

VARIANTES GENÉTICAS DEL VIRUS CHIKUNGUNYA

AUTORES:

Sebastiano Volpe^{1,2,3}, Jesús Barraza^{2,3}, Santiago Faraj^{2,3}, Mónica Montes^{2,3}, Carla Saleh⁴ y Claudia Filomatori^{2,3}.

1) Escuela de Bio y Nanotecnología, Universidad de San Martín - CONICET, Buenos Aires, Argentina

2) Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas "Prof. Alejandro C. Paladini" (IQUIFIB) - CONICET, CABA, Argentina

3) Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Departamento de Química Biológica. Argentina.

4) Institut Pasteur, Université Paris Cité, CNRS UMR3569, Laboratorio de Virus y ARN de Interferencia, 75015 Paris, Francia

<https://doi.org/10.55634/3.1.2>

RESUMEN

El virus chikungunya es un patógeno humano transmitido por mosquitos y, por lo tanto, debe desarrollar estrategias para replicar en estos dos hospedadores diferentes. Esto lo logra gracias a que su genoma de ARN es muy proclive a incorporar cambios. La recombinación por cambio de molde ocurre con alta frecuencia durante la síntesis del genoma viral. En este proceso, la polimerasa viral se disocia del molde y se reasocia en una segunda molécula para continuar la síntesis del genoma. Esta estrategia le permite al virus generar una colección de variantes que componen la población viral.

Mediante experimentos de genética inversa, demostramos que existen requerimientos opuestos para la replicación viral en células de mosquito y mamífero. Como consecuencia, distintas variantes virales son seleccionadas en cada hospedador.

Para comprender el mecanismo de recombinación, secuenciamos las variantes virales e identificamos los motivos de ARN que promueven el cambio de molde. Este mecanismo ocurre con mayor frecuencia en las regiones del genoma viral donde existen secuencias repetidas y elementos estructurados de ARN.

En base a estos hallazgos propusimos un modelo, en el cual la recombinación de ARN le permite al virus chikungunya cambiar su genoma para superar las barreras específicas de especie y ser transmitido en la naturaleza.

INTRODUCCIÓN

Los virus con genoma de ARN incluyen un vasto número de virus emergentes y re-emergentes de alta relevancia, que han provocado brotes con consecuencias devastadoras para la salud humana y la economía mundial. En lo que va del siglo XXI, la OMS declaró la emergencia internacional epidemiológica debido a los ARN-virus en cinco oportunidades (1). La primera fue en el año 2009 y se debió a la pandemia de gripe A causada por el virus de la influenza H1N1, que surgió por una combinación de los virus de la gripe porcina, aviar y humana. La segunda fue en el año 2014, cuando re-emergió el virus de la poliomielitis humana, que había sido erradicado en 1994. Casi en simultáneo, en el período 2014-2016, se produjo el mayor brote epidémico de la enfermedad por el virus del Ébola, que se repitió luego en 2018-2020 en la República del Congo. La cuarta emergencia sanitaria se declaró en el 2016 por la reaparición del virus zika, un arbovirus ancestral transmitido por mosquitos al igual que dengue y chikungunya. Finalmente, en el año 2020 se inició la pandemia más importante de nuestra historia: la del nuevo coronavirus SARS Cov-2.

No es casual que las grandes pandemias de la historia hayan sido ocasionadas por virus con genoma de ARN. Estos virus codifican para ARN-polimerasas dependientes de ARN (RdRp's), responsables de amplificar el genoma viral. Las RdRp's operan con tasas de mutación varios órdenes de magnitud mayores que las ADN polimerasas que amplifican el genoma de las células y el de los ADN-virus (2). Esto da como resultado la generación continua de variantes virales que compiten entre ellas dentro del hospedador. Básicamente, la diversidad del genoma viral obedece a dos mecanismos moleculares: mutaciones puntuales y recombinación genética (3-5). Las mutaciones puntuales surgen de la introducción de cambios nucleotídicos por RdRp's que carecen de actividad correctora. En cambio, la recombinación genética no produce

cambios a nivel nucleotídico, sino la reorganización de los genomas existentes para generar un nuevo genoma quimérico. Estos mecanismos moleculares han sido los principales responsables de la (re)emergencia de los ARN-virus y de la rápida generación de nuevas variantes virales, que constituyen amenazas constantes para la salud pública mundial. Este hecho resalta la necesidad de estudiar los aspectos fundamentales que gobiernan la evolución de los virus con genoma de ARN.

El chikungunya (CHIKV) es un ARN-virus perteneciente al género Alphavirus. CHIKV es un patógeno humano reemergente, transmitido por mosquitos del género Aedes. La infección puede ser asintomática con desarrollo de inmunidad permanente o puede causar una enfermedad (i) aguda con fiebre alta, dolor articular, exantema, náuseas, vómitos y conjuntivitis; (ii) sub-aguda, caracterizada por la afectación articular discapacitante y (iii) crónica, si estos síntomas perduran en el tiempo (6).

El CHIKV se aisló por primera vez en Tanzania en 1952 y durante más de 50 años estuvo limitado a África y Asia. Se ha propuesto que existen tres linajes originales del virus: el de África Occidental, el del Este-Centro-Sur África (ECSA), y el asiático. A partir del 2004, ocurrió la reemergencia del linaje ECSA en una isla francesa del Océano Índico (Isla La Reunión) y en el 2007 aparecieron los primeros años en Europa. Por otro lado, en el año 2013, se produjo un brote del virus en una isla del Caribe (7, 8), pero esta vez, la reemergencia se asoció al linaje asiático, que se difundió en las Américas y llegó a Argentina en el año 2016 (7-9).

CHIKV tiene un genoma de ARN de

polaridad positiva con dos marcos de lectura abiertos. El primero codifica para las proteínas que forman el complejo de replicación viral, el cual sintetiza la cadena negativa y a partir de esa, el genoma viral y el ARN subgenómico. Este último corresponde al segundo marco de lectura y codifica para las proteínas estructurales del virus. En los extremos se encuentran las regiones no codificantes (5'UTR y 3'UTR). El 3'UTR de CHIKV contiene un número variable de repeticiones cortas de secuencias (DRs por Direct Repeats) (10-12). Este rasgo es muy llamativo, ya que los virus tienen genomas muy compactos. El número de repeticiones varía entre los linajes virales. Por ejemplo, el 3'UTR del linaje ECSA contiene sólo dos tipos de repeticiones: DR1 (dos copias) y DR2 (tres copias). En cambio, el linaje asiático, que se generó hace 100 años a partir del ECSA, contiene mutaciones puntuales e inserciones en las DR1 y DR2 [en este linaje DR (1+2)] y la duplicación de una nueva secuencia (DR3). La cepa que apareció en las Islas del Caribe (CHIKV-Cbn) y se diseminó en América, tiene un 3'UTR nunca descrito en la naturaleza, con tres copias de DR (1+2) y dos copias de DR3 (13). La gran heterogeneidad del 3'UTR de CHIKV sugiere que esta región del genoma juega un papel importante durante la evolución viral. Por este motivo, nos interesamos en estudiar la evolución del 3'UTR de CHIKV durante la adaptación viral a sus hospedadores naturales.

Demostramos que, durante la adaptación a células de mamífero, la recombinación por cambio de molde ocurre frecuentemente en el 3'UTR del genoma de CHIKV, generando una colección de variantes virales. Estas variantes virales tienen distinta capacidad para replicar en mamífero y mosquito. En consecuencia, la población viral cambia cuando el virus alterna entre hospedadores. Además, indagamos sobre el mecanismo de recombinación en el 3'UTR de CHIKV e identificamos las secuencias y estructuras que la favorecen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis del genoma viral

En el laboratorio disponemos del clon infeccioso de la cepa Caribe del virus chikungunya (CHIKV-Cbn), que consiste en un plásmido que contiene el genoma viral completo en forma de ADN copia, bajo el promotor de la polimerasa SP6.

Este plásmido permite la incorporación de mutaciones y deleciones por genética inversa. La construcción Mut 3'UTR se generó mediante PCR de ensamblaje, reemplazando el fragmento WT por el fragmento con la deleción de las tres copias de las DR(1+2).

Las construcciones se linealizaron mediante digestión con NotI y se utilizaron como moldes para la transcripción in vitro con la polimerasa SP6, en presencia de la estructura Cap m7G(5)ppp(5)G, utilizando el kit de transcripción mMessage Machine (Thermo Fisher).

Células, transfecciones y evolución in vitro

Las células de mamífero BHK-21 (riñón de hámster *Mesocricetus auratus*, ATCC, CCL-10) se cultivaron a 37 ° C en medio MEM alfa (Gibco) en atmósfera de 5% CO₂ suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco) y 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco).

Las células de mosquito C6/36 (*Aedes albopictus*, ATCC, CRL-1660) se cultivaron a 28 ° C en medio Leibovitz L-15 (Gibco) suplementado con 10% de FBS, 10% de fosfato de triptosa (Britania), 1% de penicilina-estreptomicina y anfotericina B (Gibco).

Para las transfecciones de ARN, las líneas celulares se cultivaron hasta una confluencia del 60-70% y se transfectaron en placas de 24 pocillos utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los virus se cosecharon al cabo de dos días y se realizó una segunda infección en las mismas líneas celulares con una multiplicidad de infección (MOI) = 0,5.

A continuación, se extrajeron los ARN virales de los sobrenadantes de cultivo con TRIzol™ (Invitrogen) y se utilizaron para reacciones de RT-PCR con el oligonucleótido T15 (5'-TTTTTTTTTTTTTGAATAT-3', complementario de la cola poli(A) más los últimos 7 nucleótidos del genoma del CHIKV). Las reacciones de PCR se realizaron utilizando el oligonucleótido inverso T15 y el oligonucleótido directo T16 (5'-CTAATCGTGGTCTATGC-3', complementario de la última porción de la región codificante del genoma viral).

Los productos se ligaron en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y se utilizaron para transformar bacterias XLI-Blue. Se realizaron dos experimentos independientes.

En cada experimento se analizaron 20 clones para los virus WT y Mut 3'UTR. La longitud de los 3'UTR individuales se estimó resolviendo el producto de la PCR T15-T16 en geles de agarosa al 1,5%.

Los clones plasmídicos individuales se secuenciaron mediante el método Sanger.

Cría de mosquitos

Se utilizaron colonias de laboratorio de mosquitos *Aedes albopictus* (19ª generación; recogidos originalmente en Phu Hoa, provincia de Binh Duong, Vietnam).

Las condiciones del insectario para el mantenimiento de los mosquitos fueron 28 ° C, 70% de humedad relativa y un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

Los adultos se mantuvieron con acceso permanente a una solución de sacarosa al 10%. A las hembras adultas se les suministró sangre de conejo comercial (BCL, Boisset-Saint-Priest, Francia) dos veces por semana a través de un sistema de alimentación por membrana (Hemotek Ltd).

Infecciones experimentales de mosquitos

Los ensayos de infección se llevaron a cabo en un laboratorio de bioseguridad de nivel 3 (BSL-3) utilizando hembras de 7 a 10 días de edad a las que se privó de alimento 24 h antes de la infección.

Se ofreció a los mosquitos sangre infecciosa

literatura gris relacionada con nuestro durante 30 minutos a través de un sistema de alimentación por membrana (Hemotek Ltd).

Antes de suplementar la sangre, el stock viral se diluyó en medio Leibovitz L-15 con un 0,1% de bicarbonato sódico (Gibco) para conseguir un título infeccioso de entre 1×10^6 y 1×10^7 unidades formadoras de placas/ml.

Tras la ingesta de sangre, se seleccionaron las hembras totalmente infectadas y se incubaron a 28 ° C con una humedad relativa del 70% y un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con acceso permanente a sacarosa al 10%.

En diferentes momentos tras la infección, los mosquitos se homogeneizaron en microtubos que contenían perlas de acero (5 mm de diámetro) y 300 µl de DMEM suplementado con 2% de FBS utilizando un instrumento TissueLyser II (Qiagen).

Los homogeneizados se clarificaron por centrifugación y se almacenaron a -80 ° C hasta su procesamiento.

Para analizar el 3'UTR de CHIKV en las poblaciones virales, los ARN extraídos con TRIzol se utilizaron en reacciones de transcripción inversa con el oligonucleótido T15 y luego, en reacciones de PCR con los oligonucleótidos T15 y T16.

La longitud de los 3'UTR individuales se estimó en geles de agarosa al 1,5%. Los clones plasmídicos individuales se secuenciaron mediante el método Sanger.

Sangre humana y declaración ética

La sangre humana utilizada para alimentar a los mosquitos se obtuvo de donantes voluntarios sanos.

El reclutamiento de donantes se organizó mediante la evaluación de investigadores locales a partir de la historia clínica, los resultados de laboratorio y los exámenes clínicos.

Las muestras biológicas se suministraron mediante la participación

de voluntarios sanos en la plataforma de biobancos ICAReB (BB-0033-00062 / Plataforma ICAReB / Institut Pasteur, París / BBMRI AO203 / [BIORESOURCE]) del Institut Pasteur a los protocolos CoSImmGen y Diagmicoll que han sido aprobados por el Comité Ético Francés (CPP) Ilede-France I. El protocolo Diagmicoll fue declarado al Ministerio de Investigación francés con la referencia: DC 2008-68 COL1.

Análisis estructural

Las secuencias del 3'UTR del CHIKV se alinearon utilizando el programa ClustalW2. La estructura secundaria del ARN se predijo con el programa RNAalifold. En base a los alineamientos del 3'UTR, se identificaron los breakpoints de recombinación del ARN.

Experimentos de competencia

Los 3'UTRs de virus recombinantes seleccionados se introdujeron en el clon infeccioso parental.

A continuación, los ARN parentales y recombinantes se obtuvieron mediante transcripción *in vitro*, se cuantificaron y se mezclaron por pares en proporciones definidas.

Se transfectó una cantidad total de 3 µg de transcritos por pocillo en células cultivadas en dos experimentos independientes.

Los virus se recogieron de los sobrenadantes y se utilizaron para reinfectar células frescas.

Tras uno y dos pasajes, se extrajo el ARN, se utilizó como molde para las reacciones de RT-PCR y se ligó en el vector pCR2.1-TOPO.

A continuación, se calculó la abundancia relativa de cada virus en la población.

RESULTADOS

Evolución experimental del 3'UTR del genoma de CHIKV en células de mamífero

Puesto que distintos linajes virales contienen distinto número de copias de las DRs en el 3'UTRs, pensamos que esta región del genoma viral juega un papel importante durante la evolución viral.

Para investigarlo, realizamos experimentos de evolución *in vitro*.

Estos experimentos consisten en realizar pasajes virales sucesivos en células crecidas en cultivo y al término de estos, se analiza el genoma de la población viral.

Para nuestros experimentos, utilizamos la variante CHIKV-Cbn, la que llegó a las Américas en el 2013, y tiene 3 copias de DR (1+2) y dos copias de DR3 (Figura 1A). Construimos también un virus mutante conteniendo un 3'UTR mínimo (Mut 3'UTR). Sintetizamos *in vitro* el genoma del virus wild type (WT) y de Mut 3'UTR y los transfectamos en células de mamífero crecidas en cultivo (BHK, derivadas de riñón de hámster).

Para obtener las poblaciones virales adaptadas, infectamos células frescas con los sobrenadantes de células infectadas (Figura 1B).

Después de dos pasajes en cultivo, recolectamos los sobrenadantes, extrajimos el ARN total, amplificamos y clonamos el 3'UTR del genoma viral.

En las Figuras 1C y 1D se muestran geles de agarosa representativos y en cada calle, se evidencia el tamaño del 3'UTR de una variante que compone la población viral. Observamos que la población derivada del virus WT está formada por una colección de variantes virales con deleciones de las DRs en el 3'UTR, que representaron el 70% de la población viral.

Contrariamente, la población derivada de Mut 3'UTR fue homogénea y no detectamos variabilidad en el 3'UTR.

Estos resultados indican que el 3'UTR de CHIKV es proclive a perder copias de las DRs durante la adaptación a células de mamífero, dependientemente de su arquitectura. Aquellos virus con mayor número de copias de las DRs generan poblaciones virales más heterogéneas que los virus que contienen un 3'UTR mínimo.

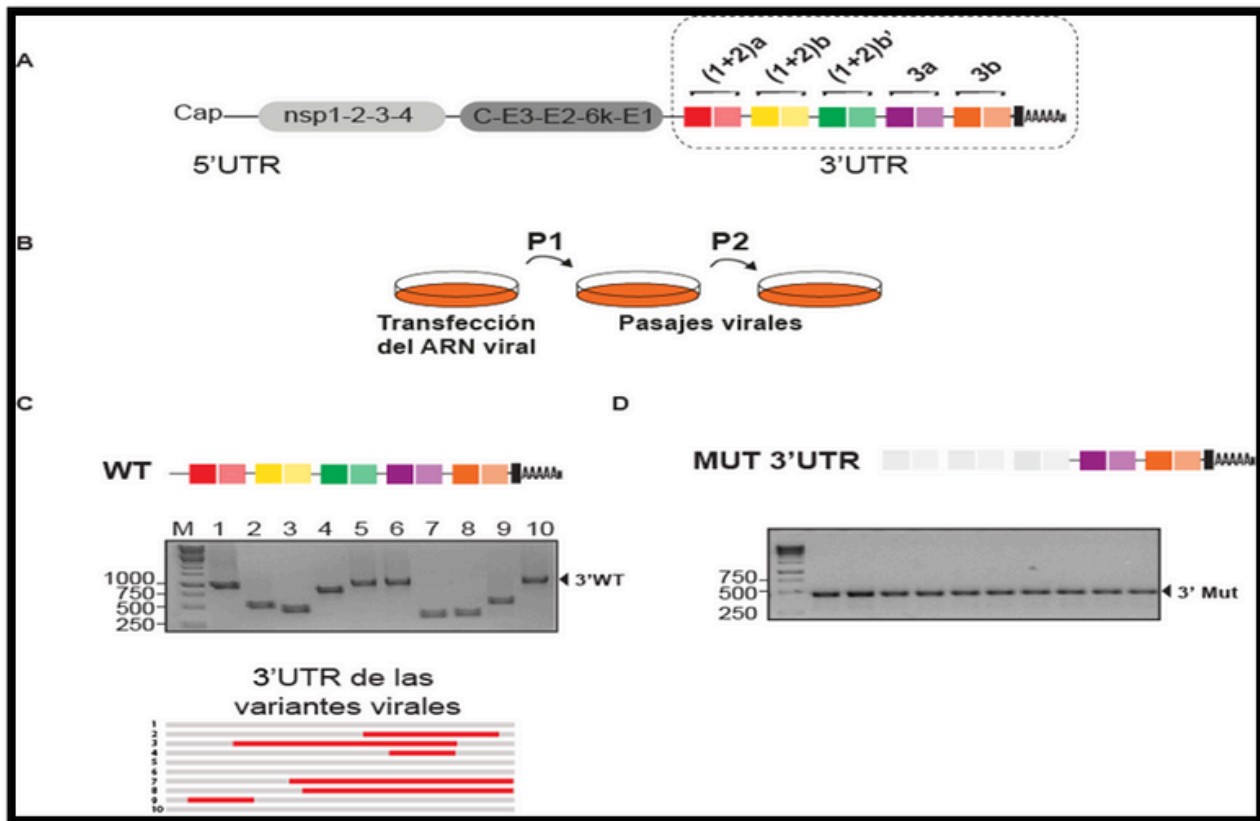


FIGURA 1. Composición de las poblaciones de CHIKV en células de mamífero (A) Representación esquemática del genoma viral. Las repeticiones de secuencias (DRs) en el 3'UTR se muestran como bloques de colores. (B) Protocolo de evolución experimental. (C) Gel de agarosa representativo donde se muestra el 3'UTR de las variantes que componen la población derivada del virus WT. Abajo, se representa la secuencia del 3'UTR de cada variante viral y con líneas rojas, las deleciones. (D) Gel de agarosa representativo donde se muestra el 3'UTR de la población derivada de un virus mutante que contiene un 3'UTR mínimo.

Infección de mosquitos con las poblaciones adaptadas a células de mamífero

El CHIKV debe alternar obligatoria y constantemente entre mosquito y mamífero, que constituyen dos sistemas biológicos muy diferentes y, por ende, tienen distintos requerimientos para la replicación viral.

En consecuencia, es esperable que mamífero y mosquito ejerzan distintas presiones de selección sobre la población viral, modulando su composición.

Para estudiar la dinámica de la población viral durante el cambio de hospedador, alimentamos cepas de mosquitos de referencia del género *Aedes* con sangre infectada con las poblaciones adaptadas a mamífero derivadas del virus WT o de la Mut 3'UTR.

A los ocho días, extrajimos el ARN de

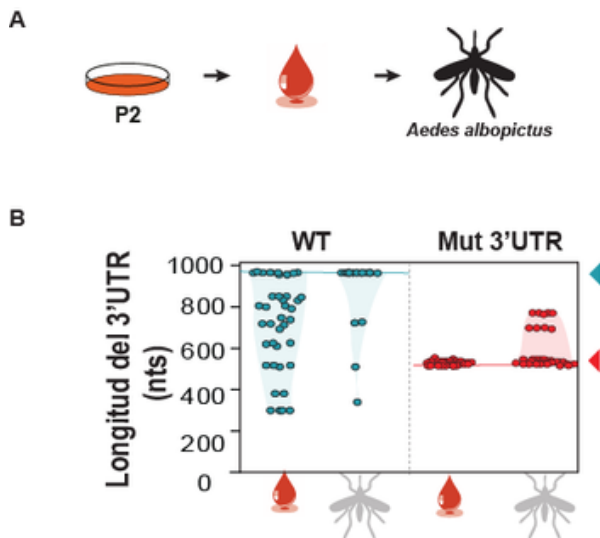
mosquitos individuales y analizamos el 3'UTR de las variantes virales (Figura 2A). En los mosquitos alimentados con la población derivada del WT, las variantes con deleciones se seleccionaron negativamente y pasaron a representar solo el 15% de la población (Figura 2B, izquierda).

En cambio, en los mosquitos alimentados con el virus mutante, emergieron variantes con 3'UTRs más largos (Figura 2B, derecha).

Estos resultados indican que el 3'UTR de CHIKV cambia durante el cambio de hospedador, y distintas variantes virales son seleccionadas negativa y positivamente en cada uno de ellos.

Dentro de los mosquitos infectados, se seleccionan variantes virales con 3'UTR más largos.

Asimismo, luego de infectar mosquitos con un virus que contiene un 3'UTR mínimo, se generan variantes virales que insertaron copias de las DRs en el 3'UTR.



Asimismo, luego de infectar mosquitos con un virus que contiene un 3'UTR mínimo, se generan variantes virales que insertaron copias de las DRs en el 3'UTR.

Ensayos de competencia viral

Como vimos, en células de mamífero predominan las variantes con deleciones en el 3'UTR, mientras que en mosquito estas variantes son desplazadas por aquellos con el 3'UTR WT.

Para examinar el fitness o capacidad replicativa de las variantes virales, realizamos ensayos de competencia viral.

Estos ensayos son el gold standard para determinar el fitness de dos virus y consiste en hacer competir una mezcla de virus en cultivo celular.

Aquel virus con mayor fitness aumentará su abundancia relativa e incluso puede desplazar al otro.

Para realizar estos ensayos, construimos virus conteniendo el 3'UTR de variantes virales seleccionadas y los hicimos competir con el virus WT.

Luego de dos pasajes virales en células de mosquito o células de mamífero, estimamos la abundancia de cada uno. A modo de ejemplo, mostramos los resultados para una variante representativa (Del 3'UTR).

En células de mamífero Del 3'UTR fue capaz de desplazar al virus WT, lo que indica que el virus con deleciones tiene un fitness mayor que el que tiene un 3'UTR WT.

Por el contrario, en células de mosquito, el virus WT fue capaz de desplazar a Del 3'UTR, lo cual indica que las repeticiones de secuencia confieren un mayor fitness en este hospedador.

Además de estos dos virus, observamos que emergen en cultivo celular nuevas variantes virales, ausentes en la mezcla inicial (Figura 3, en gris).

Concluimos que las variantes virales están sometidas a presiones opuestas de selección en los hospedadores virales: las DRs son beneficiosas para la replicación viral en células de mosquito y redundantes/desventajosas en células de mamífero.

Mecanismo de generación de las variantes virales

En estudios previos de nuestro laboratorio (14), demostramos que las variantes del 3'UTR se generan por recombinación homóloga.

En este proceso, la polimerasa viral cambia de molde y continua la síntesis de ARN.

Si su reasociación ocurre hacia el 5'UTR respecto al punto de disociación se generan genomas con inserciones, mientras que si ocurre en una secuencia hacia el 3'UTR se generan genomas con deleciones (Figura 4A). Generalmente, este mecanismo no ocurre al azar, sino que existen secuencias y/o estructuras que lo favorecen.

Los elementos que favorecen la recombinación suelen encontrarse en

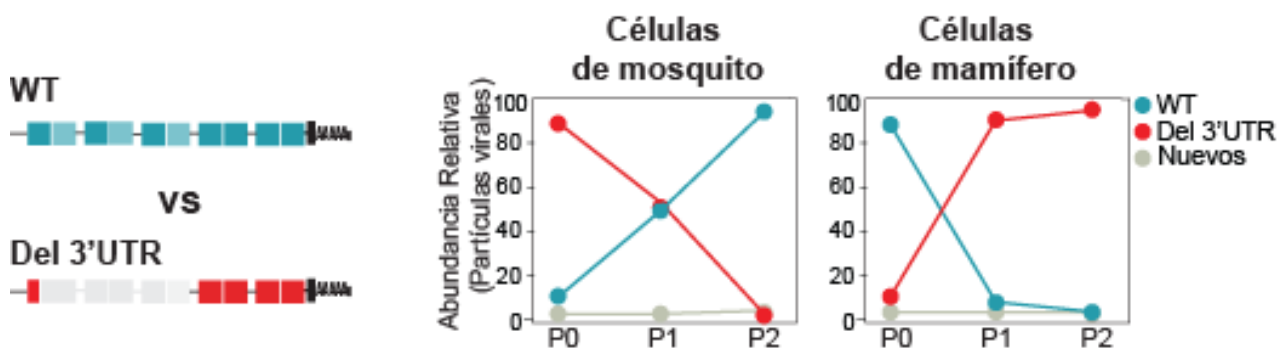


FIGURA 3.

las cercanías de las regiones que flanquean las deleciones y/o inserciones, es decir, en los sitios donde ocurrió la disociación y/o reasociación de la polimerasa viral. Estas regiones se denominan comúnmente puntos de corte o breakpoints de recombinación (Figura 4B).

Para investigar los elementos que promueven la recombinación en el 3'UTR de CHIKV, secuenciamos el 3'UTR de las variantes virales recuperadas en los ensayos anteriores, lo alineamos con el 3'UTR parental, e identificamos los breakpoints.

Observamos que la recombinación no ocurrió al azar, sino en regiones definidas del 3'UTR.

En particular, en ciertas variantes virales la recombinación ocurrió en regiones ricas en adenina (A) y uracilo (U), y en la cercanía de estructuras secundarias de ARN como hairpins, interacciones ARN-ARN de largo alcance y Stem-loops (Figura 4B).

Estos resultados demuestran que el 3'UTR de CHIKV contiene elementos de secuencia y estructuras de ARN que favorecen la recombinación, explicando su gran plasticidad en la naturaleza, en mosquitos de laboratorio y en cultivo celular.

DISCUSIÓN

En este trabajo, exploramos la dinámica del 3'UTR de las poblaciones virales adaptadas in vitro a células de mamífero y en colonias de mosquitos crecidas en laboratorio. Observamos que el 3'UTR es muy plástico y

cambia drásticamente su composición durante la adaptación de CHIKV a cultivo celular.

En células de mamífero, la población viral está compuesta por una colección de variantes virales con deleciones en el 3'UTR.

La diversidad de la población está relacionada con la organización del 3'UTR: los virus con múltiples copias de las DRs evolucionan rápidamente, mientras que los que tienen un 3'UTR mínimo están restringidos en su capacidad evolutiva.

Interesantemente, distintos linajes virales tienen distinto número de copias de las DRs en el 3'UTR, por lo que es posible que difieran en su potencial evolutivo.

Cuando el virus pasa a mosquito, la población viral cambia drásticamente, seleccionándose negativamente las variantes virales con deleciones.

Asimismo, cuando los mosquitos son infectados con un virus que contiene un 3'UTR mínimo, se generan variantes virales con inserciones en el 3'UTR.

La diversidad de la población está relacionada con la organización del 3'UTR: los virus con múltiples copias de las DRs evolucionan rápidamente, mientras que los que tienen un 3'UTR mínimo están restringidos en su capacidad evolutiva.

Interesantemente, distintos linajes virales tienen distinto número de copias de las DRs en el 3'UTR, por lo que es posible que difieran en su potencial evolutivo. Cuando el virus pasa a mosquito, la población viral cambia

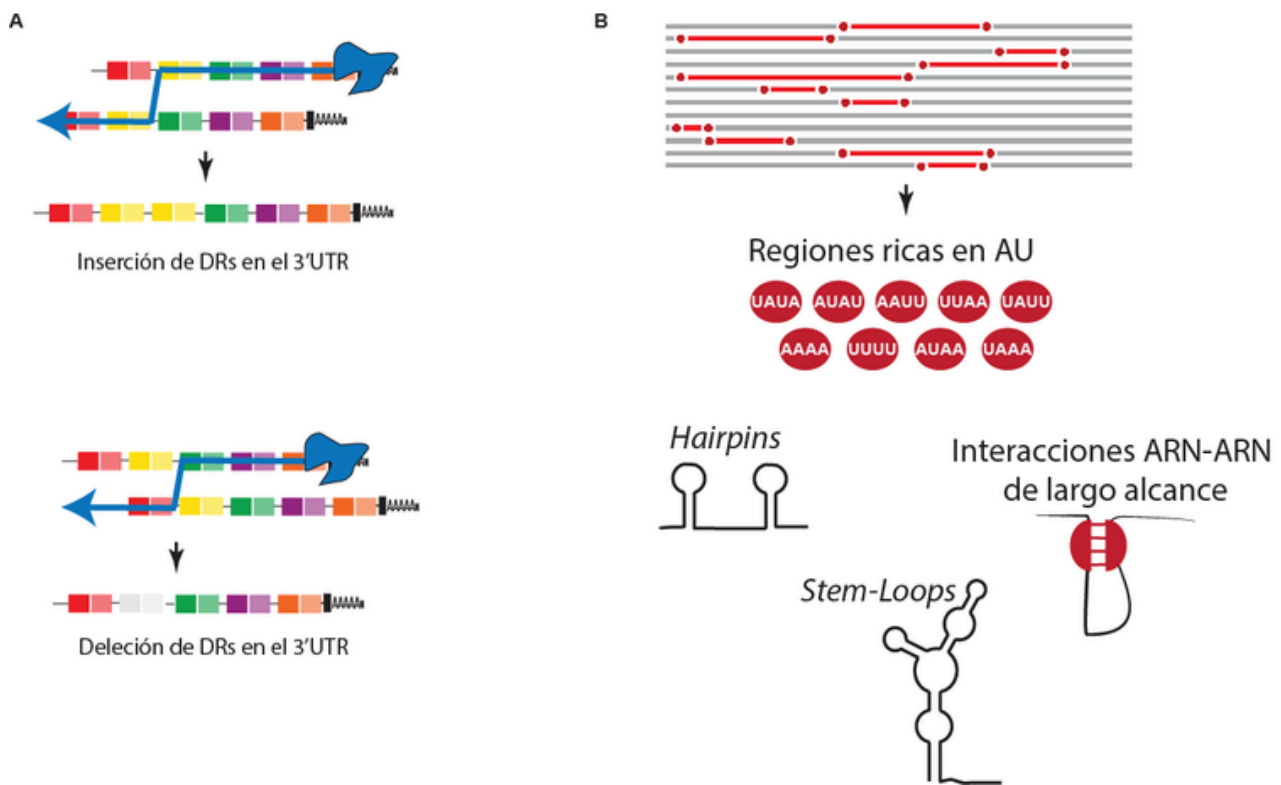


FIGURA 4

seleccionándose negativamente las variantes virales con deleciones.

Asimismo, cuando los mosquitos son infectados con un virus que contiene un 3'UTR mínimo, se generan variantes virales con inserciones en el 3'UTR.

El virus chikungunya, al igual que otros arbovirus, debe alternar constantemente entre mamíferos y mosquitos, que representan dos sistemas biológicos muy diferentes.

Para ello, debe adaptarse rápidamente y cumplir con las condiciones que cada hospedador impone para la replicación viral.

Nuestros experimentos de competencia viral demostraron que el 3'UTR está sometido a distintas presiones de selección en mamífero y mosquito.

Esto sugiere que la capacidad evolutiva del virus es afectada por el hospedador además de estar afectada por rasgos intrínsecos del genoma viral.

Proponemos entonces, que la recombinación homóloga es una estrategia viral para incorporar o eliminar bloques de las DRs en el genoma viral, con el fin de "construir" un 3'UTR a medida del hospedador y satisfacer los requerimientos que las distintas especies

imponen para la replicación viral.

Para otros virus se observó que la recombinación no ocurre al azar (15-18).

Nos propusimos entonces identificar los elementos del 3'UTR que favorecen la recombinación.

Encontramos que ciertos motivos de ARN se encontraban con recurrencia en los breakpoints de recombinación, como las secuencias ricas en AU y las estructuras estables de ARN.

Uno de los factores que mantiene asociado el complejo de replicación al molde de ARN es la complementariedad de secuencias entre la hebra naciente de ARN y la molécula molde.

Por lo tanto, es probable que cuando existen en el molde una abundancia de secuencias ricas en AUs, esta hibridación sea débil y favorezca la disociación del complejo de replicación viral, promoviendo el cambio de molde por este mecanismo molecular.

En cambio, las estructuras de ARN posiblemente ofrezcan una resistencia a la procesividad del complejo de replicación y favorezcan la recombinación por este mecanismo.

En síntesis, las repeticiones del 3'UTR de CHIKV contienen elementos de secuencia y estructura que promueven la recombinación mediante distintos mecanismos moleculares. Los linajes ancestrales de CHIKV tienen 3'UTRs más cortos, mientras que los linajes reemergentes como el CHIKV-Cbn poseen duplicaciones de secuencias repetidas en el 3'UTR.

Por consiguiente, la reemergencia viral parecería estar asociada a la incorporación de DRs en el 3'UTR (19).

Puesto que estas DRs se incorporaron íntegramente en regiones cercanas a los dominios que identificamos en este trabajo, es muy probable que se hayan incorporado por recombinación por cambio de molde.

La posibilidad de modular la recombinación viral es una herramienta muy poderosa. Aquellos virus con dificultades para recombinar están restringidos en su capacidad evolutiva. Por lo tanto, la incorporación de cambios en el genoma viral que limiten la recombinación podría ser útil en el diseño de vacunas, ya que evitarían las reversiones de virus atenuados a cepas virulentas (20).

Por otro lado, aquellos virus menos recombinogénicos tendrían dificultades para adaptar el 3'UTR al hospedador, lo que supone una barrera importante para el cambio de especie.

En conjunto, nuestros hallazgos nos permiten comprender las bases moleculares del cambio de hospedador, la dinámica de las poblaciones virales y la evolución de las cepas epidémicas de CHIKV, ofreciendo alternativas novedosas para el diseño de cepas atenuadas.

BIBLIOGRAFIA:

1. <https://www.paho.org>.
2. Domingo E. Rapid evolution of viral RNA genomes. *J Nutr.* 1997;127(5 Suppl):958S-61S.
3. Simon-Loriere E, Holmes EC. Why do RNA viruses recombine? *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(8):617-26.
4. Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol.* 1997;51:151-78.
5. Domingo E, Escarmís C, Sevilla N, Moya A, Elena SF, Quer J, et al. Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB J.* 1996;10(8):859-64.
6. Weaver SC, Lecuit M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *N Engl J Med.* 2015;372(13):1231-9.
7. Lanciotti RS, Valadere AM. Transcontinental movement of Asian genotype chikungunya virus. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(8):1400-2.
8. Weaver SC. Arrival of chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(6):e2921.
9. Mourad O, Makhani L, Chen LH. Chikungunya: An Emerging Public Health Concern. *Curr Infect Dis Rep.* 2022;24(12):217-28.
10. Hyde JL, Chen R, Trobaugh DW, Diamond MS, Weaver SC, Klimstra WB, et al. The 5' and 3' ends of alphavirus RNAs--Non-coding is not non-functional. *Virus research.* 2015;206:99-107.
11. Chen R, Wang E, Tsetsarkin KA, Weaver SC. Chikungunya virus 3' untranslated region: adaptation to mosquitoes and a population bottleneck as major evolutionary forces. *PLoS pathogens.* 2013;9(8):e1003591.
12. Pfeffer M, Kinney RM, Kaaden OR. The alphavirus 3'-nontranslated region: size heterogeneity and arrangement of repeated sequence elements. *Virology.* 1998;240(1):100-8.
13. Stapleford KA, Moratorio G, Henningsson R, Chen R, Matheus S, Enfissi A, et al. Whole-Genome Sequencing Analysis from the Chikungunya Virus Caribbean Outbreak Reveals Novel Evolutionary Genomic Elements. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(1):e0004402.
14. Filomatori CV, Bardossy ES, Merwaiss F, Suzuki Y, Henrion A, Saleh MC, et al. RNA recombination at Chikungunya virus 3'UTR as an evolutionary mechanism that provides adaptability. *PLoS Pathog.* 2019;15(4):e1007706.
15. Nagy PD, Bujarski JJ. Engineering of homologous recombination hotspots with AU-rich sequences in brome mosaic virus. *J Virol.* 1997;71(5):3799-810.
16. da Silva Couto R, de Oliveira Ribeiro G, Pandey RP, Leal É. Is the Intergenic Region of. *Viruses.* 2022;14(11).
17. Nagy PD, Pogany J, Simon AE. RNA elements required for RNA recombination function as replication enhancers in vitro and in vivo in a plus-strand RNA virus. *EMBO J.* 1999;18(20):5653-65.
18. Carpenter CD, Oh JW, Zhang C, Simon AE. Involvement of a stem-loop structure in the location of junction sites in viral RNA recombination. *J Mol Biol.* 1995;245(5):608-22.
19. Merwaiss F, Filomatori CV, Suzuki Y, Bardossy ES, Alvarez DE, Saleh MC. Chikungunya Virus Replication Rate Determines the Capacity of Crossing Tissue Barriers in Mosquitoes. *J Virol.* 2021;95(3).
20. Yeh MT, Bujaki E, Dolan PT, Smith M, Wahid R, Konz J, et al. Engineering the Live-Attenuated Polio Vaccine to Prevent Reversion to Virulence. *Cell Host Microbe.* 2020;27(5):736-51.e8.