Habana	Venezuela	Octubre	25.67
131/14	Las Tunas	Venezuela	Octubre	31.01
135/14	La Habana	No refiere	Octubre	29.20
137/14	La Habana	Venezuela	Octubre	22.90
138/14	La Habana	Venezuela	Octubre	32.27
139/14	Sancti Spiritus	Venezuela	Octubre	31.44
140/14	La Habana	Venezuela	Octubre	25.69
141/14	La Habana	Alemania	Octubre	21.00
143/14	La Habana	Venezuela	Octubre	38.86
144/14	Villa Clara	Venezuela	Octubre	32.14
159/14	Sancti Spiritus	Venezuela	Octubre	25.88

169/14	La Habana	Venezuela	Octubre	34.22
171/14	Sancti Spiritus	Venezuela	Noviembre	31.94
178/14	Cienfuegos	Venezuela	Noviembre	26.99
179/14	Camagüey	Venezuela	Noviembre	29.59
181/14	Isla de la Juventud	Venezuela	Octubre	34.31
183/14	La Habana	Venezuela	Noviembre	28.56
187/14	Santiago de Cuba	Venezuela	Noviembre	33.77
188/14	La Habana	Venezuela	Noviembre	27.44
193/14	La Habana	Venezuela	Noviembre	31.54
194/14	La Habana	Venezuela	Noviembre	21.88
196/14	La Habana	No refiere	Noviembre	26.74
197/14	La Habana	Venezuela	Noviembre	29.22
200/14	Sancti Spiritus	Venezuela	Noviembre	33.97
206/14	Artemisa	Venezuela	Noviembre	23.89
207/14	Las Tunas	Venezuela	Noviembre	25.31
209/14	La Habana	No refiere	Noviembre	35.20
211/14	Santiago de Cuba	Venezuela	Noviembre	29.46
213/14	La Habana	Irlanda	Noviembre	33.87
214/14	La Habana	Venezuela	Noviembre	18.96
218/14	Matanzas	Venezuela	Noviembre	36.98
220/14	La Habana	Venezuela	Noviembre	26.61
224/14	Sancti Spiritus	No refiere	Noviembre	22.73
225/14	La Habana	Venezuela	Noviembre	20.02
229/14	La Habana	No refiere	Noviembre	21.28
231/14	Santiago de Cuba	Venezuela	Diciembre	17.58
238/14	La Habana	No refiere	Diciembre	33.42
239/14	La Habana	Venezuela	Diciembre	21.89
242/14	La Habana	Nicaragua	Diciembre	20.62
243/14	La Habana	Venezuela	Diciembre	22.22
244/14	Matanzas	Jamaica	Diciembre	32.05
245/14	Matanzas	Jamaica	Diciembre	32.03
247/14	Granma	República Dominicana	Diciembre	34.13

3.2. Extracción del ARN viral de los sueros seleccionados

Este procedimiento se efectuó en el extractor automático Qiacube (Qiagen, Alemania), donde se utilizaron 140 µL de suero y los reactivos contenidos en el estuche comercial QIAamp viral RNA (Qiagen, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.3. Amplificación del gen de la glicoproteína de la envoltura E1

Se realizó una Transcripción reversa- Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, del inglés Reverse Transcription-PCR), en un solo paso de la región del gen de la glicoproteína de la envoltura E1, a partir del ARN extraído previamente y empleando el estuche comercial Transcriptor One-Step RT-PCR Kit (Roche, Alemania). Para su ejecución se preparó para cada muestra una mezcla que contenía 25 μL de agua libre de nucleasas, 10 μL de tampón de reacción 5X (Tris 1.5 mM, MgCl_2 1.5 mM y dNTPs 1.5 mM), 2 μL del cebador positivo (10 μM), 2 μL del cebador negativo (10 μM) y 1 μL de la mezcla de enzimas. Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Cebadores empleados en la RT-PCR de los sueros colectados de casos importados de CHIKV en Cuba.

Cebador	Posición del genoma	Secuencia (5'→3')
E2 9648F	9648	AGTTGTGTCAGTGGCCTCGTTC
E1 11158R	11158	TGACTATGTGGTCCTTCGGAGG

Posteriormente, a dicha mezcla se le adicionaron 10 μL de ARN extraído para un volumen final de 50 μL . La reacción se llevó a cabo en el termociclador QCyler II (Quanta Biotech, Reino Unido), y comenzó a 50°C durante 30 min (paso de la RT), luego se efectuó la desnaturalización inicial a 94°C por 7 min. Para dar inicio a la amplificación la PCR se comenzó con 10 ciclos de desnaturalización (94°C por 10 s), hibridación (66°C por 30 s) y elongación (68°C por 3 min). En la segunda etapa de amplificación se realizaron 25 ciclos sucesivos que contaban con desnaturalización (94°C por 10 s), hibridación (53°C por 30 s) y elongación a 68°C por 3 min (con un incremento de 5 s en cada ciclo). Por último, se efectuó un paso de elongación final a 68°C por 7 min.

Para evidenciar la presencia de los productos del PCR deseados, se realizó una electroforesis submarina en gel de agarosa al 1% en tampón TBE 1X (Tris 0.5 M, Ácido bórico 0.5 M y EDTA 10 mM), teñido con GelRed. Para ello se aplicaron en cada pocillo 5 μL de los productos amplificados y 2 μL de tampón de muestra, y se

corrieron en una cámara electroforética (Apelex, Francia), utilizando una fuente (Amersham Biosciences, EUA) a 120 V y a 400 A, durante 45 min. Al finalizar, las bandas del ADN amplificado se visualizaron mediante un transiluminador de luz UV (Hofer, Alemania), determinando sus tallas por comparación con un marcador de peso molecular de ADN (500 pb, Roche, Alemania).

3.4. Purificación de los productos de la RT- PCR

Los productos de la RT- PCR se purificaron mediante el empleo del estuche comercial Qiaquick PCR purification (Qiagen, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para comprobar la efectividad del proceso de purificación se volvió a efectuar una electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando los procedimientos descritos anteriormente.

3.5. Reacción de secuencia

Para determinar la secuencia nucleotídica de las muestras amplificadas se empleó el estuche comercial CEQ DTCS quickstart kit (Beckman Coulter, EUA). Este estuche incluía una mezcla con la enzima, tampón de reacción, dNTPs y dideoxinucleótidos marcados para 96 reacciones de secuencia (Master Mix). Se prepararon mezclas de reacción para cada uno de los cebadores de secuencia, adicionándose 1 µL de cada cebador (5 pmoles/µL) (Tabla 3), 3 µL del producto de PCR, 8 µL de agua de calidad de Biología molecular y 8 µL de Master Mix, para obtener 20 µL de volumen final. Posteriormente, se utilizó el termociclador QCyler II (Quanta Biotech, Reino Unido) para realizar 30 ciclos de 96°C por 20 s, 55°C por 20 s y 60°C por 4 min.

Tabla 3. Cebadores utilizados para la reacción de secuencia del gen E1 de los sueros proveniente de los casos importados de CHIKV en Cuba.

Cebador	Posición del genoma	Secuencia (5'→3')
E2 9648F	9648	AGTTGTGTCAGTGGCCTCGTTC
E110403R	10403	TAAAGGACGCGGAGCTTAGCTG
E1 10145F	10145	ACAAAACCGTCATCCCGTCTC
E1 11158R	11158	TGACTATGTGGTCCTTCGGAGG
E1 10959F	10959	CAGCAAGAAAGGCAAGTGTGC

3.6. Purificación de los productos de la reacción de secuencia

La purificación de los productos de la reacción de secuencia se realizó mediante el método de precipitación con etanol. Para ello se preparó un tubo estéril etiquetado de 1.5 mL para cada muestra, donde a cada uno se le adicionaron 5 μ L de solución terminadora (2 μ L de Acetato de Sodio 3M + 2 μ L EDTA 100mM + 1 μ L de glucógeno 20 mg/mL). La solución anterior se mezcló con los 20 μ L resultantes de la reacción de secuencia y se adicionaron 60 μ L de etanol absoluto. Posteriormente, se mezcló y centrifugó a 14 000 rpm a 4°C durante 25 min, utilizando una microcentrífuga refrigerada (Eppendorff, Alemania). Luego se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado 2 veces con 200 μ L de etanol diluido con agua al 70% (v/v), donde en cada lavado se centrifugó inmediatamente a 14 000 rpm a 4°C durante 2 min. Después de centrifugar, se retiró con cuidado todo el sobrenadante y se dejó secar el precipitado por 2 min. Luego se resuspendió el precipitado en 40 μ L de formamida.

Posteriormente las muestras se transfirieron a las placas del secuenciador automático de electroforesis capilar GeXP (Beckman Coulter, EUA), el cual emplea la metodología de Sanger ⁽²³⁰⁾. Las secuencias y los cromatogramas correspondientes se procesaron utilizando el programa Sequencher 4.8 (Gene Codes Corporation, EUA) que permitió el ensamblaje de las secuencias para obtener la secuencia consenso del gen E1 en cada una de las muestras estudiadas.

3.7. Análisis de las secuencias

Las secuencias de CHIKV obtenidas en este estudio pertenecientes al gen E1 se compararon con una amplia selección de secuencias de dicho gen disponibles en la base de datos Genbank ⁽²³¹⁾, las cuales se alinearon, utilizando el programa Clustal X ⁽²³²⁾. El alineamiento se editó y analizó con el programa Bioedit ⁽²³³⁾. Dicho alineamiento se introdujo en el programa MEGA 6 ⁽²³⁴⁾ para determinar el modelo de evolución que mejor se ajustaba a los datos. Una vez seleccionado el modelo se procedió a la construcción del árbol filogenético utilizando el método estadístico de Máxima Verosimilitud (del inglés, Maximum Likelihood). Para

evaluar cuan robustos eran los grupos filogenéticos obtenidos, se realizó un análisis de re-muestreo (del inglés, bootstrapping), utilizando 1500 réplicas de los árboles. Todos estos análisis se efectuaron con el paquete MEGA 6.

3.8. Consideraciones éticas

El estudio se realizó según los principios éticos expresados en la Declaración de Helsinki y con la aprobación del Comité de Ética del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”. En la investigación solo se estudiaron muestras de pacientes recibidas a través de la Vigilancia Viroológica que realiza el Laboratorio Nacional de Referencial de Arbovirus, y la misma no implicó riesgos para los participantes. Los investigadores involucrados en el estudio expresaron su compromiso bioético de mantener la confidencialidad de los resultados y solo los investigadores a cargo tuvieron acceso a las bases de datos confeccionadas.

4. Resultados

De las 53 muestras de suero positivas a CHIKV según la técnica de PCR en tiempo real, colectadas en el año 2014, se obtuvo la secuencia del gen de la glicoproteína E1 en nueve de ellas (Tabla 4). Como se puede observar, más de 50% de las secuencias pertenecían a viajeros residentes en la provincia de La Habana (5 secuencias), además se puede evidenciar que predominaron los casos importados de Venezuela (6 secuencias).

Tabla 4. Secuencias obtenidas en este estudio correspondientes a los casos importados de CHIKV en Cuba durante el año 2014.

No. Muestra	Procedencia	Historial de Viaje	Fecha de colecta
62/14	La Habana	República Dominicana	Julio 2014
110/14	Camagüey	Jamaica	Septiembre 2014
112/14	Holguín	Venezuela	Septiembre 2014
120/14	La Habana	Venezuela	Octubre 2014
137/14	La Habana	Venezuela	Octubre 2014
139/14	Sancti Spiritus	Venezuela	Octubre 2014
171/14	Sancti Spiritus	Venezuela	Noviembre 2014
214/14	La Habana	Venezuela	Noviembre 2014
242/14	La Habana	Nicaragua	Diciembre 2014

4.1 Análisis filogenético de las secuencias de CHIKV obtenidas

La evaluación del alineamiento de las secuencias obtenidas en este estudio con secuencias de todos los genotipos de CHIKV mediante el programa MEGA 6, sugirió que el modelo de evolución que mejor se ajustaba a los datos es el Kimura 2 parámetros + distribución gamma. El árbol filogenético de Máxima Verosimilitud construido según este modelo (Figura 1) muestra que todas las secuencias de CHIKV de este estudio se agrupan dentro del genotipo Asiático, responsable de las epidemias y brotes ocurridos en las Américas desde su introducción en el año 2013 y como parte del ciclo urbano de este virus ⁽²³⁵⁾.

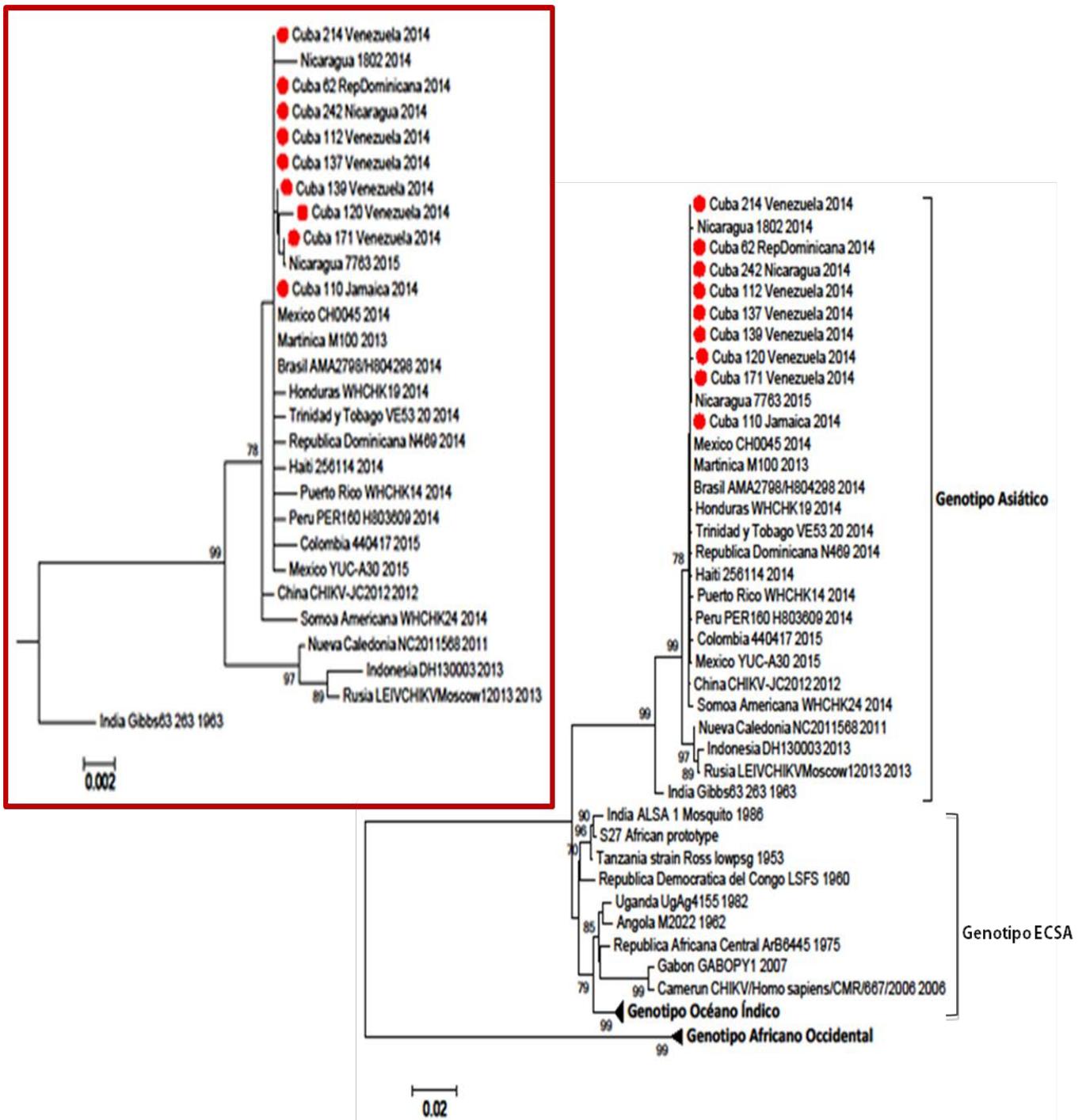


Figura 1. Árbol filogenético del CHIKV construido a partir del método de Máxima Verosimilitud (modelo Kimura 2 parámetros + distribución gamma) con 51 secuencias representativas de cada genotipo. Se muestran los valores de soporte estadístico de los nodos con valores superiores a 70%. Las secuencias correspondientes al genotipo Asiático se encuentran ampliadas en el recuadro rojo y las secuencias obtenidas se distinguen con círculos rojos.

El árbol filogenético evidencia una estrecha relación genética entre las secuencias de este estudio y las correspondientes a la región de las Américas, principalmente con Nicaragua, México, Martinica y Brasil. Es necesario resaltar que en el momento en que se construyó dicho árbol filogenético, en la base de datos GenBank no estaban disponibles secuencias procedentes de Venezuela, país que estuvo ampliamente representado en las secuencias obtenidas en este trabajo. Este aspecto, unido al corto tiempo de circulación de CHIKV en las Américas que impide la acumulación de mutaciones específicas que permitan diferenciar mejor las secuencias desde el punto de vista genético, tuvo un impacto en la filogenia obtenida. De esta forma, no fue posible dilucidar el origen evolutivo más probable en cada caso. No obstante, dentro del genotipo Asiático se evidenció la existencia de un subgrupo monofilético Americano, lo que sugiere una única introducción en las Américas que debió ocurrir en el Caribe alrededor de 2013, seguida de una expansión rápida con una circulación sostenida en diferentes áreas de la región cuya población era completamente susceptible.

4.2 Mutaciones en la región E1 del CHIKV con impacto en la epidemiología de la CHIKF

Aunque las secuencias de este estudio confirman que la circulación del CHIKV en Cuba correspondía al genotipo Asiático, el cual es transmitido principalmente por el mosquito *Aedes aegypti* ⁽⁴⁷⁾, se buscaron las mutaciones que han sido asociadas con una mejor adaptación del virus en el mosquito *Aedes albopictus*, ya que en Cuba habitan de forma natural ambos vectores. Adicionalmente, era relevante la información publicada por otros autores sobre la competencia de *Aedes albopictus* colectados en las Américas para la transmisión del CHIKV perteneciente al genotipo Asiático ^(236, 237).

Con este fin, se analizaron las secuencias aminoacídicas de CHIKV pertenecientes a este estudio tomando como referencia la secuencia obtenida durante la epidemia ocurrida en la Isla francesa de La Reunión en el año 2005. Dicho análisis estaba dirigido a identificar los motivos presentes en las posiciones

98 y 226 de la glicoproteína de la envoltura E1 relacionados con la adaptación al vector (Figura 2).

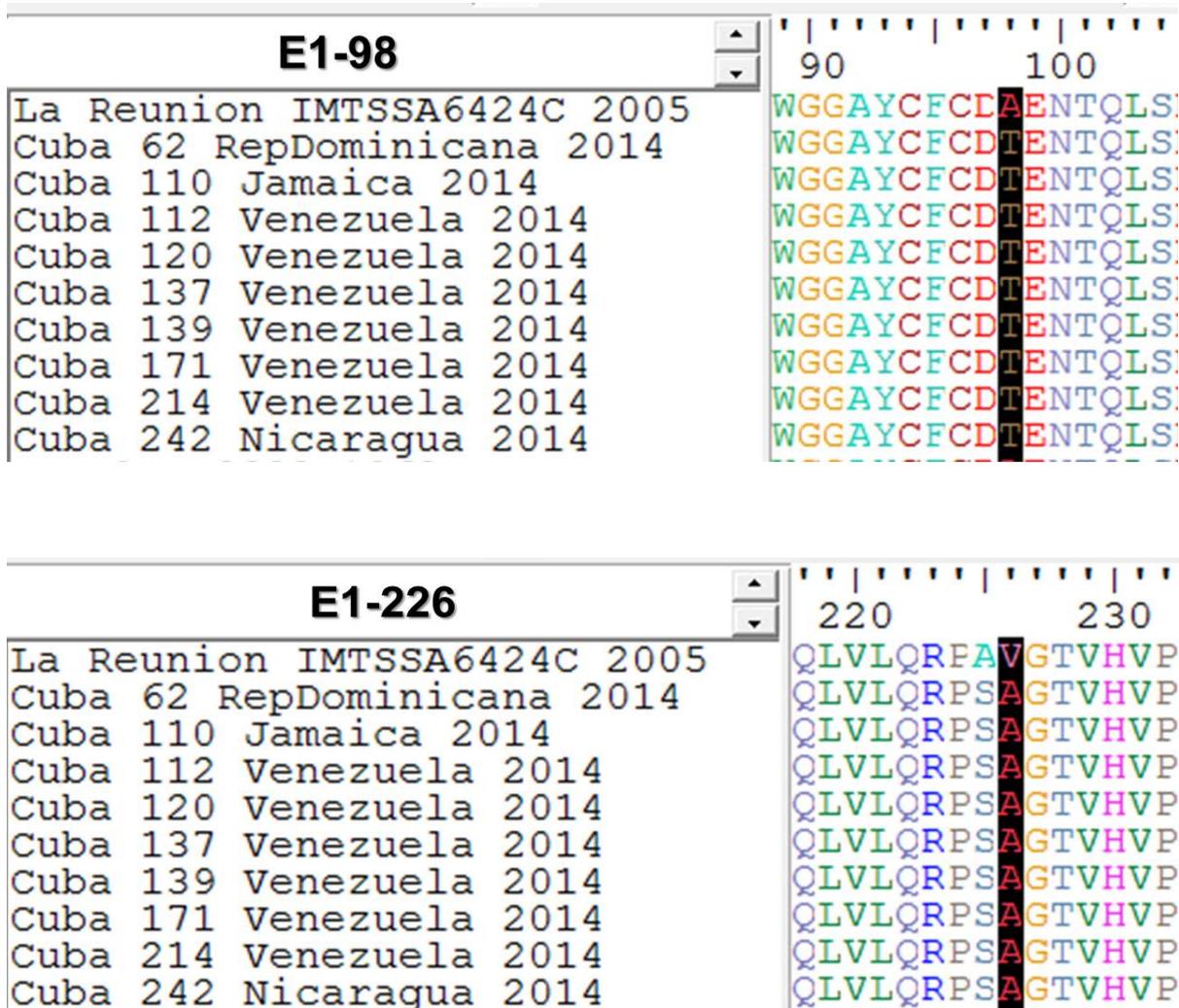


Figura 2. Mutaciones en la región E1 98 y 226 del CHIKV observadas en las secuencias de este estudio en comparación con una secuencia perteneciente al linaje IOL y representativa de la epidemia ocurrida en la isla La Reunión, 2005.

A- Alanina, T- Treonina y V- Valina

Como se puede observar en la figura anterior, todas las secuencias estudiadas presentaron una treonina en la posición 98 del gen de la glicoproteína E1, a diferencia de la cepa de referencia perteneciente al linaje IOL, la cual presentó una alanina. De igual manera, en la posición 226 se evidenció que todas las secuencias de este trabajo presentaban una alanina, mientras que la cepa de referencia una valina, lo cual es consistente con lo reportado en la literatura en relación a dicha sustitución en cepas del genotipo Asiático.

Por otra parte, se consideró de relevancia el análisis de las secuencias obtenidas en este estudio en comparación con la cepa de referencia antes mencionada en relación al cambio aminoacídico K211E, descrito en el dominio II de la glicoproteína E1, como una mutación conservada dentro del genotipo Asiático y reconocida por su importante influencia en la epidemiología de la CHIKV (Figura 3).

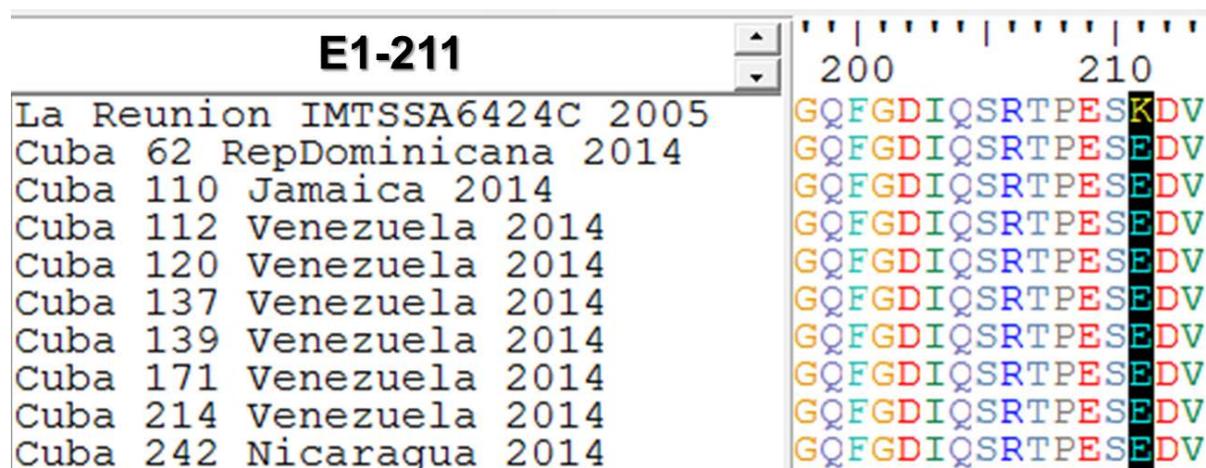


Figura 3. Mutaciones en la región E1- 211 del CHIKV observadas en las secuencias estudiadas en comparación con una secuencia perteneciente al linaje IOL y representativa de la epidemia ocurrida en la isla La Reunión, 2005.

K- Lisina y E- Ácido glutámico

En la Figura 3, se puede evidenciar como todas las secuencias estudiadas presentaron un ácido glutámico en la posición 211 de la glicoproteína E1, mientras que la cepa de referencia tiene una lisina. De esta forma, se demuestra que las secuencias de este estudio no presentan el cambio drástico en la superficie electrostática de E1 que implica la presencia de un aminoácido cargado positivamente (lisina), en una posición que habitualmente existe un aminoácido cargado negativamente (ácido glutámico).

5. Discusión

La caracterización molecular de los casos importados de CHIKV en Cuba arrojó un total de 9 secuencias cubanas, lo cual representó un 16.98% de los sueros utilizados en este estudio. Este bajo número de secuencias obtenidas estuvo dado principalmente por el fundamento de las técnicas empleadas, ya que el PCR en tiempo real es capaz de detectar pequeños fragmentos de ácidos nucleicos (aproximadamente 120 pb), mientras que para la secuenciación nucleotídica de la región E1 fue necesario contar con fragmentos mayores a los 1510 pb. Por lo tanto, para la caracterización molecular del CHIKV se requiere de ácidos nucleicos poco degradados, no así para el PCR en tiempo real. Además, la sensibilidad de este último es mayor en comparación con el PCR a punto final empleado para amplificar la región de interés con vistas a la secuenciación nucleotídica.

De igual forma, nuestros resultados evidencian el valor del PCR en tiempo real para la selección de muestras útiles para secuenciación nucleotídica. Si se analizan los valores de Ct (ciclo de amplificación donde la muestra emite suficiente fluorescencia para ser detectada como positiva) de las muestras estudiadas (Tabla 1), podemos concluir que las positivas por PCR en tiempo real con $Ct > 32$ no son útiles para la amplificación del gen E1, por presentar una carga viral insuficiente. Por el contrario, se obtuvieron resultados satisfactorios en muestras con valores de Ct en el rango de 17 a 32. Resultados similares se evidenciaron durante la amplificación de los virus del dengue provenientes de pequeños brotes ocurridos en el estado de Aragua, Venezuela, durante el 2006-2007 ⁽²³⁸⁾. En dicho estudio se secuenciaron a nivel del genoma viral completo 21 muestras, las cuales habían sido positivas por PCR en tiempo real (en un rango de 12.880 a 8 UFC/mL); sin embargo, 10 muestras con menos de 4 UFC/mL resultaron inútiles para la amplificación de los virus del dengue, debido a la existencia de bajas cargas virales en dichas muestras.

No obstante, hubo un grupo de muestras con valores de Ct en el rango adecuado, en las que no se logró la amplificación del gen E1. Consideramos como posibles causas: problemas de conservación y/o manipulación de las mismas, ya que

estuvieron almacenadas hasta el momento del estudio en condiciones no idóneas de temperatura o sufrieron varios procesos de congelación/descongelación, lo que sin duda atenta contra la calidad del ARN viral y por consiguiente, tiene un impacto negativo en la amplificación de fragmentos largos con una concentración de ADN suficiente para la reacción de secuencia.

Por otra parte, la obtención de un gran número de secuencias pertenecientes a la provincia de La Habana, fue un resultado esperado ya que 27 sueros de las 55 muestras positivas recibidas en 2014 pertenecieron a dicha provincia. Esto se debe a que la mayoría de las muestras recibidas se enviaron desde el Hospital del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” como parte de la Vigilancia de Fronteras que se realiza en Cuba ante una emergencia sanitaria y por tanto no tuvieron afectaciones durante la transportación, como ocurre con las muestras remitidas desde provincias distantes. De igual manera se puede apreciar en la Tabla 3, seis secuencias de un total de nueve correspondían a casos importados de Venezuela, lo cual también era esperado, ya que 37 de los sueros positivos procesados pertenecían a casos importados de ese país.

A pesar del bajo número de secuencias obtenidas, el presente estudio permitió tener un panorama de los virus introducidos en Cuba en el año 2014 y demostrar la estrecha relación genética que existe entre las secuencias de virus circulantes en diferentes países de las Américas. Este hecho, se explica por la introducción reciente del virus en nuestra región, donde existe un amplio intercambio que potencia la dispersión del virus a través de los viajeros, así como el movimiento de aeronaves y embarcaciones con mosquitos infectados hacia países que originalmente no presentaban circulación de este agente viral ⁽²³⁹⁾.

Desde el punto de vista epidemiológico, es relevante no solo confirmar la circulación del virus. Se impone la realización de una vigilancia molecular que permita determinar los genotipos circulantes en cada región o país, lo que puede tener un gran impacto en las medidas a tomar para su control.

Se ha documentado que la circulación de cepas del genotipo Asiático puede impactar fuertemente en la efectividad de un posible candidato vacunal,

principalmente si el mismo se desarrolla con cepas de otros genotipos. Lo anterior se evidenció por un grupo de investigadores que estudiaron dos epidemias independientes ocurridas en Malasia en los años 2006 y 2008-2010, con cepas del genotipo Asiático y ECSA, respectivamente. En dicho estudio, se observó que los sueros inmunes al genotipo Asiático y ECSA, neutralizaban más eficazmente a cepas del genotipo ECSA en comparación con las del genotipo Asiático, de manera que, los anticuerpos neutralizantes independientemente del genotipo del virus infectante (genotipo Asiático o ECSA) reconocen preferencialmente los epítopes presentados por los virus del genotipo ECSA ⁽²⁴⁰⁾. Por lo tanto, esto impone un reto en la aplicación de un candidato vacunal, sobre todo en la región de las Américas, ya que hay que tener en cuenta que la circulación de cepas del genotipo Asiático serán menos neutralizadas por los anticuerpos generados por el candidato si el mismo corresponde a un genotipo diferente, y por consiguiente la vacuna sería menos efectiva.

Debido a que en Cuba habitan de forma natural los dos vectores del CHIKV, es decir *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, se buscaron mutaciones que han estado relacionadas con una transmisión más eficiente en alguno de estos mosquitos (Figura 2). Dentro de las mutaciones estudiadas, se encuentran las ubicadas en las posiciones 98 y 226 de la glicoproteína de la envoltura E1.

El aminoácido ubicado en la posición 226 de E1 es muy importante para el SFV, SINV y CHIKV, ya que el mismo es sensible al pH y a los lípidos ^(11, 201, 241, 242). Este residuo se encuentra en el dominio central DII en estrecha proximidad con el lazo de fusión ⁽⁷⁸⁾. Los cambios aminoacídicos presentes en la posición 226 se han asociado con la capacidad de transmisión del CHIKV por sus principales vectores, donde la existencia del aminoácido valina (V) permitió una replicación viral más eficiente en la glándula salival del mosquito *Aedes albopictus* durante la epidemia ocurrida en las Islas del Océano Índico en el año 2005 ⁽¹¹⁾. Además, estudios posteriores demostraron que las cepas que poseen en esta posición una valina, en vez de una alanina, son más dependientes del colesterol y requieren un pH más bajo para la infección viral ^(11, 243) y la fusión ^(33, 69, 244). Por lo tanto, esta mutación sirvió para establecer un nuevo linaje dentro del genotipo ECSA, donde todas las

secuencias que lo integra poseen dicha mutación, y por lo tanto, son capaces de transmitirse más eficientemente a través del mosquito *Aedes albopictus* como vector principal.

Como se puede observar en la Figura 2, las secuencias estudiadas no poseen una valina en esa posición (al igual que el resto de las secuencias del genotipo Asiático) ya que presentan una alanina, por lo que, las cepas obtenidas se podrían replicar en el *Aedes albopictus* pero no de manera eficiente. Lo anterior se explica porque aunque las cepas Asiáticas posean esta mutación, es decir una valina en la posición 226, existe un residuo (E1- 98) que ejerce una fuerte interacción epistática negativa que bloquea la habilidad de dichas cepas para adaptarse eficientemente al mosquito *Aedes albopictus* mediante la sustitución E1- A226V⁽²⁰⁵⁾. Por lo tanto, las cepas cubanas al poseer una treonina en la posición E1- 98, ejercen dicha interacción epistática negativa, de manera que aunque ambos vectores se encuentran en nuestro país y en el Caribe, el mosquito *Aedes aegypti* continúa siendo el principal responsable de la transmisión del CHIKV en nuestra región⁽²⁴⁵⁾.

Otra de las sustituciones estudiadas en este trabajo fue la presente en la posición aminoacídica 211 de E1 (Figura 3), ya que la misma juega un papel importante en la eficacia de la neutralización contra el CHIKV. La presencia de una lisina en dicha posición, se relaciona con un aumento en la unión a los anticuerpos y en una neutralización más eficiente. Por lo tanto, las secuencias obtenidas en este estudio al poseer un aminoácido diferente (ácido glutámico, E) presentan una ventaja selectiva para la diseminación viral y para el escape a la acción de los anticuerpos neutralizantes generados durante una infección⁽²⁴⁶⁾.

Con relación a lo anterior, Henss y colaboradores en 2016 encontraron dos nuevas mutaciones relacionadas con la modulación de la infectividad y transmisión viral por especies *Aedes*, y dentro de estas mutaciones se encontraba el cambio aminoacídico E1- K211E. En este estudio se evidenció que los dobles mutantes que contenían las mutaciones E1- K211E y E2- V264A (en la glicoproteína E2) tenían una notable adecuación viral en el mosquito *Aedes aegypti*, lo cual indicaba

un incremento significativo en la infectividad viral (13 veces), en la diseminación (15 veces) y en la transmisión (62 veces) en comparación con los mutantes que no poseían dichas mutaciones ⁽²⁴⁷⁾.

A pesar de que en el presente estudio solo se secuenció la región del gen E1, las evidencias relacionadas con mutaciones en gen E2, se deben tomar en consideración en investigaciones futuras, así como en la estrategia aplicada a la vigilancia molecular. De modo que se pueda detectar tempranamente la circulación de cepas virales con este tipo de mutaciones adaptativas que pudieran favorecer una eficiente transmisión a través del mosquito *Aedes aegypti*, lo cual podría contribuir a la ocurrencia de grandes epidemias de CHIKV. Además, todos los hallazgos filogenéticos obtenidos en este estudio no solo son válidos para el contexto epidemiológico cubano, sino que son un reflejo de lo que pudo ocurrir en otros países de la región como Venezuela, Jamaica, República Dominicana y Nicaragua, ya los virus estudiados en este trabajo provenían de viajeros infectados en esos países.

La caracterización molecular de los virus circulantes es sin dudas una herramienta de gran valor, que permite alertar al Sistema Nacional de Salud en cuanto a circulación de cepas con un alto potencial epidémico. Los resultados de este tipo de estudio deben tenerse en cuenta para el diseño de campañas efectivas para el control del vector de manera que pueda cortarse la transmisión en un tiempo breve y puedan evitarse epidemias de gran magnitud. En el contexto actual, la circulación viral de CHIKV cesó a finales de 2015 en nuestro país debido a la rápida y oportuna acción del Sistema Nacional de Salud.

6. Conclusiones

- Se demostró el valor de los resultados del PCR en tiempo real para la selección de muestras de suero útiles para la caracterización molecular de CHIKV mediante secuenciación nucleotídica.
- El análisis filogenético realizado permitió demostrar que las cepas de CHIKV introducidas en Cuba durante el año 2014, se agrupaban dentro del genotipo Asiático, detectado por primera vez en las Américas durante el año 2013.
- La filogenia mostró la presencia de un grupo monofilético que incluye las secuencias del estudio y otras pertenecientes a países del Caribe, Centroamérica y América del Sur, lo cual es indicativo de la dispersión de un virus con origen filogenético común y no debido a múltiples introducciones en las Américas.
- La caracterización molecular de las cepas de CHIKV introducidas en Cuba permitió verificar la presencia de mutaciones en la glicoproteína de la envoltura E1, que sugieren una transmisión preferencial a través del mosquito *Aedes aegypti* y un posible mecanismo de escape a la acción de los anticuerpos neutralizantes.

7. Recomendaciones

- Extender los estudios de caracterización molecular utilizando los sueros positivos a CHIKV colectados durante el año 2015.
- Implementar un sistema que permita realizar la secuenciación nucleotídica de cepas de CHIKV a nivel de genoma completo, con el fin de identificar marcadores moleculares asociados a una mayor adecuación viral con impacto en la epidemiología de la enfermedad.

8. Referencias bibliográficas

1. Salazar-Gonzalez JA, Angulo C, Rosales-Mendoza S. Chikungunya virus vaccines: Current strategies and prospects for developing plant-made vaccines. *Vaccine*. 2015;33(31):3650-8.
2. Zhang N, Zhang L. Key components of COPI and COPII machineries are required for chikungunya virus replication. *Biochemical and biophysical research communications*. 2017.
3. Chevillon C, Briant L, Renaud F, Devaux C. The Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective. *Trends in microbiology*. 2008;16(2):80-8.
4. Volk SM, Chen R, Tsetsarkin KA, Adams AP, Garcia TI, Sall AA, et al. Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. *Journal of virology*. 2010;84(13):6497-504.
5. Burt FJ, Rolph MS, Rulli NE, Mahalingam S, Heise MT. Chikungunya: a re-emerging virus. *Lancet (London, England)*. 2012;379(9816):662-71.
6. Ho PS, Ng MM, Chu JJ. Establishment of one-step SYBR green-based real time-PCR assay for rapid detection and quantification of chikungunya virus infection. *Virology journal*. 2010;7:13.
7. Fros JJ, Liu WJ, Prow NA, Geertsema C, Ligtenberg M, Vanlandingham DL, et al. Chikungunya virus nonstructural protein 2 inhibits type I/II interferon-stimulated JAK-STAT signaling. *Journal of virology*. 2010;84(20):10877-87.
8. Voss JE, Vaney MC, Duquerroy S, Vonrhein C, Girard-Blanc C, Crublet E, et al. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature*. 2010;468(7324):709-12.
9. Weaver SC. Arrival of chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(6):e2921.
10. Tsetsarkin KA, Chen R, Yun R, Rossi SL, Plante KS, Guerbois M, et al. Multi-peaked adaptive landscape for chikungunya virus evolution predicts continued fitness optimization in *Aedes albopictus* mosquitoes. *Nature communications*. 2014;5:4084.
11. Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS pathogens*. 2007;3(12):e201.
12. Waggoner JJ, Gresh L, Vargas MJ, Ballesteros G, Tellez Y, Soda KJ, et al. Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected With Zika Virus,

Chikungunya Virus, and Dengue Virus. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2016;63(12):1584-90.

13. AbuBakar S, Sam IC, Wong PF, MatRahim N, Hooi PS, Roslan N. Reemergence of endemic Chikungunya, Malaysia. *Emerging infectious diseases*. 2007;13(1):147-9.

14. Ligon BL. Reemergence of an unusual disease: the chikungunya epidemic. *Seminars in pediatric infectious diseases*. 2006;17(2):99-104.

15. Arankalle VA, Shrivastava S, Cherian S, Gunjekar RS, Walimbe AM, Jadhav SM, et al. Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963-2006) with special reference to the 2005-2006 explosive epidemic. *The Journal of general virology*. 2007;88(Pt 7):1967-76.

16. Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet (London, England)*. 2007;370(9602):1840-6.

17. Leparc-Goffart I, Nougairede A, Cassadou S, Prat C, de Lamballerie X. Chikungunya in the Americas. *Lancet (London, England)*. 2014;383(9916):514.

18. Weaver SC, Lecuit M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *The New England journal of medicine*. 2015;372(13):1231-9.

19. Nunes MR, Faria NR, de Vasconcelos JM, Golding N, Kraemer MU, de Oliveira LF, et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC medicine*. 2015;13:102.

20. Organization PAH. Chikungunya. 2014.

21. Organization PAH. Chikungunya. 2015.

22. Xavier-Carvalho C, Cezar R, Freire NM, Vasconcelos CMM, Solorzano VEF, de Toledo-Pinto TG, et al. Association of rs1285933 single nucleotide polymorphism in CLEC5A gene with dengue severity and its functional effects. *Human immunology*. 2017.

23. Yang S, Fink D, Hulse A, Pratt RD. Regulatory considerations in development of vaccines to prevent disease caused by Chikungunya virus. *Vaccine*. 2017;35(37):4851-8.

24. Goic B, Stapleford KA, Frangeul L, Doucet AJ, Gausson V, Blanc H, et al. Virus-derived DNA drives mosquito vector tolerance to arboviral infection. *Nature communications*. 2016;7:12410.

25. Weinbren MP. The occurrence of Chikungunya virus in Uganda. II. In man on the Entebbe peninsula. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1958;52(3):258-9.
26. Jupp PG, McIntosh BM. Aedes furcifer and other mosquitoes as vectors of chikungunya virus at Mica, northeastern Transvaal, South Africa. Journal of the American Mosquito Control Association. 1990;6(3):415-20.
27. Hammon WM, Rudnick A, Sather GE. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. Science (New York, NY). 1960;131(3407):1102-3.
28. Tsetsarkin KA, Chen R, Sherman MB, Weaver SC. Chikungunya virus: evolution and genetic determinants of emergence. Current opinion in virology. 2011;1(4):310-7.
29. Chretien JP, Anyamba A, Bedno SA, Breiman RF, Sang R, Sergon K, et al. Drought-associated chikungunya emergence along coastal East Africa. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2007;76(3):405-7.
30. Kariuki Njenga M, Nderitu L, Ledermann JP, Ndirangu A, Logue CH, Kelly CH, et al. Tracking epidemic Chikungunya virus into the Indian Ocean from East Africa. The Journal of general virology. 2008;89(Pt 11):2754-60.
31. Gerardin P, Barau G, Michault A, Bintner M, Randrianaivo H, Choker G, et al. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Reunion. PLoS medicine. 2008;5(3):e60.
32. Schilte C, Staikowsky F, Couderc T, Madec Y, Carpentier F, Kassab S, et al. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. PLoS neglected tropical diseases. 2013;7(3):e2137.
33. Tsetsarkin KA, Weaver SC. Sequential adaptive mutations enhance efficient vector switching by Chikungunya virus and its epidemic emergence. PLoS pathogens. 2011;7(12):e1002412.
34. Cordel H, Quatresous I, Paquet C, Couturier E. Imported cases of chikungunya in metropolitan France, April 2005 - February 2006. Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2006;11(4):E060420 3.
35. Krastinova E, Quatresous I, Tarantola A. Imported cases of chikungunya in metropolitan France: update to June 2006. Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2006;11(8):E060824 1.
36. Grandadam M, Caro V, Plumet S, Thiberge JM, Souares Y, Failloux AB, et al. Chikungunya virus, southeastern France. Emerging infectious diseases. 2011;17(5):910-3.

37. Frank C, Schoneberg I, Stark K. Trends in imported chikungunya virus infections in Germany, 2006-2009. *Vector borne and zoonotic diseases* (Larchmont, NY). 2011;11(6):631-6.
38. Bodenmann P, Genton B. Chikungunya: an epidemic in real time. *Lancet* (London, England). 2006;368(9531):258.
39. Outbreak news. Chikungunya and dengue, south-west Indian Ocean. *Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations*. 2006;81(12):106-8.
40. Tilston N, Skelly C, Weinstein P. Pan-European Chikungunya surveillance: designing risk stratified surveillance zones. *International journal of health geographics*. 2009;8:61.
41. Angelini R, Finarelli AC, Angelini P, Po C, Petropulacos K, Macini P, et al. An outbreak of chikungunya fever in the province of Ravenna, Italy. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2007;12(9):E070906 1.
42. Gould EA, Gallian P, De Lamballerie X, Charrel RN. First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality! *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2010;16(12):1702-4.
43. Parola P, de Lamballerie X, Jourdan J, Rovey C, Vaillant V, Minodier P, et al. Novel chikungunya virus variant in travelers returning from Indian Ocean islands. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(10):1493-9.
44. Bonilauri P, Bellini R, Calzolari M, Angelini R, Venturi L, Fallacara F, et al. Chikungunya virus in *Aedes albopictus*, Italy. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(5):852-4.
45. Depoortere E, Salmaso S, Pompa MG, Guglielmetti P, Coulombier D. Chikungunya in Europe. *Lancet* (London, England). 2008;371(9614):723.
46. Thiberville SD, Moyen N, Dupuis-Maguiraga L, Nougairede A, Gould EA, Roques P, et al. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral research*. 2013;99(3):345-70.
47. Weaver SC, Forrester NL. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral research*. 2015;120:32-9.
48. Enserink M. *Infectious diseases*. Massive outbreak draws fresh attention to little-known virus. *Science* (New York, NY). 2006;311(5764):1085.
49. Powers AM, Brault AC, Tesh RB, Weaver SC. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical

lineages and distant evolutionary relationships. *The Journal of general virology*. 2000;81(Pt 2):471-9.

50. Vanlandingham DL, Tsetsarkin K, Klingler KA, Hong C, McElroy KL, Lehane MJ, et al. Determinants of vector specificity of o'nyong nyong and chikungunya viruses in *Anopheles* and *Aedes* mosquitoes. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2006;74(4):663-9.

51. Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiological reviews*. 1994;58(3):491-562.

52. Khan AH, Morita K, Parquet Md Mdel C, Hasebe F, Mathenge EG, Igarashi A. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *The Journal of general virology*. 2002;83(Pt 12):3075-84.

53. Jose J, Snyder JE, Kuhn RJ. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future microbiology*. 2009;4(7):837-56.

54. Simizu B, Yamamoto K, Hashimoto K, Ogata T. Structural proteins of Chikungunya virus. *Journal of virology*. 1984;51(1):254-8.

55. Leung JY, Ng MM, Chu JJ. Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells. *Advances in virology*. 2011;2011:249640.

56. Haywood AM. Virus receptors: binding, adhesion strengthening, and changes in viral structure. *Journal of virology*. 1994;68(1):1-5.

57. Mercer J, Schelhaas M, Helenius A. Virus entry by endocytosis. *Annual review of biochemistry*. 2010;79:803-33.

58. Smith TJ, Cheng RH, Olson NH, Peterson P, Chase E, Kuhn RJ, et al. Putative receptor binding sites on alphaviruses as visualized by cryoelectron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(23):10648-52.

59. Ashbrook AW, Burrack KS, Silva LA, Montgomery SA, Heise MT, Morrison TE, et al. Residue 82 of the Chikungunya virus E2 attachment protein modulates viral dissemination and arthritis in mice. *Journal of virology*. 2014;88(21):12180-92.

60. Li L, Jose J, Xiang Y, Kuhn RJ, Rossmann MG. Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. *Nature*. 2010;468(7324):705-8.

61. Paredes AM, Ferreira D, Horton M, Saad A, Tsuruta H, Johnston R, et al. Conformational changes in Sindbis virions resulting from exposure to low pH and interactions with cells suggest that cell penetration may occur at the cell surface in the absence of membrane fusion. *Virology*. 2004;324(2):373-86.

62. Vancini R, Wang G, Ferreira D, Hernandez R, Brown DT. Alphavirus genome delivery occurs directly at the plasma membrane in a time- and temperature-dependent process. *Journal of virology*. 2013;87(8):4352-9.
63. Marsh M, Helenius A. Virus entry: open sesame. *Cell*. 2006;124(4):729-40.
64. Benmerah A, Lamaze C. Clathrin-coated pits: vive la difference? *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 2007;8(8):970-82.
65. Kirchhausen T, Owen D, Harrison SC. Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2014;6(5):a016725.
66. Marsh M, Bolzau E, Helenius A. Penetration of Semliki Forest virus from acidic prelysosomal vacuoles. *Cell*. 1983;32(3):931-40.
67. Colpitts TM, Moore AC, Kolokoltsov AA, Davey RA. Venezuelan equine encephalitis virus infection of mosquito cells requires acidification as well as mosquito homologs of the endocytic proteins Rab5 and Rab7. *Virology*. 2007;369(1):78-91.
68. Yamauchi Y, Helenius A. Virus entry at a glance. *Journal of cell science*. 2013;126(Pt 6):1289-95.
69. Hoornweg TE, van Duijl-Richter MK, Ayala Nunez NV, Albulescu IC, van Hemert MJ, Smit JM. Dynamics of Chikungunya Virus Cell Entry Unraveled by Single-Virus Tracking in Living Cells. *Journal of virology*. 2016;90(9):4745-56.
70. Bernard E, Solignat M, Gay B, Chazal N, Higgs S, Devaux C, et al. Endocytosis of chikungunya virus into mammalian cells: role of clathrin and early endosomal compartments. *PloS one*. 2010;5(7):e11479.
71. Lee RC, Hapuarachchi HC, Chen KC, Hussain KM, Chen H, Low SL, et al. Mosquito cellular factors and functions in mediating the infectious entry of chikungunya virus. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(2):e2050.
72. van Duijl-Richter MK, Blijleven JS, van Oijen AM, Smit JM. Chikungunya virus fusion properties elucidated by single-particle and bulk approaches. *The Journal of general virology*. 2015;96(8):2122-32.
73. Zeng X, Mukhopadhyay S, Brooks CL, 3rd. Residue-level resolution of alphavirus envelope protein interactions in pH-dependent fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(7):2034-9.
74. White J, Helenius A. pH-dependent fusion between the Semliki Forest virus membrane and liposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980;77(6):3273-7.

75. Bron R, Wahlberg JM, Garoff H, Wilschut J. Membrane fusion of Semliki Forest virus in a model system: correlation between fusion kinetics and structural changes in the envelope glycoprotein. *The EMBO journal*. 1993;12(2):693-701.
76. Smit JM, Bittman R, Wilschut J. Low-pH-dependent fusion of Sindbis virus with receptor-free cholesterol- and sphingolipid-containing liposomes. *Journal of virology*. 1999;73(10):8476-84.
77. Wahlberg JM, Boere WA, Garoff H. The heterodimeric association between the membrane proteins of Semliki Forest virus changes its sensitivity to low pH during virus maturation. *Journal of virology*. 1989;63(12):4991-7.
78. Roussel A, Lescar J, Vaney MC, Wengler G, Wengler G, Rey FA. Structure and interactions at the viral surface of the envelope protein E1 of Semliki Forest virus. *Structure (London, England : 1993)*. 2006;14(1):75-86.
79. Kampmann T, Mueller DS, Mark AE, Young PR, Kobe B. The Role of histidine residues in low-pH-mediated viral membrane fusion. *Structure (London, England : 1993)*. 2006;14(10):1481-7.
80. Hammar L, Markarian S, Haag L, Lankinen H, Salmi A, Cheng RH. Prefusion rearrangements resulting in fusion Peptide exposure in Semliki forest virus. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(9):7189-98.
81. Gibbons DL, Ahn A, Liao M, Hammar L, Cheng RH, Kielian M. Multistep regulation of membrane insertion of the fusion peptide of Semliki Forest virus. *Journal of virology*. 2004;78(7):3312-8.
82. Kielian M, Rey FA. Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nature reviews Microbiology*. 2006;4(1):67-76.
83. Cao S, Zhang W. Characterization of an early-stage fusion intermediate of Sindbis virus using cryoelectron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(33):13362-7.
84. Ahn A, Gibbons DL, Kielian M. The fusion peptide of Semliki Forest virus associates with sterol-rich membrane domains. *Journal of virology*. 2002;76(7):3267-75.
85. Klimjack MR, Jeffrey S, Kielian M. Membrane and protein interactions of a soluble form of the Semliki Forest virus fusion protein. *Journal of virology*. 1994;68(11):6940-6.
86. Nieva JL, Bron R, Corver J, Wilschut J. Membrane fusion of Semliki Forest virus requires sphingolipids in the target membrane. *The EMBO journal*. 1994;13(12):2797-804.

87. Wahlberg JM, Bron R, Wilschut J, Garoff H. Membrane fusion of Semliki Forest virus involves homotrimers of the fusion protein. *Journal of virology*. 1992;66(12):7309-18.
88. Zheng Y, Sanchez-San Martin C, Qin ZL, Kielian M. The domain I-domain III linker plays an important role in the fusogenic conformational change of the alphavirus membrane fusion protein. *Journal of virology*. 2011;85(13):6334-42.
89. Qin ZL, Zheng Y, Kielian M. Role of conserved histidine residues in the low-pH dependence of the Semliki Forest virus fusion protein. *Journal of virology*. 2009;83(9):4670-7.
90. Sanchez-San Martin C, Sosa H, Kielian M. A stable prefusion intermediate of the alphavirus fusion protein reveals critical features of class II membrane fusion. *Cell host & microbe*. 2008;4(6):600-8.
91. Sanchez-San Martin C, Nanda S, Zheng Y, Fields W, Kielian M. Cross-inhibition of chikungunya virus fusion and infection by alphavirus E1 domain III proteins. *Journal of virology*. 2013;87(13):7680-7.
92. Wengler G, Koschinski A, Wengler G, Repp H. During entry of alphaviruses, the E1 glycoprotein molecules probably form two separate populations that generate either a fusion pore or ion-permeable pores. *The Journal of general virology*. 2004;85(Pt 6):1695-701.
93. Singh I, Helenius A. Role of ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapsid uncoating. *Journal of virology*. 1992;66(12):7049-58.
94. Glanville N, Ranki M, Morser J, Kaariainen L, Smith AE. Initiation of translation directed by 42S and 26S RNAs from Semliki Forest virus in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1976;73(9):3059-63.
95. Wengler G, Wurkner D, Wengler G. Identification of a sequence element in the alphavirus core protein which mediates interaction of cores with ribosomes and the disassembly of cores. *Virology*. 1992;191(2):880-8.
96. de Groot RJ, Hardy WR, Shirako Y, Strauss JH. Cleavage-site preferences of Sindbis virus polyproteins containing the non-structural proteinase. Evidence for temporal regulation of polyprotein processing in vivo. *The EMBO journal*. 1990;9(8):2631-8.
97. Takkinen K, Peranen J, Kaariainen L. Proteolytic processing of Semliki Forest virus-specific non-structural polyprotein. *The Journal of general virology*. 1991;72 (Pt 7):1627-33.
98. Lemm JA, Rumenapf T, Strauss EG, Strauss JH, Rice CM. Polypeptide requirements for assembly of functional Sindbis virus replication complexes: a

model for the temporal regulation of minus- and plus-strand RNA synthesis. *The EMBO journal*. 1994;13(12):2925-34.

99. Shirako Y, Strauss JH. Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. *Journal of virology*. 1994;68(3):1874-85.

100. De I, Sawicki SG, Sawicki DL. Sindbis virus RNA-negative mutants that fail to convert from minus-strand to plus-strand synthesis: role of the nsP2 protein. *Journal of virology*. 1996;70(5):2706-19.

101. Froshauer S, Kartenbeck J, Helenius A. Alphavirus RNA replicase is located on the cytoplasmic surface of endosomes and lysosomes. *The Journal of cell biology*. 1988;107(6 Pt 1):2075-86.

102. Kujala P, Ikaheimonen A, Ehsani N, Vihinen H, Auvinen P, Kaariainen L. Biogenesis of the Semliki Forest virus RNA replication complex. *Journal of virology*. 2001;75(8):3873-84.

103. Salonen A, Vasiljeva L, Merits A, Magden J, Jokitalo E, Kaariainen L. Properly folded nonstructural polyprotein directs the semliki forest virus replication complex to the endosomal compartment. *Journal of virology*. 2003;77(3):1691-702.

104. LaStarza MW, Lemm JA, Rice CM. Genetic analysis of the nsP3 region of Sindbis virus: evidence for roles in minus-strand and subgenomic RNA synthesis. *Journal of virology*. 1994;68(9):5781-91.

105. Melancon P, Garoff H. Processing of the Semliki Forest virus structural polyprotein: role of the capsid protease. *Journal of virology*. 1987;61(5):1301-9.

106. Aliperti G, Schlesinger MJ. Evidence for an autoprotease activity of sindbis virus capsid protein. *Virology*. 1978;90(2):366-9.

107. Garoff H, Simons K, Dobberstein B. Assembly of the Semliki Forest virus membrane glycoproteins in the membrane of the endoplasmic reticulum in vitro. *Journal of molecular biology*. 1978;124(4):587-600.

108. Weiss B, Nitschko H, Ghattas I, Wright R, Schlesinger S. Evidence for specificity in the encapsidation of Sindbis virus RNAs. *Journal of virology*. 1989;63(12):5310-8.

109. Owen KE, Kuhn RJ. Identification of a region in the Sindbis virus nucleocapsid protein that is involved in specificity of RNA encapsidation. *Journal of virology*. 1996;70(5):2757-63.

110. Duffus WA, Levy-Mintz P, Klimjack MR, Kielian M. Mutations in the putative fusion peptide of Semliki Forest virus affect spike protein oligomerization and virus assembly. *Journal of virology*. 1995;69(4):2471-9.

111. Andersson H, Barth BU, Ekstrom M, Garoff H. Oligomerization-dependent folding of the membrane fusion protein of Semliki Forest virus. *Journal of virology*. 1997;71(12):9654-63.
112. Barth BU, Wahlberg JM, Garoff H. The oligomerization reaction of the Semliki Forest virus membrane protein subunits. *The Journal of cell biology*. 1995;128(3):283-91.
113. de Curtis I, Simons K. Dissection of Semliki Forest virus glycoprotein delivery from the trans-Golgi network to the cell surface in permeabilized BHK cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(21):8052-6.
114. Green J, Griffiths G, Louvard D, Quinn P, Warren G. Passage of viral membrane proteins through the Golgi complex. *Journal of molecular biology*. 1981;152(4):663-98.
115. Sariola M, Saraste J, Kuismanen E. Communication of post-Golgi elements with early endocytic pathway: regulation of endoproteolytic cleavage of Semliki Forest virus p62 precursor. *Journal of cell science*. 1995;108 (Pt 6):2465-75.
116. Ziemiecki A, Garoff H, Simons K. Formation of the Semliki Forest virus membrane glycoprotein complexes in the infected cell. *The Journal of general virology*. 1980;50(1):111-23.
117. Lobigs M, Zhao HX, Garoff H. Function of Semliki Forest virus E3 peptide in virus assembly: replacement of E3 with an artificial signal peptide abolishes spike heterodimerization and surface expression of E1. *Journal of virology*. 1990;64(9):4346-55.
118. Owen KE, Kuhn RJ. Alphavirus budding is dependent on the interaction between the nucleocapsid and hydrophobic amino acids on the cytoplasmic domain of the E2 envelope glycoprotein. *Virology*. 1997;230(2):187-96.
119. Metsikko K, Garoff H. Oligomers of the cytoplasmic domain of the p62/E2 membrane protein of Semliki Forest virus bind to the nucleocapsid in vitro. *Journal of virology*. 1990;64(10):4678-83.
120. Vaux DJ, Helenius A, Mellman I. Spike--nucleocapsid interaction in Semliki Forest virus reconstructed using network antibodies. *Nature*. 1988;336(6194):36-42.
121. Acheson NH, Tamm I. Replication of Semliki Forest virus: an electron microscopic study. *Virology*. 1967;32(1):128-43.
122. Laine R, Soderlund H, Renkonen O. Chemical composition of Semliki forest virus. *Intervirology*. 1973;1(2):110-8.

123. Vogel RH, Provencher SW, von Bonsdorff CH, Adrian M, Dubochet J. Envelope structure of Semliki Forest virus reconstructed from cryo-electron micrographs. *Nature*. 1986;320(6062):533-5.
124. Fuller SD. The T=4 envelope of Sindbis virus is organized by interactions with a complementary T=3 capsid. *Cell*. 1987;48(6):923-34.
125. Rozanov MN, Koonin EV, Gorbalenya AE. Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. *The Journal of general virology*. 1992;73 (Pt 8):2129-34.
126. Schluckebier G, O'Gara M, Saenger W, Cheng X. Universal catalytic domain structure of AdoMet-dependent methyltransferases. *Journal of molecular biology*. 1995;247(1):16-20.
127. Martin JL, McMillan FM. SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Current opinion in structural biology*. 2002;12(6):783-93.
128. Ahola T, Kujala P, Tuittila M, Blom T, Laakkonen P, Hinkkanen A, et al. Effects of palmitoylation of replicase protein nsP1 on alphavirus infection. *Journal of virology*. 2000;74(15):6725-33.
129. Lampio A, Kilpelainen I, Pesonen S, Karhi K, Auvinen P, Somerharju P, et al. Membrane binding mechanism of an RNA virus-capping enzyme. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(48):37853-9.
130. Spuul P, Salonen A, Merits A, Jokitalo E, Kaariainen L, Ahola T. Role of the amphipathic peptide of Semliki forest virus replicase protein nsP1 in membrane association and virus replication. *Journal of virology*. 2007;81(2):872-83.
131. Vasiljeva L, Merits A, Auvinen P, Kaariainen L. Identification of a novel function of the alphavirus capping apparatus. RNA 5'-triphosphatase activity of Nsp2. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(23):17281-7.
132. Hahn YS, Strauss EG, Strauss JH. Mapping of RNA- temperature-sensitive mutants of Sindbis virus: assignment of complementation groups A, B, and G to nonstructural proteins. *Journal of virology*. 1989;63(7):3142-50.
133. Wang YF, Sawicki SG, Sawicki DL. Sindbis virus nsP1 functions in negative-strand RNA synthesis. *Journal of virology*. 1991;65(2):985-8.
134. Akhrymuk I, Kulemzin SV, Frolova EI. Evasion of the innate immune response: the Old World alphavirus nsP2 protein induces rapid degradation of Rpb1, a catalytic subunit of RNA polymerase II. *Journal of virology*. 2012;86(13):7180-91.

135. Garmashova N, Gorchakov R, Frolova E, Frolov I. Sindbis virus nonstructural protein nsP2 is cytotoxic and inhibits cellular transcription. *Journal of virology*. 2006;80(12):5686-96.
136. Frolov I, Agapov E, Hoffman TA, Jr., Pragai BM, Lippa M, Schlesinger S, et al. Selection of RNA replicons capable of persistent noncytopathic replication in mammalian cells. *Journal of virology*. 1999;73(5):3854-65.
137. Garmashova N, Gorchakov R, Volkova E, Paessler S, Frolova E, Frolov I. The Old World and New World alphaviruses use different virus-specific proteins for induction of transcriptional shutoff. *Journal of virology*. 2007;81(5):2472-84.
138. Gomatos PJ, Kaariainen L, Keranen S, Ranki M, Sawicki DL. Semliki Forest virus replication complex capable of synthesizing 42S and 26S nascent RNA chains. *The Journal of general virology*. 1980;49(1):61-9.
139. Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM. A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS letters*. 1988;235(1-2):16-24.
140. Gomez de Cedron M, Ehsani N, Mikkola ML, Garcia JA, Kaariainen L. RNA helicase activity of Semliki Forest virus replicase protein NSP2. *FEBS letters*. 1999;448(1):19-22.
141. Rikkonen M, Peranen J, Kaariainen L. ATPase and GTPase activities associated with Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *Journal of virology*. 1994;68(9):5804-10.
142. Hardy WR, Strauss JH. Processing the nonstructural polyproteins of sindbis virus: nonstructural proteinase is in the C-terminal half of nsP2 and functions both in cis and in trans. *Journal of virology*. 1989;63(11):4653-64.
143. Vasiljeva L, Merits A, Golubtsov A, Sizemskaja V, Kaariainen L, Ahola T. Regulation of the sequential processing of Semliki Forest virus replicase polyprotein. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(43):41636-45.
144. Wang YF, Sawicki SG, Sawicki DL. Alphavirus nsP3 functions to form replication complexes transcribing negative-strand RNA. *Journal of virology*. 1994;68(10):6466-75.
145. Rupp JC, Jundt N, Hardy RW. Requirement for the amino-terminal domain of sindbis virus nsP4 during virus infection. *Journal of virology*. 2011;85(7):3449-60.
146. Pehrson JR, Fuji RN. Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. *Nucleic acids research*. 1998;26(12):2837-42.

147. Park E, Griffin DE. The nsP3 macro domain is important for Sindbis virus replication in neurons and neurovirulence in mice. *Virology*. 2009;388(2):305-14.
148. Lastarza MW, Grakoui A, Rice CM. Deletion and duplication mutations in the C-terminal nonconserved region of Sindbis virus nsP3: effects on phosphorylation and on virus replication in vertebrate and invertebrate cells. *Virology*. 1994;202(1):224-32.
149. De I, Fata-Hartley C, Sawicki SG, Sawicki DL. Functional analysis of nsP3 phosphoprotein mutants of Sindbis virus. *Journal of virology*. 2003;77(24):13106-16.
150. Tuittila M, Hinkkanen AE. Amino acid mutations in the replicase protein nsP3 of Semliki Forest virus cumulatively affect neurovirulence. *The Journal of general virology*. 2003;84(Pt 6):1525-33.
151. Oberste MS, Parker MD, Smith JF. Complete sequence of Venezuelan equine encephalitis virus subtype IE reveals conserved and hypervariable domains within the C terminus of nsP3. *Virology*. 1996;219(1):314-20.
152. Davis NL, Willis LV, Smith JF, Johnston RE. In vitro synthesis of infectious venezuelan equine encephalitis virus RNA from a cDNA clone: analysis of a viable deletion mutant. *Virology*. 1989;171(1):189-204.
153. Galbraith SE, Sheahan BJ, Atkins GJ. Deletions in the hypervariable domain of the nsP3 gene attenuate Semliki Forest virus virulence. *The Journal of general virology*. 2006;87(Pt 4):937-47.
154. Peranen J, Takkinen K, Kalkkinen N, Kaariainen L. Semliki Forest virus-specific non-structural protein nsP3 is a phosphoprotein. *The Journal of general virology*. 1988;69 (Pt 9):2165-78.
155. Li GP, La Starza MW, Hardy WR, Strauss JH, Rice CM. Phosphorylation of Sindbis virus nsP3 in vivo and in vitro. *Virology*. 1990;179(1):416-27.
156. Foy NJ, Akhrymuk M, Akhrymuk I, Atasheva S, Bopda-Waffo A, Frolov I, et al. Hypervariable domains of nsP3 proteins of New World and Old World alphaviruses mediate formation of distinct, virus-specific protein complexes. *Journal of virology*. 2013;87(4):1997-2010.
157. Rupp JC, Sokoloski KJ, Gebhart NN, Hardy RW. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *The Journal of general virology*. 2015;96(9):2483-500.
158. O'Reilly EK, Kao CC. Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure. *Virology*. 1998;252(2):287-303.

159. Tomar S, Hardy RW, Smith JL, Kuhn RJ. Catalytic core of alphavirus nonstructural protein nsP4 possesses terminal adenylyltransferase activity. *Journal of virology*. 2006;80(20):9962-9.
160. Paredes AM, Brown DT, Rothnagel R, Chiu W, Schoepp RJ, Johnston RE, et al. Three-dimensional structure of a membrane-containing virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(19):9095-9.
161. Kuhn RJ. *Togaviridae: the viruses and their replication*. *Fields virology*, 5th ed, vol 1 Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia. 2007:1001–22.
162. Kielian M, Chanel-Vos C, Liao M. Alphavirus Entry and Membrane Fusion. *Viruses*. 2010;2(4):796-825.
163. Lescar J, Roussel A, Wien MW, Navaza J, Fuller SD, Wengler G, et al. The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell*. 2001;105(1):137-48.
164. Liao M, Kielian M. Domain III from class II fusion proteins functions as a dominant-negative inhibitor of virus membrane fusion. *The Journal of cell biology*. 2005;171(1):111-20.
165. Roman-Sosa G, Kielian M. The interaction of alphavirus E1 protein with exogenous domain III defines stages in virus-membrane fusion. *Journal of virology*. 2011;85(23):12271-9.
166. Selvamani SP, Mishra R, Singh SK. Chikungunya virus exploits miR-146a to regulate NF-kappaB pathway in human synovial fibroblasts. *PloS one*. 2014;9(8):e103624.
167. Lopez-Dee Z, Pidcock K, Gutierrez LS. Thrombospondin-1: multiple paths to inflammation. *Mediators of inflammation*. 2011;2011:296069.
168. Maine GN, Mao X, Komarck CM, Burstein E. COMMD1 promotes the ubiquitination of NF-kappaB subunits through a cullin-containing ubiquitin ligase. *The EMBO journal*. 2007;26(2):436-47.
169. Dudha N, Rana J, Rajasekharan S, Gabrani R, Gupta A, Chaudhary VK, et al. Host-pathogen interactome analysis of Chikungunya virus envelope proteins E1 and E2. *Virus genes*. 2015;50(2):200-9.
170. Kam YW, Lum FM, Teo TH, Lee WW, Simarmata D, Harjanto S, et al. Early neutralizing IgG response to Chikungunya virus in infected patients targets a dominant linear epitope on the E2 glycoprotein. *EMBO molecular medicine*. 2012;4(4):330-43.

171. Lum FM, Teo TH, Lee WW, Kam YW, Renia L, Ng LF. An essential role of antibodies in the control of Chikungunya virus infection. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2013;190(12):6295-302.
172. Weber C, Buchner SM, Schnierle BS. A small antigenic determinant of the Chikungunya virus E2 protein is sufficient to induce neutralizing antibodies which are partially protective in mice. *PLoS neglected tropical diseases*. 2015;9(4):e0003684.
173. Choi HK, Tong L, Minor W, Dumas P, Boege U, Rossmann MG, et al. Structure of Sindbis virus core protein reveals a chymotrypsin-like serine proteinase and the organization of the virion. *Nature*. 1991;354(6348):37-43.
174. Elgizoli M, Dai Y, Kempf C, Koblet H, Michel MR. Semliki Forest virus capsid protein acts as a pleiotropic regulator of host cellular protein synthesis. *Journal of virology*. 1989;63(7):2921-8.
175. Aguilar PV, Weaver SC, Basler CF. Capsid protein of eastern equine encephalitis virus inhibits host cell gene expression. *Journal of virology*. 2007;81(8):3866-76.
176. Hong EM, Perera R, Kuhn RJ. Alphavirus capsid protein helix I controls a checkpoint in nucleocapsid core assembly. *Journal of virology*. 2006;80(18):8848-55.
177. Goh LY, Hobson-Peters J, Prow NA, Baker K, Piyasena TB, Taylor CT, et al. The Chikungunya Virus Capsid Protein Contains Linear B Cell Epitopes in the N- and C-Terminal Regions that are Dependent on an Intact C-Terminus for Antibody Recognition. *Viruses*. 2015;7(6):2943-64.
178. Thomas S, Rai J, John L, Schaefer S, Putzer BM, Herchenroder O. Chikungunya virus capsid protein contains nuclear import and export signals. *Virology journal*. 2013;10:269.
179. WILKINS LW. F I E L D S *Virology* S I X T H E D I T I O N 2013.
180. Diallo M, Thonnon J, Traore-Lamizana M, Fontenille D. Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1999;60(2):281-6.
181. Inoue S, Morita K, Matias RR, Tuplano JV, Resuello RR, Candelario JR, et al. Distribution of three arbovirus antibodies among monkeys (*Macaca fascicularis*) in the Philippines. *Journal of medical primatology*. 2003;32(2):89-94.
182. Wolfe ND, Kilbourn AM, Karesh WB, Rahman HA, Bosi EJ, Cropp BC, et al. Sylvatic transmission of arboviruses among Bornean orangutans. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2001;64(5-6):310-6.

183. Weaver SC, Osorio JE, Livengood JA, Chen R, Stinchcomb DT. Chikungunya virus and prospects for a vaccine. *Expert review of vaccines*. 2012;11(9):1087-101.
184. Madariaga M, Ticona E, Resurrecion C. Chikungunya: bending over the Americas and the rest of the world. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2016;20(1):91-8.
185. Hardy JL, Houk EJ, Kramer LD, Reeves WC. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annual review of entomology*. 1983;28:229-62.
186. Franz AW, Kantor AM, Passarelli AL, Clem RJ. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses*. 2015;7(7):3741-67.
187. Black WCt, Bennett KE, Gorrochotegui-Escalante N, Barillas-Mury CV, Fernandez-Salas I, de Lourdes Munoz M, et al. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Archives of medical research*. 2002;33(4):379-88.
188. Bennett KE, Beaty BJ, Black WCt. Selection of D2S3, an *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strain with high oral susceptibility to Dengue 2 virus and D2MEB, a strain with a midgut barrier to Dengue 2 escape. *Journal of medical entomology*. 2005;42(2):110-9.
189. Dubrulle M, Mousson L, Moutailler S, Vazeille M, Failloux AB. Chikungunya virus and *Aedes* mosquitoes: saliva is infectious as soon as two days after oral infection. *PloS one*. 2009;4(6):e5895.
190. Arias-Goeta C, Mousson L, Rougeon F, Failloux AB. Dissemination and transmission of the E1-226V variant of chikungunya virus in *Aedes albopictus* are controlled at the midgut barrier level. *PloS one*. 2013;8(2):e57548.
191. Powers AM, Logue CH. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *The Journal of general virology*. 2007;88(Pt 9):2363-77.
192. Amraoui F, Failloux AB. Chikungunya: an unexpected emergence in Europe. *Current opinion in virology*. 2016;21:146-50.
193. Weaver SC. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. *Trends in microbiology*. 2013;21(8):360-3.
194. Costa-da-Silva AL, Ioshino RS, Petersen V, Lima AF, Cunha MDP, Wiley MR, et al. First report of naturally infected *Aedes aegypti* with chikungunya virus genotype ECSA in the Americas. 2017;11(6):e0005630.
195. Carey DE. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? *Journal of the history of medicine and allied sciences*. 1971;26(3):243-62.

196. Halstead SB. Reappearance of chikungunya, formerly called dengue, in the Americas. *Emerging infectious diseases*. 2015;21(4):557-61.
197. Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. *Antiviral research*. 2010;85(2):328-45.
198. Tsetsarkin KA, Chen R, Weaver SC. Interspecies transmission and chikungunya virus emergence. *Current opinion in virology*. 2016;16:143-50.
199. Schuffenecker I, Itman I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney MC, et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS medicine*. 2006;3(7):e263.
200. Charrel RN, de Lamballerie X, Raoult D. Chikungunya outbreaks--the globalization of vectorborne diseases. *The New England journal of medicine*. 2007;356(8):769-71.
201. Vashishtha M, Phalen T, Marquardt MT, Ryu JS, Ng AC, Kielian M. A single point mutation controls the cholesterol dependence of Semliki Forest virus entry and exit. *The Journal of cell biology*. 1998;140(1):91-9.
202. Ahn A, Schoepp RJ, Sternberg D, Kielian M. Growth and stability of a cholesterol-independent Semliki Forest virus mutant in mosquitoes. *Virology*. 1999;262(2):452-6.
203. Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D, Rousseaux C, Khun H, Huerre M, et al. Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PloS one*. 2007;2(11):e1168.
204. Tsetsarkin KA, McGee CE, Volk SM, Vanlandingham DL, Weaver SC, Higgs S. Epistatic roles of E2 glycoprotein mutations in adaption of chikungunya virus to *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* mosquitoes. *PloS one*. 2009;4(8):e6835.
205. Tsetsarkin KA, Chen R, Leal G, Forrester N, Higgs S, Huang J, et al. Chikungunya virus emergence is constrained in Asia by lineage-specific adaptive landscapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(19):7872-7.
206. Coffey LL, Failloux AB, Weaver SC. Chikungunya virus-vector interactions. *Viruses*. 2014;6(11):4628-63.
207. Holmes EC. *The Evolution and Emergence of RNA Viruses*. Oxford University Press: New York, NY, USA. 2009.
208. Coffey LL, Beeharry Y, Borderia AV, Blanc H, Vignuzzi M. Arbovirus high fidelity variant loses fitness in mosquitoes and mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(38):16038-43.

209. Rozen-Gagnon K, Stapleford KA, Mongelli V, Blanc H, Failloux AB, Saleh MC, et al. Alphavirus mutator variants present host-specific defects and attenuation in mammalian and insect models. *PLoS pathogens*. 2014;10(1):e1003877.
210. Stapleford KA, Coffey LL, Lay S, Borderia AV, Duong V, Isakov O, et al. Emergence and transmission of arbovirus evolutionary intermediates with epidemic potential. *Cell host & microbe*. 2014;15(6):706-16.
211. Ebel GD, Carricaburu J, Young D, Bernard KA, Kramer LD. Genetic and phenotypic variation of West Nile virus in New York, 2000-2003. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2004;71(4):493-500.
212. Davis CT, Ebel GD, Lanciotti RS, Brault AC, Guzman H, Siirin M, et al. Phylogenetic analysis of North American West Nile virus isolates, 2001-2004: evidence for the emergence of a dominant genotype. *Virology*. 2005;342(2):252-65.
213. Parameswaran P, Charlebois P, Tellez Y, Nunez A, Ryan EM, Malboeuf CM, et al. Genome-wide patterns of intrahuman dengue virus diversity reveal associations with viral phylogenetic clade and interhost diversity. *Journal of virology*. 2012;86(16):8546-58.
214. Coffey LL, Forrester N, Tsetsarkin K, Vasilakis N, Weaver SC. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. *Future microbiology*. 2013;8(2):155-76.
215. Turner PE, Morales NM, Alto BW, Remold SK. Role of evolved host breadth in the initial emergence of an RNA virus. *Evolution; international journal of organic evolution*. 2010;64(11):3273-86.
216. Coffey LL, Vignuzzi M. Host alternation of chikungunya virus increases fitness while restricting population diversity and adaptability to novel selective pressures. *Journal of virology*. 2011;85(2):1025-35.
217. Muller HJ. THE RELATION OF RECOMBINATION TO MUTATIONAL ADVANCE. *Mutation research*. 1964;106:2-9.
218. Smith DR, Adams AP, Kenney JL, Wang E, Weaver SC. Venezuelan equine encephalitis virus in the mosquito vector *Aedes taeniorhynchus*: infection initiated by a small number of susceptible epithelial cells and a population bottleneck. *Virology*. 2008;372(1):176-86.
219. Forrester NL, Guerbois M, Seymour RL, Spratt H, Weaver SC. Vector-borne transmission imposes a severe bottleneck on an RNA virus population. *PLoS pathogens*. 2012;8(9):e1002897.
220. Ruiz-Moreno D, Vargas IS, Olson KE, Harrington LC. Modeling dynamic introduction of Chikungunya virus in the United States. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(11):e1918.

221. Eisen L, Monaghan AJ, Lozano-Fuentes S, Steinhoff DF, Hayden MH, Bieringer PE. The impact of temperature on the bionomics of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti*, with special reference to the cool geographic range margins. *Journal of medical entomology*. 2014;51(3):496-516.
222. Zouache K, Fontaine A, Vega-Rua A, Mousson L, Thiberge JM, Lourenco-De-Oliveira R, et al. Three-way interactions between mosquito population, viral strain and temperature underlying chikungunya virus transmission potential. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society*. 2014;281(1792).
223. Organization PAH. Epidemiological Alert. Chikungunya and Dengue fever in the Americas 29 August 2014. [cited 2016 Jan 30].
224. Organization PAH. Number of Reported Cases of Chikungunya Fever in the Americas, by Country or Territory 2015. [cited 2016 Jan 26].
225. Organization PAH. Number of Reported Cases of Chikungunya Fever in the Americas in 2016. [cited 2016 Jan 26].
226. Organization PAH. Chikungunya: Data, Maps and Statistics. Geographic Distribution. [cited May 2017].
227. Lourenco-de-Oliveira R. High risk for chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas. *PLoS one*. 2017;11(6):e0005698.
228. Reiskind MH, Lounibos LP. Spatial and temporal patterns of abundance of *Aedes aegypti* L. (*Stegomyia aegypti*) and *Aedes albopictus* (Skuse) [*Stegomyia albopictus* (Skuse)] in southern Florida. *Medical and veterinary entomology*. 2013;27(4):421-9.
229. Arbovirus BdddLNdRd. 2016.
230. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(12):5463-7.
231. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. GenBank. *Nucleic acids research*. 2013;41(Database issue):D36-42.
232. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research*. 1997;24:4876-82.
233. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. . *Nucl Acids Symp Ser*. 1999;41 95-8.
234. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*. 2013;30(12):2725-9.

235. Singer M. The spread of Zika and the potential for global arbovirus syndemics. *Global public health*. 2017;12(1):1-18.
236. Reiskind MH, Pesko K, Westbrook CJ, Mores CN. Susceptibility of Florida mosquitoes to infection with chikungunya virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2008;78(3):422-5.
237. Vega-Rua A, Zouache K, Girod R, Failloux AB, Lourenco-de-Oliveira R. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. *Journal of virology*. 2014;88(11):6294-306.
238. Rodriguez-Roche R, Villegas E, Cook S, Poh Kim PA, Hinojosa Y, Rosario D, et al. Population structure of the dengue viruses, Aragua, Venezuela, 2006-2007. Insights into dengue evolution under hyperendemic transmission. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2012;12(2):332-44.
239. Prevention CfDCa. Chikungunya virus in the United States. Accessed Sept 12, 2014.
240. Chalaem P, Chusri S, Fernandez S, Chotigeat W, Anguita J, Pal U, et al. Characterization of a Chikungunya virus strain isolated from banked patients' sera. *Virology journal*. 2016;13(1):150.
241. Chatterjee PK, Vashishtha M, Kielian M. Biochemical consequences of a mutation that controls the cholesterol dependence of Semliki Forest virus fusion. *Journal of virology*. 2000;74(4):1623-31.
242. Lu YE, Cassese T, Kielian M. The cholesterol requirement for sindbis virus entry and exit and characterization of a spike protein region involved in cholesterol dependence. *Journal of virology*. 1999;73(5):4272-8.
243. Gay B, Bernard E, Solignat M, Chazal N, Devaux C, Briant L. pH-dependent entry of chikungunya virus into *Aedes albopictus* cells. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2012;12(6):1275-81.
244. Kuo SC, Chen YJ, Wang YM, Tsui PY, Kuo MD, Wu TY, et al. Cell-based analysis of Chikungunya virus E1 protein in membrane fusion. *Journal of biomedical science*. 2012;19:44.
245. Nasci RS. Movement of chikungunya virus into the Western hemisphere. *Emerging infectious diseases*. 2014;20(8):1394-5.
246. Dirlikov E, Major CG, Mayshack M, Medina N, Matos D, Ryff KR, et al. Guillain-Barre Syndrome During Ongoing Zika Virus Transmission - Puerto Rico, January 1-July 31, 2016. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2016;65(34):910-4.

247. Henss L, Beck S, Weidner T, Biedenkopf N, Sliva K, Weber C, et al. Suramin is a potent inhibitor of Chikungunya and Ebola virus cell entry. *Virology journal*. 2016;13:149.

9. Anexos

Anexo 1. Genética y estructura del CHIKV.

