**Evidencia de origen en ratones de la variante Omicron de SARS-CoV-2**

**Introducción**

La pandemia de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), causada por

el virus de ARN SARS-CoV-2, ha provocado enfermedades y muertes significativas

en todo el mundo. La variante SARS-CoV-2 Omicron se informó por primera vez en

Sudáfrica el 24 de noviembre de 2021, y fue designado como variante de preocupación (VOC) dentro de dos días por la Organización Mundial de la Salud en base al aumento de infecciones atribuibles a esta variante en Sudáfrica (es decir, brote de Omicron).

Además, el marco de lectura abierto que codifica la proteína espiga (ORF S) de Omicron

alberga un número excepcionalmente alto de mutaciones. Estas mutaciones

son particularmente relevantes para las características de la infección porque

se sabe que la proteína espiga del SARS-CoV-2 media la entrada del virus en

la célula huésped al interactuar con la enzima convertidora de angiotensina 2

(ACE2) en la superficie celular (Zhou et al., 2020). Además, la proteína de espiga también es un objetivo para el desarrollo de vacunas, anticuerpos y terapias de bloqueo (Huang et al., 2020; Martinez-Flores et al., 2021).

Los orígenes próximos de Omicron se han convertido rápidamente en un tema controversial de acalorado debate en el ámbito científico y en la comunidad de la salud pública (Callaway, 2021; Kupferschmidt, 2021). Muchas mutaciones detectadas en Omicron rara vez se informaron entre las variantes previamente secuenciadas del SARS-CoV-2 (Shu y McCauley, 2017; Hadfield et al., 2018), lo que lleva a tres hipótesis predominantes con respecto a su

historia evolutiva. La primera hipótesis es que Omicron podría haber tenido

‘propagación críptica’ y circulado en una población con insuficiente

vigilancia y secuenciación viral. En segundo lugar, Omicron podría haber evolucionado en

un paciente con infección crónica por COVID-19, como un individuo inmunocomprometido,

que proporcionó un entorno de acogida propicio para la adaptación del virus intra huésped a largo plazo. La tercera posibilidad La posibilidad es que Omicron podría haber acumulado mutaciones en un huésped no humano y luego haber saltado a los humanos. Actualmente, el segundo escenario representa la hipótesis más popular con respecto a los

orígenes próximos de Omicron (Callaway, 2021; Kupferschmidt, 2021).

Las dos primeras hipótesis asumen que Omicron adquirió estas mutaciones en humanos (denominadas colectivamente como “hipótesis de origen humano”), mientras que el tercero asume que Omicron adquirió mutaciones en una especie no humana. Basado en nuestro trabajo previo en evolución viral (Shan et al., 2021), planteamos la hipótesis de que las especies huéspedes en las que Omicron adquirió su conjunto particular de mutaciones

podría determinarse analizando los espectros moleculares de las mutaciones

(es decir, la frecuencia relativa de los 12 tipos de sustituciones de bases). En

trabajo anterior, mostramos que muchas mutaciones de novo en el genoma de virus de ARN

se generan de manera independiente de la replicación y son altamente dependientes de mecanismos mutagénicos específicos del entorno celular del huésped, lo que resulta en una sobrerrepresentación de tipos específicos de mutaciones. Por ejemplo, las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden oxidar la guanina a 8-oxoguanina y así inducir la transversión G>U (Li et al., 2006; Kong y Lin, 2010), mientras que las aminasas pueden inducir la edición de ARN, como las transiciones C>U (Blanc y Davidson, 2010; Harris y Dudley, 2015). De acuerdo con este fenómeno, virus pertenecientes a diferentes órdenes (por ejemplo, poliovirus, virus del Ébola, SARS-CoV-2) exhiben similares

espectros moleculares de mutaciones cuando evolucionan en la misma especie huésped,

mientras que los miembros de la misma especie de virus exhiben diferentes espectros moleculares al evolucionar en huéspedes de diferentes especies (Shan et al., 2021).

Dado que las mutaciones de novo pueden influir fuertemente en la estructura molecular del

espectro de mutaciones que se acumulan durante la evolución del virus en un

manera específica del huésped, la especie huésped en la que Omicron adquirió sus

mutaciones podría determinarse analizando la información transportada por

las mutaciones mismas.

En este estudio, identificamos mutaciones adquiridas por Omicron antes de

su brote y probamos si el espectro molecular de estas

mutaciones era consistente con el entorno celular de huéspedes humanos. Se observaron diferencias prominentes entre el espectro molecular de Omicron y un conjunto relativamente completo de espectros moleculares de variantes que se sabe han evolucionado en humanos, incluyendo los de tres aislamientos de pacientes crónicos con COVID-19. Por lo tanto, nosotros luego examinamos los espectros moleculares de las mutaciones obtenidas de una amplia gama de mamíferos huéspedes para compararlos con los de Omicron.

Finalmente, utilizamos análisis basados ​​en acoplamiento molecular para investigar si las mutaciones en la proteína S de Omicron podrían estar asociadas

con la adaptación a la especie huésped inferida del análisis de espectro molecular.

Nuestro estudio proporciona información sobre la evolución, trayectoria y orígenes próximos de Omicron a través de un escrutinio cuidadoso de

sus mutaciones y sugiere estrategias para evitar futuros brotes

causada por variantes del SARS-CoV-2 que proliferan en animales salvajes.

**Resultados**

**Sobrerrepresentación de mutaciones no sinónimas en Omicron**

**ORF S sugiere una fuerte selección positiva**

Para identificar primero las mutaciones que se acumularon en el genoma de SARS-CoV-2

antes del brote de Omicron, construimos un árbol filogenético que incluía las secuencias genómicas de referencia de SARS-CoV-2 (Wu et al., 2020a), dos variantes en el linaje B.1.1,

que estaban genéticamente cerca de Omicron (basado en los resultados de

BLASTn), y 48 variantes de Omicron muestreadas antes del 15 de noviembre de

2021 (Fig. 1A). Estas dos variantes B.1.1 fueron muestreadas desde el 22 de abril al 5 de mayo de 2020, sugiriendo que el progenitor de Omicron se separó del linaje B.1.1 aproximadamente a mediados de 2020. Versiones intermedias han pasado en gran medida desapercibidas, lo que resulta en una rama excepcionalmente larga que conduce al antepasado común más reciente (MRCA) de Omicron en el árbol filogenético (Fig. 1A). Nosotros de aquí en adelante nos referiremos a esta rama larga como Rama O.

Identificamos 45 mutaciones puntuales que se introdujeron en la Rama O

(en lo sucesivo, "mutaciones de Omicron previas al brote"; Fig. S1).

Observamos que las mutaciones de Omicron previas al brote estaban sobre-

representado en ORF S (P 1⁄4 1.2 1013, prueba binomial con probabilidad esperada igual a la longitud de ORF S en relación con el genoma SARS-CoV-2; Fig. 1B), especialmente en la región de codificación del dominio de unión al receptor (RBD) (P 1⁄4 1.1 1013, Fig. 1B). Identificamos más mutaciones en las otras cuatro VOC del SARS-CoV-2 (es decir, Alpha,

Beta, Gamma y Delta), así como los de la variante SARS-CoV-2 aisladas de tres pacientes crónicamente infectados (Kemp et al., 2021; Truong et al., 2021), pero no observó tal nivel de sobrerrepresentación de mutaciones en la región ORF S o RBD como en las mutaciones pre brote de Omicron (Fig. 1B).

Para probar si la tasa a la que se acumularon las mutaciones en ORF S fue

acelerada en la Rama O, tomamos muestras al azar de una variante SARS-CoV-2

por día desde el 24 de diciembre de 2019, de la Iniciativa Global de intercambio de todos los datos sobre la influenza (GISAID) (Shu y McCauley, 2017) para comparar las tasas de acumulación de mutaciones entre diferentes variantes.

Encontramos que las mutaciones se acumularon en ORF S a una tasa de ~ 0.45

mutaciones por mes en promedio. En marcado contraste, 27 mutaciones

acumuladas en ORF S en la Rama O durante los 18 meses que abarcan

Mayo 2020 a Noviembre 2021, equivalente a ~1.5 mutaciones por mes,

o ~3,3 veces más rápido que la tasa promedio de otras variantes (Fig. 1C).

El recuento de mutaciones en todo el genoma del SARS-CoV-2

indicó que Omicron adquirió mutaciones en el genoma en un tiempo similar a la

tasa de otras variantes (Fig. 1D), lo que sugiere que la acelerada

tasa evolutiva de ORF S no podría ser explicada por una tasa total de mutación elevada en los progenitores de Omicron. A la luz de estos hallazgos, planteamos la hipótesis de que la selección positiva podría haber ayudado a acelerar la tasa evolutiva de ORF S. Para probar esta hipótesis se trató de inferir la fuerza de la selección positiva mediante la estimación de la proporción de mutaciones no sinónimas a sinónimas. Veintiséis de las 27 mutaciones previas al brote en el ORF S de Omicron no fueron sinónimo (Fig. 1E), lo que resulta en una relación dN/dS de 6.64, significativamente mayor que un dN/dS de 1,00 (P 1⁄4 0,03, prueba exacta de Fisher). Estos resultados indicaron que la selección positiva contribuyó a aumentar la tasa de mutación en ORF S en la rama O.

Para probar si tal nivel de selección positiva es común entre variantes del SARS-CoV-2 contamos el número de variantes no sinónimas y mutaciones sinónimas en ORF S en los otros cuatro VOC así como en las variantes aisladas de tres pacientes crónicamente infectados (Kemp et al., 2021; Truong et al., 2021). Ninguno de estas otras VOC aisladas exhibieron números comparables de mutaciones no sinónimas como la de las mutaciones en la Rama O (Fig. 1E). Estas observaciones sugirieron fuertemente que la variante Omicron había sufrido una fuerte selección positiva para la proteína espiga como ninguna otra variante de SARS CoV-2 conocida evolucionada en humanos. Considerando que la proteína de espiga determina el rango de huéspedes de un coronavirus (es decir, qué organismos puede infectar) planteamos la hipótesis de que el progenitor de Omicron podría saltar de huéspedes humanos a especies no humanas porque este proceso requeriría una cantidad sustancial mutaciones en la proteína espiga para una rápida adaptación a un nuevo huésped.

**El espectro molecular de las mutaciones de Omicron previas al brote**

**es inconsistente con una historia evolutiva en humanos**

Estudios previos mostraron que el espectro molecular de mutaciones que se acumulan en un genoma viral refleja el entorno celular específico del huésped (Deng et al., 2021; Shan et al., 2021). Para probar la hipótesis del origen humano de Omicron, comparamos los espectros moleculares de las 45 mutaciones de Omicron previas al brote con el espectro molecular etándar para las variantes del SARS-CoV-2 que se sabe han evolucionado estrictamente en humanos (en lo sucesivo, "el espectro hSCV2”; Figura 2A). El espectro hSCV2 incluyó 6986 mutaciones que fueron compiladas a partir de 34,853 secuencias de alta calidad de variantes de SARS-CoV-2 aisladas de pacientes en todo el mundo (Shan et al., 2021). Encontramos que el espectro molecular de las mutaciones pre-brote

de Omicron fueron significativamente diferentes de las del espectro de hSCV2 (P 1⁄4 0.004, prueba G; Fig. 2B). En particular, en el espectro hSCV2 las transiciones fueron más abundantes que las transversiones, y la mutación C>U fue más abundante que su mutación complementaria G>A. Sin embargo, un sello distintivo de las mutaciones de los virus de ARN que evolucionan en humanos -mayor tasa de mutación G>U que su mutación complementaria C>A (Panchin y Panchin, 2020; De Maio et al., 2021;

Deng et al., 2021; Shan et al., 2021) probablemente causada por ROS celular-

estaba ausente en las mutaciones de Omicron previas al brote.

Para excluir la posibilidad de que esta aparente diferencia en el espectro molecular fuera causada por el número relativamente pequeño de mutaciones de Omicron antes del brote, generamos 100 'pseudo' variantes *in silico* mediante un muestreo aleatorio de 45 mutaciones del espectro hSCV2. Ninguna de las pseudo variantes mostró menores

valores de P (basados ​​en pruebas G) que los obtenidos usando las mutaciones de Omicron pre-brote(Fig. 2C), tampoco los aislamientos de SARS-CoV-2 con mutaciones adquiridas en los tres pacientes infectados crónicamente (el número de mutaciones es 30, 47 y 81; Fig. 2C). Estas observaciones indicaron que la diferencia entre el espectro molecular específico de mutaciones Omicron previas al brote y el espectro hSCV2 no podía atribuirse estrictamente a la aleatoriedad estadística.

Para excluir la posibilidad de que algunas mutaciones que ocurrieron

temprano en la evolución de Omicron (por ejemplo, mutaciones en el ARN-

polimerasa de ARN dependiente) distorsionaron el espectro molecular de

mutaciones que se acumularon después, identificamos 120 mutaciones que ocurrieron después del brote de Omicron mediante la detección de 695 variantes de Omicron recopiladas entre el 8 de noviembre y el 7 de diciembre de 2021 (en lo sucesivo, "mutaciones de Omicron posteriores al brote").

El espectro molecular de estas mutaciones de Omicron posteriores al brote no fue significativamente diferente del espectro hSCV2 (P 1⁄4 0.64, prueba G; Fig. 2B y 2C). Este hallazgo indicó que Omicron adquiere mutaciones siguiendo el mismo espectro molecular que otras variantes del SARS-CoV-2 durante su evolución en huéspedes humanos. Colectivamente, estos análisis de espectro molecular revelaron que antes del brote

es poco probable que las mutaciones de Omicron se hayan adquirido en humanos.

**El espectro molecular de las mutaciones de Omicron previas al brote**

**es consistente con una historia evolutiva en ratones**

A la luz de nuestros hallazgos de que Omicron puede haber evolucionado en otro

anfitrión antes de su brote, a continuación buscamos determinar especies huésped no humanas en las que se acumularon estas mutaciones. Con este fin, caracterizamos por primera vez los espectros moleculares de los coronavirus que han evolucionado en diferentes especies huésped para compararlo con el de Omicron.

Específicamente, recuperamos 17 secuencias de virus de hepatitis murina,

13 coronavirus caninos, 54 coronavirus felinos, 23 coronavirus bovinos

navirus y 110 delta coronavirus porcinos (Tabla S1), se construyó el árbol filogenético de los coronavirus aislados de cada especie huésped (coronavirus canino como ejemplo que se muestra en Fig. 3A y el resto se muestran en la Fig. S2), y se identificaron la mutaciones que se acumularon en cada rama (Fig. 3A). Las cinco ramas externas más largas

de cada especie hospedera se utilizaron para el análisis subsecuente (ver Materiales y métodos). También incluimos algunos espectros moleculares informados anteriormente (Shan et al., 2021), incluidos 17 espectros de mutaciones adquiridas por SARS-CoV-, SARS-CoV-2- y coronavirus relacionados con MERS-CoV durante su evolución en murciélagos, dos espectros de camello MERS-CoV, un espectro estimado a partir de 807

Mutaciones MERS-CoV acumuladas en humanos (el espectro hMERS), así como el espectro hSCV2. Además, también incluimos el espectro molecular de mutaciones identificadas en una variante de cada uno de las otras cuatro VOC.

Realizamos un análisis de componentes principales para reducir la dimensionalidad del espectro molecular de mutaciones y visualizamos rápidamente los datos utilizando los dos primeros componentes principales (Figura 3B). De acuerdo con los resultados de nuestro estudio anterior (Shan et al., 2021), dibujando elipses de confianza del 95% para cada especie huésped se mostró que los espectros moleculares se agruparon de acuerdo con sus respectivos anfitriones (Fig. 3B), probablemente porque los virus que evolucionan en el mismo huésped comparten los mutágenos específicos del entorno celular de ese huésped. Apoyando este punto, el espectro molecular de mutaciones post-brote de Omicron (que se sabe que se han acumulado en humanos) se encuentra dentro de la elipse humana del 95% de confianza. Por el contrario, el espectro molecular de las mutaciones de Omicron antes del brote estaba dentro de la elipse del ratón, lo que sugiere que las mutaciones previas al brote se ha acumulado en un huésped roedor (en particular, un ratón).

Las mutaciones de Omicron previas al brote en la proteína espiga se superponen significativamente con mutaciones en SARS- CoV-2 adaptado a ratones.

Se informó anteriormente que los ratones servían como pobres anfitriones para el SARS-

CoV-2 porque la proteína de espiga de las primeras variantes del SARS-CoV-2

exhibió interacciones de baja afinidad con ACE2 de ratón (Lam et al., 2020;

Zhou et al., 2020; Ren et al., 2021; Wong et al., 2021). Sin embargo, sobre

el transcurso de la pandemia, surgieron variantes del SARS-CoV-2 que

podría infectar a los ratones. Por ejemplo, las variantes que albergan la mutación de espiga

N501Y, que son relativamente comunes en pacientes humanos (24,7%, CoV-

GLUE-Viz, consultado el 23 de noviembre de 2021), podrían infectar ratones (Gu

et al., 2020; Leist et al., 2020; Sol et al., 2021). Si el progenitor de

Omicron evolucionó en una especie de ratón antes del brote, postulamos que su proteína espiga probablemente se adaptó a través de un aumento de afinidad de unión por ACE2 de ratón. Para probar esta posibilidad, proyectamos las mutaciones de Omicron previas al brote en la proteína espiga en una estructura tridimensional del complejo espiga: ACE2 (Lan

et al., 2020). Siete mutaciones (es decir, K417N, G446S, E484A, Q493R,

G496S, Q498R y N501Y) se ubicaron en la interfaz de ACE2 y la proteína espiga RBD, y podría afectar potencialmente sus interacciones (Fig. 4A).

Estudios previos reportaron mutaciones específicas de aminoácidos que

permitirían el uso de variantes del SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2 adaptado al ratón)

ratón ACE2 de manera más eficiente para ingresar a las células (Leist et al., 2020; Wu

et al., 2020b; Huang et al., 2021; Montagutelli et al., 2021; Sol et al.,

2021; Wong et al., 2021; Zhang et al., 2021). Además, estudios anteriores

han descrito algunos eventos zoonóticos inversos (es decir, salto de humanos a otros mamíferos como el visón y el venado) para SARS-CoV-2 (Chandler et al., 2021; Oude Munnink et al., 2021), y las variantes aisladas de estos huéspedes mamíferos

presumiblemente albergaban mutaciones de aminoácidos que podrían potencialmente

participar en su adaptación a estos huéspedes (Telenti et al., 2021).

Por lo tanto, si el progenitor de Omicron evolucionó en ratones y se adaptó a

ACE2 de ratones, predijimos que las mutaciones de Omicron previas al brote

deben compartir una superposición considerable con las mutaciones identificadas en

estas variantes de SARS-CoV-2 adaptadas al ratón, pero no con las aisladas en otras especies de mamíferos.

Para probar esta predicción, identificamos las mutaciones en ORF S de

variantes de SARS-CoV-2 aisladas de 18 especies de mamíferos (por ejemplo,

ratones, gatos, perros, visones y ciervos; Tablas S2 y S3) y encontramos que las mutaciones de Omicron previas al brote tendían a compartir las mismas posiciones

que las mutaciones ORF S identificadas en ratones (odds ratio 1⁄4 231.4,

P 1⁄4 1,6 1011, prueba exacta de Fisher; Fig. 4B y 4C). Por el contrario, la misma prueba estadística mostró razones de probabilidad y significación mucho más bajas en los

niveles de superposición en estas mutaciones con otras especies (Fig. 4C).

Las mutaciones de Omicron previas al brote también se superpusieron con algunas mutaciones detectadas en aislamientos de pacientes crónicamente infectados (Kemp

et al., 2021; Truong et al., 2021); sin embargo, ellos también mostraron sub

cocientes de probabilidades y niveles de significación sustancialmente más bajos que los hallados en ratones (Fig. 4C). Estas observaciones implicarían que las mutaciones pre

brote de Omicron en ORF S promovieron su adaptación a un huésped ratón.

Luego llevamos a cabo un análisis de enriquecimiento para cada una de las siete

variantes de SARS-CoV-2 adaptadas a ratones y de signos estadísticos de importancia observados en todas estas variantes (Fig. 4D). En particular, observamos

mutaciones de aminoácidos en los residuos 493 y 498 en cinco y seis de los

siete variantes de SARS-CoV-2 adaptadas a ratones, respectivamente (Fig. 4D).

Mutaciones de aminoácidos idénticas (es decir, Q493R y Q498R) fueron observadas en dos variantes (Montagutelli et al., 2021; Wong et al., 2021).

Teniendo en cuenta que estas dos mutaciones de aminoácidos son poco frecuentes en

pacientes humanos infectados por variantes de SARS-CoV-2 que no son de Omicron

(0,005 % y 0,002 %, respectivamente, CoV-GLUE-Viz, accedido en 23 de noviembre de 2021), propusimos la hipótesis de que el progenitor de Omicron evolucionó en ratones.

**Las mutaciones de Omicron antes del brote en el RBD significativamente**

**mejoraron la afinidad de unión con el ratón ACE2**

A fin de investigar los mecanismos por los cuales las mutaciones pre brote de Omicron en la proteína de espiga podrían haber contribuido a su adaptación a un huésped ratón, examinamos su interacción a través de análisis de acoplamiento molecular de la proteína de pico RBD y ratón ACE2 (Fig. 5A). Siguiendo estudios previos (Lam et al., 2020;

Rodrigues et al., 2020), estimamos la puntuación HADDOCK (van Zundert et al., 2016), que se asocia positivamente con la constante de asociación (KD, donde un KD más pequeño indica una unión más fuerte) de interacciones proteicas (Kastritis y Bonvin, 2010), y se puede utilizar para predecir la susceptibilidad de una especie de mamífero a la infección por

SARS-CoV-2 (Rodrigues et al., 2020).

Para confirmar la precisión de las inferencias basadas en el acoplamiento molecular

con respecto a la afinidad de unión entre la proteína de pico RBD y ACE2,

estimamos las puntuaciones de HADDOCK para la interacción entre el

RBD y ACE2 de varias especies de mamíferos que tienen

evidencia experimental de susceptibilidad a la infección con el

SARS-CoV-2 de referencia. De hecho, las especies de mamíferos susceptibles

exhibieron puntajes más bajos de HADDOCK (P 1⁄4 0.001, prueba t; Fig. S3).

Además, calculamos la puntuación HADDOCK para ocho valores experimentales

KD determinados mentalmente entre cuatro variantes RBD y ( de hombre o ratón) ACE2 (Sun et al., 2021). Las puntuaciones de HADDOCK correlacionaron positivamente con los valores de KD en el análisis (Pearson's coeficiente de correlación r 1⁄4 0,93, P 1⁄4 0,002; Figura S4AeS4C). Además, la afinidad de unión con el ratón ACE2 se elevó en las siete

variantes de SARS-CoV-2 adaptadas a ratones (cinco de ellas fueron estadísticamente

significativas; figura S4D). Todas estas observaciones apoyaron la validez de

predicciones basadas en el acoplamiento molecular de la afinidad de unión a ACE2 para

otras variantes de RBD.

Las predicciones basadas en el acoplamiento molecular sugirieron que el

RBD de Omicron exhibió una mayor afinidad de unión por ACE2 de ratón

que el de RBD codificado en el genoma de referencia del SARS-CoV-2,

lo que sugiere además una historia evolutiva en ratones (Fig. 5B). Y, como era

esperado, las mutaciones detectadas en el RBD de las otros cuatro VOC

del SARS-CoV-2, así como las de variantes aisladas de enfermedades crónicas

pacientes humanos infectados, no mostraron cambios aparentes en su

afinidad de unión por ACE2 de ratón en comparación con el RBD de referencia

(Figura 5B).

Dado que cinco mutaciones de aminoácidos fueron compartidas entre Omicron

y variantes de SARS-CoV-2 adaptadas a ratones en RBD (es decir, K417N,

E484A, Q493R, Q498R y N501Y; Fig. 4B), y que mostraron afinidad de unión RBD mejorada para ACE2 de ratón (Fig. 5B), a continuación se determinaron los efectos individuales de cada una de estas cinco mutaciones.

En particular, solo Q493R y Q498R aumentaron significativamente la afinidad de unión con el ACE2 de ratón, que fue consistente con su repetida detección en variantes de SARS-CoV-2 adaptadas a ratones (Montagutelli et al., 2021; Wong et al., 2021). De hecho, el análisis de acoplamiento mostró que la doble mutación Q493R/Q498R podría aumentar aún más las afinidades de unión previstas entre variantes de RBD y ACE2 de ratón.

Por el contrario, las otros tres mutaciones no mostraron efectos significativos sobre la afinidad de unión entre la interpolación de RBD y ACE2 de ratón, ni en el RBD de referencia ni en el Q493R/Q498R doble mutante (Fig. 5B), lo que sugiere que no contribuye a la interacción mejorada entre Omicron RBD y ACE2 de ratón. Especulamos que estas mutaciones (K417N, E484K, y N501Y) fueron adquiridas en Omicron porque estaban relacionados con escapar de los anticuerpos neutralizantes, como lo indican estudios previos (Li et al., 2021; Nelson et al., 2021).

Las mutaciones de Omicron previas al brote en el RBD mostraron la

mayor afinidad de unión mejorada para ACE2 de ratón entre 32

mamíferos. Nuestra caracterización del espectro molecular de mutaciones y

las observaciones de las interacciones RBD-ACE2 sugirieron que los ratones

fueron las especies huésped más probables en las que el progenitor de Omicron

evolucione. Sin embargo, seguía siendo plausible que Omicron pudiera haber

evolucionado en otra especie con un ambiente mutágeno celular de estructura similar a ACE2 de los ratones. Por lo tanto, postulamos que si Omicron evolucionó en otra especie, en el Omicron anterior al brote las mutaciones en el RBD deberían mejorar sus interacciones con el ACE2 de ese anfitrión. Para probar esta predicción aplicamos análisis de acoplamiento molecular a ACE2 de otras 31 especies, lo que representa marcadamente

diferentes linajes de mamíferos (Kumar et al., 2017). Encontramos que,

en comparación con el RBD codificado en el genoma de referencia, el

Omicron RBD mostró la mayor mejora de interacción con ACE2 de ratones entre todos estos mamíferos (Fig. 6), lo que sugiere que los ratones fueron las especies hospederas más probables en influir en la evolución del progenitor de Omicron.

**Discusión**

En este estudio, utilizamos el espectro molecular de mutaciones de

la variante SARS-CoV-2 Omicron para rastrear sus orígenes de huésped próximo.

Descubrimos que el espectro molecular de mutaciones de Omicron antes del brote

era inconsistente con la rápida acumulación en humanos, sino que sugería una trayectoria en la que el progenitor de Omicron experimentó un evento zoonótico inverso de

humanos a ratones en algún momento durante la pandemia (muy probablemente a

mediados de 2020) y mutaciones acumuladas en un huésped de ratón durante más

de un año antes de volver a los humanos a finales de 2021. Evolucionando en ratones, el progenitor de Omicron se adaptó al ratón huésped mediante la adquisición de mutaciones de aminoácidos en la proteína de espiga que aumentó su afinidad de unión con el ACE2 de ratón (esto también se ha reportado por otro estudio, Cameroni et al., 2021). Además, las mutaciones asociadas con el escape inmune también se acumularon, lo

que también puede ser un factor que contribuye a su rápida propagación en

humanos.

Las variantes B.1.1 mostraron las similitudes de secuencia más altas con

Omicron en la base de datos GISAID (donde los virus relacionados con el SARS-CoV-2

como los aislados de murciélagos también fueron depositados), sugiriendo que el progenitor de Omicron saltó de los humanos, en lugar de otro animal (como murciélagos), a ratones. Sin embargo, en principio sigue siendo plausible que el MRCA de Omicron fue un

producto evolutivo de la recombinación entre una variante humana (que

proporcionó la secuencia genómica para la región no RBD, o la

‘columna vertebral’) y una variante de otra especie (que proporcionó la

región RBD). Aunque no se destaca en nuestros resultados, probamos esta posibilidad mediante una búsqueda BLAST en la base de datos GISAID usando la secuencia principal de Omicron. Los principales éxitos fueron nuevamente del linaje B.1.1, que difería de Omicron por 31 mutaciones, lo que indica que las variantes humanas del SARS-CoV-2 reportadas hasta la fecha podrían no proporcionar una columna vertebral para Omicron. Además, el espectro molecular de estas 31 mutaciones en Omicron también fue significativamente diferente del espectro hSCV2 (P 1⁄4 0.008, prueba G; Fig. S5),

lo que sugiere que estas mutaciones de la columna vertebral no se adquirieron en

humanos.

Mientras mostramos una rama filogenéticamente larga que conduce a la

MRCA de las variantes actuales de Omicron (es decir, Branch O), vale la pena señalar

que ocasionalmente se informaron versiones intermedias de Omicron.

Por ejemplo, una variante de SARS-CoV-2 (EPI\_ISL\_7136300) fue

recopilada por el Laboratorio de Salud Pública de Utah el 1 de diciembre de

2021, que albergaba 32 de las 45 mutaciones de Omicron previas al brote.

Sin embargo, las 13 mutaciones ausentes en esta variante se agruparon dentro

residuos 371e501 de la proteína espiga (Fig. S6). La ausencia de estas mutaciones de la proteína espiga sugirieron que esta variante era un producto de la recombinación entre una variante de Omicron y otra variante SARS-CoV-2 en lugar de un progenitor directo de Omicron.

Teniendo en cuenta la gran cantidad de mutaciones de Omicron previas al brote

(45) combinadas con la escasez de versiones intermedias identificadas para

fecha, esta larga rama que conduce a Omicron en nuestra filogenética

la reconstrucción sigue siendo válida.

Aunque nos enfocamos principalmente en las mutaciones puntuales porque el

espectro molecular de estas mutaciones puede reflejar el ambiente de la célula huésped (Deng et al., 2021; Shan et al., 2021), también nos dimos cuenta de

que la información de eliminaciones e inserciones podría usarse para inferir

la trayectoria evolutiva de Omicron. Por ejemplo, se señaló que

Omicron albergaba una inserción de nueve nucleótidos (GAGCCAGAA,

que codifica el péptido EPE) después del residuo 214 en la proteína de punta. Esta

inserción es idéntica a la secuencia de TMEM245 en el genoma humano o el de ORF S en el coronavirus humano hCoV-229E, que se usó como evidencia para apoyar un origen humano para Omicron (Venkatakrishnan et al., 2021). Sin embargo, proporcionamos una más simple explicación para esta inserción, a saber, que se derivó de un ARN

fragmento de ORF N en el genoma del SARS-CoV-2 (Fig. S7) porque la abundancia de ARN de ORF N es mucho mayor que la de ARNm desarrollado por el genoma humano (Wei et al., 2021). Y esto es especialmente así para ORF N debido a la naturaleza anidada del genoma del coronavirus y subgenomas (Kim et al., 2020).

Las predicciones basadas en el acoplamiento molecular mostraron que la

adaptación de Omicron a ratones también promovió su adaptación a otras

especies, como humanos, camellos y cabras, a través de la interacción RBD-ACE2 (Fig. 6). Tal 'efecto pleiotrópico' de las mutaciones probablemente fue causado por la similitud estructural de ACE2 entre especies, e indica que una vez que una variante del SARS-CoV-2 adquiere la capacidad de infectar a un nuevo huésped, puede acumular mutaciones en este nuevo reservorio animal y se vuelve transmisible a otro huésped. Esta “reacción en cadena” del salto de huésped podría conducir potencialmente a un nivel notablemente alto

diversidad en la adaptación a ACE2 de varias especies huésped.

De acuerdo con esta posibilidad, se identificaron numerosas mutaciones en la proteína espiga del fragmento de ARN del SARS-CoV-2 amplificado a partir de

muestras de aguas residuales (Smyth et al., 2021).

Los seres humanos representan el mayor reservorio conocido de SARS-CoV-2,

y con frecuencia entran en contacto con otros animales, incluidos los animales de reserva, mascotas o animales salvajes que invaden los hogares en busca de alimento y refugio. Dada la capacidad del SARS-CoV-2 de saltar a diversas especies, parece probable que las poblaciones mundiales se enfrenten a variantes adicionales derivadas de animales hasta que la pandemia esté bien bajo control. Por lo tanto, nuestro estudio enfatiza la necesidad de vigilancia viral y secuenciación en animales, especialmente aquellos en estrecho contacto con humanos. Además, la caracterización computacional de

RBD en animales e identificación de sus potenciales para interactuar con

ACE2 humano probablemente ayudará a prevenir futuros brotes de peligrosas variantes del SARS-CoV-2.