

Virus chikungunya: Características virales y evolución genética

Chikungunya Virus: Viral Features and Genetic Evolution

Guillermo Cervantes-Acosta¹, Homero Sanjuán-Vergara²

Resumen

El virus chikungunya pertenece al género Alphavirus, de la familia de los Togaviridae. Es transmitido por artrópodos, en particular por la picada de especies de mosquitos, tales como Aedes aegypti y Aedes albopictus. El curso clínico característico de la infección incluye fiebres, artralgias y exantema. Desde que fue reportado en 1952 en los límites de Tanzania y Mozambique ha generado brotes de enorme significado epidemiológico. Recientemente fue causado un brote en las Américas por una cepa del virus, aparentemente, asiática. En esta revisión presentamos su filogenia, estructura y organización del genoma. Enfatizaremos en el mecanismo de multiplicación y la expresión genética. Finalmente, la interacción virus-huésped y sus mecanismos de adaptación a vectores específicos también son discutidos.

Palabras clave: virus chikungunya, arbovirus, genoma viral, evolución genética, multiplicación viral, vectores.

Abstract

Chikungunya virus belongs to the Alphavirus genus of the family Togaviridae. It is transmitted by arthropods, in particular by the biting of mosquito species such as Aedes aegypti and Aedes albopictus. The characteristic clinical course of the infection includes fever, arthralgia, and rash. Since it was reported on 1952 on the borders of Tanzania and Mozambique, it has been triggered outbreaks with tremendous epidemiological significance. Recently an outbreak was caused in the Americas by an apparent Asian strain of this virus. In this review we present its phylogeny, structure and genome organization. We will emphasize the mechanism of replication and gene expression. Finally, the virus-host interaction and its mechanisms of adaptation to specific vectors are also discussed.

Keywords: chikungunya virus, arboviruses, viral genome, genetic evolution, viral replication, vectors.

¹ Ph.D. Profesor asociado, tiempo completo, Departamento de Medicina Universidad del Norte. Barranquilla (Colombia). guicerva@uninorte.edu.co

² Ph.D. Profesor titular, tiempo completo, Departamento de Medicina Universidad del Norte. Barranquilla (Colombia) hsanjuan@uninorte.edu.co

Correspondencia: Guillermo Cervantes Acosta. Carrera 58 n° 68-174. Barranquilla (Colombia). Teléfono: 300 440 8112. Institución: Universidad del Norte, km 5, vía Puerto Colombia. Barranquilla (Colombia). guicerva@uninorte.edu.co

INTRODUCCIÓN

Los arbovirus, término derivado de la expresión en inglés “Arthropod-borne virus”, constituyen un grupo importante del cual forman parte virus pertenecientes a varias familias. Tienen en común que son transmitidos por artrópodos como los mosquitos y los ciclos que realizan entre el huésped humano y el vector han sido entonces los determinantes de la generación de epidemias en las zonas geográficas donde se localizan estos últimos (1, 2).

Recientemente se ha reportado en las Américas la emergencia del virus chikungunya (CHIKV), un arbovirus perteneciente a la familia Togaviridae, causante de la fiebre del mismo nombre, caracterizada por fiebres altas, artralgia y exantema (3, 4, 5).

El nombre de este virus deriva del makonde, lengua bantú hablada en Tanzania y Mozambique. Significa “el hombre que camina encorvado”, en alusión al dolor articular provocado por la infección (6).

A pesar de ser un virus de reciente aparición en el continente americano, desde 1952 fue reportado en las fronteras entre Tanzania y Mozambique. De aquí se ha desplazado y ocasionado epidemias esporádicas hacia Asia, islas del océano Índico, Italia y últimamente las Américas (7, 8, 9). La transmisión autóctona del virus en estas regiones se ha favorecido por la presencia urbana de sus principales vectores, las especies de mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (10, 11, 12) (figura 1).

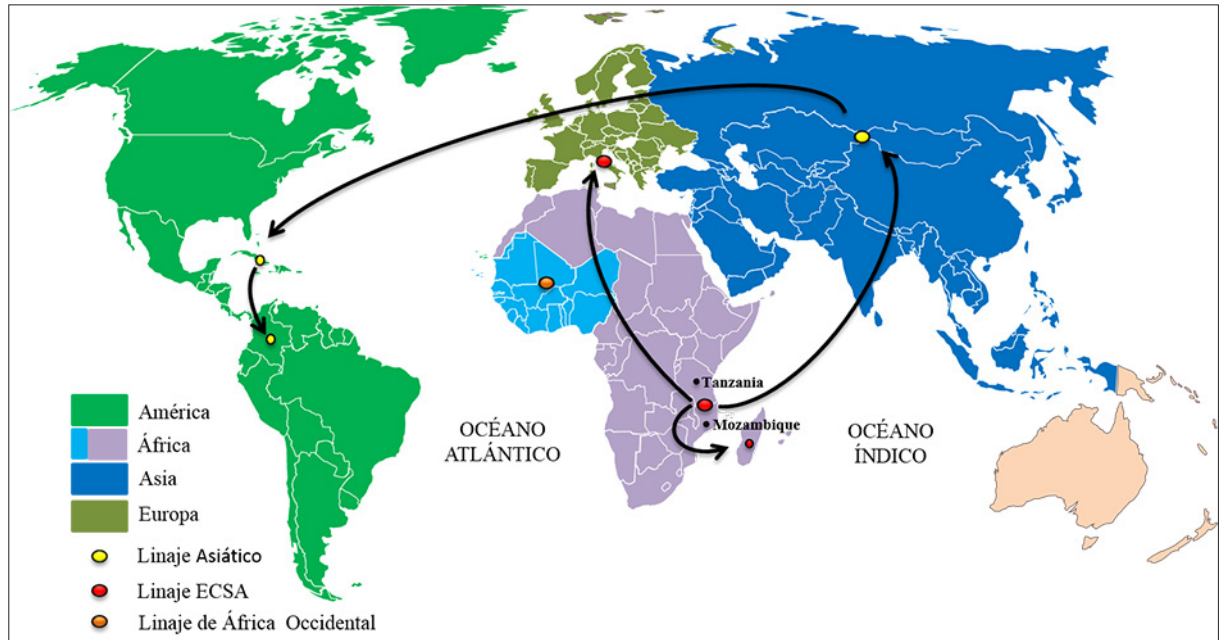


Figura 1. Origen y propagación más probable del CHIKV antes de llegar a América. Los linajes Asiático, ECSA y de África Occidental son representados

En Colombia, país donde ya ha sido reportado por primera vez, se teme una no desestimable diseminación y emergencia de este patógeno debido a la presencia de los *Aedes* transmisores, al desplazamiento de los vectores a otras regiones en respuesta al calentamiento global que afectó su nicho ecológico y a la migración urbana que invadió estos nichos (13). De hecho, se reportó una epidemia por el CHIKV con picos máximos a finales de 2014 y principios de 2015. De acuerdo con lo reportado por el Boletín de la semana 53 del Instituto Nacional de Salud, se presentaron 96 433 casos, de los cuales 90 488 fueron confirmados por clínica y 611 por laboratorio. Se debe tener en cuenta que no todos los casos son notificados, pudiéndose presentar, en consecuencia, un alto subregistro (14).

En esta revisión se abordan aspectos relacionadas con la estructura viral, su mecanismo de multiplicación, la interacción virus-vector y la evolución genética.

FILOGENIA

Taxonómicamente, el CHIKV pertenece a los Togaviridae, familia de virus envueltos que recibió su denominación de la expresión latina *toga*, que significa “manto”. Esta familia está constituida por dos géneros. El primero es llamado Rubivirus, el cual posee solo una especie, el virus de la Rubeola, conocido por la enfermedad exantémica que produce. El segundo género es el Alphavirus, caracterizado porque la mayoría es transmitida por artrópodos; llamado así por la letra griega alfa, debido a que inicialmente sus integrantes constituyeron el grupo A de los arbovirus. Este género lo constituyen, además del CHIKV, otras especies, tales como el virus de la Fiebre Equina Venezolana del Este, el virus de la Fiebre Equina Venezolana del Oeste, el Virus Mayaro,

el Virus Fort Morgan y otras especies no distribuidas en América. La mayoría de las especies pertenecientes a este género ha estado restringida a uno u otro continente, habiéndose reportado históricamente solo un número muy limitado de transferencias entre las Américas y el viejo continente. Este comportamiento contrasta con la mayoría de las familias de virus existentes, en las cuales la distribución de sus especies constituyentes es de tipo global (15).

ESTRUCTURA VIRAL Y ORGANIZACIÓN GENÓMICA

El CHIKV apenas alcanza entre 60 y 70 nm de diámetro y está constituido por viriones envueltos por una bicapa lipídica derivada de la membrana plasmática de la célula infectada. La envoltura posee 240 copias de heterodímeros de las glicoproteínas transmembranales tipo I, E2 y E1, las cuales forman proyecciones y median el reconocimiento del receptor para el virus en la célula diana (16, 17). Ambas proteínas de envoltura poseen gran capacidad antigénica (18). En la región central se localiza la cápside viral, de simetría icosaédrica y formada por alrededor de 240 copias de la proteína C (19). Esta encierra una molécula de ARN de una sola hebra de polaridad positiva de aproximadamente 11 800 pares de base de longitud, la cual constituye el genoma viral y posee una estructura de metilguanilina (capuchón) en posición 5' y una cola de poli-A en su extremo 3' (20).

La estructura genómica comprende dos cuadros de lectura abierta. El primero, situado hacia el extremo 5', posee 7 425 pares de base y codifica para las proteínas no estructurales del virus. La poliproteína traducida a partir de este primer cuadro de lectura posee 2474 residuos y da origen a las

proteínas nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4, mediante incisión por una proteasa viral. El segundo, situado hacia el extremo 3', codifica para una poliproteína de 1244 aminoácidos, la cual mediante proteólisis efectuadas por proteasas de origen viral y celular origina las cinco proteínas estructurales C, E3, E2, 6K, y E1 (21).

EXPRESIÓN GENÓMICA

El virus entra a la célula diana, monocito/macrófago, mediante mecanismos de endocitosis mediada por receptores, y la multiplicación la efectúa en el citoplasma celular. Luego de la acidificación de la vesícula y la correspondiente decapsidación, el genoma viral, consistente en un ARNm, es traducido en una poliproteína, llamada P1234. Esta poliproteína es escindida por la proteasa viral nsP2 en las cuatro proteínas no estructurales, necesarias para la transcripción y la replicación del ARN viral. Estas cuatro proteínas realizan actividad de ARN-polimerasa para la síntesis de ARN viral; colocación del capuchón en el extremo 5' del ARNm viral y en el ARNm subgenómico que da origen a las proteínas estructurales; actividad helicasa, implicada en el desenrollamiento de la molécula de ARN durante la replicación genómica y actividad de proteasa para el procesamiento de la poliproteína P1234 (22, 23).

La expresión de las cuatro proteínas no estructurales a partir de proteólisis de la P1234 procede mediante mecanismos que están implicados en la regulación de la replicación del ARN viral. Mediante un proceso de autoproteólisis, la poliproteína precursora origina la proteína intermediaria P123 y la proteína madura nsP4, capaces de realizar la síntesis de ARN de polaridad negativa (ARN-) viral pero que no son muy eficientes en la síntesis de ARN de polaridad positiva (ARN+). Una nueva

proteólisis de P123 entre los polipéptidos nsP1 y nsP2 da lugar a una actividad polimerasa que es capaz de sintetizar, en forma eficiente, tanto ARN- como ARN+. Una segunda proteólisis entre nsP2 y nsP3 origina una polimerasa capaz de sintetizar ARN+. Se ha propuesto que la regulación de la replicación del ARN procede mediante una proteólisis diferencial de P123. En las etapas precoces de la infección, nsP4 y P123 forman complejos de replicación de ARN- transitorios que desaparecen con la proteólisis de P123. En las etapas tardías de la infección, un nivel elevado de actividad de proteinasa viral elimina la síntesis de novo de P123 y ninguna síntesis adicional de ARN- es posible. En contraste, nsP4 y los productos de la proteólisis de P123 forman complejos de replicación de ARN+ que son estables y permanecen activos a lo largo del ciclo de infección (24, 25) (figura 2).

Las proteínas de estructura, consistentes en la proteína de la cápside, C, las glicoproteínas de envoltura, E3, E2 y E1 y la proteína 6K son traducidas como una poliproteína a partir de un ARNm subgenómico, sintetizado en las etapas tardías del ciclo de multiplicación que preceden al ensamblaje viral. El ARNm subgenómico es sintetizado por la polimerasa viral, utilizando como molde una molécula de ARN antigenómico. Una vez sintetizada la poliproteína precursora, la proteína C es liberada de esta mediante una actividad autocatalítica. La poliproteína remanente, consistente en una glicoproteína, es insertada mediante secuencias señales en el retículo endoplásmico, donde es escindida por enzimas celulares allí localizadas para originar la proteína precursora de E2, la glicoproteína PE2, la pequeña proteína 6K y la glicoproteína E1. Las glicoproteínas PE2 y E1 permanecen unidas formando un heterodímero, que es transportado hacia la membrana plasmática.

Se ha sugerido la transmisión vertical del virus de la hembra adulta del mosquito a las larvas, sin embargo, hasta ahora no se tienen evidencias concluyentes en una infección natural de este mecanismo de transmisión, como tampoco los intentos por demostrar en el laboratorio la transmisión transovariana han sido determinantes. No podría entonces ser tomada en cuenta la transmisión vertical en la mantención del ciclo viral (32, 33, 34).

Aparte del mosquito no se ha evidenciado la transmisión por otro vector. A pesar de que el virus ha sido aislado de la garrapata, este artrópodo no puede ser considerado como un vector potencial, ya que los intentos por infectarlo con el CHIKV han sido infructuosos. La presencia del virus podría entonces explicarse por estar presente en un componente alimenticio obtenido de la sangre de un vertebrado virémico y no digerido por este hematófago (35, 32).

Se ha determinado que el CHIKV circuló inicialmente en la región subsahariana de África, de donde es probablemente originario y considerado endémico. El virus cumple allí un ciclo enzoótico en el que participan mosquitos selváticos del género *Aedes* y primates no humanos. La emergencia de una epidemia implicó la transición desde el ciclo enzoótico a un ciclo urbano en el que mosquitos domésticos pudieron transmitirlo al humano (36).

Inicialmente se describieron dos linajes enzoóticos africanos identificados como el linaje de África Occidental y el linaje del Este, Centro y Sur de África (ECSA) (37, 38). En estudios filogenéticos más recientes, utilizando fragmentos subgenómicos o el genoma completo viral, se reportan, además de los genotipos africanos, un tercer genotipo denominado Asiático (39, 40).

La introducción del virus en Asia coincidió con la adaptación de un ciclo urbano en donde la transmisión de humano a humano es realizada por las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (41).

La necesidad del CHIKV de alternar entre dos huéspedes diferentes, al igual que en otros arbovirus, constituye una limitante para su evolución. Esto se debe a que mutantes que optimizan su adaptación o que son neutrales a uno de los huéspedes no son viables para su multiplicación en el otro (42, 43). Sin embargo, sorprendentemente, durante la gran epidemia iniciada por el genotipo ECSA en las costas de Kenia en 2004, conocido como linaje del océano Índico (IOL por sus siglas en inglés) y que terminó en la introducción del virus en la isla de La Reunión, al suroeste del océano Índico, se encontró la mutación del residuo alanina (A) a valina (V) en la posición 226 de la glicoproteína de envoltura E1. Esta mutante era transmitida más eficientemente por el vector predominante en la isla, el *Aedes albopictus*, comparada con el genotipo salvaje (44, 45). El aumento en la transmisión por este vector estaba relacionado con un incremento en la capacidad de infección de las células epiteliales del intestino medio del mosquito por parte de la mutante E1-A226V, permitiendo, en consecuencia, una mayor diseminación (46).

Mutaciones posteriores en las proteínas NSP2 y NSP3 y en las glicoproteínas E1, E2 y E3 han sido asociadas de forma específica a sublinajes derivados de desplazamientos del IOL a diversas regiones geográficas.

Se determinó que mutantes localizadas en la glicoproteína E2 consistentes en el reemplazo del correspondiente residuo por glutamina o ácido glutámico (E2-K252Q, E2-R198Q y E2-

L210Q) correspondieron con un aumento en la adaptación al vector *A. albopictus*. Todas estas mutantes fueron encontradas en cepas que ya poseían la primera mutante (E1-A226V) y que, por lo tanto, ya presentaban el fenotipo de una mayor capacidad de infección del *A. albopictus*.

Las mutantes E2-252Q, E2-198Q y E2-210Q constituyen entonces un segundo paso en el mecanismo de adaptación, lo cual potencializó el efecto logrado en la primera substitución.

Sorpresivamente, estas adaptaciones, que sugieren poder ayudar a una rápida diversificación del linaje, son especie específicas de vector y no tuvieron mayor efecto en la infección del vector urbano alterno, el *A. aegypti*.

De otra parte, similitudes de tipo estructural y funcional observadas entre las mutaciones correspondientes al segundo paso podrían permitir predecir la aparición de mutaciones adicionales con capacidad adaptativa.

En fin, el análisis de sublinajes que expresan una combinación de mutaciones ha revelado la existencia de momentos máximos de adaptación, que sugieren la aparición en el futuro de cepas de CHIKV con aun mayor eficiencia de transmisión (47).

El virus circulante en Colombia pudo haber sido introducido por viajeros provenientes de las islas del Caribe. De otra parte, análisis de secuencias aisladas en esta última región sugieren una fuerte asociación con el linaje asiático (48).

Análisis filogenéticos efectuados recientemente en Colombia a partir de secuencias parciales de la proteína no estructural NS1 y la glicoproteína E2 (49) y de secuencias com-

pletas de la glicoproteína E1 (50) revelaron que la cepa responsable del brote en nuestro territorio está relacionada estrechamente con la cepa aislada en la Islas Vírgenes Británicas, perteneciente al genotipo asiático. Estos estudios brindan una visión de la situación actual de la epidemia del CHKV en nuestra región.

Conflicto de intereses: ninguno.

Financiación: Universidad del norte.

REFERENCIAS

1. Reeves WC, Hammon W. Laboratory transmission of Japanese B encephalitis virus by seven species (three genera) of north american mosquitoes. *J Exp Med* 1946;83:185-94.
2. Barret ADT, Weaver SC. Arboviruses: alphaviruses, flaviviruses and bunyaviruses. En: Greenwood D, Slack RCB, Peutherer JF, editores. *Medical Microbiology*. 16ª edición. London: Churchill Livingstone; 2002. p. 484-501.
3. Van Bortel W, Dorleans F, Rosine J, Blateau A, Rousset D, Matheuss S et al. Chikungunya outbreak in the Caribbean region, december 2013 to march 2014, and the significance for Europe. *Euro Surveill* 2014; 19:1-11.
4. Cleton NB, Reusquen C, van Corp EC. The Chikungunya epidemic in the Caribbean: implication for travellers and physicians. *Ned Tijdschr Geneesk* 2014;158:A7918.
5. Garcia de Figueiredo ML, Moraes Figueiredo LT. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. *Rev Soc Bras Med Trop* 2014;47(6):677-683.
6. Robinson MC. An epidemic of virus disease in southern province, Tanganyika territory, in 1952-53. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1955;49:28-32.
7. Powers AM, Logue CH. Changing patterns of chikungunya virus: Re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J Gen Virol* 2007;88:23-63-2377.
8. Tssetsarkin KA, Chen R, Sherman MB, Weaver SC. Chikungunya virus: Evolution and

- genetic determinants of emergence. *Curr Opin Virol* 2011;1:310-317.
9. Kuehn BM. Chikungunya virus transmission found in the United States: US health authorities brace for wider spread. *JAMA* 2014;312:776-777.
 10. Horwood PF, Buchy P. Chikungunya. *Rev Sci Tech* 2015;34:479-489.
 11. Yergolkar PN, Tandale BV, Arankalle VA, Sathe PS, Sudeep AB et al. Chikungunya outbreaks caused by African genotype. *India Emerg Infect Dis* 2006;12:1580-1583.
 12. Kumar NP, Joseph R, Kamaraj T, Jambulingam P. A226V mutation in virus during the 2007 chikungunya outbreak in Kerala, India. *J Gen Virol* 2008;89:1945-1948.
 13. Pan American Health Organization (PAHO). Chikungunya outbreaks. PAHO; 2014.
 14. Instituto Nacional de Salud. *Boletín Epidemiológico* 2014;53: 17-19.
 15. Knipe DM, Howley PM. Aphaviruses. En: Wolters Klumer, editors. *Fields virology*. 6^a ed. Lippincot Williams & Wilkins; 2015:651-686.
 16. Voss JE, Vaney MC, Duquerroy S, Vonnrhein C, Girard-Blanc C, Crublet E et al. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature* 2010;468(7324):707-12.
 17. Metz SW, Geertsema C, Martina BE, Andrade P, Heldens JG, van Oers MM et al. Functional processing and secretion of Chikungunya virus E1 and E2 glycoproteins in insect cells. *Virol J* 2011;8:353. Doi: 10.1186/1743-422X-8-353.
 18. Fong RH, Banik SS, Mattia K, Barnes T, Tucker D, Liss N et al. Exposure of epitope residues on the outer face of the chikungunya virus envelope trimer determines antibody neutralizing efficacy. *J Virol* 2014;88(24):14364-14379.
 19. Simizu B, Yamamoto K, Hashimoto K, Ogata T. Structural proteins of Chikungunya virus. *J Virol* 1984;51(1):254-258.
 20. Knipe DM, Howley PM. Togaviridae. En: *Fields Virology*. 6^a ed. Wolters Klumer. Lippincot Williams & Wilkins; 2015:629-650.
 21. Khan AH, Morita, K, Parquet Md M del C, Hasebe F, Mathenge EG, e Igarashi A. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *J Gen Virol* 2002;83:3075-3084.
 22. Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: Gene expression, replication and evolution. *Microbiol. Rev* 1994;58:491-562.
 23. Saisawang C, Saitornuang S, Sillapee P, Ubol S, Smith DR, Ketterman AJ. Chikungunya nsP2 protease is not a papain-like cysteine protease and the catalytic dyad cysteine is interchangeable with a proximal serine. *Sci Rep* 2015;5:17125. doi: 101038/srep17125.
 24. Rupp JC, Sokoloski KJ, Gebhart NN, Hardy RW. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *J Gen Virol* 2015;96(9):2483-2500.
 25. 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. *J Virol* 1994;68:1874-1885.
 26. Schlesinger S, Schlesinger MJ. Formation of Sindbis virus proteins: identification of a precursor for one of the envelope proteins. *J. Virol* 1972;10:925-932.
 27. Schlesinger MJ, Schlesinger S. Large-Molecular-Weight Precursors of Sindbis Virus. *J Virol*. 1973;11:1013-1016.
 28. Diallo M, Thonnon J, Traore-Lamizana M, Fontenille D. Vectors of chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1999;60:281-286.
 29. Vanlandingham DL, Hong C, Klingler K, Tsetsarkin K, McElroy KL, Powers AM et al. Differential inactivities of O'nyong-nyong and Chikungunya virus isolates in *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* mosquitoes. *J Trop Med Hyg* 2005;72:616-621.
 30. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Human arboviral infections. En: Jawetz. *Melnick and Adelberg's Medical microbiology*. 23^a ed.. Singapore: McGraw-Hill; 2004. p. 514-524.

31. Jupp PG, McIntosh BM. Aedes furcifer and other mosquitoes as vectors of chikungunya virus at Mica, Northeast Transvaal, South Africa. *J Am Mosq Control Assoc* 1990;6:415-420.
32. Jupp PJ, McIntosh BM, Dos Santos I. Laboratory vector studies on six mosquito and one tick species with Chikungunya virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981;75:15-19.
33. Mourya DT. Absence of transovarial transmission of Chikungunya virus in *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes. *Indian J Med Res.* 1987;85: 593-595.
34. Agarwal A, Dash PK, Singh AK, Sharma S, Gopalan N, Rao PV et al. Evidence of Experimental Vertical Transmission of Emerging Novel ECSA Genotype of Chikungunya Virus in Aedes aegypti. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;8(7): e2990. doi:10.1371/journal.pntd.0002990.
35. Brès P, Camicas JL, Cornet M, Robin Y, Taufflieb R. Considération sur l'épidémiologie des arboviroses au Sénégal. *Bull Soc Pathol Exot* 1969;62: 253-259.
36. 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. *J Virol* 2010;84:6497-6504. 0022-538X/10/\$12.00 doi:10.1128/JVI.01603-09.
37. Weinbren MP, Haddow AJ, Williams MC. The occurrence of chikungunya virus in Uganda. Isolation from mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hygiene* 1958;52:253-257.
38. Suwannakarn K, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Molecular genome tracking in East, Central and South African genotype of Chikungunya virus in South-east Asia between 2006 and 2009. *Asian Pac J Trop Med* 2011;4(7):535-540. doi: 10.1016/S1995-7645(11)60141-7
39. Sam I-C, Loong, S-K, Michael JC, Chua C-L, Wan Sulaiman WY, Vythilingam I et al. Genotypic and Phenotypic Characterization of Chikungunya Virus of Different Genotypes from Malaysia. *PLoS One* 2012;7(11): e50476. doi:10.1371/journal.pone.0050476.
40. Lo Presti A, Ciccozzi M, Cella E, Lai A, Simonetti FR, Galli M et al. Origin, evolution, and phylogeography of recent epidemic CHIKV strains. *Infect Genet Evol* 2012;12:392-398.
41. Schuffenecker I, Iteman I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney MC et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med.* 2006;3(7): e263. doi: 10.1371/journal.pmed.0030263.
42. Jain, J., Mathur, K., Shrinet, J., Bhatnagar, R. K., y Sunil, S. Analysis of coevolution in nonstructural proteins of chikungunya virus. *Virol J* 2016;13(1):86. doi: 10.1186/s12985-016-0543-1.
43. 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:7872-7877.
44. Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs SA. Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. *PLoS Pathog* 2007;3(12): e201. doi:10.1371/journal.ppat.0030201.
45. Arias-Goeta C, Mousson L, Rougeon F, Failoux 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. doi: 10.1371/journal.pone.0057548.
46. Tsetsarkin KA, Weaver SC. Sequential Adaptive Mutations Enhance Efficient Vector Switching by Chikungunya Virus and Its Epidemic Emergence. *PLoS Pathog* 2011;7(12): e1002412. doi:10.1371/journal.ppat.1002412.
47. 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. *Nat. Commun* 2014;5:4084. doi: 10.1038/ncomms5084.

48. Leparc-Goffart I, Nougairede A, Cassadou S, Prat C, de Lamballerie X. Chikungunya in the Americas. *Lancet* 2014;383(9916):514. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60185-9.
49. Mattar S, Miranda J, Pinzon H, Tique V, Bolaños A, Aponte J et al. Outbreak of Chikungunya virus in the north Caribbean area of Colombia: clinical presentation and phylogenetic analysis. *J Infect Dev Ctries* 2015;9(10):1126-1132. doi:10.3855/jidc.6670.
50. Laiton-Donato K, Usme-Ciro JA, Rico A, Pardo L, Martínez C, Salas D et al. Análisis filogenético del virus Chikungunya en Colombia: evidencia de selección purificadora sobre el gen E1. *Biomédica* 2016;36(Supl.1).