

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ**

**VICERRECTORIA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

**TÍTULO**

COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INFECCIÓN Y REPLICACIÓN ENTRE  
CEPAS DEL VIRUS MADARIAGA QUE HAN CIRCULADO EN PANAMÁ ANTES Y  
DESPUÉS DEL BROTE EN HUMANOS DEL 2010

**AUTORA**

MARÍA DENISE CHEN GERMÁN

**DIRECTORA DE TESIS**

SANDRA LÓPEZ, PHD

**AÑO:**

2023

**Trabajo de Tesis para optar para el título de Maestría en  
Ciencias Biomédicas**

## **DEDICATORIA**

*Este trabajo de tesis, está dedicado a mi esposo y a mi mamá. Sin su constante apoyo, comprensión, consejos y amor todo esto hubiera sido más duro.*

*Gracias por empujarme y siempre estar a mi lado.*

## AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar, quiero agradecer a Dios por permitirme cumplir esta meta, por guiarme y darme fuerzas para llegar hasta aquí. Este trabajo fue llevado a cabo gracias a la constante guía de mi tutora y mentora la Dra. Sandra López quien me enseña cada día a crecer más como científica. Quisiera hacer mención especial a Yaneth Pittí, Lisseth Saénz, Melissa Gaitán, Davis Beltrán y Brechla Moreno amigos, compañeros y grupo de trabajo quienes me han brindado su apoyo incondicional durante este tiempo y agradecer a todo el equipo del Modular Virología y al equipo del BSL3 por brindarme su ayuda y compañerismo, sin ustedes no hubiera sido posible este trabajo*

## **Abstract**

Madariaga virus (MADV), formerly known as the Eastern Equine Encephalitis virus South American (EEEV-SA) was characterized by having a high degree of morbidity and mortality in horses but not in humans, since only two fatal cases had been reported in the literature, one in Brazil in 1956 and Trinidad in 1970 , however, in 2010, in Panama for the first time an epidemiological outbreak of MADV in co-circulation with the Venezuelan Equine Encephalitis virus (VEEV) was described in humans, in which cases of MADV encephalitis and severe neurological sequelae were reported in some cases. Since then, there have been case reports in humans, mostly children, in Panama, Haiti, Brazil, and Venezuela where the severity of MADV has ranged from a mild febrile syndrome to cases of hospitalization and death. Using the 2010 human outbreak as a baseline, we tested the hypothesis that the most recent MADV isolate has better infectivity and replication in human cells compared to virus isolates from other years due to an escape to interferon response.

Our findings suggest that the 2017 strain is the one that produced the highest viral titer in the cell lines tested and despite the fact that the induction of the interferon response between isolates did not vary much, we found that the antiviral response in adults is faster and more intense in children than in adults, which could explain, in part, the greater severity of cases in children under 5 years of age due to MADV infection.

## Resumen

El virus Madariaga (MADV), anteriormente conocido como virus de la Encefalitis Equina del Este Suramericano (EEEV-SA) se caracterizaba por tener un alto grado de morbilidad y mortalidad en caballos pero no en humanos, ya que solo se habían reportado dos casos fatales en la literatura, uno en Brasil en 1956 y Trinidad en 1970 , sin embargo, en el año 2010, en Panamá por primera vez se describió en humanos un brote epidemiológico de MADV en co-circulación con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana (VEEV), en el cual se reportaron casos de encefalitis por MADV y secuelas neurológicas graves en algunos casos. Desde entonces, se han dado casos de reportes en humanos, en su mayoría niños, en Panamá, Haití, Brasil y Venezuela en donde la severidad de MADV ha ido desde un síndrome febril leve hasta casos de hospitalización y muerte. Tomando como punto de referencia el brote en humanos del 2010, probamos la hipótesis de que el aislado más recientemente de MADV tiene una mejor infectividad y replicación en células humanas en comparación con aislados del virus de otros años debido a un escape a la respuesta del Interferón.

Nuestros hallazgos sugieren que la cepa de 2017 es la que mayor título viral produjo en las líneas celulares probadas y a pesar de que la inducción de respuesta interferón entre aislados no vario mucho, encontramos que la respuesta antiviral en adultos es más rápida y más intensa que en los niños, lo que podría explicar, en parte, la mayor severidad de casos en niños menores de 5 años por la infección por MADV.

## GLOSARIO

**Anticuerpo Monoclonal:** proteínas artificiales que actúan como anticuerpos humanos en el sistema inmunitario

**Anticuerpo:** Proteína elaborada por las células plasmáticas en respuesta a un antígeno. Cada anticuerpo se puede unir a un solo antígeno específico. El propósito de esta unión es ayudar a destruir el antígeno.

**Antígeno:** sustancia que provoca que el cuerpo reaccione mediante una respuesta inmunitaria específica)

**Arbovirus:** acrónimo para referirse a virus transmitido por artrópodos

**BSL:** Nivel de Bioseguridad de Laboratorio, por sus siglas en inglés Biosafety Level Laboratory (BSL) abarca las regulaciones y reglamentaciones bajo las cuales los agentes biológicos pueden manipularse de forma segura.

**Cebador:** pequeño fragmento de ADN monocatenario diseñado para unirse específicamente a una sola región en el genoma para permitir una amplificación precisa del objetivo

**Medio de cultivo:** solución que cuenta con los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de virus, microorganismos y células.

**Reacción en la Cadena de la Polimerasa (PCR):** técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo

**Sonda:** fragmentos de ADN monocatenario marcadas con un fluoroforo que al unirse con su objetivo emiten una señal fluorescente a medida que aumenta la amplificación de esa área

**Tripsina:** enzima páncreática que rompe los enlaces de las proteínas mediante hidrólisis, se usa para despegar las células de la superficie de crecimiento (placas de cultivo) y poder tenerlas en suspensión.

**Virus:** (del latín virus, «toxina» o «veneno») agente infeccioso microscópico que solo puede multiplicarse dentro de las células de otros organismos.

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BSL	Nivel de seguridad, por sus siglas en inglés Biosafety Level
cGAS	Proteína relacionada con GMP-AMP cíclica sintasa
CLR	Receptores de lectina tipo C
CPE	Efecto citopático
DAMP	Patrones moleculares asociados a peligros endógenos
DIVB	Departamento de Investigación de Virología y Biotecnología
DMEM	Medio Escencial Mínimo de Dublesco
ds	Cadena doble
EEEV-NA	Virus de la Encefalitis Equina del Este Norteamericana
HFA	Fibroblastos Humanos Adultos
HFN	Fibroblastos Humanos Neonatos
ICGES	Instituto Conmemorativo Gorgas Estudios de la Salud
IFI	Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta
IFN	Interferón
IFN I	Interferón tipo I
IRFs	Factores reguladores de interferón
ISG	Genes estimulados por IFN
MADV	Virus Madariaga
MDA5	Proteína asociada a la diferenciación del melanoma 5

MEM	Medio Escencial Mínimo
MOI	Cantidad de virus por célula, por sus siglas Multiplicity of infection
NLR	Receptores tipo NOD
OAS	Receptores tipo oligoadenilato sintasa
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción de la cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
RIG-I	Gen I inducible con ácido retinoico
RT-PCR	Retro-transcripción de la reacción de la cadena de la polimerasa
ss	Cadena sencilla
TLR	Receptores tipo Toll

## INDICE GENERAL

<b>CAPITULO I: MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>17</b>
Generalidades .....	18
Complejo Encefalitis Equina del Este .....	22
Virus Madariaga (MADV) .....	23
Transmisión .....	24
MADV en Panamá .....	25
Síntomatología .....	27
Diagnóstico .....	27
Tratamiento .....	28
Respuesta Inmune Innata .....	29
Interferón (IFN) .....	30
<b>CAPITULO II: METOLOGÍA Y MATERIALES .....</b>	<b>35</b>
Consideraciones Especiales .....	36
Tipo De Estudio .....	36
Hipótesis .....	36
Objetivo General .....	37
Objetivos Específicos .....	37
Muestras .....	37
Diseño De Cebadores .....	38
Estandarización y validación de la PCR En Tiempo Real MADV .....	40
Determinación de mejor concentración de Cebadores .....	41
Determinación de mejor concentración de Sonda .....	42
Especificidad .....	42
<b>CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDO .....</b>	<b>42</b>
PCR para plásmido MADV1984 .....	43
Purificación del fragmento de adn MADV 1984 .....	44
Ligación .....	44
Transformación .....	46
Verificación de inserto del plásmido .....	48
Secuenciación de productos .....	49
Cuantificación de MADV con plásmido .....	51
<b>ESTANDARIZACION DE CELULAS PARA EXPERIMENTOS DE INFECTIVIDAD .....</b>	<b>53</b>
Descongelación de línea celular VERO y BS153 .....	53
Pasaje o Subcultivo de VERO y BS153 .....	54

Descongelación de HFN y HFA .....	55
Pasaje o Subcultivo de HFA y HFN.....	56
Cultivo Celular.....	57
Estandarización de células BS153, HFA, HFN en platos de 12 pocillos .....	58
Producción de cepas de MADV.....	61
Infección de líneas celulares con diferentes MOI.....	64
Inmunofluorescencia .....	65
Carga Viral .....	67
ELISA .....	68
<b>CAPITULO III RESULTADOS.....</b>	<b>69</b>
Diseño De Primers .....	70
Estandarización de PCR .....	72
Selección de concentraciones de sondas .....	73
Prueba de especificidad .....	74
Construcción de Plásmido .....	76
PCR.....	76
Secuenciación .....	78
Sensibilidad del plásmido.....	80
Resultados producción de cepas.....	81
Titulación de cepas para experimentos de infectividad.....	82
Infección de Líneas Celulares.....	83
Inmunofluorescencia .....	92
Titulación de Sobrenadantes.....	93
Gráficas de titulación de sobrenadantes .....	94
Cuantificación de Carga Viral por RT-qPCR en Tiempo Real de HFA.....	95
Gráficas de Carga Viral por RT-qPCR en Tiempo Real de HFA .....	96
Cuantificación de Carga Viral por RT-qPCR en Tiempo Real de HFN.....	97
Gráficas de Carga Viral por RT-qPCR en Tiempo Real de HFN .....	98
Cuantificación de Carga Viral por RT-qPCR en Tiempo Real de BS153.....	99
Gráficas de Carga Viral por RT-qPCR en Tiempo Real de BS153 .....	100
Comparación de Infectividad de HFA vs HFN.....	101
ELISA IFN $\alpha$ .....	102
<b>CAPITULO IV DISCUSIÓN Y RECOEMENDACIONES.....</b>	<b>104</b>
Cuantificación del genoma viral de MADV por biología molecular .....	105
Capacidad infecciosa y replicativa de MADV en células humanas .....	106

Cuantificación de la producción de IFN I en células humanas infectadas por MADV.....	110
RECOMENDACIONES .....	112
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>114</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>120</b>
Carta de comité de bioética .....	121
Protocolo de extracción de arn viral.....	122
Qiaquick per purification kit.....	124
Protocolo de extraccion minipreps.....	126

## INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 : Representación de genoma del género Alfavirus.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 2 : Árbol filogenético de MADV .....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 3 : Mapa representativo de los puntos donde ha circulado MADV.....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 4 Representación de cascada de señalización tras el reconocimiento de PAMPs virales y la activación de IFN .....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 5 :Representación de vector utilizado, pGEM-T Easy.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 6 : Representación del proceso de Transformación .....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 7 : Selección de colonias blancas .....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 8 Elaboración de Plato Maestro y Minicultivos .....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 9 : Número de copias calculado para plásmido .....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 10 : Monocapa de células BS153.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 11 : Monocapa de células VERO.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 12 : Visualización de BS153 en distintas concentraciones, y su preparación 24 horas antes.....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 13 : Visualización de HFA en distintas concentraciones, y su preparación 24 horas antes. ....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 14 : Visualización de HFN en distintas concentraciones, y su preparación 24 horas antes. ....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 15 : Esquema de Producción Viral .....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 16 : Esquema de Titulación Viral .....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 17 : Representación de ELISA tipo sandwich.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 18 : Diseño de cebadores en programa Primer3.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 19 : Curva de Melting .....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 20 Gel de Agarosa 2%.....</i>	<i>73</i>
<i>Figura 21 Resultados de Prueba de especificidad .....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 22 Resultados en valor CT en prueba de especificidad .....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 23 Ubicación de cebadores .....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 24 Gel de Agarosa 2%.....</i>	<i>76</i>
<i>Figura 25 Medición de concentración de ADN de MADV 1984 ADN.....</i>	<i>76</i>
<i>Figura 26 Plato de colonias azules y blancas producto de la transformación.....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 27 Gel de Agarosa 2% para verificación de inserto en las colonias blandas.....</i>	<i>77</i>

<i>Figura 28 Analisis de secuencias en Sequencher.....</i>	78
<i>Figura 29 Análisis de secuencia de plásmido en BLAST.....</i>	79
<i>Figura 30 : Verificación de sentido del plásmido DIVB-MADV1984.....</i>	79
<i>Figura 31 : Diluciones de plásmido para ver alcance de detección.....</i>	80
<i>Figura 32 Fotografías de CPE en células VERO infectadas con las 3 cepas de MADV a 24 y 48horas. ....</i>	81
<i>Figura 33 CPE observado en células VERO infectadas con MADV 1984 a diferentes MOIs .....</i>	82
<i>Figura 34 HFN infectados con MADV, MOI 1 .....</i>	83
<i>Figura 35 HFN infectados con MADV, MOI 0.01 .....</i>	84
<i>Figura 36 HFN infectados con MADV, MOI 0.0001.....</i>	85
<i>Figura 37 HFA infectados con MADV, MOI 1 .....</i>	86
<i>Figura 38 HFA infectados con MADV, MOI de 0.01 .....</i>	87
<i>Figura 39 HFA infectados con MADV, MOI de 0.0001 .....</i>	88
<i>Figura 40 BS153 infectados con MADV, MOI de 1 .....</i>	89
<i>Figura 41 BS153 infectados con MADV, MOI de 0.01 .....</i>	90
<i>Figura 42 BS153 infectados con MADV, MOI de 0.0001.....</i>	91
<i>Figura 43 Técnica de inmunofluorescencia.....</i>	92
<i>Figura 44 Comparación de títulos virales en líneas de fibroblastos humanos infectadas con MADV.....</i>	94
<i>Figura 45 Títulos virales en línea BS 153 infectados con MADV.....</i>	94
<i>Figura 46 Comparación de Carga Viral por RT-qPCR en infección con MADV en HFA .</i>	96
<i>Figura 47 Comparación de Carga Viral por RT-qPCR en infección con MADV en HFN .</i>	98
<i>Figura 48 : Comparación de Carga Viral por qRT-PCR en infección con MADV en BS153 .....</i>	101
<i>Figura 49 Títulos virales de células infectadas con MADV MOI 0.01 .....</i>	102
<i>Figura 50 Carga viral de células infectadas con MADV MOI 0.01.....</i>	102
<i>Figura 51 Gráfica de Producción de IFN en HFA y HFN .....</i>	103

## INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1 : Complejos antigénicos del género Alfavirus.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabla 2 : Publicaciones encontradas para detección del virus de Encefalitis Equina del Este Norteamericana.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabla 3 : Listado de Secuencias de Genoma completo descargados en formato fasta, para diseño de cebadores.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 4: Prueba de distintas concentraciones de cebadores.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 5 : Prueba de distintas concentraciones de sonda.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 6: Reactivos para preparación de PCR.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabla 7: Condiciones de PCR para amplificación de MADV.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabla 8: Mezcla de Reactivos para Reacción de Ligación.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabla 9 : Reacción de Secuenciación.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabla 10: Diluciones seriadas para ensayo.....</i>	<i>52</i>
<i>Tabla 11 : Mezcla de reactivos de RT-qPCR en Tiempo Real para detección y cuantificación de MADV.....</i>	<i>67</i>
<i>Tabla 12 : Análisis en Oligo Evaluator de juego de cebadores seleccionados.....</i>	<i>70</i>
<i>Tabla 13: Concentraciones probadas de cebadores.....</i>	<i>72</i>
<i>Tabla 14: Concentraciones probadas de sondas.....</i>	<i>73</i>
<i>Tabla 15: Concencetraciones de ADN de Miniprerps para secuenciación.....</i>	<i>78</i>
<i>Tabla 16: Valores ct de diluciones de plásmido para ver alcance de detección.....</i>	<i>80</i>
<i>Tabla 17: Títulos virales de las 3 cepas de MADV.....</i>	<i>82</i>
<i>Tabla 18: Promedio de títulos de HFN infectados con MOI de 0.01.....</i>	<i>93</i>
<i>Tabla 19: Promedio de títulos de HFN infectados con MOI de 0.01.....</i>	<i>93</i>
<i>Tabla 20: Promedio de títulos de BS153 infectados con MOI de 0.01.....</i>	<i>93</i>
<i>Tabla 21: Carga Viral de HFA infectadas con MOI 1.....</i>	<i>95</i>
<i>Tabla 22: Carga Viral de HFA infectadas con MADV MOI 0.01.....</i>	<i>95</i>
<i>Tabla 23: Carga Viral de HFA infectada con MADV MOI 0.0001.....</i>	<i>95</i>
<i>Tabla 24: Carga Viral de HFN infectadas con MADV MOI 1.....</i>	<i>97</i>
<i>Tabla 25: Carga Viral de HFN infectadas con MADV MOI 0.01.....</i>	<i>97</i>
<i>Tabla 26: Carga Viral de HFN infectadas con MADV MOI 0.0001.....</i>	<i>97</i>
<i>Tabla 27: Carga Viral de BS153 infectadas con MADV MOI 1.....</i>	<i>99</i>
<i>Tabla 28: Carga Viral de BS153 infectadas con MADV MOI 0.01.....</i>	<i>99</i>
<i>Tabla 29: Carga Viral de BS153 infectadas con MADV MOI 0.0001.....</i>	<i>100</i>

*Tabla 30: Tabla: Producción de IFN $\alpha$  en HFA y HFN..... 102*

*Tabla 31: Producción de IFN $\beta$  en HFA y HFN..... 103*

## **CAPITULO I: MARCO TEÓRICO**

## GENERALIDADES

La familia *Togaviridae* está compuesta por un grupo de virus pequeños envueltos, aproximadamente de 70nm de diámetro, con genomas de ARN monocatenario de sentido positivo, con un tamaño entre 10 a 12 kb y está conformado únicamente por el género *Alfavirus* (Chen, Mukhopadhyay, Merits, et al., 2018) que comprende alrededor de 32 especies transmitidas principalmente por mosquitos y muchas son patógenas para humanos y animales (Azar et al., 2020; Chen, Mukhopadhyay, Merits, et al., 2018; Strauss & Strauss, 1994).

Los alfavirus poseen dos marcos de lectura abiertos (ORF), el primero codifica para cuatro proteínas no estructurales nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4 necesarias para la traducción viral, la replicación viral y evasión del huésped. El segundo ORF codifica para seis proteínas estructurales, necesarias para la entrada de viriones, ensamblaje de nucleocápsides y salida del virus de la célula huésped. Estas proteínas son la cápside (C), dos glicoproteínas de envoltura E1 y E2, dos productos de escisión (E3, 6K) y la proteína “transframe” (TF) (Bakar & Ng, 2018; Strauss & Strauss, 1994) Figura 1. La cápside es una proteína multifuncional, que participa en la encapsulación del genoma, salida y ensamblaje de viriones, la proteína E1 está involucrada en la formación de la capa icosaédrica de la partícula del virus y la fusión de la membrana durante la entrada del virus en la célula huésped (Rao & Taylor, 2021), la proteína E2 consta de tres dominios (A, B y C) y está involucrada directamente con la unión a receptores. Se ha visto que los dominios A y B contienen la mayoría de los residuos que afectan la unión celular o el tropismo tejido/célula (Weger-Lucarelli et al., 2016). La Proteína E3 garantiza la generación de una partícula infecciosa competente para la fusión, tiene dos funciones: servir como secuencia de señal para la translocación de la poliproteína E3-E2-6K-

E1 en el retículo endoplásmico, y la división de E3 de E2 que es esencial para la maduración del virus (Snyder & Mukhopadhyay, 2012). La proteína 6K, produce dos proteínas, 6K y TF, la 6K ayuda a la maduración de la glicoproteína y la proteína TF contribuye al ensamblaje de partículas de virus e inhibe las respuestas de interferón tipo I (IFN) en células *in vitro* e *in vivo* a través de un mecanismo dependiente de la palmitoilación de la proteína (Holmes et al., 2020). La región 5'UTR contiene elementos promotores, secuencias reguladoras traslacionales que modulan la dependencia de los factores de traducción celular y estructuras que ayudan a evitar las defensas inmunitarias innatas y la región 3'UTR contiene elementos de secuencia altamente conservados que tiene un papel importante en la replicación viral, sitios de unión para los micro ARN celulares que determinan el tropismo celular, el rango de los huéspedes y la patogénesis (Hyde et al., 2015).

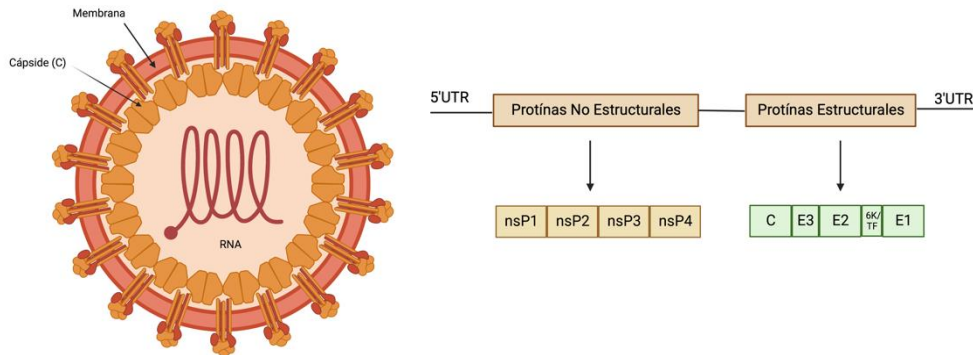


Figura 1 : Representación de genoma del género *Alfavirus*, MCH creado con BioRender.com, basado en (Chen, Mukhopadhyay, Bolling, et al., 2018)

Los alfavirus han sido causantes de enfermedades tanto emergentes como reemergentes a lo largo de los años (Holmes et al., 2020) dentro de ellos, el virus Chikungunya (CHIKV) es uno de los que ha tomado mayor importancia clínica en estos últimos años debido a los brotes que ha causado desde el 2005 cuando el virus se extendió a las islas del Océano Índico, Europa y Asia, introduciéndose en las Islas del Caribe en el 2013 y detectándose en Panamá

para mayo 2014 (Díaz et al., 2015). Otros alfavirus importantes para la salud pública detectados en Panamá son: el virus de Encefalitis Equina Venezolana (VEEV) y el virus Madariaga (MADV), ambos causantes de epizootias importantes en caballos y algunos casos en humanos, de estos, algunos con resultados fatales.

Según sus similitudes antigénicas o genéticas los alfavirus pueden agruparse en diez complejos (Ludert et al., 2017; Nasar et al., 2012); sin embargo, también existe una clasificación más tradicional según su distribución geográfica y sintomatología a desarrollar en: alfavirus de Nuevo Mundo y alfavirus de Viejo Mundo, donde los de viejo mundo están localizados principalmente en África, Europa y Asia (Tabla 1) y se caracterizan por producir síndromes febriles, erupciones cutáneas y principalmente artralgias, mientras que los de nuevo mundo están localizados en América y se caracterizan por causar encefalitis o síndromes neurológicos (Powers et al., 2001; Strauss & Strauss, 1994).

A pesar de esta clasificación tradicional, existen diferentes factores que pueden favorecer la distribución de los vectores y por ende la transmisión de enfermedades arbovirales fuera de su localización clásica u originaria; causando brotes importantes ante una población virgen inmunológicamente como lo son el aumento de la migración humana, la urbanización, las condiciones climáticas, ambientales y socioeconómicas (Tajudeen et al., 2021).

<b>Complejo</b>	<b>Especie</b>	<b>Localización</b>
Barmah Forest	Virus de Bosque Barmah (BFV)	Viejo Mundo
Encefalitis Equina del Este	Encefalitis Equina del Este (EEEV) Virus Madariaga (MADV)	Nuevo Mundo
Middelburg	Virus Middelburg (MIDV)	Viejo Mundo
Ndumu	Ndumu (NDUV)	Viejo Mundo

Semliki Forest	Virus Semliki Forest(SFV) Virus Chikungunya (CHIKV)* Virus O'nyong-nyong (ONNV) Virus Getah (GETV) Virus Bebaru (BEBV) Virus Ross River(RRV) Virus Mayaro (MAYV)*	Viejo Mundo
Encefalitis Equina Venezolana	Virus de Encefalitis Equina Venezolana (VEEV) Virus de Everglades (EVEV) Virus Pixuna (PIXV) Virus Tonate (TONV) Virus Mucambo (MUCV) Virus Mosso das Pedras (MDPV) Virus Rio Negro (RNV) Virus Cabassou (CABV)	Nuevo Mundo
Encefalitis Equina del Oeste	Virus de Encefalitis Equina del Oeste (WEEV) Virus Sindbis (SINV) Virus Whataroa (WHA V) Virus Highlands J (HJV) Virus Fort Morgan (FMV) Virus Aura (AURAV)	Nuevo y Viejo Mundo
Trocara	Trocara virus (TROV)	Nuevo Mundo
Enfermedad Pancreática de Salmón	Virus de enfermedad pancreática del salmón (SPDV) Virus de enfermedad del sueño (SDV)	
Virus del elefante marino del sur	Virus del elefante marino del sur (SESV)	

Tabla 1 : Complejos antigénicos del género Alfavirus, especies que lo forman y clasificación según localización en Nuevo o Viejo mundo.\*CHIKV y MAYV tienen distribución tanto en el nuevo y viejo mundo. Basado en (Chen, Mukhopadhyay, Merits, et al., 2018; Ludert et al., 2017; Nasar et al., 2012; Weaver et al., 2008)

## COMPLEJO ENCEFALITIS EQUINA DEL ESTE

Dentro del complejo de Encefalitis Equina del Este, existen dos especies, el virus de Encefalitis Equina del Este (EEEV) y el virus Madariaga (MADV), anteriormente estos dos virus pertenecían a la misma especie y se distinguían exclusivamente por su localización geográfica. Eran conocidas como cepas norteamericanas (EEEV-NA) presentando casos en Estados Unidos, Canadá, y algunas partes del Caribe y cepas suramericanas (EEEV-SA) con casos en Centroamérica y América del Sur; sin embargo, las diferencias en transmisión y clínica eran y siguen siendo muy marcadas (Casals Jordi, 1963).

Para EEEV-NA el ciclo de transmisión en humanos se da principalmente a través de las picaduras de mosquitos del género *Culiseta melanura* que se alimenta casi exclusivamente de aves que sirven como hospederos del virus. La infección en humanos en su mayoría puede ser asintomática; sin embargo, cuando hay la presencia de síntomas como fiebre, dolor de cabeza, rigidez de nuca, irritabilidad, debilidad focal, parálisis de nervios craneales, convulsiones, y/o estado mental alterado, se da la evolución a una enfermedad sistémica o encefálica que produce un deterioro rápido del cuerpo llevando a estados de coma y/o muerte. La tasa de mortalidad de EEEV-NA es de alrededor de 33% en humanos, y los pacientes que sobreviven a la infección casi siempre resultan con secuelas neurológicas graves (Quilliam et al., 2020). Para los caballos esta tasa aumenta a un 70-90% de letalidad (Corrin et al., 2021). Por otro lado EEEV-SA o MADV a lo largo del siglo XX siempre se consideró como un virus con una baja patogenicidad en humanos, con solo dos casos fatales documentados en Trinidad en 1970 (Corniou, B., Ardoin, P., Bartholomew, C., Ince W., 1972), y en Brasil 1956 (Alice, 1956) a pesar de ser el agente causal de varios brotes enzoóticos en Panamá, Brasil y Argentina (Dietz et al., 1980; Obaldía et al., 1991; Weaver et al., 2012) con alta tasa

de infección, pero sin evidencia de enfermedad en humanos o de infección asintomática. La transmisión de EEEV-SA no está bien descrita, con asociaciones serológicas que incluyen aves silvestres, roedores terrestres, marsupiales y reptiles (Corrin et al., 2021).

Luego de varios análisis donde se estudiaron a profundidad estas diferencias y además se hicieron estudios filogenéticos y moleculares (Arrigo et al., 2010; Brault A.C. et al., 1999; Scott & Weaver, 1989; Weaver et al., 1994) en 2010 se propuso separar EEEV-SA como una especie distinta, debido a las diferencias geográficas, epidemiológicas, patogénicas, filogenéticas y evolutivas con el objetivo de que la separación proporcionaría una descripción médica y científica más precisa. Esta nueva especie fue nombrada virus Madariaga (MADV), en honor al primer aislado de este virus, obtenido del general Madariaga Partido en Argentina (Arrigo et al., 2010).

### **VIRUS MADARIAGA (MADV)**

MADV es considerado un virus emergente, de importancia zoonótica y para la salud pública de las Américas ya que es un virus que puede causar mortalidad y secuelas neurológicas graves tanto en animales como en humanos (Benvenuto et al., 2019); fue aislado por primera vez en Argentina durante un brote de equinos en 1930 (Corniou, B., Ardoin, P., Bartholomew, C., Ince W., 1972; Scott & Weaver, 1989). MADV posee tres linajes genéticos (linaje II, III y IV) que se han dividido de acuerdo a los lugares donde se ha demostrado circulación del mismo, el linaje II circula en Guatemala, Brasil, y Perú, el linaje III se ha encontrado más ampliamente distribuido circula en Argentina, Brasil, Colombia, Ecuador, Guyana, Panamá, Perú, Venezuela y Trinidad; y el IV linaje incluye únicamente a un aislado en Brasil (Arrigo et al., 2010; Ludert et al., 2017) (Figura 2).

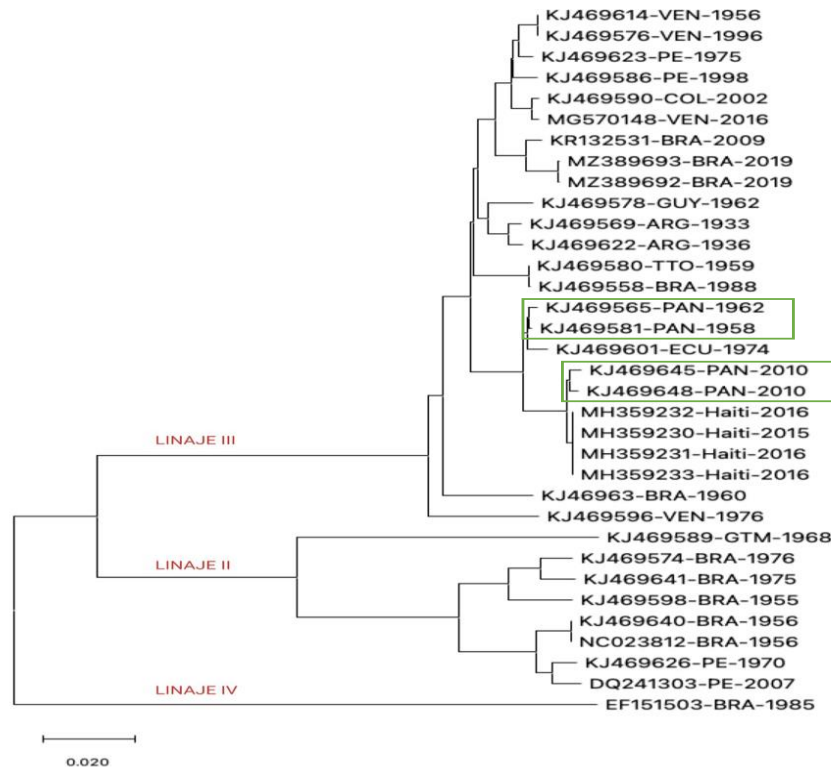


Figura 2 : Árbol filogenético de MADV, representando sus 3 linajes. Las cepas panameñas se agrupan en el linaje III. MCH- Creado con MEGA X. Modelo estadístico de Neighbor-joining

## TRANSMISIÓN

El ciclo de transmisión enzoótica y epizoótica de MADV todavía no ha sido bien dilucidado, algunos autores sugieren como posibles hospederos a los roedores, aves, marsupiales y reptiles (Scott & Weaver, 1989; Vittor et al., 2016; Weaver, 2005). Estudios realizados en Panamá sugieren que el ratón de caña de cola corta (*Zygodontomys brevicauda*) podría ser el hospedero principal, ya que demostró la mayor seroprevalencia de MADV. Además en estudios serológicos en humanos asociaron las actividades de ganadería, agricultura y la pesca con un mayor riesgo de contraer MADV (Vittor et al., 2016).

Hasta la fecha se ha logrado detectar MADV en los mosquitos de especie *Culex spp.* que se consideran principalmente ornitófilos, pero que dependiendo de donde se encuentren pueden cambiar su alimentación prefiriendo alimentarse de aves en áreas urbanas y de mamíferos en áreas silvestres (Stechina et al., 2019). En Panamá se han logrado aislamientos de MADV en los subgéneros *Culex melanoconion* y *C. taeniopus* (Dietz et al., 1980); en Perú en el subgénero *C. pedroi* (Kondig, J.P., et al., 2007) y en Argentina de *C. bidens* (Stechina et al., 2019)

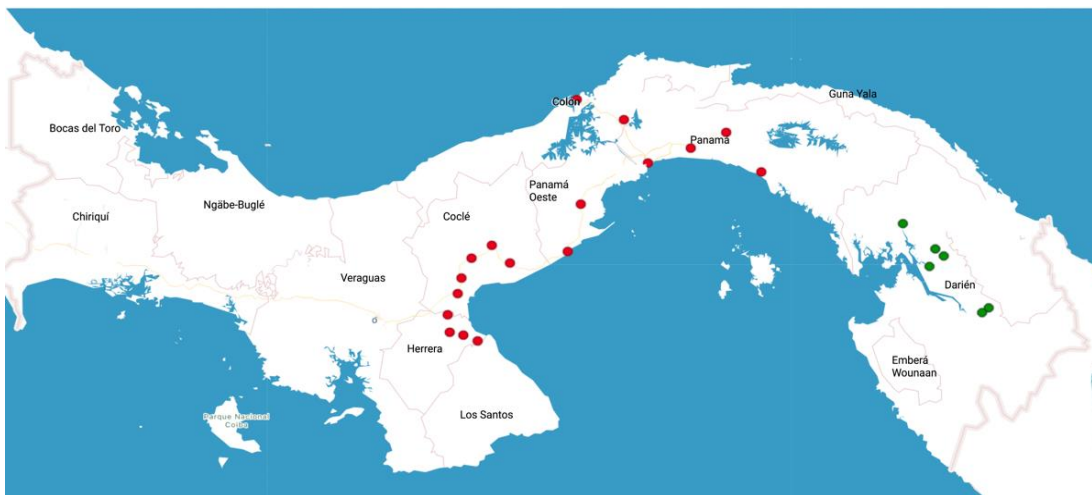
### **MADV EN PANAMÁ**

MADV fue detectado en Panamá por primera vez en 1936, históricamente existen datos de circulación del virus en los años 1946, 1958, 1962, 1973 y 1986. Estas detecciones se caracterizaban por epizootias de caballos, que iniciaban abruptamente y terminaban rápidamente, generalmente dándose en los meses de junio y julio que solían ser épocas lluviosas. Entre las regiones donde se dio la detección de casos están: Ciudad de Panamá (Hipodromo, Club de equitación, Zonas del Canal tanto Pacífico como Atlántico), Colón, Chepo, Pacora, Capira, Aguadulce, Natá, Penonomé, Pasiga (Distrito de Chimán) (Dietz et al., 1980) (Obaldia et al., 1991), Parita, Chitré, Portobelillo, Santa María y El Rincón, Antón, Río Grande, San Carlos, Gatuncillo (Medina et al., 1965) (Figura3).

Históricamente MADV se ha asociado como agente causal de enfermedad en equinos; sin embargo, hasta el 2010 no existía evidencia científica clara para hacer una asociación con la enfermedad producida en humanos (Arrigo et al., 2010; Dietz et al., 1980). En este año se reportan casos de encefalitis en humanos en la región de Darién Panamá, y por primera vez se detecta MADV como agente causal de la enfermedad en 13 pacientes que vivían en las comunidades de Río Iglesias, Metetí, Santa Rosa, Yaviza, El Real y Santa Fe, durante este

brote también hubo la circulación del virus de Encefalitis Equina Venezuela (VEEV) y se logró detectar una co-infección de los virus VEEV/MADV en un paciente de 13 años de edad (Carrera et al., 2013).

Este brote ha sido el más importante de MADV ya que planteó preguntas sobre posibles cambios en el ciclo de transmisión del virus o si algunas cepas de EEEV-SA se están volviendo más patógenas para los seres humanos (Gil et al., 2021) que puedan explicar esta emergencia de la enfermedad en humanos. Años posteriores se sigue dando la detección de casos de encefalitis por MADV; en 2015 con 4 casos, siendo uno fatal, 2016 con 3 casos, 2017 con 6 casos por MADV (datos no publicados del ICGES y MINSA) y 2019 con 5 casos (De la Rosa, 2020). Durante el período de pandemia COVID 19 hubo un cesé en el reporte de casos, sin embargo para este año 2022 hubo reportes de casos de encefalitis dentro de los cuales se confirmó 1 caso por MADV (datos no publicados ICGES y MINSA).



*Figura 3* : Mapa representativo de los puntos donde ha circulado MADV creado con QGIS versión 3.28. Puntos en rojo muestran circulación antes de reportes de casos en humanos: Parita, Chitré, Río Grande, Natá, Aguadulce, Penonomé, San Carlos, Santa María, Antón, Capira, Ciudad de Panamá, Gatuncillo, Pacora, Colón, Chepo y Pasiga. Puntos en verde señalan casos en humanos: Río Iglesias, Metetí, Santa Rosa, Yaviza, El Real y Santa Fe.

## **SÍNTOMATOLOGÍA**

Los síntomas descritos en humanos causados por la infección por MADV pueden variar dependiendo del curso de la enfermedad en que se desarrolle. En los caso más graves los síntomas reportados han sido: fiebre, vómitos, convulsiones, desorientación, irritabilidad en niños; la presencia de encefalitis no siempre se ve, pero generalmente en estos casos termina con una enfermedad neurológica grave (Carrera et al., 2013). Sin embargo, existen estudios de seroprevalencia en los países de Perú (Aguilar et al., 2007) y Panamá (Carrera et al., 2020) donde han encontrado anticuerpos contra MADV en la población, incluyendo personas que nunca han reportado la enfermedad, lo que podría sugerir que existe una circulación de MADV aun cuando no se llegue al desarrollo de síntomas neurológicos y que esto esté pasando desapercibido por los sistemas de salud (Powers, 2018). Los síntomas producidos por MADV en casos leves en humanos pueden incluir fiebres indiferenciadas, dolor de cabeza, mialgia, tos y dolor abdominal; síntomas que podrían confundirse con un resfriado común o enfermedad del Dengue. Este ha sido el caso de la reciente detección de MADV en humanos donde se encontró el virus por estudios de seguimientos de pacientes con fiebres indiferenciadas en países como: Haití y Venezuela (Blohm et al., 2018; Lednicky et al., 2019) o investigaciones de estudios de brotes de otros arbovirus como el caso reportado en Brasil (de Souza Costa et al., 2019). Mostrando por primera vez que el alcance y la severidad de la enfermedad producida por MADV podría ir desde síntomas muy leves como una fiebre indiferenciada hasta lesiones cerebrales y en los peores casos hasta la muerte.

## **DIAGNÓSTICO**

Los primeros diagnósticos de MADV se hacían por medio de intentos de aislamiento en ratones lactantes o cobayos, mediante la inoculación intracerebral de muestras de suero

sospechosas. Luego de unos días se hacían cortes de secciones específicas del cerebro en parafina y se teñían con hematoxilina-eosina en busca de lesiones compatibles con la encefalitis viral que histológicamente se presentaba por múltiples infiltraciones linfocíticas perivascular y proliferación glial en varias secciones. Además de la búsqueda histopatológica se realizaba una preparación de antígenos para la identificación de los anticuerpos por medio de la fijación del complemento en la presencia de antiseros de los virus de Encefalitis Equina Venezolana, Encefalitis Equina del Este y Encefalitis Equina del Oeste (Medina et al., 1965). Con el desarrollo de nuevas técnicas para la detección de agentes virales estas metodologías se fueron introduciendo para el diagnóstico de MADV como el intento de aislamiento en células *in-vitro*, prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI), ELISA, Técnica de neutralización de placas (PRNT) y técnicas moleculares de PCR genéricas para posterior secuenciamiento (Blohm et al., 2018; Gil et al., 2021).

Actualmente, para diagnóstico, no existe ninguna técnica de biología molecular específica para MADV, todos los casos de reportes que se han dado hasta la fecha se han hecho mediante técnicas de Neutralización en placa, aislamiento viral y PCR en tiempo final con la amplificación de un fragmento de ADN con cebadores degenerados que detectan virus del género alfavirus para su posterior secuenciamiento por método de Sanger (de Souza Costa et al., 2019; Lednicky et al., 2019). Todas estas técnicas requieren de personal altamente capacitado en técnicas tanto de biología molecular como de virología tradicional, infraestructura que cumpla con los niveles de bioseguridad y recursos financieros lo que dificulta el diagnóstico.

## **TRATAMIENTO**

No existe una vacuna para humanos, el tratamiento en caso de humanos consiste en

tratamientos paleativos para tratar de mejorar la sintomatología. Sin embargo sí existe vacuna para equinos. En Panamá desde el 2016 se estableció como obligatoria la vacunación de todos los équidos contra EEEV la cual debe realizarse a los seis meses de edad del animal, un refuerzo a los 21 días y posteriormente una inmunización anual (Gaceta Oficial, Resolución N° OAL-553-ADM-2016 PANAMA, 1 de Noviembre de 2016)

## **RESPUESTA INMUNE INNATA**

La respuesta inmune innata inicia con los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) cuya finalidad es detectar patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y patrones moleculares asociados a peligros endógenos (DAMP) que se liberan por células dañadas o en proceso de extinción. Dentro de los PRR se encuentran diferentes familias como: receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo NOD (NLR), receptores similares a RIG-I (RLR) RIG-I (gen I inducible con ácido retinoico) y MDA5 (proteína asociada a la diferenciación del melanoma 5), receptores de lectina tipo C (CLR), receptores tipo oligoadenilato sintasa (OAS) y la proteína relacionada con GMP-AMP cíclica sintasa (cGAS) (Brisse & Ly, 2019; Vajjhala et al., 2017)

Los PRR más importantes para el reconocimiento de agentes virales pertenecen a dos familias: los TLR y los RLR RIG-I y MDA5 donde TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 son importantes para el reconocimiento de los ácidos nucleicos virales en los endosomas de las células dendríticas plasmacitoidas (pDC) y otras células presentadoras de antígeno (APC) en donde los TLR3 identifican el ARN viral de doble cadena (dsRNA), TLR7 y TLR8 detectan el ARN de una sola cadena (ssRNA) y TLR9 detecta el ADN CpG no metilado en los genomas de los virus del ADN, como el virus del herpes simplex (HSV). Sin embargo, la mayoría de los otros tipos de células reconocen el ARN viral a través de los RLR RIG-I y

MDA5. RIG-I reconoce ARN viral de una sola cadena (ssRNA), como los virus de la gripe, bunyaviruses, filovirus y rabdovirus y MDA5 se especializa en el reconocimiento de moléculas más largas como ARN viral de doble cadena (dsRNA) como los picornavirus (Bowie & Unterholzner, 2008). Una vez hay el reconocimiento por medio de los PRR se desencadena una serie de cascadas de señalizaciones que conducen a la transcripción de ciertos genes de la respuesta inmune innata que ayudan a eliminar los patógenos, atraer a las células inmunes e inducir respuestas inmunes adaptativas (Wallet et al., 2018)

## **INTERFERÓN (IFN)**

El IFN fue descrito por primera vez en 1957 por Alick Isaacs y Jean Lindenmann en Inglaterra, donde experimentando con el virus de la influenza se encontraron con una sustancia que protegía a las células de la infección viral; a esta sustancia llamaron “interferón” (Isaacs & Lindenmann, 1957). Sus funciones principales se pueden resumir en: acción antiviral, respuesta inmunomoduladora, y acción anti-proliferativa.

Existen tres tipos de IFN:

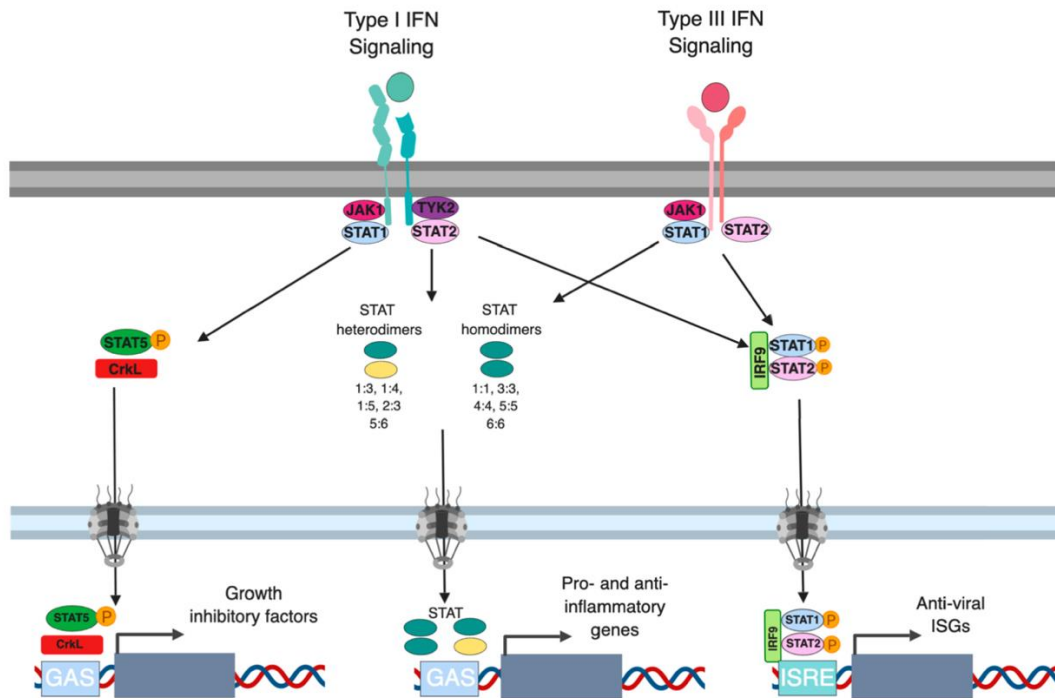
- IFN de tipo I: compuesto por 13 citocinas multigénicas en humanos, (14 en ratones) subtipos  $IFN_{\alpha 1}$ ,  $IFN_{\alpha 2}$ ,  $IFN_{\alpha 4}$ ,  $IFN_{\alpha 5}$ ,  $IFN_{\alpha 6}$ ,  $IFN_{\alpha 7}$ ,  $IFN_{\alpha 8}$ ,  $IFN_{\alpha 10}$ , un solo  $IFN_{\beta}$ , y los subtipos  $IFN_{\epsilon}$ ,  $IFN_{\tau}$ ,  $IFN_{\kappa}$ ,  $IFN_{\omega}$ . El  $IFN_{\alpha}$  también es llamado interferón leucocitario; es producido en la mayoría de las células humanas en pequeñas cantidades, sin embargo se produce en mayor cantidad por las células mononucleares de la sangre periférica, linfocitos B y macrófagos.
- IFN de tipo II : compuesto únicamente de  $IFN_{\gamma}$ , es producido exclusivamente por las

células T y las células Natural Killer (NK) y se caracteriza por sus funciones proinflamatorias e inmunomoduladoras

- IFN de tipo III: compuesto por  $IFN_{\lambda 1}$ ,  $IFN_{\lambda 2}$ ,  $IFN_{\lambda 3}$ ,  $IFN_{\lambda 4}$

El IFN tipo I y III se conocen principalmente por su actividad antiviral, destacando la producción ISG “genes estimulados por interferón” (De Andrea et al., 2002; Lazear et al., 2019; Malterer et al., 2014; Ramos-bello, 2008; Schoggins, 2019; Simmons et al., 2009)

La respuesta IFN tipo I ( $IFN-\alpha$  e  $IFN-\beta$ ) es la respuesta principal de defensa ante agentes virales, ya que induce un estado antiviral en el cuerpo que limita la replicación del virus (Fritsch & Weichhart, 2016), y esta mediada por la activación de los factores de transcripción  $NF-\kappa B$ , ATF-2/c-Jun y de los factores reguladores de interferón (IRFs). Cuando el IFN tipo I se une a sus receptores activa la cascada de señalización a través del transductor de señal de Janus quinasa y la vía del activador de transcripción (JAK-STAT) que promueve la transcripción de los (ISG) donde gran parte de ellos codifican proteínas antivirales (Fritsch & Weichhart, 2016) como MX1, viperin y los miembros de la familia IFITM, IFIT y OAS, que promueven un estado antiviral tanto en las células infectadas como en las vecinas, restringiendo la replicación viral e induciendo la apoptosis para proteger al organismo de la propagación del virus (Koyama et al., 2008; Lazear et al., 2019) Figura 4.



*Figura 4* Representación de cascada de señalización tras el reconocimiento de PAMPs virales y la activación de IFN para la inducción de productos y respuesta antiviral. Tomado de (Stanifer et al., 2019) Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons CC-BY, que permite el uso, la distribución y la reproducción sin restricciones en cualquier medio, siempre que el trabajo original se cite correctamente.

El rol del IFN tipo I va más allá del control de respuesta frente a infecciones causadas por agentes virales, ya que se ha demostrado que también ayudan en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa debido a que es capaz de ejercer un efecto positivo en las células mieloides, células B, células T y células NK; mejorando así la generación de una respuesta de memoria (McNab et al., 2015). Debido al papel crucial que desempeña el IFN en el control de las infecciones virales, los virus han desarrollado ciertas vías para la evasión o inactivación del mismo, así es el caso del VEEV (Simmons et al., 2009) y el caso de EEEV-NA, ambos alfavirus que parecen usar la proteína cápside para inhibir la respuesta de IFN y la expresión génica de la célula huésped para desregular la respuesta antiviral (Aguilar et al., 2008).

Los trabajos *in vitro* que existen con MADV son limitados ya que antes del 2010, EEEV-NA y MADV eran considerados como un mismo virus con diferentes linajes, por lo cual, cuando se realizaban trabajos de comparación o en general experimentos si utilizaban una cepa norteamericana asumían que el comportamiento sería el mismo para la especie en general.

En algunos de los primeros trabajos que se realizaron para estudiar el rol de IFN utilizaron líneas celulares primarias de embriones de pollo y fibroblastos de conejos neonatales infectados con el virus de Encefalitis Equina del Este Norteamericana (EEEV-NA), llegando a la conclusión de que el IFN era capaz de inhibir la cantidad de virus infeccioso y la síntesis viral (Armstrong et al., 1971; Mayer, 1962). En este estudio ambas líneas celulares eran pretratadas con IFN, no se midió directamente la producción del mismo.

Dentro de los pocos trabajos que existen donde directamente se comparan las cepas de EEEV-NA y MADV para evaluar el efecto del IFN en la replicación del virus en las células, Aguilar et al. realizaron un estudio *in vitro* en células de mono verde (VERO) donde observaron que las células pretratadas con IFN e infectadas con EEEV-NA lograban replicarse a las 48-72 horas en contraste a las infectadas con MADV que se mantuvieron con títulos muy bajos indicando que son más sensibles al IFN que las cepas norteamericanas. (Aguilar et al., 2005). Estos resultados se alinean con los estudios de años más tarde de Gardner donde estudió el tropismo de EEEV y encontró que EEEV replica bien en células de linaje mesenquimales, como los osteoblastos y los fibroblastos y no replica bien en tejido linfoide ni células de linaje mieloide como las células dendríticas y macrófagos. El tropismo de EEEV-NA lo correlacionó con una producción sérica muy baja en ratones de IFN tipo I, lo que puede permitir que el EEEV evada la respuesta inmune innata del huésped y, por lo tanto, mejore la neurovirulencia (Gardner et al., 2008).

En base a estos estudios, donde hay evidencia de que el IFN tiene un mayor efecto en la infección con MADV que con EEEV-NA, nos propusimos utilizar por primera vez líneas celulares humanas, escogiendo la línea celular de los fibroblastos ya que son células capaces de producir IFN tipo I y en estudios previos muestran una buena replicación del virus. Además, nos planteamos comparar si hay alguna diferencia en la replicación de las líneas adultas comparada a las neonatales, debido a que los casos más graves de MADV han sido reportados en niños. También utilizaremos células glía transformadas e inmortalizadas, como modelo de las células glía que son las células de soporte de las neuronas para estudiar la replicación de MADV.

Este es el primer estudio *in-vitro* utilizando líneas celulares humanas para comparar la infectividad de MADV utilizando una metodología de biología molecular cuantitativa que desarrollaremos para medir las concentraciones de carga viral y poder comparar la infectividad entre las líneas celulares, y el primer trabajo comparativo de la producción de IFN en infecciones por MADV de diferentes aislados panameños, detectados antes (1962 y 1984) y después del brote de MADV en humanos.

## **CAPITULO II: METOLOGÍA Y MATERIALES**

## **CONSIDERACIONES ESPECIALES**

El virus Madariaga (MADV) es considerado como un agente de riesgo biológico tipo 3 por lo cual todos los procedimientos donde se requirió trabajar con las cepas de MADV infeccioso se realizaron dentro del laboratorio BSL-3 del ICGES siguiendo los lineamientos de bioseguridad para este agente. Una vez inactivado el virus, los experimentos se realizaron en los laboratorios BSL-2 del ICGES.

El protocolo fue sometido a una revisión por el comité de Bioética del Instituto Conmemorativo Gorgas Estudios de la Salud N°169/CBI/ICGES/19 y se determinó que el permiso de bioética no era necesario debido a que no se utilizarán muestras de pacientes ni otros productos provenientes de humanos.

## **TIPO DE ESTUDIO**

Este es un estudio de tipo experimental, *in vitro* donde se utilizarán las líneas celulares humanas comerciales Fibroblastos Humanos dermales de Adultos (HFA) (Sciencell, catálogo 2320), Fibroblastos Humanos dermales de Neonatos (HFN) (Sciencell, catálogo 2300), Línea celular de células glía humanas BS153 (donada por Dr. Gerald Moncayo) y Células VERO (ATCC, CCL-81) para infectar y comparar aislados de MADV de los años 1962, 1984 y 2017.

## **HIPOTESIS**

El virus Madariaga aislado más recientemente tiene una mejor infectividad y replicación en células humanas en comparación con aislados del virus anteriores al brote en humanos del año 2010 debido a un escape a la respuesta del Interferón.

## **OBJETIVO GENERAL**

Comparar la capacidad de infección e inducción de la respuesta Interferón tipo I en líneas celulares humanas entre cepas de MADV que han circulado en Panamá antes y después del brote en humanos del 2010.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Crear un protocolo de cuantificación del genoma viral de MADV por biología molecular.
2. Analizar la capacidad infecciosa y replicativa de MADV en células humanas.
3. Cuantificar la producción de IFN I en células humanas infectadas por MADV.

## **MUESTRAS**

Se utilizarán tres aislados de MADV ya que son las cepas que se han podido recuperar de los casos que ha habido de MADV y serán divididos partiendo de la fecha del brote en humanos del año 2010 en dos grupos. Dos aislados del virus antes del brote en humanos en Darién cepas de 1962 y 1984 y un aislado después del brote en humanos, la cepa de 2017.

Todos los aislados se encontraban en el Departamento de Investigación de Virología y Biotecnología preservados en congeladores -80°C y disponibles para su uso en este proyecto.

## DISEÑO DE CEBADORES

Se realizó una búsqueda bibliográfica de las PCR Tiempo Real publicadas (hasta el 2019, fecha de inicio de la tesis) en donde no se encontró ninguna metodología específica para la detección del virus Madariaga (MADV), sin embargo habían ciertas PCR (Hull et al., 2008; Kang et al., 2010; Lambert et al., 2003; Zink et al., 2013) que detectaban el virus de Encefalitis Equina del Este (EEEV-NA) (Tabla 2).

Año	Publicación		Secuencia	Gen
2013	Quadraplex qRT-PCR assay for the simultaneous detection of Eastern equine encephalitis and West Nile virus.	Fw	CCCTAGTTCGATGTACTTCCG	E1
		Rv	GCATTATGCACTGCCCTTAG	E1
		Probe	CCGCCGATGCAGTG	E1
		Fw	ATGAAGAGCGCAGAAGACCC	NSP1
		Rv	GCGTCGACATTACTGTTAGC	NSP1
2010	A duplex real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for detecting western equine and eastern equine encephalitis viruses	Probe	CAGACTCTACCGCTACGCAGACAAG	NSP1
		Fw	TGTGCGTACCTCCTCATCGTT	NSP1
		Rv	GACTGGCGTGAATCTCTGCTT	NSP1
2009	A duplex real-time RT-PCR assay for the detection of St. Louis encephalitis and Eastern equine encephalitis viruses	Probe	AGCAGCCTACCTTTCCGACAATGGTTGTC	NSP1
		Fw	ACACTAAATTCACCCTAGTTCGAT	E1
		Rv	GTGTATAAAATTACTTAGGAGCAGCATTATG	E1
2003	Detection of North American Eastern and Western Equine Encephalitis Viruses by Nucleic Acid Amplification	Probe	CGAGCTATGGTGACGGTGGTGCA	E1
		Fw	ACACCGCACCCCTGATTTTACA	E2
		Rv	CTTCCAAGTGACCTGGTCGTC	E2
		Probe	TGCACCCGGACCATCCGACCT	E2

Tabla 2 : Publicaciones encontradas para detección del virus de Encefalitis Equina del Este Norteamericana.

Debido a que no encontramos ninguna metodología para detección de MADV en tiempo real, se decidió diseñar cebadores para la detección de MADV ya que se requería para la cuantificación de carga viral en experimentos posteriores. Para esto se realizó una búsqueda informática de secuencias del genoma completo de MADV mediante la plataforma Genbank. La base de datos y recursos de análisis de virus patógenos (ViPR) se descargaron en formato fasta (Tabla 3).

	Número GenBank	País	Año
1	KJ469569.1	Argentina	1933
2	KJ469622.1	Argentina	1936
3	KJ469598.1	Brasil	1955
4	NC_023812.1	Brasil	1956
5	KJ469640.1	Brasil	1956
6	KJ469581.1	Panamá	1958
7	KJ469580.1	Trinidad y Tobago	1959
8	KJ469637.1	Brasil	1960
9	KJ469578.1	Guyana Francesa	1962
10	KJ469565.1	Panamá	1962
11	KJ469589.1	Guatemala	1968
12	KJ469626.1	Perú	1970
13	KJ469601.1	Ecuador	1974
14	KJ469641.1	Brasil	1975
15	KJ469623.1	Perú	1975
16	KJ469596.1	Venezuela	1976
17	KJ469574.1	Brasil	1976
18	EF151503.1	Brasil	1985
19	KJ469558.1	Brasil	1988
20	KJ469614.1	Venezuela	1996
21	KJ469576.1	Venezuela	1996
22	KJ469586.1	Perú	1998
23	KJ469590.1	Colombia	2002
24	DQ241303.1	Peru	2007
25	KR132531.1	Brasil	2009
26	KJ469648.1	Panamá	2010
27	KJ469645.1	Panamá	2010
28	MH359230.1	Haití	2015
29	MH359233.1	Haití	2016
30	MH359232.1	Haití	2016
31	MH359231.1	Haití	2016
32	MG570148.1	Venezuela	2016
33	MZ389693.1	Brasil	2019
34	MZ389692.1	Brasil	2019

Tabla 3 : Listado de Secuencias de Genoma completo descargados en formato fasta, para diseño de cebadores

Las secuencias se exportaron al programa Sequencher (Sequencher® version 5.4.6 DNA sequence analysis software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA), donde se alinearon y se creó una secuencia consenso.

Con la secuencia consenso se compararon las PCRs existentes que estaban publicadas (Tabla2) y se realizó un alineamiento para inferir si estas PCRs eran capaces de reconocer las secuencias de MADV, ya que no fueron tomada en cuenta para su diseño.

Con el resultado obtenido decidimos hacer pequeñas modificaciones a los cebadores ya existentes y basándonos en la PCR de (Zink et al., 2013) diseñamos un nuevo juego de cebadores utilizando el programa vía web PRIMER 3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3/>) que luego fueron evaluados con el programa Oligo Evaluator (Sigma Aldrich, <http://www.oligoevaluator.com/LoginServlet>). Estos posteriormente fueron verificados con el programa BLAST y fueron mandados a sintetizar con la compañía LGC, Biosearch Technologies, USA.

## **ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA PCR EN TIEMPO REAL MADV**

La técnica de PCR en tiempo real es una de las técnicas más utilizadas en biología molecular con usos en ciencias biológicas y ciencias de la salud (Tamay de Dios et al., 2013). Consiste en una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos donde la secuencia blanco es copiada; para esto utiliza un molde de ADN, cebadores, desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina) dNTPs, una enzima polimerasa, una sonda y un tampón que contenga magnesio. Lo que caracteriza a la PCR en tiempo real es la utilización de la sonda que es una secuencia marcada con un fluoróforo que al excitarse genera una señal de fluorescencia que refleja la cantidad de producto formado (Kubista et al., 2006). En nuestro caso partimos de

ARN, por lo cual requerimos, además de la taq polimerasa, la enzima retro-transcriptasa inversa.

### DETERMINACIÓN DE MEJOR CONCENTRACIÓN DE CEBADORES

Al recibir los cebadores, se rehidrataron con agua grado molecular para llevarlos a una concentración de 100uM y se guardaron a -20°C hasta su uso. Con el kit de QIAamp viral Rna mini kit (Qiagen, catálogo 52906) se hizo extracción de ARN viral de las cepas de MADV para probar los cebadores siguiendo exactamente las instrucciones del fabricante.

Se hizo una PCR para generar ADN complementario con el kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, catálogo 18080051) y se procedió a probar distintas concentraciones de los cebadores (250, 500 y 1000 nM) con el kit de SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, catálogo 4309155) en un volumen final de reacción de 20uL para determinar la mejor concentración de trabajo (Tabla 4). Para esta PCR se utilizó el equipo Applied Biosystems 7500Fast (Thermo Fisher Scientific). Los resultados se visualizaron por medio de los valores cts obtenidos, las curvas de amplificación y para la concentración elegida como optima se realizó un gel de agarosa al 2% para verificar el tamaño del producto amplificado que se visualizó en el transiluminador BioDoc-It 220 M-20V UV (BioDoc-It™).

	Mix para Determinación de Concentración de cebadores																		
	1		2		3		4		5		6		7		8		9		
Reactivos	Fw 250	Rv 250	Fw 250	Rv 500	Fw 250	Rv 1000	Fw 500	Rv 250	Fw 500	Rv 500	Fw 500	Rv 1000	Fw 1000	Rv 200	Fw 1000	Rv 500	Fw 1000	Rv 1000	
Mix	10		10		10		10		10		10		10		10		10		10
Fw	1.66		1.66		1.66		3.33		3.33		3.33		2		2		2		2
Rv	1.66		3.33		2		1.66		3.33		2		1.66		3.33		2		2
H2O	4.68		3.01		4.34		3.01		1.34		2.67		4.34		2.67		4		4
cDNA MADV	2		2		2		2		2		2		2		2		2		2
Total	20		20		20		20		20		20		20		20		20		20

Tabla 4 Mezcla de reacción por pocillo para prueba de distintas concentraciones de cebadores. Stock utilizado para 250nM y 500nM fue de 3µM. Stock utilizado para 1000nM fue de 10µM. Los volúmenes presentados corresponden a uL.

## DETERMINACIÓN DE MEJOR CONCENTRACIÓN DE SONTA

Para determinar el funcionamiento y mejor rendimiento de la sonda de la PCR, se realizó una prueba de diferentes concentraciones de sonda (100, 150, 200, 300 y 400 nM) (Tabla 5) con el kit SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR (Invitrogen, catálogo 11732088) en el termociclador 7500Fast (Applied Biosystems). Se consideró la mejor concentración de sonda aquella que permitió obtener una buena señal de fluorescencia y a su vez optimizar el uso de reactivos.

Prueba para Determinación de Concentración de Sonda					
	100nM	150nM	200nM	300nM	400nM
2X Mix	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
Fw (10uM)	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Rv (10uM)	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Sonda (Prueba)	0.83	1.25	1.66	2.5	3.3
Enzima	1	1	1	1	1
H2O	6.17	5.75	5.34	4.5	3.67
RNA	2	2	2	2	2

Tabla 5 : Mezcla de reacción por pocillo para prueba de distintas concentraciones de sonda. Stock utilizado para las concentraciones fue de 3µM. Los volúmenes presentados corresponden a µL.

## ESPECIFICIDAD

Una vez encontrada la mejor concentración tanto de sondas como cebadores, se realizó un ensayo probando la especificidad de los cebadores donde se probaron los virus Madariaga (MADV), Chikungunya (CHIKV), Mayaro (MAYV) todos del mismo género de MADV.

## CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDO

Los plásmidos son fragmentos de ADN extracromosómico en forma circular que se han encontrado en los dominios *Archae*, *Bacteria* y *Eukarya* donde su principal característica es su capacidad de replicarse independientemente de la célula huésped. Gracias a esto son capaces de incorporar y entregar genes, favoreciendo así los intercambios genéticos en las

poblaciones bacterianas y actuar como vectores naturales de clonación (del Solar et al., 1998; Feinbaum, 1998). Los plásmidos, además poseen uno o más genes que a menudo son responsables de algunas características únicas que presentará la bacteria huésped, por ejemplo, la capacidad de sobrevivir en concentraciones normalmente tóxicas de antibióticos. (Christophersen et al., 2008), lo que permite seleccionar las bacterias transformadas que contienen los plásmidos de interés.

### **PCR PARA PLÁSMIDO DIVB-MADV1984**

Se extrajo ARN de la cepa ICGES1984 con el kit de QiaAmp viral Rna mini kit (Qiagen, catálogo 52906) siguiendo las instrucciones del fabricante. Con este material se generó un fragmento de ADN con el kit de amplificación OneStep RT-PCR kit (Qiagen catálogo 210212) en un volumen final de 50ul (Tabla 6 y 7).

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Qiagen Buffer OneStep RT-PCR Buffer 5x</b>	10uL
<b>dNTP mix (10mM)</b>	2uL
<b>Primer Forward (10uM)</b>	3uL
<b>Primer Reverse (10uM)</b>	3uL
<b>Qiagen Buffer OneStep RT-PCR Enzima Mix</b>	2uL
<b>Buffer 5x Q Solution</b>	10uL
<b>Agua</b>	15uL
<b>RNA</b>	5uL

**Tabla 6 Reactivos para preparación de PCR**

La reacción se llevó a cabo en el termociclador de tiempo final en el termociclador SimplyAmp Thermal cycler (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones:

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Transcripción Reversa</b>	50°C	30 min
<b>Activación de Taq DNA polimerasa</b>	95°C	15 min
Repetir 40 ciclos de los siguientes 3 pasos: (desnaturalización, anidación, extensión)		
<b>Desnaturalización</b>	94°C	30 seg
<b>Anidación</b>	60°C	1 min
<b>Extensión</b>	72°C	1 min
<b>Extensión Final</b>	72°C	10 min

Tabla 7 Condiciones de PCR para amplificación de MADV

Una vez culminada la PCR se corrió el producto en un gel de agarosa al 2%, por 45 minutos a 100V y se visualizó en el transiluminador BioDoc-It 220 M-20V UV (BioDoc-It™).

#### **PURIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DE ADN MADV1984**

El fragmento de ADN obtenido fue purificado con el kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, catalogo 28106), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN purificado fue medido en el NanoDrop 200c (Thermo Scientific) y guardado a -80°C hasta su uso. La lectura en el NanoDrop muestra la pureza del ADN, en donde la lectura de la relación A260/280 debe tener un valor mayor a 1.6 para considerarse aceptable, si este valor es inferior puede indicar contaminación con compuestos como alcoholes o proteínas generalmente utilizados en el proceso de extracción.

#### **LIGACIÓN**

El primer paso para la construcción de un plásmido es conocido como Ligación; en este paso se da la formación de un ADN recombinante que luego deberá ser introducido a células vivas;

en este trabajo utilizamos el plásmido comercial pGEM T Easy-Vector para insertar nuestro ADN de interés, por medio de la enzima T4 ligasa (Promega, catálogo A1360) (Figura 5).

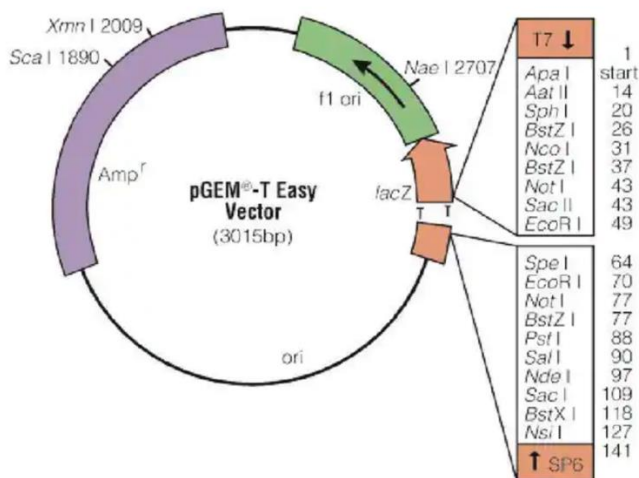


Figura 5 :Representación de vector utilizado, pGEM-T Easy. Tomado de inserto de pGEM-T Easy Vector Promega cat A1360

Para aumentar las probabilidades de tener una reacción de ligación exitosa, el kit del plásmido recomienda hacer una relación 1:3 con respecto al inserto.

La reacción se realizó de la siguiente manera:

	Plásmido #1	Control
Buffer 2x	5uL	5uL
pGEM T Easy Vector	1uL	1uL
PCR o control positivo*	0.13uL	2uL
Enzima T4 Ligasa	1uL	1uL
Agua	2.87uL	1uL

Tabla 8 . Mezcla de Reactivos para Reacción de Ligación

\*El kit viene con un control positivo para asegurar que los procedimientos fueron realizados correctamente. Estas reacciones fueron incubadas a 4°C sobre la noche.

## TRANSFORMACIÓN

Este paso consiste en introducir el ADN recombinante en bacterias competentes para que puedan producir a gran escala y de manera eficiente el ADN de interés.

Para esto se descongelaron las bacterias competentes en hielo, se le añadieron 2uL de reacción de ligación y se dejaron incubando en hielo por 20 minutos.

Transcurrido este tiempo, se realizó un choque térmico incubando las bacterias a 42°C en baño María por 50 segundos pasando inmediatamente a hielo, dejándolos reposar por 2 minutos. Se le agregó 900uL de medio LB sin antibiótico y se dejó en un agitador térmico (New Brunswick™ Excella® E24 Incubator Shaker) por 1 hora a 225rpm a 37°C. Mientras transcurría esta hora se le agregó 40uL de XGAL (MP Biomedicals™ catálogo 114063102) a una concentración de 40 mg/mL a los platos de agar LB que contenían ampicilina (BP1760-5 Fisher Scientific). Finalizada la hora de incubación se sembraron 100uL del medio en cada plato y se dejó incubando sobre la noche (Figura6).

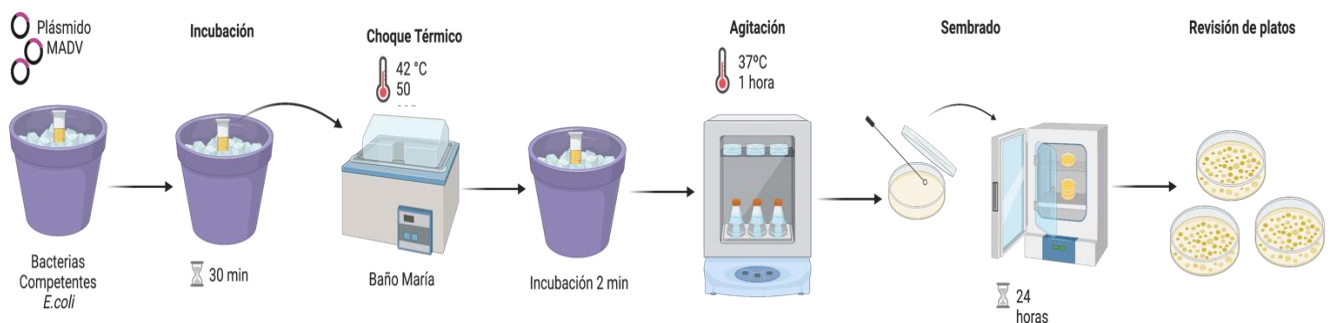


Figura 6 : Representación del proceso de Transformación - MCH creado con BioRender.com

## SELECCIÓN DE COLONIAS

Para ayudar a la selección de colonias, a los platos de agar LB que contenían ampicilina, se le agregó X- gal a una concentración de 40 mg/mL. Algunos vectores de plásmidos y

bacteriófagos utilizados para clonación llevan un segmento corto de ADN de *E. coli* que contiene secuencias reguladoras y la información de codificación de los primeros 146 aminoácidos del gen de la  $\beta$ -galactosidasa. La  $\beta$ -galactosidasa hidroliza la lactosa en glucosa y galactosa; esta actividad se puede ver con un sustrato cromogénico como X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido), que produce un compuesto azul denso e insoluble. Si bien, los fragmentos de  $\beta$ -galactosidasa no están activos ni en el huésped ni en el plásmido, estos pueden asociarse para formar una proteína enzimáticamente activa, esto generalmente ocurre en un sitio de policlonación del vector que permite la diferenciación de las bacterias lactosa positivas de las negativas debido a que las lactosa positivas formaran colonias azules en presencia de la sustancia cromogénica X-Gal; mientras que las lactosa negativas generaran colonias blancas debido a que se introduce en el sitio de síntesis de lactosa el fragmento de ADN extraño lo que no permite al plásmido la complementación para activar la  $\beta$ -galactosidasa (Green & Sambrook, 2019).

Transcurridas las 24 horas de incubación, se observaron los platos para discriminar entre las colonias que contenían o no el inserto. Las colonias blancas representan las colonias con inserto y las colonias azules las que no tienen la secuencia de interés.

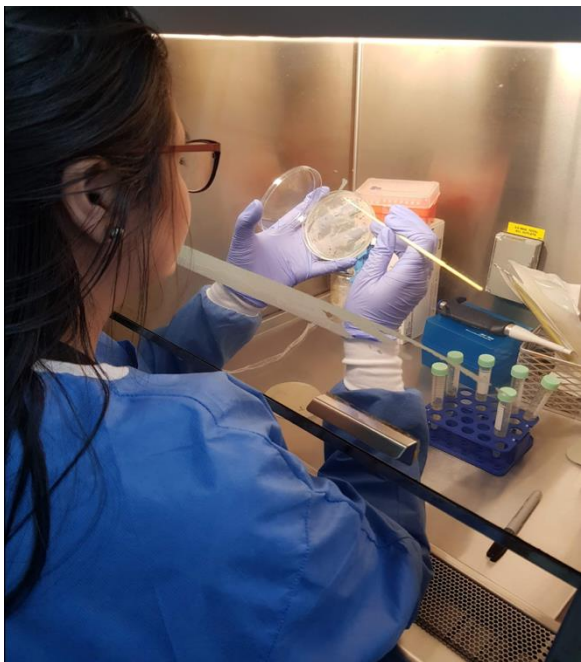
Una vez obtenida las colonias blancas, que teóricamente deben contener nuestra secuencia de interés, se hicieron mini cultivos de estas colonias para su posterior purificación y secuenciación. Cada colonia blanca fue picada con un asa bacteriológica cuidadosamente sin tocar ninguna otra para evitar contaminación, se hizo un subcultivo rayando un nuevo plato de agar LB llamado “Plato Maestro” donde estarán todas las colonias blancas que se vayan a probar.

Luego de picar en el plato, el asa con la colonia se introdujo en un tubo cónico de 15mL con 5mL de medio LB con ampicilina y se dejó en crecimiento por 12horas en un agitador térmico a 37°C a 225rpm. El plato maestro de agar se puso en incubadora a 37°C sobre la noche.

Al día siguiente se realizó la purificación del ADN plasmídico utilizando el kit comercial QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, catálogo 27106) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se eluyó en un volumen final de 50uL para cada colonia.

### VERIFICACIÓN DE INSERTO DEL PLÁSMIDO

Para comprobar que el plásmido tuviese el inserto deseado se realizó una digestión



*Figura 7* : Selección de colonias blancas – Tomado por LS- ICGES



*Figura 8* Elaboración de Plato Maestro y Minicultivos Tomado por LS- ICGES

enzimática con la enzima de restricción ECORI (New England BioLabs, catálogo R0101S).

Las enzimas de restricción son endonucleasas que se unen al ADN en secuencias específicas, una vez reconoce el sitio específico la enzima corta el ADN en ese sitio, generando un fragmento definido (Evans, 1993).

El plásmido pGEM TEasy-Vector al ser cortado con ECORI libera el inserto clonado generando 2 fragmentos, uno de 3015bp (tamaño del fragmento del vector) y otro del tamaño del fragmento del inserto.

La digestión enzimática se llevó a cabo con la enzima ECORI (New England BioLabs, catalogo R0101S) según las recomendaciones del fabricante, incubando a 37°C por una hora.

Luego se verificaron los tamaños de los productos con una electroforesis de gel de agarosa al 2% por 45 minutos a 90 voltios, transcurrido este tiempo se visualizaron las bandas en un fotodocumentador (BioDoc-It 220 M-20V UV).

## **SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS**

Una vez revelado el gel de agarosa, se seleccionaron las colonias que tenían el tamaño deseado y se procedió a realizar secuenciación por método de Sanger. Este método también es conocido como método de terminación de cadena, y se basa en el uso de análogos químicos de los desoxirribonucleótidos (dNTP) o **terminadores de cadena**. (Crossley et al., 2020; Heather & Chain, 2016)

Para secuenciar nuestros productos se utilizó el Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, catálogo 4337455). Se midió la concentración de las miniprep en el NanoDrop. Conocida la concentración de las muestras se ajustó el volumen para tener la cantidad recomendada según el kit que para productos de cadena doble de ADN es de 150-300ng (Tabla9). Los cebadores utilizados para secuenciar nuestro producto fueron los M13 que reconocen el vector utilizado y deben amplificar el vector con el inserto ya que nuestro fragmento era pequeño. Los cebadores se utilizaron a una concentración de 3.2uM y

en este caso se utilizó una reacción para el cebador delantero y otra reacción para el cebador reverso por cada muestra a secuenciar en un volumen final de 10uL.

	Mix Cebador Delantero (	Mix Cebador Reverso
Buffer 5X	7uL	7uL
Big Dye Terminator	14uL	14uL
Cebador 3.2uM	7uL	7uL
Agua	21uL	21uL
DNA	3uL	3uL
Tabla 9 : Reacción de Secuenciación		

En cada pocillo se sirvieron 7uL de Mix con 3uL de la muestra de ADN a secuenciar. Se utilizo también como control una reacción de PGEM (control del kit). Se procedió a hacer una PCR con las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial de 96°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de 96°C por 10 segundos, 53°C por 10 segundos y 60°C por 4 minutos. Una vez finalizada esta reacción se purificó con el kit BigDye XTerminator (Applied Biosystems, catálogo 4376484). Este kit atrapa todos los componentes de la reacción de secuenciación, como iones de sal, terminadores de tinte no incorporados y dNTPs, para evitar llevarlas al secuenciador.

El ICGES cuenta con un centro de secuenciación donde se entrega el plato preparado por el investigador con las muestras y el personal idóneo hace el manejo del equipo, entregando al investigador los resultados crudos de su corrida para su posterior análisis.

Una vez se lleva al secuenciador los datos de la reacción se leen en un cromatograma de picos representativos de cada dNTP, nuestras lecturas y análisis se realizaron con el programa

Sequencher 7, una vez limpiada la secuencia se sometió al programa BLAST para evaluar nuevamente la calidad de la secuencia.

Una vez fue comprobada la construcción exitosa del plásmido se realizó un cultivo grande y se guardaron alícuotas del plásmido original en glicerol 80% para preservar y poder utilizar en futuros experimentos.

### CUANTIFICACIÓN DE MADV CON PLÁSMIDO

El ADN del plásmido construido se cuantificó en el NanoDrop 200c (Thermo Scientific) arrojando una concentración de 55ng/uL,

Con este resultado se utilizó la calculadora “Number of copies calculator” (Science Primer, <https://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr>) y nos mostró que teníamos  $1.62 \times 10^{10}$  copias/uL (Figura 9).

### Copy number calculator for realtime PCR

Calculate copy number based on:

Length  Mass

Template: **Double Stranded DNA**

Amount of DNA:  ng

Length of DNA:  bases or base pairs

The number of copies is:

**$1.619 \times 10^{10}$**

Template Options:  dsDNA  ssDNA  ssRNA

Figura 9 : Número de copias calculado para plásmido

Para cuantificar con el plásmido, partimos de la concentración conocida de ADN siendo esta  $1.62 \times 10^{10}$  copias/uL que transformamos a unidades de copias/mL correspondiendo a  $1.63 \times 10^{13}$  copias/mL.

Partiendo de esta concentración se hicieron diluciones seriadas 1:10 desde la concentración  $10^9$  hasta 10 copias (Tabla 10).

	<b>Concentración inicial ADN (copias/mL)</b>	<b>Agua (uL)</b>	<b>ADN plásmido (uL)</b>	<b>Concentración final Copias/ml</b>
Stock 1000X	$1.62 \times 10^{13}$	1998	2	$1.62 \times 10^{10}$
Stock 1.62X	$1.62 \times 10^{10}$	1800	200	$1.62 \times 10^9$
Dilución 1	$1.62 \times 10^9$	76.54	123.46	$10^9$
Dilución 2	$10^9$	180	20	$10^8$
Dilución 3	$10^8$	180	20	$10^7$
Dilución 4	$10^7$	180	20	$10^6$
Dilución 5	$10^6$	180	20	$10^5$
Dilución 6	$10^5$	45	5	$10^4$
Dilución 7	$10^4$	45	5	$10^3$
Dilución 8	$10^3$	45	5	$10^2$
Dilución 9	$10^2$	45	5	$10^1$

Tabla 10 Diluciones seriadas para ensayo

Se realizó la mezcla maestra de reactivos para montar la RT-qPCR Tiempo Real para detección de MADV ya estandarizada, se sirvieron 20uL de esta mezcla en cada pocillo y 5uL de cada dilución del plásmido.

Cada dilución se hizo en duplicado y se añadió un pocillo de control negativo y uno positivo en el termociclador de tiempo real QuantStudio5 (Applied Biosystems™).

## **ESTANDARIZACION DE CELULAS PARA EXPERIMENTOS DE INFECTIVIDAD**

En nuestros experimentos utilizamos diversas líneas celulares:

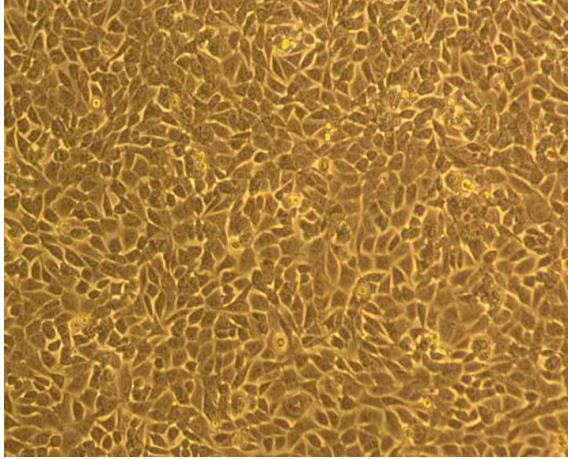
- Fibroblastos dermales de Humanos Adultos (HFA) (Sciencell, catálogo 2320)
- Fibroblastos dermales de Humanos Neonatales (HFN) (Sciencell, catálogo 2300)
- Línea celular de células glía humanas BS153 proveniente de un glioblastoma (donada por Dr. Gerald Moncayo)
- Células VERO (ATCC, CCL-81), células aisladas del epitelio renal de riñón de mono verde africano

Para las células VERO y BS153 se utilizó el medio de mantenimiento MEM (Gibco catálogo 41500-034) enriquecido con 10% SFB, 1% Penicilina/Estreptomicina y 0.5% de Anfotericina, y para las BS153 se utilizó DMEM (Gibco catálogo 12100046) 10% SFB, 1% Penicilina/Estreptomicina y 0.5% de Anfotericina. Para las líneas HFN y HFA se utilizó el medio FM (Sciencell, catálogo 2301) enriquecido con 2% SFB, 1% de suplemento de crecimiento de fibroblastos y 1% Penicilina/Estreptomicina.

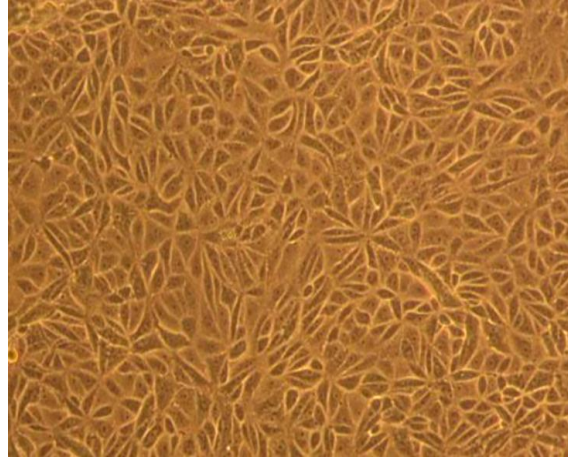
### **Descongelación de línea celular VERO y BS153**

El vial se sacó del nitrógeno líquido y se descongeló en baño María a 37°C, mientras el vial estaba descongelándose, en un tubo cónico de 15mL se le agregó 10mL de medio de mantenimiento y se reservó. Cuando las células se descongelaron se transfirió toda la suspensión al tubo cónico de 15mL, se centrifugó a 1500rpm por 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se suspendió el botón de células en 1mL de medio el cual se inoculó en una botella de 25cm<sup>2</sup> y se le añadieron 9mL más de medio. La botella fue llevada a la incubadora

a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas. A las 24 horas había una monocapa de células las cuales se sub-cultivaron para tener mayor cantidad de células.



*Figura 10* : Monocapa de células BS153 -Tomado por MCH ICGES



*Figura 11* : Monocapa de células VERO – Tomado por MCH-ICGES

### **Pasaje o Subcultivo de VERO y BS153**

Las líneas BS153 (Figura10) y VERO (Figura 11) son líneas celulares inmortales, estas pueden sobrevivir múltiples pasajes, pero pueden ir adquiriendo mutaciones, por ende, todos los experimentos se realizaron con células que tenían menos de 25 pasajes después de la descongelación

A la monocapa de células se le retiró el medio de mantenimiento y se lavó con PBS estéril para retirar cualquier remanente de SFB, luego se le agregó 1mL de Tripsina-EDTA 0.25% (Thermo Fisher Scientific, catálogo 25200056) y se llevó por 5 minutos a la incubadora a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo todas las células estaban despegadas, se les añadió 4mL de medio de mantenimiento y todo el contenido fue pasado a un tubo de 15mL que fue centrifugado a 1500 rpm por 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se suspendió el botón de células en 2mL de medio. Estos 2mL fueron divididos en partes iguales (1mL y 1mL) en

dos botellas de 75cm<sup>2</sup> los cuales fueron llevados a un volumen final de 15mL con medio de mantenimiento. Las botellas fueron llevadas a la incubadora a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 48 horas.

Este procedimiento de pasaje fue realizado cada vez que se requirió la preparación de platos para experimentos.

### **Descongelación de HFN y HFA**

Ambas líneas son líneas primarias, por lo cual son un poco más sensibles que las utilizadas rutinariamente. Para estas líneas en sus primeros pasajes se utilizó Poly-L-Lysina (Sciencell, catálogo 0403) es un reactivo que mejora la adhesión celular y la supervivencia de células primarias y es recomendado para estas líneas.

El día anterior a la descongelación se tomó una botella de 75cm<sup>2</sup> y se le agregó 150uL de Poly-L-Lysina 1mg/mL (Sciencell catálogo 0403) y 10mL de agua estéril, se dejó incubando a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> hasta el día siguiente. El día de la descongelación se lavó la poly-L-lisina de la botella con agua estéril 2 veces, y luego se le añadió a la botella 15mL de medio y se reservó. El vial se sacó del crio tanque con nitrógeno líquido y se descongeló en baño María a 37°C, cuando las células se descongelaron se transfirió toda la suspensión a la botella que ya tenía el medio, la botella se incubó a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y se le cambió el medio 72 horas después cuando las células estaban a un 70% de confluencia.

El crecimiento de estas células es más lento y se le realizó el pasaje 6 días después cuando estaban 95% confluentes para tener mayor cantidad de células.

## **Pasaje o Subcultivo de HFA y HFN**

Tanto las líneas de HFN como HFA son células primarias, por lo cual todos los experimentos se realizaron con células que tenían hasta 10 pasajes después de la descongelación.

El día anterior se prepararon las botellas de 75cm<sup>2</sup> con Poly-L-Lysina. Se atemperó el medio FM, la Tripsina/EDTA 0.05% (Thermo Fisher Scientific, catálogo 25300054), Solución Neutralizadora de Tripsina EDTA (TNS) (Thermo Fisher Scientific, catálogo R002100) y DPBS (Thermo Fisher catálogo 14190144). Una vez todos los reactivos estuvieron a temperatura ambiente se procedió a descartar el medio de mantenimiento, se lavaron las células con 5mL de DPBS; para tripsinizar las células se les añadió 5mL de DPBS y 5mL de Tripsina/EDTA 0.05% y se dejó 5 min a 37°C, durante la incubación en un tubo cónico de 50mL se le agregó 5mL de SFB. Transcurridos los 5 minutos, todo el contenido de la botella se pasó al tubo cónico con SFB, la botella se golpeó suavemente para asegurar el desprendimiento de las células, se le añadió 5mL de TNS, se revolvió con la pipeta y se pasó todo el contenido al tubo cónico de 50mL. El tubo se centrifugó a 1000rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se suspendió el botón de células en 2mL de medio. Estos 2mL fueron divididos en dos partes iguales en dos botellas de 75cm<sup>2</sup> los cuales fueron llevadas a un volumen final de 15mL con medio de mantenimiento. Las botellas fueron llevadas a la incubadora a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> hasta la formación de una monocapa que generalmente tomaba entre 5-7 días. Este procedimiento de pasaje fue realizado cada vez que se requirió la preparación de platos para experimentos.

## **CULTIVO CELULAR**

La técnica de cultivo celular permite el crecimiento de las células *in vitro*, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. El procedimiento consiste en liberar células del tejido original y llevarlas a un ambiente que asemeje sus condiciones naturales de crecimiento para que estas crezcan, se multipliquen y mantengan de una manera controlada. El cultivo celular es indispensable a la virología, ya que las células susceptibles han permitido el aislamiento viral a partir de muestras clínicas o ambientales y la amplificación de partículas virales *in vitro*, ya que antes de la implementación de esta técnica los aislamientos virales debían hacerse en modelos animales (Castaño María E. & Zapata., 2012). Además, el cultivo celular permite hacer estudios citogenéticos, inmunológicos, bioquímicos y moleculares para investigación y estudios toxicológicos (Phelan & May, 2016).

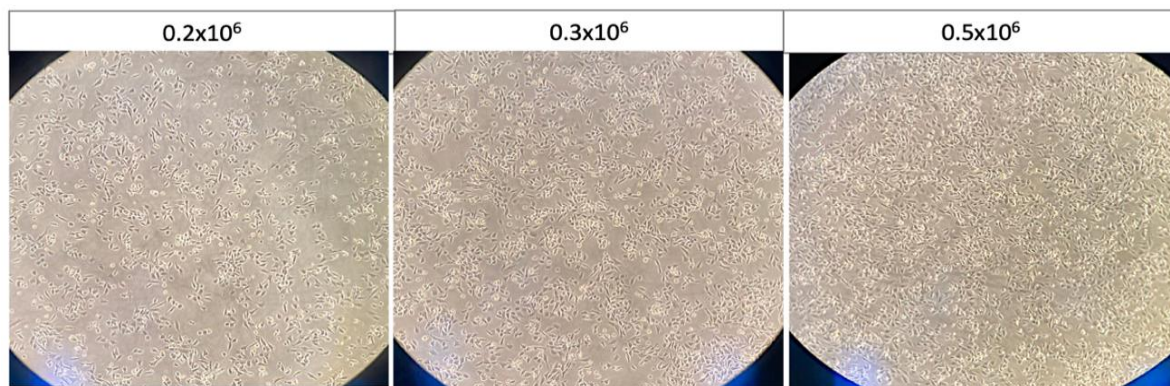
El primer paso para realizar un pasaje o un subcultivo celular es separar las células de la superficie del recipiente de cultivo primario por medio de la tripsinización o medios mecánicos, luego la suspensión celular resultante se subdivide y es sembrada en nuevas botellas de cultivos (Phelan & May, 2016). El medio utilizado para que las células puedan crecer es una mezcla compleja de nutrientes y factores de crecimiento que, junto con el entorno físico, pueden hacer que se dé la proliferación exitosa de las células o su muerte y variará según los requerimientos nutricionales que requiera la línea celular que se esté trabajando (Baust et al., 2017).

### **Estandarización de células BS153, HFA, HFN en platos de 12 pocillos**

Se estandarizó la cantidad de células para sembrar 24 horas antes de los experimentos haciendo un conteo al momento de la siembra y otro conteo a las 24 horas. Para esto se hizo una botella de 75cm<sup>2</sup> de las 3 líneas, las cuales se tripsinizaron con 3mL de Tripsina-EDTA 0.25% (Thermo Fisher, catálogo 25200056) llevando a la incubadora por 5 minutos a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, se les añadió 7mL de medio de mantenimiento, todo el contenido fue pasado a un tubo de 15mL que fue centrifugado a 1500 rpm por 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se suspendió el botón de células en 10mL de medio. Para contar las células se utilizó el tinte azul de tripano (Trypan Blue Sigma Aldrich, catálogo T8154) a una concentración de 0.4% que distingue a las células vivas de las muertas ya que el tinte atraviesa la membrana las células muertas tiñéndolas de azul, las vivas en cambio se ven incoloras y brillantes. Con el tinte se hizo una dilución 1:2 (10uL de células y 10uL de tinte) y se sirvieron 10uL en la cámara de Neubauer donde se contaron los 4 cuadrantes externos.

El resultado obtenido será la cantidad de células totales en 10mL. Sabiendo la cantidad total se realizó el cálculo para saber que volumen hay que agregar a cada pocillo para probar la cantidad deseada de células los experimentos.

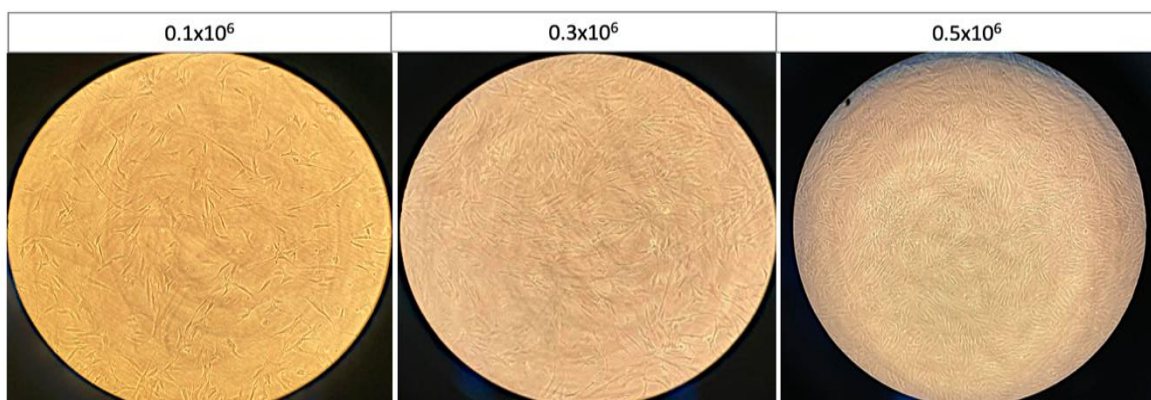
Para las BS153 se probaron las concentraciones de  $0.2 \times 10^6$ ,  $0.3 \times 10^6$  y  $0.5 \times 10^6$  células por pocillo en platos de 12 con un volumen final de 1mL (Figura 12).



	Cantidad de células (uL)	Cantidad de medio (uL)
$0.2 \times 10^6$	120uL	880uL
$0.3 \times 10^6$	180uL	820uL
$0.5 \times 10^6$	300uL	700uL

*Figura 12 : Visualización de BS153 en distintas concentraciones, y su preparación 24 horas antes.*

Para la línea de HFA se probaron las concentraciones de  $0.1 \times 10^6$ ,  $0.3 \times 10^6$  y  $0.5 \times 10^6$  células por pocillo en platos de 12 con un volumen final de 1mL (Figura 13).

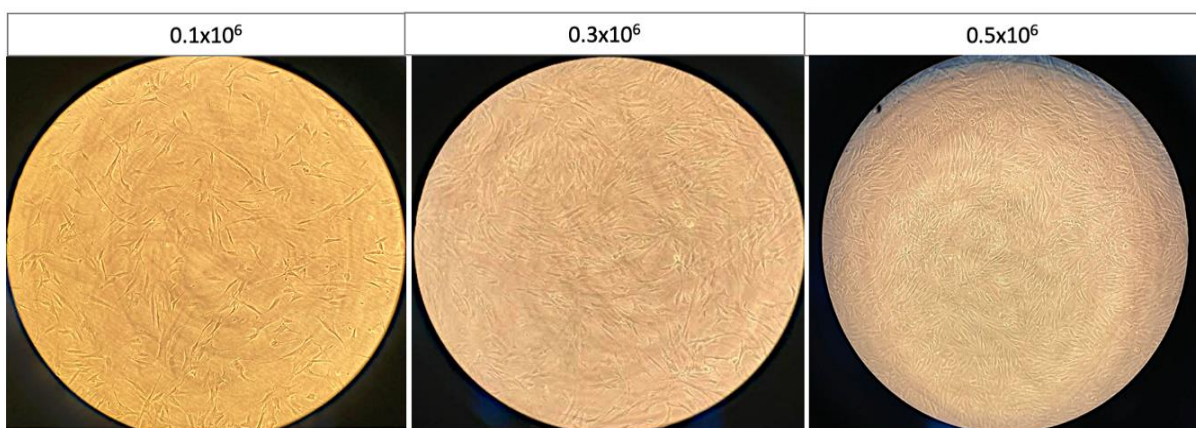


	Cantidad de células (uL)	Cantidad de medio (uL)
$0.1 \times 10^6$	278uL	722uL

$0.3 \times 10^6$	833uL	167uL
$0.5 \times 10^6$	1388uL	0

*Figura 13 : Visualización de HFA en distintas concentraciones, y su preparación 24 horas antes.*

Para los HFN se probaron las concentraciones de  $0.1 \times 10^6$ ,  $0.3 \times 10^6$  y  $0.5 \times 10^6$  células por pocillo en un volumen final de 1mL (Figura 14).



	Cantidad de células (uL)	Cantidad de medio (uL)
$0.1 \times 10^6$	185uL	815uL
$0.3 \times 10^6$	555uL	455uL
$0.5 \times 10^6$	926uL	74uL

*Figura 14 : Visualización de HFN en distintas concentraciones, y su preparación 24 horas antes.*

## PRODUCCIÓN DE CEPAS DE MADV

Para probar los cebadores diseñados y desarrollar experimentos posteriores, se realizó una producción a gran escala de MADV de las cepas panameñas disponibles MADV1962 (KJ469565 Genbank), MADV1984 (GU001936 Genbank) y MADV2017 (sin secuenciar).

Células VERO fueron cultivadas 24 horas antes del día de la infección en botellas de cultivo estériles de 150cm<sup>2</sup> de diámetro. Dentro del laboratorio BSL3 las células se infectaron con 800uL de virus puro con las distintas cepas de MADV, después de una hora de absorción en condiciones de 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, donde las células estuvieron en contacto directo con el inóculo del virus, se le adiciono 14mL de MEM con 2% de SFB, 0.5% Anfotericina y 1% Penicilina/Estreptomicina. Las células se revisaron cada 24 horas después de la infección en microscopio invertido hasta que se observara efecto citopático (CPE) (Figura 15).

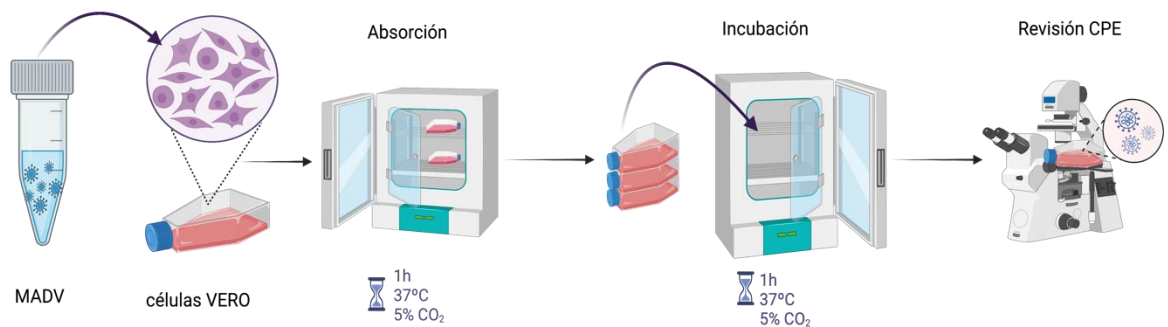


Figura 15 : Esquema de Producción Viral - MCH creado con BioRender.com.

Una vez observado un CPE de 3+, se procedió a cosechar la producción de cada virus.

## TITULACIÓN DE CEPAS DE MADV

El título del virus se define como la concentración del virus en una muestra, y se determina haciendo diluciones seriadas en factor de diez e infectando estas diluciones en monocapas de células de cultivo a las que se les pone una capa semisólida, generalmente agarosa para restringir el movimiento del virus y solo pueda infectar a su alrededor, donde al cabo de 2 a 14 días dependiendo del virus se empezarán a evidenciar la formación de placas debido a la muerte celular (unidades formadoras de placas por mililitro) (Choudhary et al., 2021; S. Jane Flint, Lynn W. Enquist, Vincent R. Racaniello, 2009)

El título viral se calculará haciendo un promedio del conteo de las placas visibles en la última dilución que aparezcan y multiplicando por el factor de dilución y se expresará en PFU/mL

$$\frac{\text{Promedio de placas contadas}}{\text{volumen del inoculo en mL}} \times \text{Factor de Dilución}$$

Para titular tanto las producciones de MADV, como los experimentos de infectividad a distintas horas, se cultivaron células VERO en platos de 12 pocillos 24 horas antes de la infección y se prepararon los reactivos necesarios para el experimento como: agarosa 2% agua, MEM2%SFB, cristal violeta 0.5%, formaldehído 10% (detallados en Anexos). El día de la infección se prepararon diluciones seriadas del virus 1:10 usando como solvente el medio MEM sin SFB, partiendo de un vial puro de concentración desconocida de MADV. Cada pocillo fue lavado con PBS estéril e inoculado con 200uL de cada dilución preparada en duplicado, los platos fueron incubados 1 hora a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Una vez culminada la hora se le adicionó a cada pocillo 2mL de agarosa al 0.6%, y se devolvieron a la incubadora

bajo las mismas condiciones hasta 72 horas. Transcurrido este tiempo a cada pocillo se le agregó 1mL de formaldehído al 10% y se dejó fijando durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego con una espátula se retiró cuidadosamente la agarosa y se realizó la tinción con cristal violeta a 0.5% adicionando suficiente volumen como para cubrir toda la superficie del pocillo, se dejó actuar el tinte entre 3 y 5 minutos y por último se enjuagó con agua del grifo y se dejó secar para realizar el conteo de las placas formadas por las partículas virales (Figura 16).

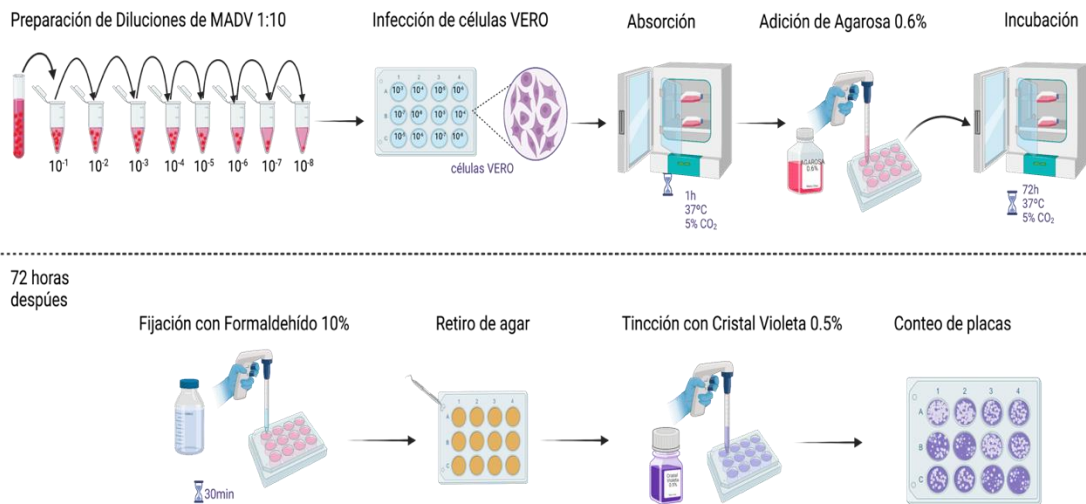


Figura 16 : Esquema de Titulación Viral- MCH creado con Biorender.com

## **INFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES CON DIFERENTES MOI**

El término MOI se deriva de las siglas de “Multiplicity of infection” que en español se traduce como el número de multiplicidad de infección y se refiere al número de partículas virales infecciosas que se agregan por célula durante la infección experimental. En un experimento, para obtener la MOI de 1, por 1 célula estaría agregando 1 partícula viral (S. Jane Flint, Lynn W. Enquist, Vincent R. Racaniello, 2009).

Para poder hacer experimentos con MOI es necesario conocer el título del virus que se va a utilizar y la cantidad de células al momento de la infección. En nuestro experimento, hicimos una infección de la línea celular VERO para observar su comportamiento (CPE) ya que sabemos que es una línea que se infecta con MADV y es comúnmente utilizada en experimentos *in vitro* de arbovirus. Las MOI utilizadas para este experimento fueron MOI de 1, MOI de 0.01, y MOI de 0.0001. Este experimento nos permitió visualizar si las MOI escogidas eran capaces de infectar las células o si tendríamos que hacer alguna modificación, subiendo o bajando la MOI. Iniciamos con MOI de 1 y no una más alta ya que en el experimento para producción de células obtuvimos CPE desde las 24 horas y cosecha a las 40 horas lo que nos indicó la replicación rápida del virus.

Para este experimento el día anterior se prepararon células VERO en un plato de 12 pocillos, por cada pocillo se pusieron  $0.25 \times 10^6$  células; al día siguiente teníamos  $0.5 \times 10^6$  (este conteo está estandarizado por el DIVB-ICGES).

Para una MOI de 1 se colocaron 500 000 PFU, para MOI de 0.01 se colocaron 5000 PFU y para la MOI de 0.0001 se colocaron 50 PFU. Los cálculos se realizaron tomando en cuenta

el título de MADV 1984 que fue de  $7.5 \times 10^7$  PFU/mL. Se infectaron las células con 200uL que contenían la cantidad de PFU indicadas anteriormente y se les dio una hora de incubación, moviendo los platos cada 15 minutos y terminada la hora se les añadió 800uL de MEM 2%SFB a cada pocillo y se observó el CPE a las 12, 24 y 48 horas.

Una vez determinadas las MOI a utilizar se realizó el mismo experimento de infección con las líneas celulares HFN, HFA y BS 153 infectando con los tres virus a comparar MADV 1962, MADV 1984 y MADV 2017, revisando el CPE cada 12 horas hasta llegar a las 72horas. Cada 12 horas se tomaban 3 alícuotas de sobrenadante y se guardaban a  $-80^{\circ}\text{C}$  para experimentos posteriores y se tomaban fotografías cada 24 horas para evidenciar CPE.

## **INMUNOFLUORESCENCIA**

Como técnica complementaria para visualización de infección se utilizo la técnica de Inmunofluorescencia (IF). Una técnica cualitativa en la que un anticuerpo específico marcado con fluorescencia se une a la molécula de interés, con esta técnica además se puede hacer la visualización de la ubicación del anticuerpo (Asai, 2015).

Para esta técnica se utilizaron cubreobjetos redondos de vidrio (Deckglasser Cover Glasses 18mm) en donde 24 horas antes se les colocaron las células y al día siguiente se infectaron con MOI de 0.1 para cada línea celular y con cada virus. La cantidad de células utilizadas en este experimento fue menor al de los experimentos de infectividad para tratar de visualizar mejor la morfología celular y la fluorescencia dentro de cada célula individual. Para la línea de fibroblastos se utilizaron  $0.20 \times 10^6$  células en platos de 6 pocillos y para BS 153 se utilizaron  $0.25 \times 10^6$ .

Los pocillos se infectaron con 500uL de virus a MOI de 0.1 incubando por 1 hora y moviendo los platos cada 15 minutos. Terminada la hora se les añadió 1.5mL de medio de mantenimiento a cada pocillo.

Al día siguiente, se retiró el medio de mantenimiento y cada pocillo se fijó por 30 minutos con paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences catálogo 15712) preparado al 4% en DPBS, se lavó dos veces con DPBS y se le agregó TWEEN 20 (Sigma Aldrich catálogo P1379) preparado en DPBS al 0.2% por 20 minutos, luego se le añadió BSA (Sigma Aldrich catálogo A3311) preparado en DPBS al 3% y se dejó incubando por 20 minutos más. Seguido de esto se retiró el BSA y se le añadió el anticuerpo primario de MADV (MAB8754 de Sigma Aldrich) que reconoce el epítipo E1 y que fue preparado en BSA al 1% en una concentración de 1:500, se dejó incubando por una hora. Seguido de este tiempo se retiró el anticuerpo primario y se lavó 3 veces con TWEEN 20 al 0.2% por 5 minutos en un agitador. Se le añadió el anticuerpo secundario FITC (ab6816 Abcam) en una dilución 1:200 preparado en BSA al 1%. Se dejó incubando con el anticuerpo secundario por 1 hora protegido de la luz y en agitación suave a temperatura ambiente. Terminado este tiempo se hicieron 3 lavados con DPBS cada uno por 10 minutos protegidos de la luz y en agitación suave, luego se tomó un portaobjeto y se añadió una gota de medio de montaje con DAPI (ProLong™ Gold Antifade Mountant de Invitrogen, catálogo P36931) y se colocó la placa sobre la gota, se dejó secar sobre la noche y al día siguiente se visualizó en el microscopio de fluorescencia del Departamento de Investigación de Parasitología del ICGES con personal capacitado para esta lectura (Dr. Ariel Magallón y Mgter. Mario Quijada) .

## CARGA VIRAL

Una de las alícuotas recogidas a los distintos tiempos de infección fueron extraídas por el equipo automatizado Kig Fisher Flex (Thermo Fisher Scientific) que utilizan el principio de perlas magnéticas para la extracción de ARN/ADN; se siguieron exactamente las instrucciones del fabricante. Una vez el ARN viral estuvo extraído se procedió a hacer la mezcla maestra para poder montar la reacción de RT-qPCR en tiempo real. Se utilizó SuperScript™ III Platinum™ One-Step RT-qPCR (Invitrogen, catálogo 11732088) en un volumen final de 25uL. La reacción para cada plato de 96 pocillos se preparó con los siguientes componentes:

	<b>1x</b>	<b>100x</b>
<b>2X Mix</b>	12.5	1250
<b>Fw (10uM)</b>	1.25	125
<b>Rv (10uM)</b>	1.25	125
<b>Sonda (25uM)</b>	0.2	20
<b>Enzima</b>	1	100
<b>H2O</b>	3.8	380

Tabla 11 : Mezcla de reactivos de RT-qPCR en Tiempo Real para detección y cuantificación de MADV

A cada pocillo se le agregó 20uL de mezcla maestra y 5uL del extraído de ARN de las muestras a probar. En cada corrida se montó las diluciones del plásmido desde la concentración  $10^9$  hasta  $10^3$  (límite de detección del plásmido construido) para la cuantificación de MADV. Cada muestra fue corrida en triplicado y el plásmido en duplicado. Los equipos utilizados fueron los termocicladores Applied Biosystems 7500Fast y el QuantStudio5 (Applied Biosystems™).

## ELISA

Para la detección de IFN, se utilizaron dos kits comerciales: el Human IFN $\alpha$  ELISA Kit (Invitrogen, catálogo BMS216) para el IFN $\alpha$  y el kit de VeriKine Human IFN Beta para IFN $\beta$  (catálogo 41410 de PBL Assay Science,).

Ambas metodologías utilizadas eran tipo sándwich, lo que quiere decir que en ambos casos los platos venían recubiertos con un anticuerpo anti-IFN, donde al adicionar las muestras o estándares, el IFN presente en ellos se unieron al anticuerpo. Luego, se le añadió un conjugado de HRP. Al anticuerpo anti- IFN humano. El conjugado HRP que no se unió fue removido por medio de lavados y posteriormente se le agregó un sustrato TMB (tetrametilbenzidina) que reacciona con el HRP produciendo una coloración de acuerdo a la cantidad de IFN presente en las muestras o el estándar. La reacción se paró añadiéndole una solución “stop” y la coloración fue medida en el espectrofotómetro (800TS Microplate Reader de Biotek) a una absorbancia de 450 nm, los resultados de las absorbancias fueron graficados y se obtuvieron los resultados de las muestras. Para ambas metodologías se utilizaron las instrucciones del fabricante (Figura 17).

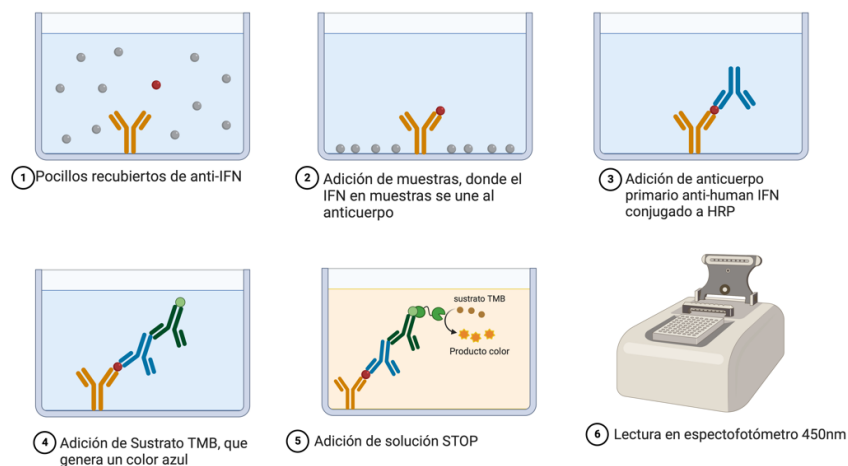


Figura 17 : Representación de ELISA tipo sanwich. Creado MCH con BioRender.com

## **CAPITULO III RESULTADOS**



Los sets de cebadores generados con primer 3 se alinearon con la secuencia consenso inicial de MADV y como el alineamiento era completo (100%), los mismos sets fueron mandados a sintetizar.

## ESTANDARIZACIÓN DE PCR

### Selección de concentraciones de cebadores

Se eligió la concentración de 500nM para los cebadores tanto delantero como reverso, ya que fue la concentración donde se obtuvo una buena señal de fluorescencia y a su vez la concentración donde se pudo optimizar el uso de reactivos (Tabla 13).

	Concentración cebador Delantero	Concentración cebador Reverso	Valor CT
1	Fw MADV 250nM	Rv MADV 250nM	16.43
2	Fw MADV 250nM	Rv MADV 500nM	16.08
3	Fw MADV 250nM	Rv MADV 1000nM	16.67
4	Fw MADV 500nM	Rv MADV 250nM	16.29
5	Fw MADV 500nM	Rv MADV 500nM	15.93
6	Fw MADV 500nM	Rv MADV 1000nM	15.87
7	Fw MADV 1000nM	Rv MADV 250nM	15.91
8	Fw MADV 1000nM	Rv MADV 500nM	15.89
9	Fw MADV 1000nM	Rv MADV 1000nM	15.65

Tabla 13 Concentraciones probadas de cebadores

Se verificó la curva de Melting, donde pudimos observar que la PCR funcionaba bien, sin la formación de dímeros o estructuras secundarias (Figura 19).

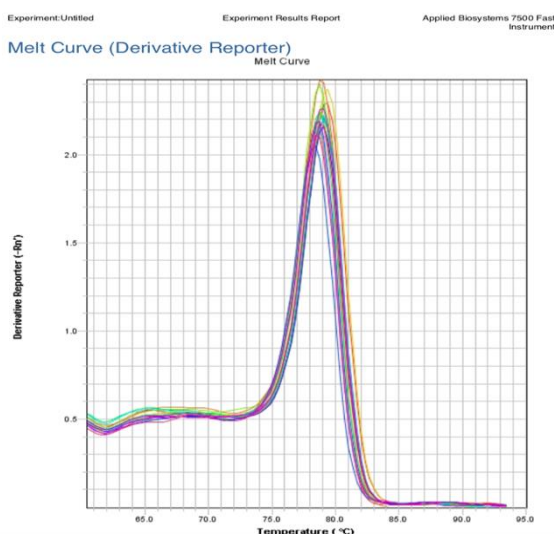


Figura 19 : Curva de Melting mostrando un solo pico de amplificación para las concentraciones probadas

También se hizo un gel de agarosa al 2%, mostrando el tamaño aproximado calculado de 112pb, aparentando un tamaño más pequeño para el aislado de MADV 2017. Los aislados utilizados fueron MADV de 1962, MADV 1984 y MADV 2017 (Figura 21).

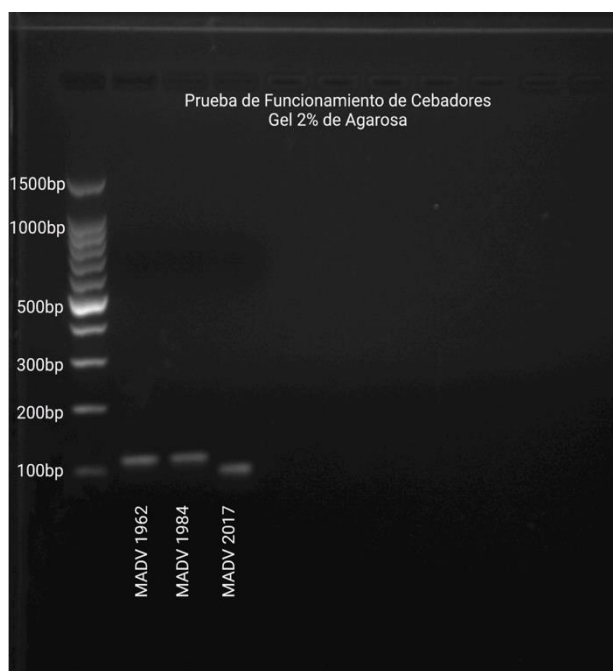


Figura 20 Gel de Agarosa 2% corrido a 90V por 1hora con los 3 aislados de MADV, escalera de 100pb de Promega.

### Selección de concentraciones de sondas

Se eligió la concentración de 200nM de sonda por reacción, ya que tuvo buena amplificación y no requiere de tanto gasto de reactivo (Tabla 14).

	Concentración Probada	Valor Ct
1	100nM	16.50
2	150nM	15.20
3	200nM	13.80
4	300nM	12.91
5	400nM	10.76

Tabla 14 Concentraciones probadas de sondas

## Prueba de especificidad

Una vez encontrado la mejor concentración tanto de sondas como de cebadores para que la RT-qPCR sea funcional, se realizó un ensayo probando la especificidad de los oligonucleótidos donde se probó un aislado del virus Madariaga (MADV), Chikungunya (CHIKV), Mayaro (MAYV), todos alfavirus, el mismo género de MADV (Figura 21 y 22).

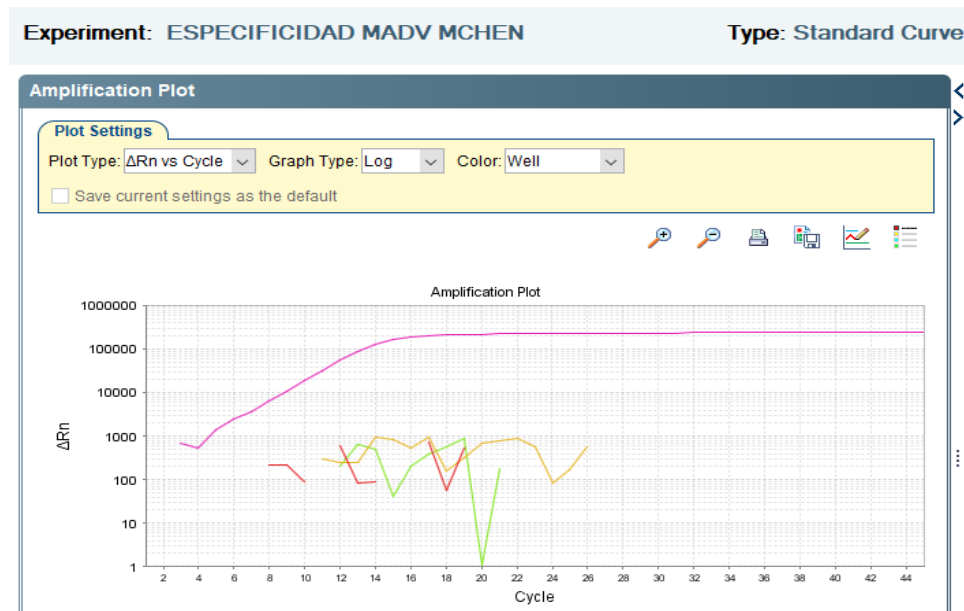


Figura 21 Resultados de Prueba de especificidad, observamos la amplificación de una sola curva, correspondiente a MADV en prueba de especificidad

## Results Table

Well	Sample	Target	Task	Quantity	C
A1	CHIK	MADV	UNKNOWN		Undetermined
B1	MAY	MADV	UNKNOWN		Undetermined
C1	NTC	MADV	UNKNOWN		Undetermined
H1	CPOS	MADV	UNKNOWN		8.8654

Figura 22 Resultados en valor CT en prueba de especificidad

Para la prueba de especificidad solo hubo amplificación para el virus MADV. No hubo amplificación para los otros virus del mismo género.

Luego de estas pruebas, comprobamos que logramos diseñar una RT-qPCR en tiempo real funcional para la detección de MADV en la región 3'UTR (Figura 23).

### Zona 3 UTR

**Tamaño: 112pb**

**Genome: Madariaga virus strain MADV/Equus feruscaballus/PAN/GML900188/1962**

```
11041 atgcaggttt gcaccagtgt agttacctgc aaaggggatt gcaaacacc caaggaccac
11101 atcgtcgatt acccagccca acatacagaa acatttatgt ctgctggtatc ggccacggcg
11161 tggtcgtggc tgaaagtgt agtaggtggc acttcggcat ttatagtact agggctgatc
11221 gccactgagg tggtcgcact ggtactatct acccacaac actaaagtag atgctaccaa
11281 cattatttta ttatcgttgt tcgatgtact tccgagcagc ggtaaagggt gtgcataatg
11341 ccacctgagc agtgcataat gctgcgaata tttagcctat tggcctatat aatcacacta
11401 caggtagctt actaccatta ttaacattac tggcagtgca taatactgcc tttataaac
11461 actactggca gtgcataatg ctgcctttta taacactatt ggcagtgcac aatactgcct
11521 tttataaaat cttttaaata catatacagt ttttctttta tgttttattt tgtttttaat
11581 atttcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa
```

Figura 23 Ubicación de cebadores, en amarillo los cebadores delantero y reverso, en celeste ubicación de la sonda.

## CONSTRUCCION DE PLASMIDO

### PCR

Visualización de gel de agarosa al 2% del fragmento amplificado de MADV 1984 para la construcción del plásmido (Figura 24).



Figura 24 Gel de Agarosa 2% corrido a 100V por 45 minutos, escalera de 100pb de Promega.

Se midió una concentración de 41.8ng/uL en el Nanodrop luego de la purificación de la PCR de MADV 1984 y la relación 260/280 fue de 2.16 indicando pureza del ADN (Figura 25).

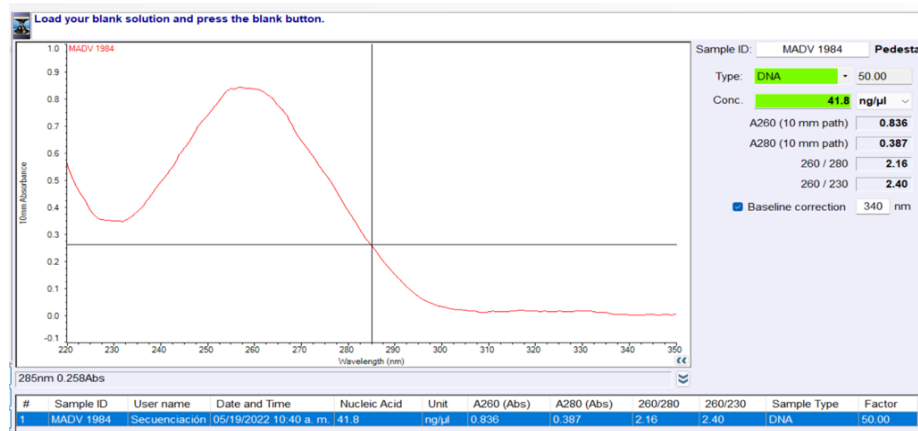


Figura 25 Medición de concentración de ADN de MADV 1984 ADN para clonar, en Nanodrop

## LIGACION – TRANSFORMACIÓN

A las 24 horas, obtuvimos el plato de control positivo con colonias blancas y nuestro plato con el inserto donde tuvimos tanto colonias blancas como azules (Figura 26). Las colonias azules corresponden a bacterias con el plásmido vector, mientras que las blancas contienen el plásmido con el inserto.

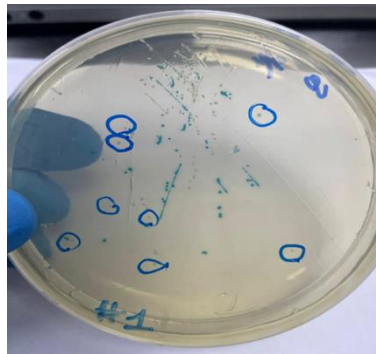


Figura 26 Plato de colonias azules y blancas producto de la transformación. Las colonias blancas (encerradas en piloto azul) representan las posibles colonias con el inserto de interés

## DIGESTIÓN ENZIMÁTICA

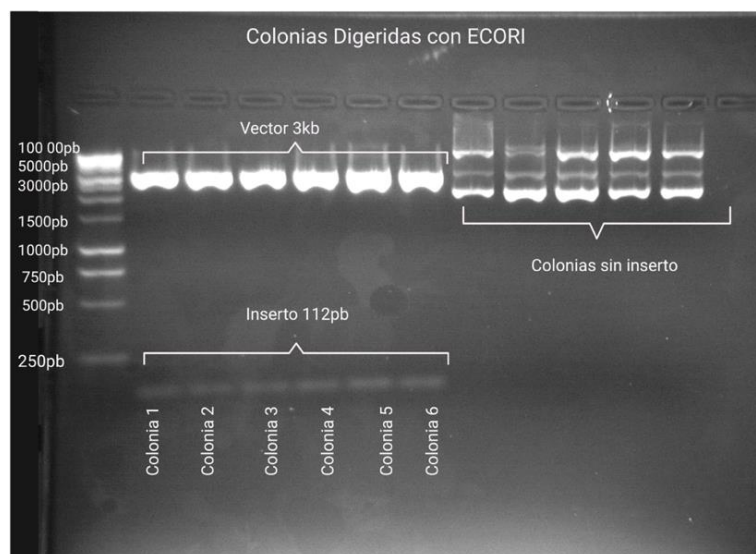


Figura 27 Gel de Agarosa 2% para verificación de inserto en las colonias blandas.

Visualización de gel de agarosa de las minipreps digeridas con la enzima ECOR I (Figura 27).

Una vez verificadas las colonias, se midió su concentración de ng/uL de ADN en el nanodrop y se prosiguió a montar la reacción de secuenciación (Tabla15).

	<b>Concentración medida en Nanodrop (ng/uL)</b>
<b>Colonia 1</b>	396 ng/ uL
<b>Colonia 2</b>	429.6 ng/uL
<b>Colonia 3</b>	475.6 ng/uL
<b>Colonia 4</b>	416.0 ng/uL
<b>Colonia 5</b>	431.7 ng/uL
<b>Colonia 6</b>	391.3 ng/uL

Tabla 15 Concencetraciones de ADN de Miniprerps para secuenciación

## SECUENCIACIÓN

Obtenidos los resultados de secuenciación, cada secuencia se limpió y se unió a su secuencia producida con el cebador delantero con la secuencia producida con el cebador reverso. Todas las secuencias entregadas se unieron exitosamente (Figura 28).

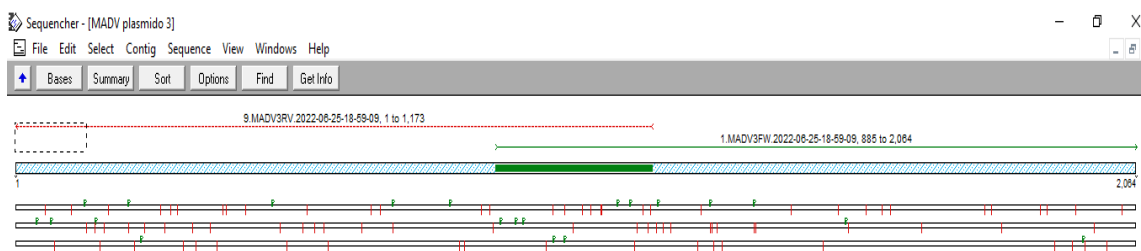


Figura 28 Analisis de secuencias en Sequencher; unión de las 2 secuencias producidas (Delantero y Reverso) con amplificación en verde del inserto del plásmido

La unión o “conting” de las secuencias fueron analizadas en el programa BLAST para verificar su especificidad. El producto insertado en el vector tiene un porcentaje de identidad del 99.16% con diferentes aislados de MADV, lo que indica que es el inserto de interés que correspondía a MADV (anteriormente conocido como Encefalitis Equina del Este) (Figura 29).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Eastern equine encephalitis virus strain CO92-C49 nsP4 protein and E2 protein genes, partial cds	Eastern equine e...	213	213	46%	1e-50	99.16%	785	AH011116.2
Eastern equine encephalitis virus strain VF96-250714 nsP4 protein and E2 protein genes, partial cds	Eastern equine e...	213	213	46%	1e-50	99.16%	786	AH011115.2
Madariaga virus strain MADV/Equus ferus caballus/PAN/MARV207963/1958, complete genome	Madariaga virus	213	213	46%	1e-50	99.16%	11607	KJ469581.1
Madariaga virus strain MADV/Equus ferus caballus/GUY/SP43710-13/1962, complete genome	Madariaga virus	213	213	46%	1e-50	99.16%	11609	KJ469578.1
Madariaga virus strain MADV/Equus ferus caballus/PAN/GML900188/1962, complete genome	Madariaga virus	213	213	46%	1e-50	99.16%	11607	KJ469565.1
Eastern equine encephalomyelitis virus GML207963 structural polyprotein gene, 3' UTR	Eastern equine e...	213	213	46%	1e-50	99.16%	278	U01566.1
Eastern equine encephalomyelitis virus Tr25714 structural polyprotein gene, 3' UTR	Eastern equine e...	209	209	47%	1e-49	97.56%	273	U01563.1
Madariaga virus strain MADV/Homo sapiens/VEN/148/2016, complete genome	Madariaga virus	207	207	46%	5e-49	98.32%	11561	MG570148.1
Eastern equine encephalitis virus strain BR77-77U1 nsP4 protein and E2 protein genes, partial cds	Eastern equine e...	207	207	46%	5e-49	98.32%	785	AH011111.2
Eastern equine encephalitis virus strain PE75-75U40 nsP4 protein and E2 protein genes, partial cds	Eastern equine e...	207	207	46%	5e-49	98.32%	785	AH011109.2
Eastern equine encephalitis virus strain BR60-18205 nsP4 protein and E2 protein genes, partial cds	Eastern equine e...	207	207	46%	5e-49	98.32%	771	AH011105.2
Madariaga virus isolate MADV/crossbred horse/BR/PR/01/2009, complete genome	Madariaga virus	207	207	46%	5e-49	98.32%	11534	KR132531.1
Madariaga virus strain MADV/Equus caballus/BRA/164/2019, complete genome	Madariaga virus	207	207	46%	5e-49	98.32%	11605	MZ389693.1

Figura 29 Análisis de secuencia de plásmido en BLAST

A pesar de que las 6 colonias seleccionadas y secuenciadas correspondían a MADV, solo una colonia tenía la secuencia del inserto en el sentido positivo (Plus, sentido del ARNm codificante 5'-3'). Por lo cual solo se utilizó esta colonia para amplificar el plásmido para experimentos posteriores (Figura 30).

Download GenBank Graphics Next Previous Descriptions

Eastern equine encephalitis virus strain CO92-C49 nsP4 protein and E2 protein genes, partial cds  
Sequence ID: AH011116.2 Length: 785 Number of Matches: 1

Range 1: 537 to 654 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
213 bits(115)	1e-50	118/119(99%)	1/119(0%)	Plus/Plus

```

Query 55  TTCGATTGTACTTCCGAGCAGCGGTAAAGGTGGTGCATAATGCCACCTGCGCAGTGCATA 114
Sbjct 537  TTCGA-TGTACTTCCGAGCAGCGGTAAAGGTGGTGCATAATGCCACCTGCGCAGTGCATA 595

Query 115  ATGCTGCGAATATTTAGCCTATTGGCCTATATAATCACACTACAGGTAGCTTACTACCA 173
Sbjct 596  ATGCTGCGAATATTTAGCCTATTGGCCTATATAATCACACTACAGGTAGCTTACTACCA 654
  
```

Figura 30 : Verificación de sentido del plásmido DIVB-MADV1984

## SENSIBILIDAD DEL PLÁSMIDO

Con los resultados pudimos determinar que nuestro plásmido es capaz de detectar hasta 100copias/mL (Figura 31, Tabla 16).

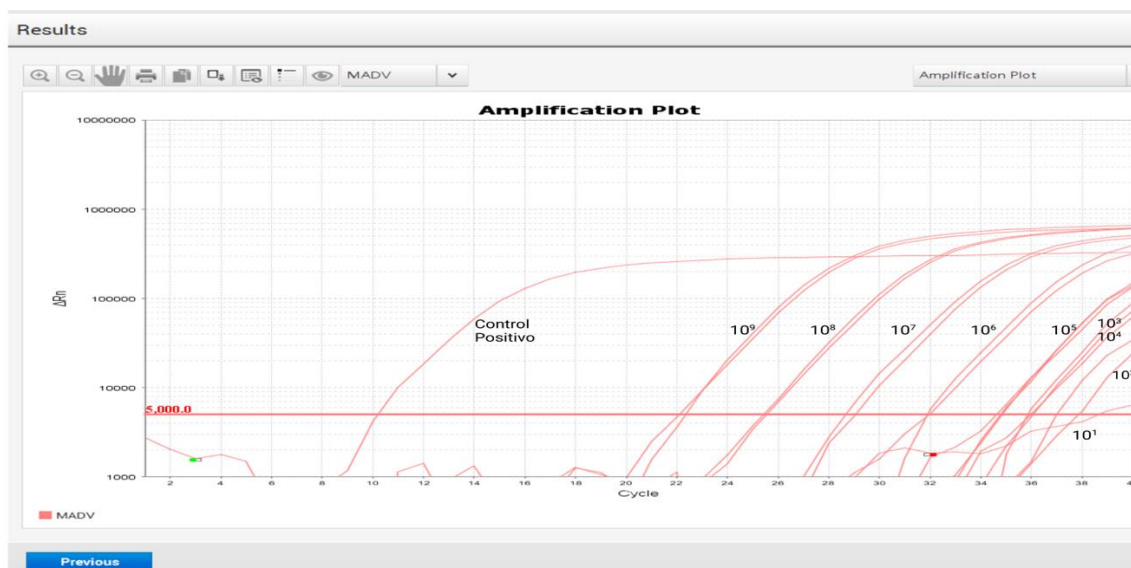


Figura 31 : Diluciones de plásmido para ver alcance de detección

	Valor Ct 1	Valor Ct 2	Cantidad de copias/mL
<b>1</b>	22.41	22.27	1.0E+09
<b>2</b>	25.68	25.59	1.0E+08
<b>3</b>	28.69	29.17	1.0E+07
<b>4</b>	31.93	32.13	1.0E+06
<b>5</b>	34.95	34.92	1.0E+05
<b>6</b>	35.95	34.67	1.0E+04
<b>7</b>	36.22	36.92	1.0E+03
<b>8</b>	37.85	36.17	1.0E+02
<b>9</b>	38.80	Undetermined	1.0E+01
<b>C. Negativo</b>	Undetermined		
<b>C.Positivo</b>	10.27		8.E+15

Tabla 16 Valores ct de diluciones de plásmido para ver alcance de detección

## RESULTADOS PRODCUCCIÓN DE CEPAS

Se observó al microscopio la morfología de las células infectadas a las 24 y 40 horas después de la infección. Se cosecho a las 40 horas post infección, cuando todavía había unas células pegadas, pero en su mayoría estaban flotando, lo que calificamos como 3+ de CPE (75% o más de las células infectadas que presentan algún efecto citopático. El cambio de morfología de las células infectadas es similar entre los tres aislados de MADV (Figura 32).

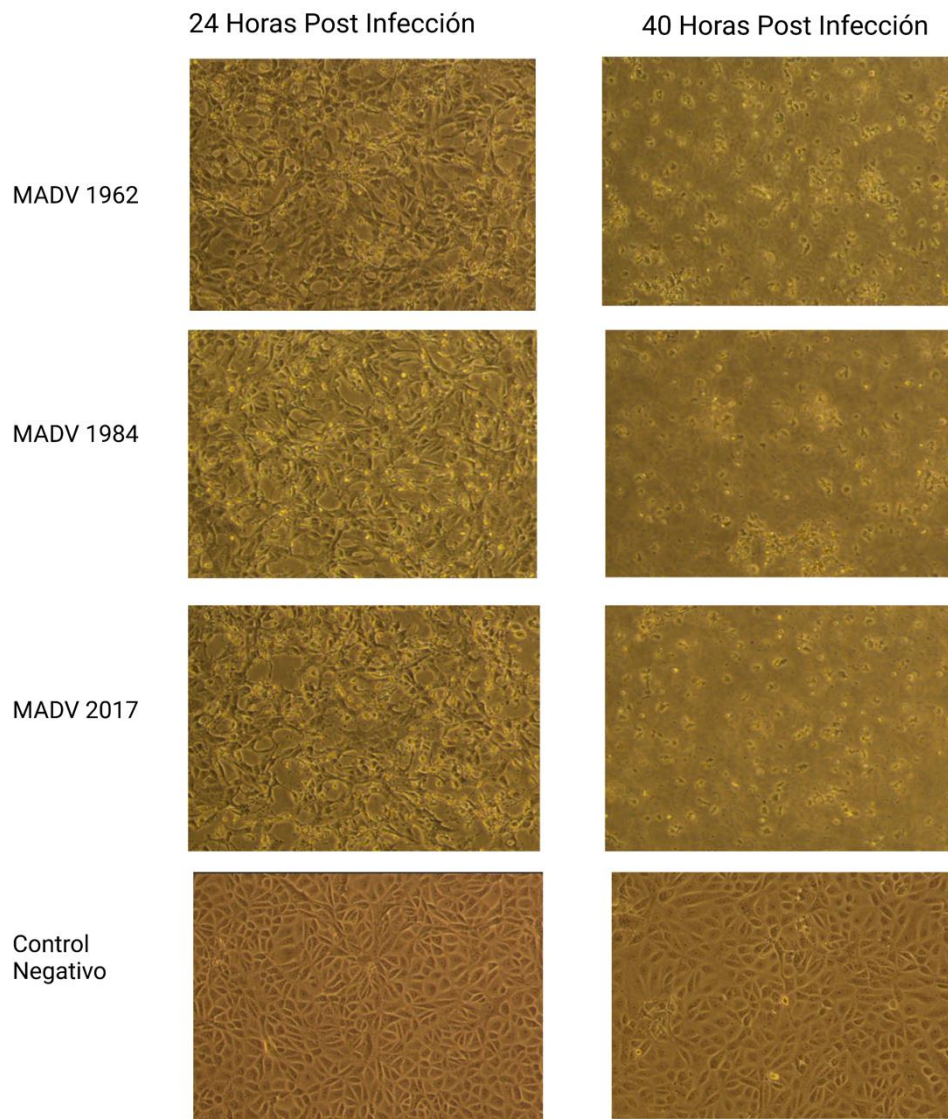


Figura 32 Fotografías de CPE en células VERO infectadas con las 3 cepas de MADV a 24 y 48horas.

## TITULACIÓN DE CEPAS PARA EXPERIMENTOS DE INFECTIVIDAD

Las placas de los virus probados fueron contadas y se calculó el título de cada virus. El título obtenido para la producción viral de los 3 aislados de MADV fue similar entre todas y fue un título suficiente para poder realizar los experimentos.

	<b>Título</b>
<b>MADV 1962</b>	$5 \times 10^7$
<b>MADV 1984</b>	$7.5 \times 10^7$
<b>MADV 2017</b>	$3.25 \times 10^7$

Tabla 17 Títulos virales de las 3 cepas de MADV

Visualización de CPE de células VERO en el cual se comprueba que las MOI elegidas (1, 0.01 y 0.0001) son capaces de infectar las células y no es necesario modificar las MOI elegidas (Figura 33).

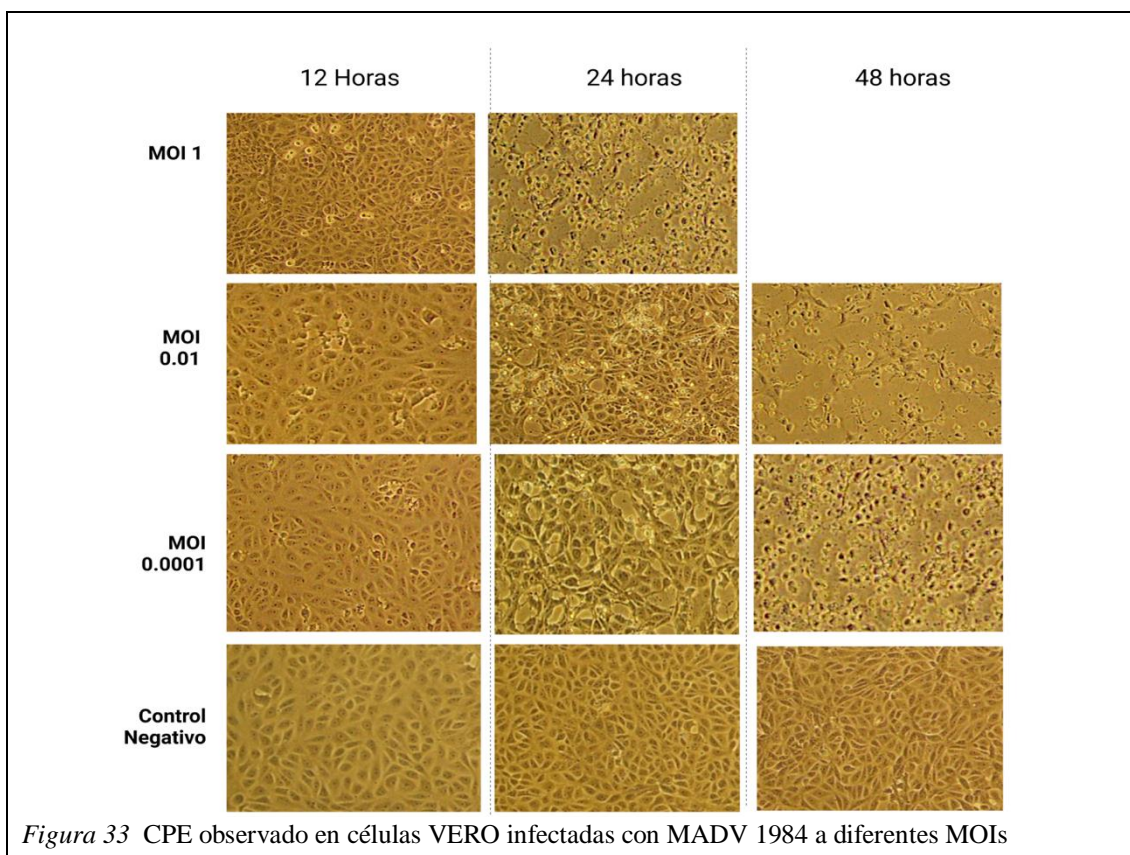


Figura 33 CPE observado en células VERO infectadas con MADV 1984 a diferentes MOIs

## INFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Fotografías de CPE de la línea HFN infectadas con MOI de 1. Los tiempos observados 24, 48 y 72 horas (Figura 34).

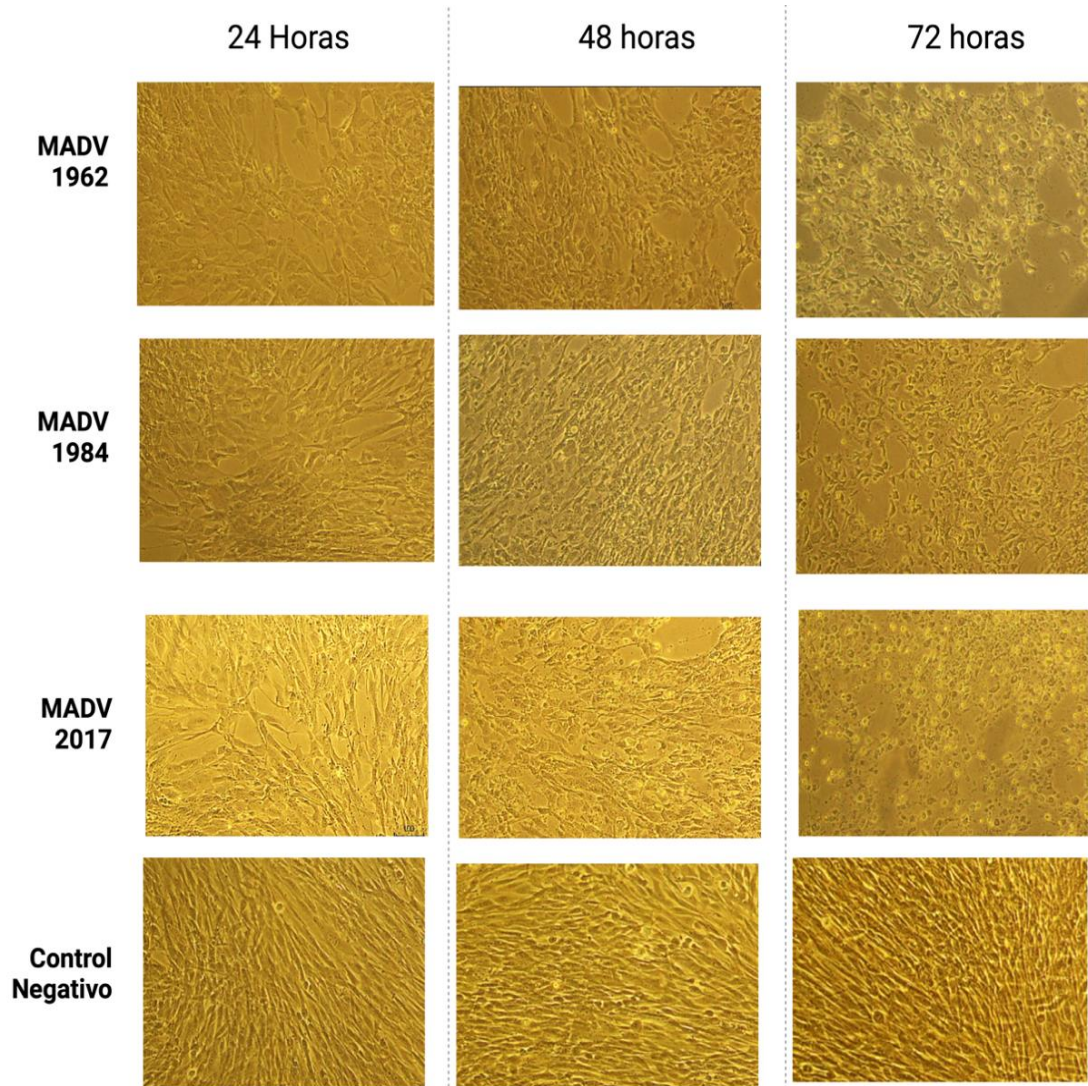


Figura 34 HFN infectados con MADV, MOI 1

Se observa efecto citopático, lo que nos indica que MADV es capaz de infectar esta línea celular, sin embargo, no se observan diferencias marcadas entre las distintas cepas de MADV.

Fotografías de CPE de la línea HFN infectadas con MOI de 0.01, los tiempos observados 24, 48 y 72 horas

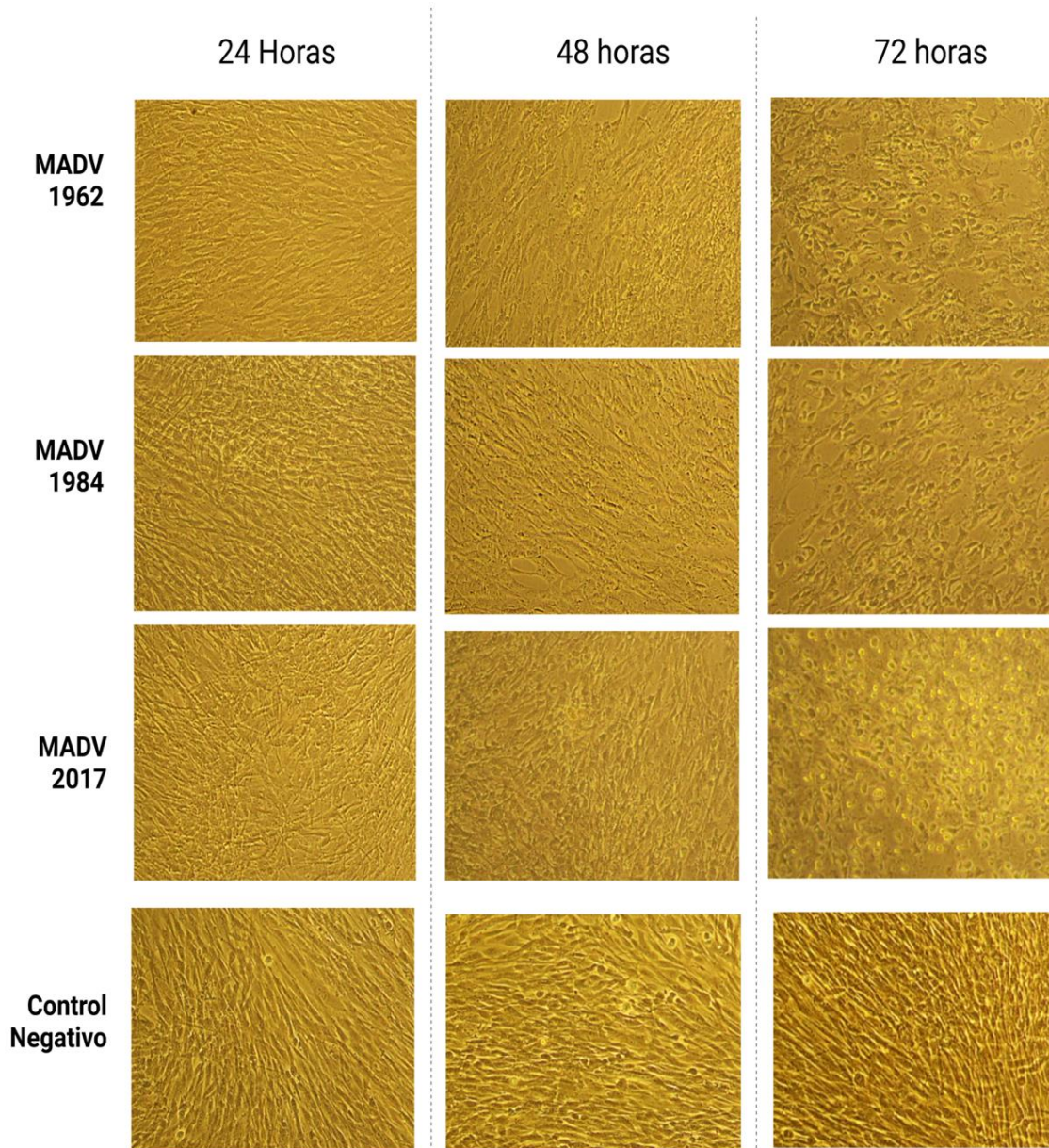


Figura 35 HFN infectados con MADV, MOI 0.01

Debido a que es una MOI más baja, la infección con 0.01 de MOI se logra; y pareciera tardar más en lograr un CPE, empezando a notarse algunas diferencias a las 48h

Fotografías de CPE de la línea HFN infectadas con MOI de 0.0001, los tiempos observados 24, 48 y 72 horas

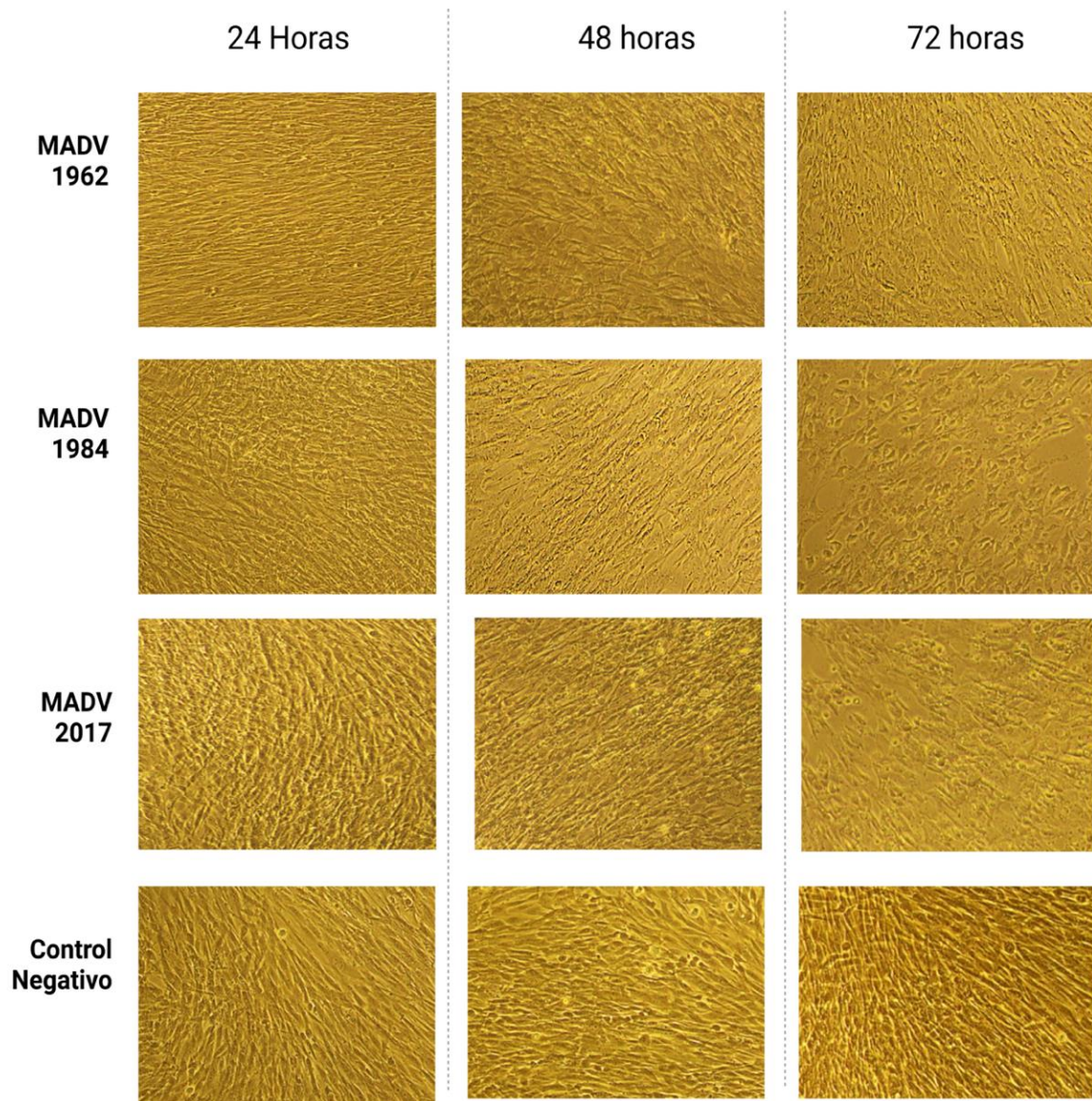


Figura 36 HFN infectados con MADV, MOI 0.0001

Con una MOI de 0.0001, la más baja utilizada en los experimentos del proyecto, también se logró visualizar infección, aunque mucho más tarde.

Fotografías de CPE de la línea HFA infectadas con MOI de 1. Los tiempos observados 24, 48 y 72 horas (Figura 37).

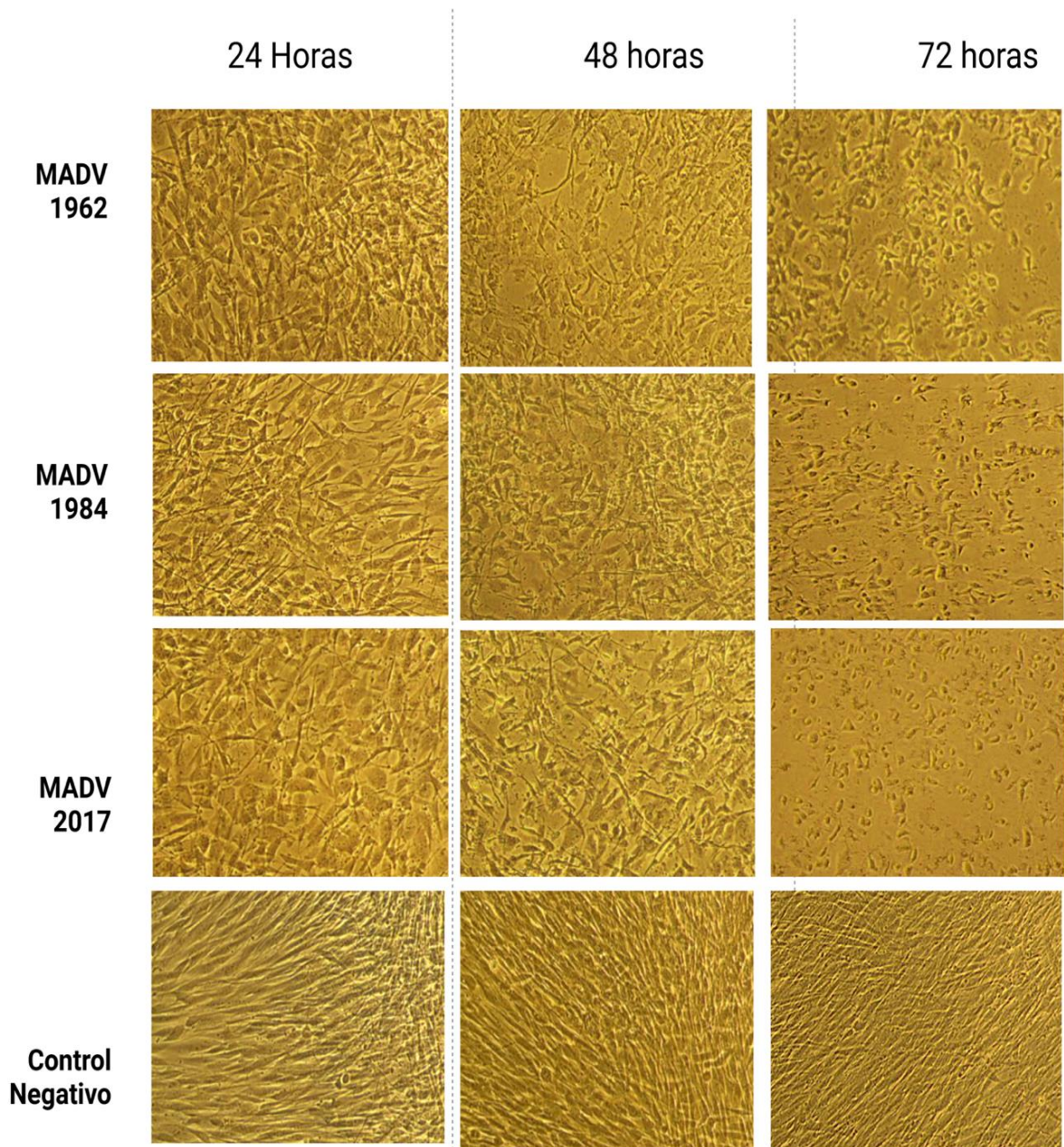


Figura 37 HFA infectados con MADV, MOI 1

Se observa efecto citopático, lo que nos indica que MADV es capaz de infectar esta línea celular, pareciera que el CPE de la cepa de 1962 fuese menos fuerte que las observadas con los años 1984 y 2017.

Fotografías de CPE de la línea HFA infectadas con MOI de 0.01 Los tiempos observados 24, 48 y 72horas (Figura 38).

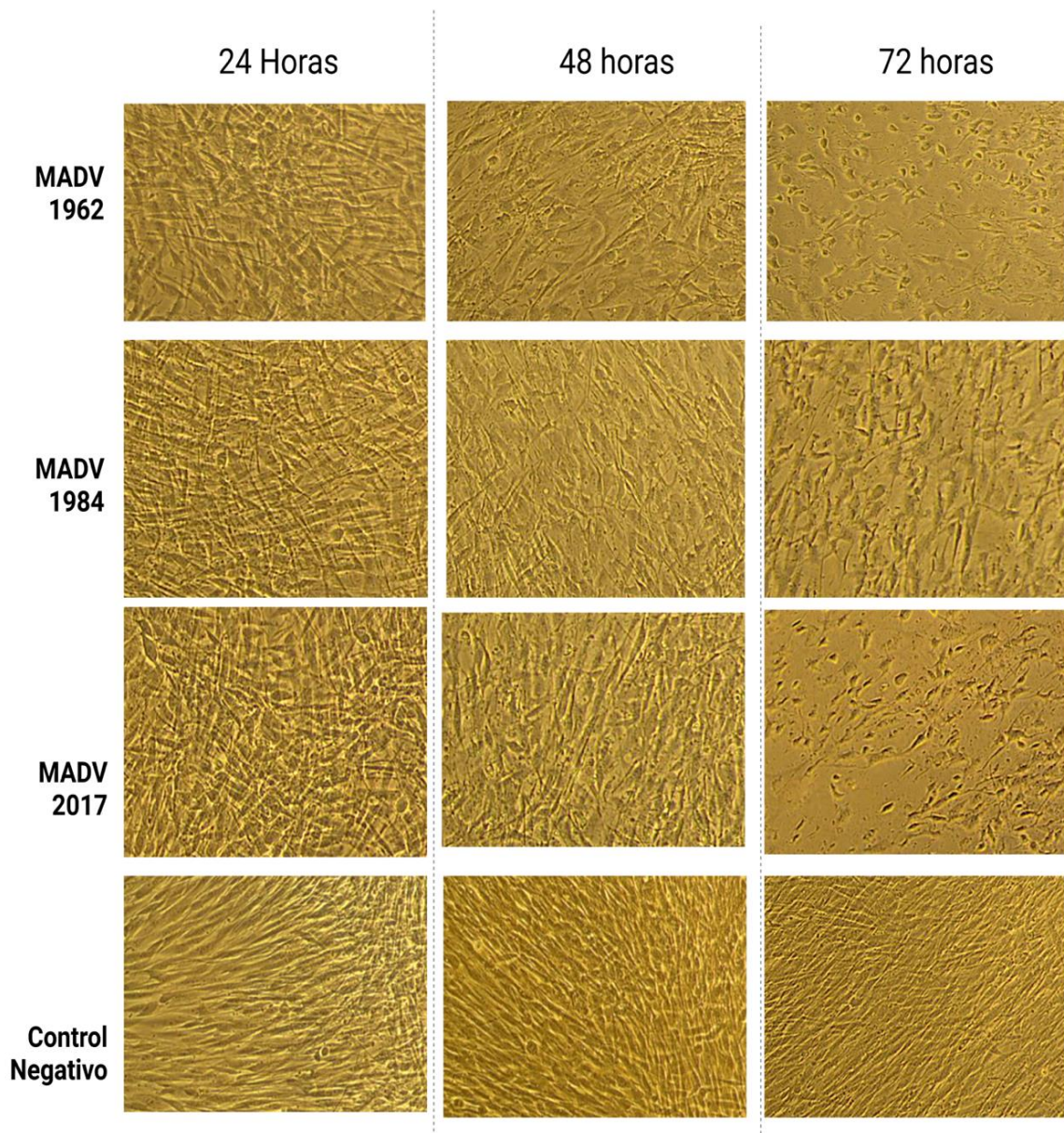


Figura 38 HFA infectados con MADV, MOI de 0.01

La infección con 0.01 de MOI se logra; sin embargo, pareciera tardar más en lograr un CPE, empezando a notarse algunas diferencias a las 48h

Fotografías de CPE de la línea HFA infectadas con MOI de 0.0001. Los tiempos observados 24, 48 y 72horas (Figura 39).

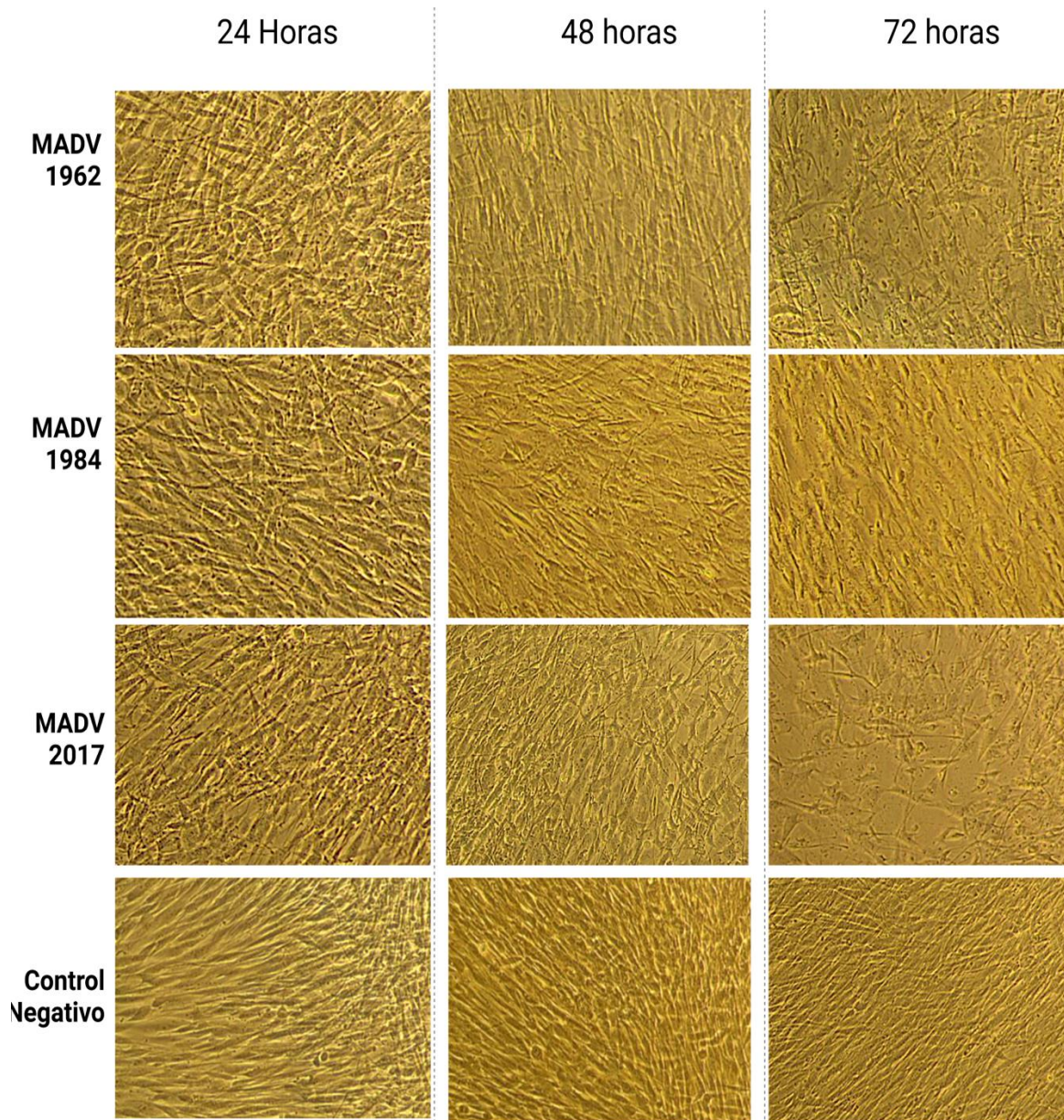


Figura 39 HFA infectados con MADV, MOI de 0.0001

Con MOI de 0.0001 la más baja utilizada en el experimento, también se logró visualizar infección, aunque mucho más tarde, empezando a aparentar CPE a las 72H

Fotografías de CPE de la línea BS153 infectadas con MOI de 1. Los tiempos observados 24, 48 y 72horas (Figura 40).

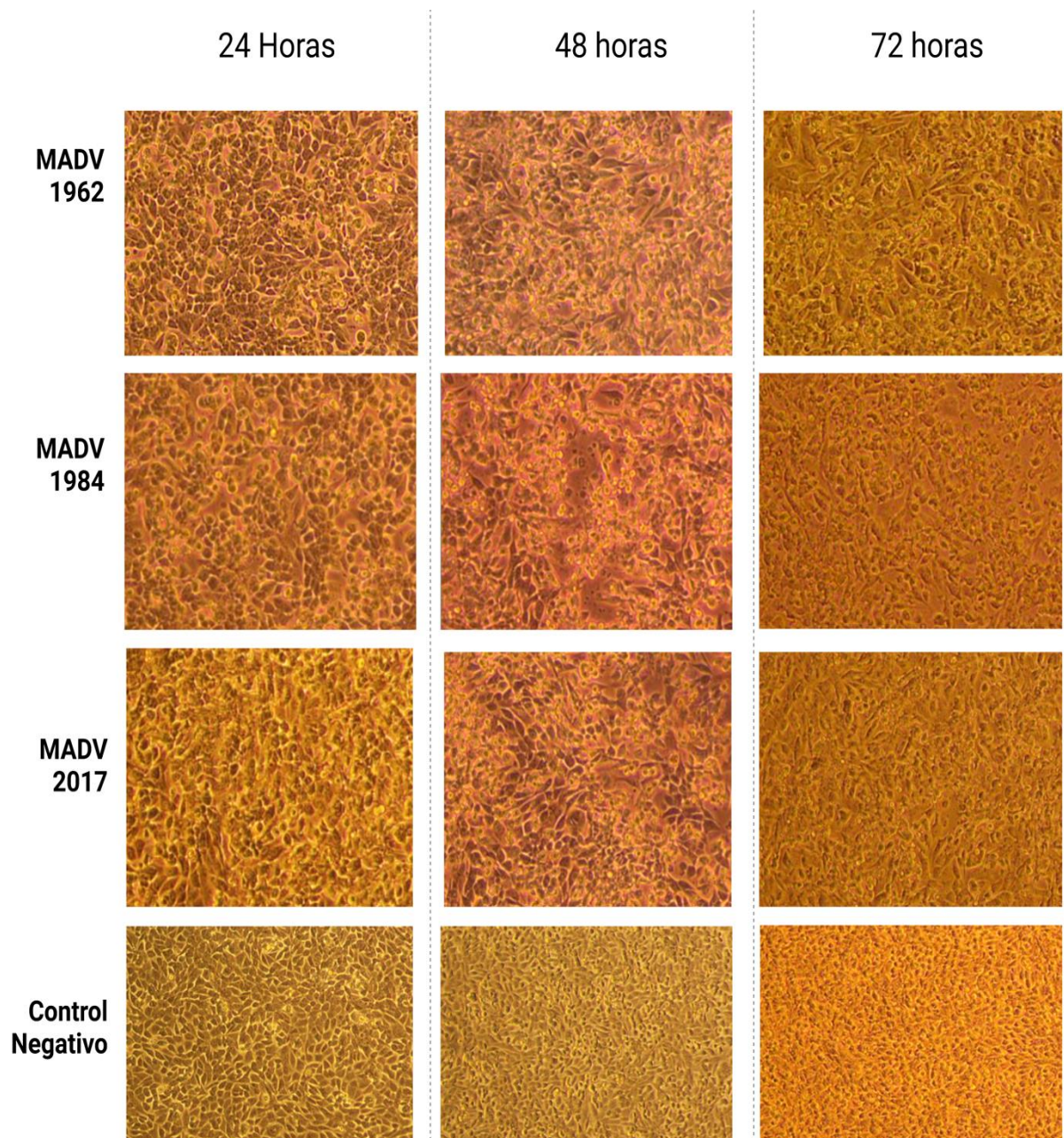


Figura 40 BS153 infectados con MADV, MOI de 1

El CPE de la línea de las BS 153 fue muy difícil de evidenciar, en la infección con MOI de 1 pareciera empezar a presentar efecto entre las 48 y 72horas.

Fotografías de CPE de la línea BS153 infectadas con MOI de 0.01, los tiempos observados 24, 48 y 72horas (Figura 41).

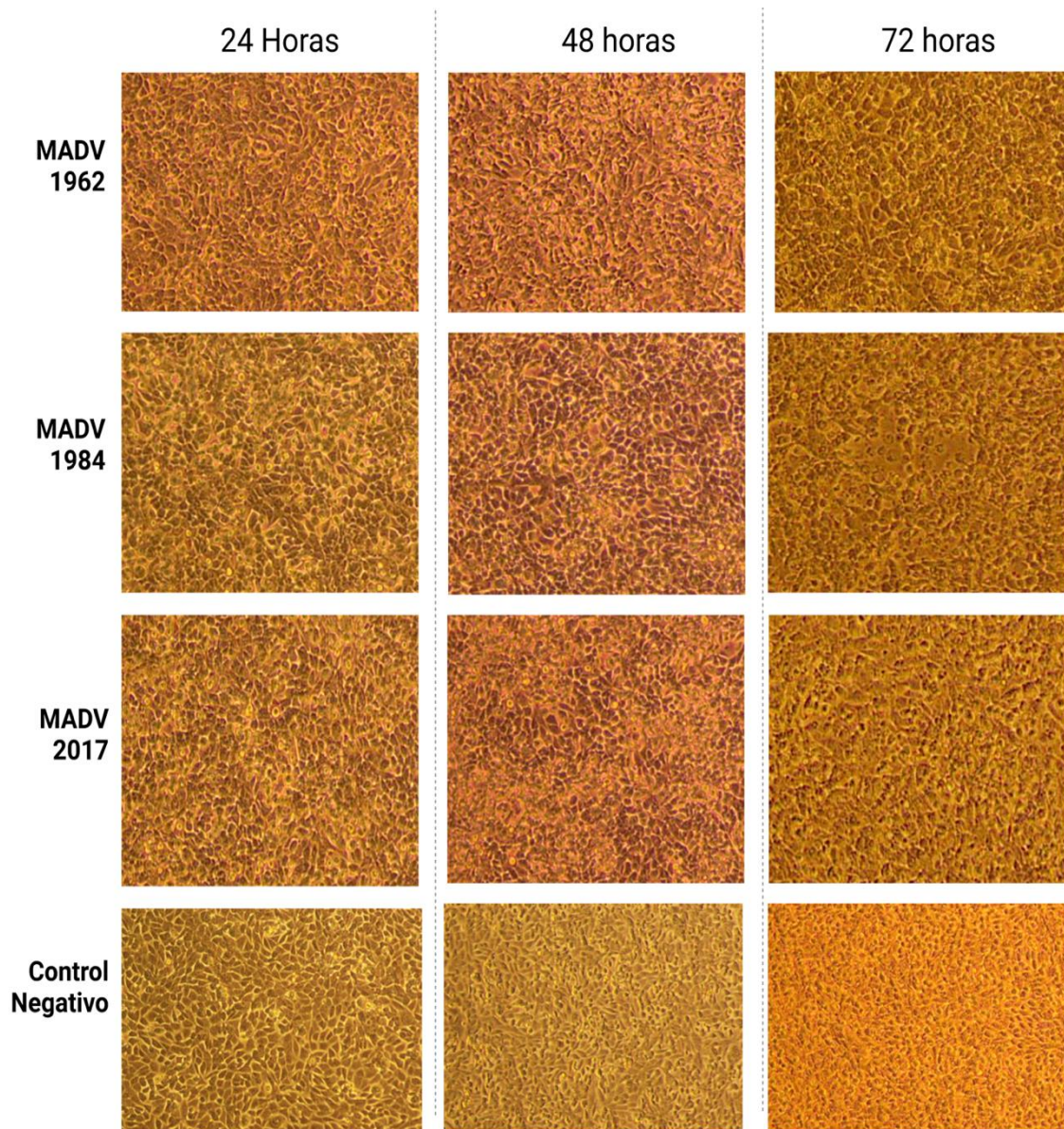


Figura 41 BS153 infectados con MADV, MOI de 0.01

A las 72h con la MOI de 0.01 pareciera que iniciara el CPE, esto nos indica que MADV es capaz de infectar las BS153, sin embargo le cuesta más, y aquí nuevamente pareciera que la cepa de 1984 infectase un poco mejor en comparación con 1962 y 2017.

Fotografías de CPE de la línea BS153 infectadas con MOI de 0.0001. Los tiempos observados 24, 48 y 72horas (Figura 42).

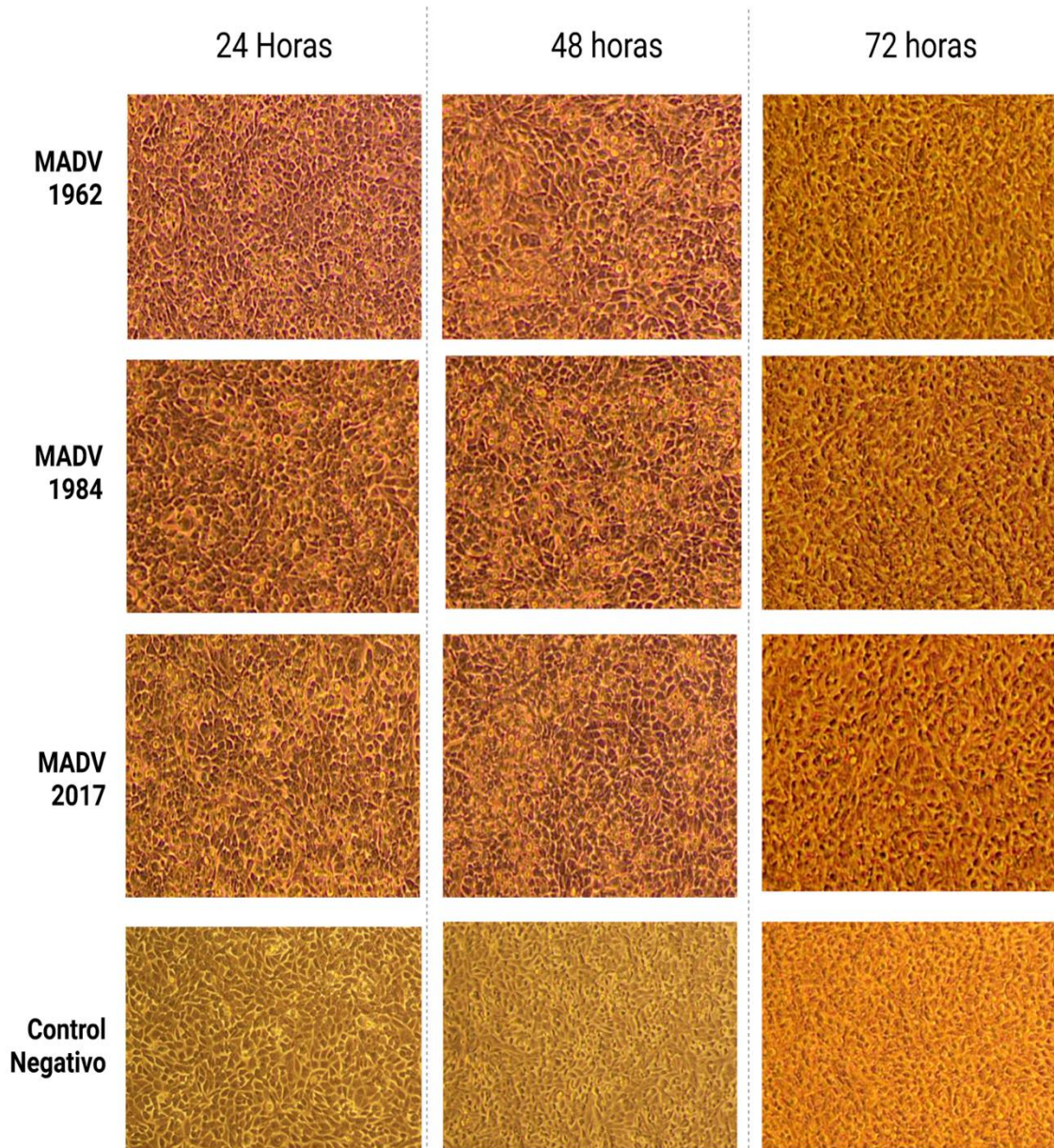


Figura 42 BS153 infectados con MADV, MOI de 0.0001

A las 72h con la MOI de 0.0001 pareciera que no hubiera efecto citopático, esto podría deberse a que es la MOI más baja del experimento y tal vez no sea suficiente para presentar CPE en el rango de horas que mantuvimos el experimento

## INMUNOFLUORESCENCIA

Teniendo en cuenta que esta es una técnica cualitativa, pudimos observar que MADV logra infectar las 3 líneas celulares probadas infectadas con la MOI de 0.1 en 24 horas (Figura 43) Las células teñidas en verde son las células infectadas con MADV reconocidas por los anticuerpos anti-MADV conjugado a FITC, mientras que los puntos azules son los núcleos celulares, y si estos no están acompañados por el verde indica que son células que no se tiñeron por los anticuerpos porque no se lograron infectar en el tiempo del experimento.

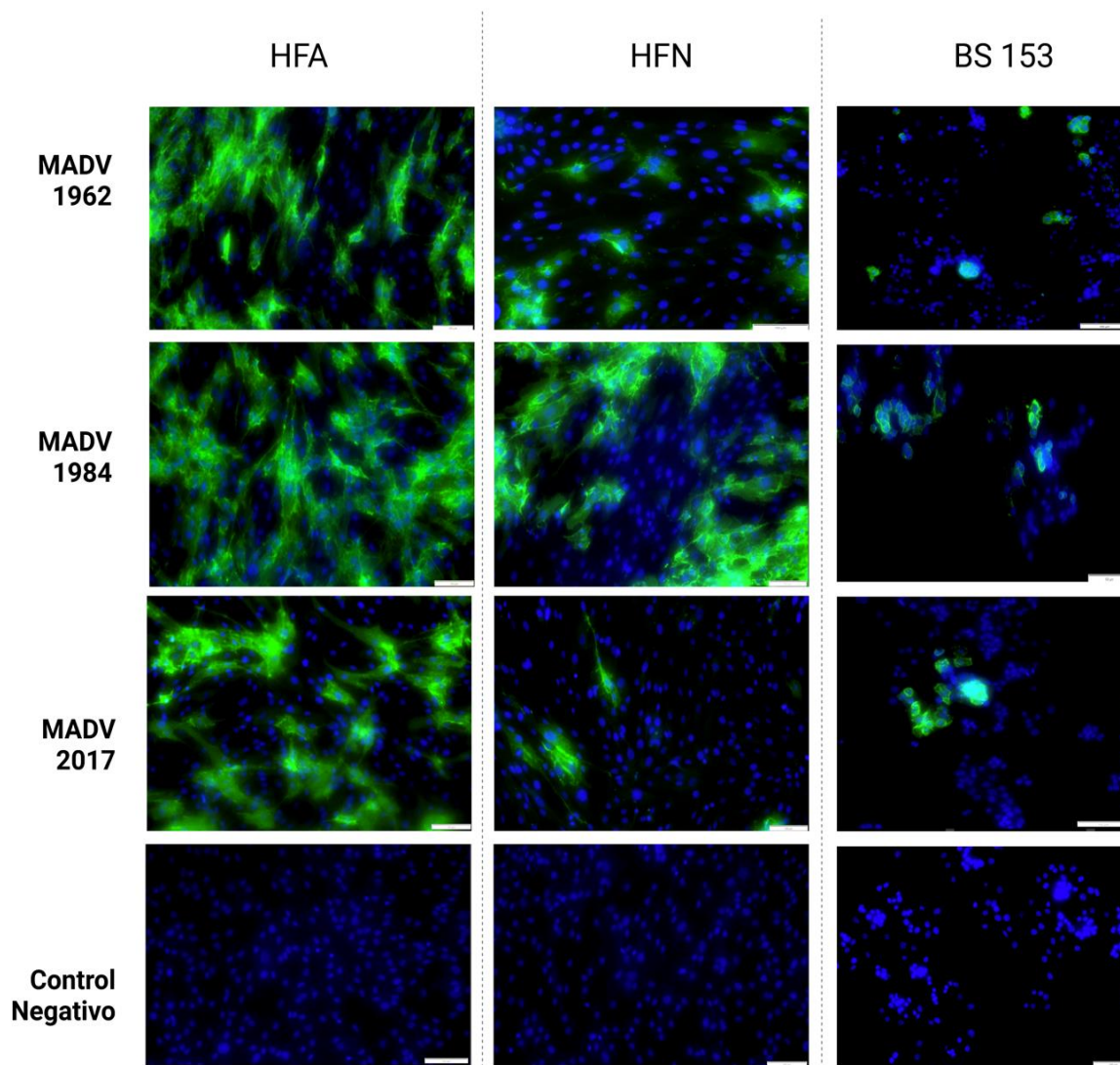


Figura 43 Técnica de inmunofluorescencia, mostrando la infección de MADV en distintas líneas celulares

## TITULACIÓN DE SOBRENADANTES

<b>Título de HFN (PFU/mL)</b>			
	<b>1962</b>	<b>1984</b>	<b>2017</b>
24h	6.00E+05	4.53E+06	3.25E+07
36h	1.83E+06	4.23E+06	4.00E+07
48h	3.83E+06	4.67E+06	6.90E+06
60h	9.40E+05	3.33E+05	1.24E+06
72h	1.02E+05	7.40E+04	9.07E+04

Tabla 18 Promedio de títulos de HFN infectados con MOI de 0.01

<b>Título de HFA (PFU/mL)</b>			
	<b>1962</b>	<b>1984</b>	<b>2017</b>
24h	7.90E+06	9.47E+06	2.47E+07
36h	6.67E+05	6.23E+06	2.63E+06
48h	5.07E+05	3.20E+06	7.53E+05
60h	7.00E+04	4.63E+05	1.30E+05
72h	8.40E+03	7.33E+04	2.04E+04

Tabla 19 Promedio de títulos de HFN infectados con MOI de 0.01

<b>Título de BS153 (PFU/mL)</b>			
	<b>1962</b>	<b>1984</b>	<b>2017</b>
24h	1.16E+06	4.23E+06	6.47E+06
36h	9.57E+06	1.95E+07	8.87E+06
48h	1.60E+07	2.77E+07	5.32E+06
60h	1.08E+07	5.57E+07	6.47E+06
72h	1.85E+06	1.10E+07	9.50E+05

Tabla 20 Promedio de títulos de BS153 infectados con MOI de 0.01

## GRÁFICAS DE TITULACIÓN DE SOBRENADANTES

Los sobrenadantes de las líneas de HFA y HFN infectadas con MOI 0.01 fueron tituladas para medir la cantidad de virus infeccioso y encontramos que los mayores títulos fueron logrados por la cepa de MADV 2017, entre las 24 y 36 horas (Figura 44).

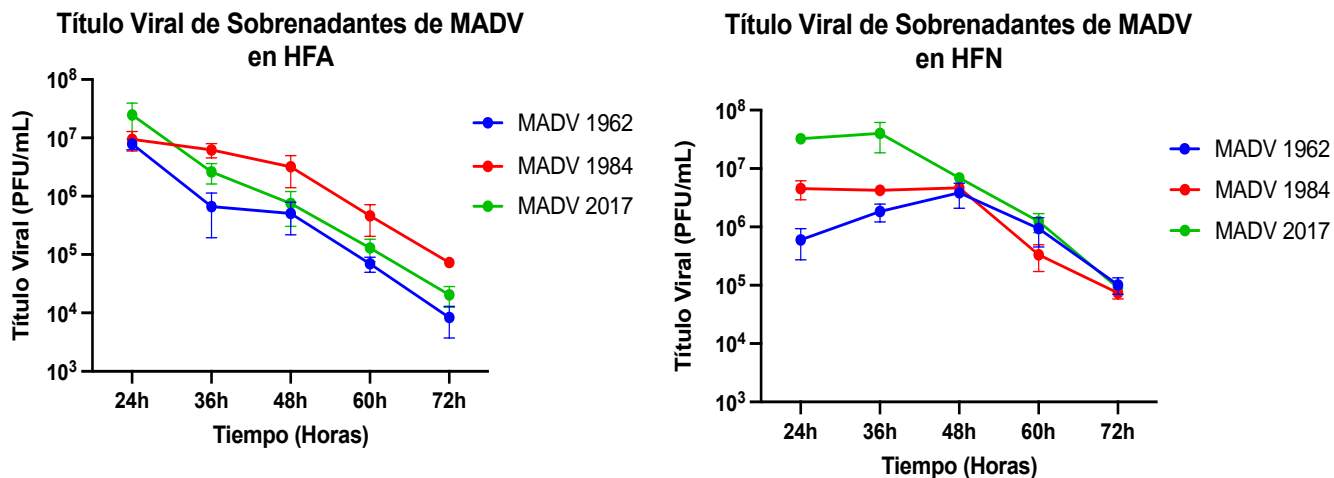


Figura 44 Comparación de títulos virales en líneas de fibroblastos humanos infectadas con MADV

En la línea de BS153 la cepa con mayor título viral, fue la cepa de 1984, llegando a su título máximo a las 60 horas (Figura45).

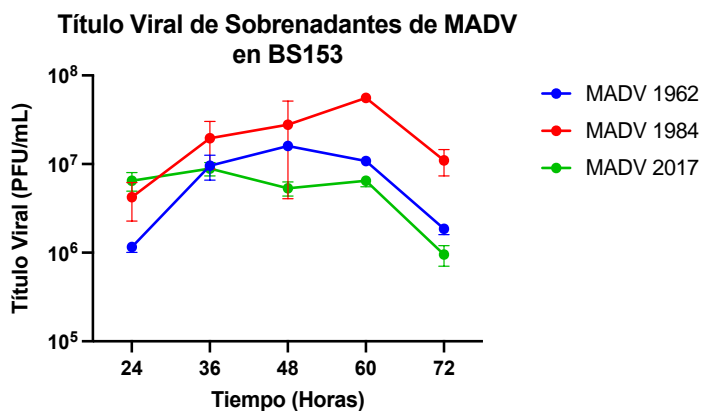


Figura 45 Títulos virales en línea BS 153 infectados con MADV

## CUANTIFICACIÓN DE CARGA VIRAL POR RT-QPCR EN TIEMPO REAL DE HFA

Carga Viral de HFA infectados con MADV MOI 1									
	HFA infectado con MADV 1962			HFA infectado con MADV 1984			HFA infectado con MADV 2017		
0H	2.03E+08	1.45E+08	1.08E+08	29368428	22681180	16053108	1.73E+08	3.26E+08	3.12E+08
6H	1.36E+09	2.74E+09	3.19E+09	1.54E+09	1.8E+09	1.1E+09	4.5E+09	3.25E+09	2.25E+09
12H	9.57E+09	5.25E+09	8.53E+09	1.93E+10	1.47E+10	2.03E+10	2.14E+10	1.71E+10	1.21E+10
24H	9.21E+10	1.33E+11	1.1E+11	6.12E+11	8.54E+11	5.89E+11	3.87E+11	2.94E+11	2.86E+11
36H	9.41E+10	7.02E+10	1.07E+11	5.32E+11	7.92E+11	2.76E+11	1.32E+11	8.93E+10	1.01E+11
48H	2.22E+10	1.34E+10	1.6E+10	2.36E+12	1.27E+11	2.36E+11	1.7E+11	4.23E+10	2.62E+10
60H	7.33E+09	5.47E+09	9.3E+09	2.98E+10	2.91E+10	1.97E+10	3.59E+10	1E+10	4.28E+10
72H	3.27E+09	2.55E+09	1.93E+10	1.29E+10	2.27E+10	1.34E+10	1.29E+10	1.12E+10	8.8E+09

Tabla 21 Carga Viral de HFA infectadas con MOI 1

Carga Viral de HFA infectados con MADV MOI 0.01									
	HFA infectado con MADV 1962			HFA infectado con MADV 1984			HFA infectado con MADV 2017		
0H	706297	1421855	1180544	191679	437360	290631	2349463	5318022	1216029
6H	12377019	1.06E+10	8071147	1.42E+10	9069419	11675744	24688664	4.24E+09	15977555
12H	1.33E+08	1.95E+08	45278508	2.04E+10	1.06E+08	48119000	2.62E+08	6.15E+09	1E+08
24H	5.11E+10	6.62E+10	5.6E+10	2.08E+11	1.58E+11	1.73E+11	3.01E+11	1.33E+11	1.54E+11
36H	6.37E+10	5.34E+10	3.16E+10	2.99E+11	2.31E+11	3.06E+11	1.3E+11	6.75E+10	1.13E+11
48H	2.63E+10	1.97E+10	2.06E+10	8.17E+10	1.15E+11	1.32E+11	8.04E+10	4.66E+10	7.57E+10
60H	1.93E+10	1.23E+10	1.13E+10	4.58E+10	5.01E+10	4.4E+10	3.58E+10	2.7E+10	4.4E+10
72H	5.08E+09	2.81E+10	3.47E+09	9.49E+09	2.41E+10	1.27E+10	1.31E+10	1.1E+10	2.66E+10

Tabla 22 Carga Viral de HFA infectadas con MADV MOI 0.01

Carga Viral de HFA infectados con MADV MOI 0.0001									
	HFA infectado con MADV 1962			HFA infectado con MADV 1984			HFA infectado con MADV 2017		
0H	1.18E+04	8.09E+03	1.80E+04	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	3.43E+04	3.43E+04	3.43E+04
6H	1.82E+04	1.62E+04	1.69E+04	6.42E+04	6.62E+04	6.92E+04	3.36E+05	4.01E+05	1.53E+05
12H	8.99E+04	3.74E+05	6.78E+05	1.83E+05	2.76E+06	1.35E+05	1.24E+06	2.70E+06	3.95E+06
24H	1.42E+08	5.21E+08	4.18E+08	9.96E+08	3.14E+09	1.68E+09	3.40E+09	1.35E+09	2.52E+09
36H	2.29E+10	3.35E+10	2.19E+10	7.06E+11	2.81E+12	2.63E+11	2.70E+11	3.49E+11	2.52E+11
48H	2.48E+11	1.35E+11	1.05E+11	2.27E+11	8.64E+11	2.86E+11	2.14E+11	3.07E+11	2.29E+11
60H	2.07E+11	8.97E+10	1.06E+11	2.59E+11	2.93E+11	4.23E+11	1.39E+11	1.73E+11	2.75E+11
72H	2.00E+11	8.87E+10	1.09E+11	1.96E+11	1.36E+11	2.12E+11	1.17E+11	1.06E+11	9.70E+10

Tabla 23 Carga Viral de HFA infectada con MADV MOI 0.0001

## GRÁFICAS DE CARGA VIRAL POR RT-QPCR EN TIEMPO REAL DE HFA

En los HFA, a distintas MOI de infección, el virus que mayor carga produjo fue el virus de MADV 1984 a las 36 horas. Se observó también que la mayor carga viral alcanzada por MADV en las MOI de 1 y 0.01 de las cepas de 2017 y 1962 fue a las 24 horas.

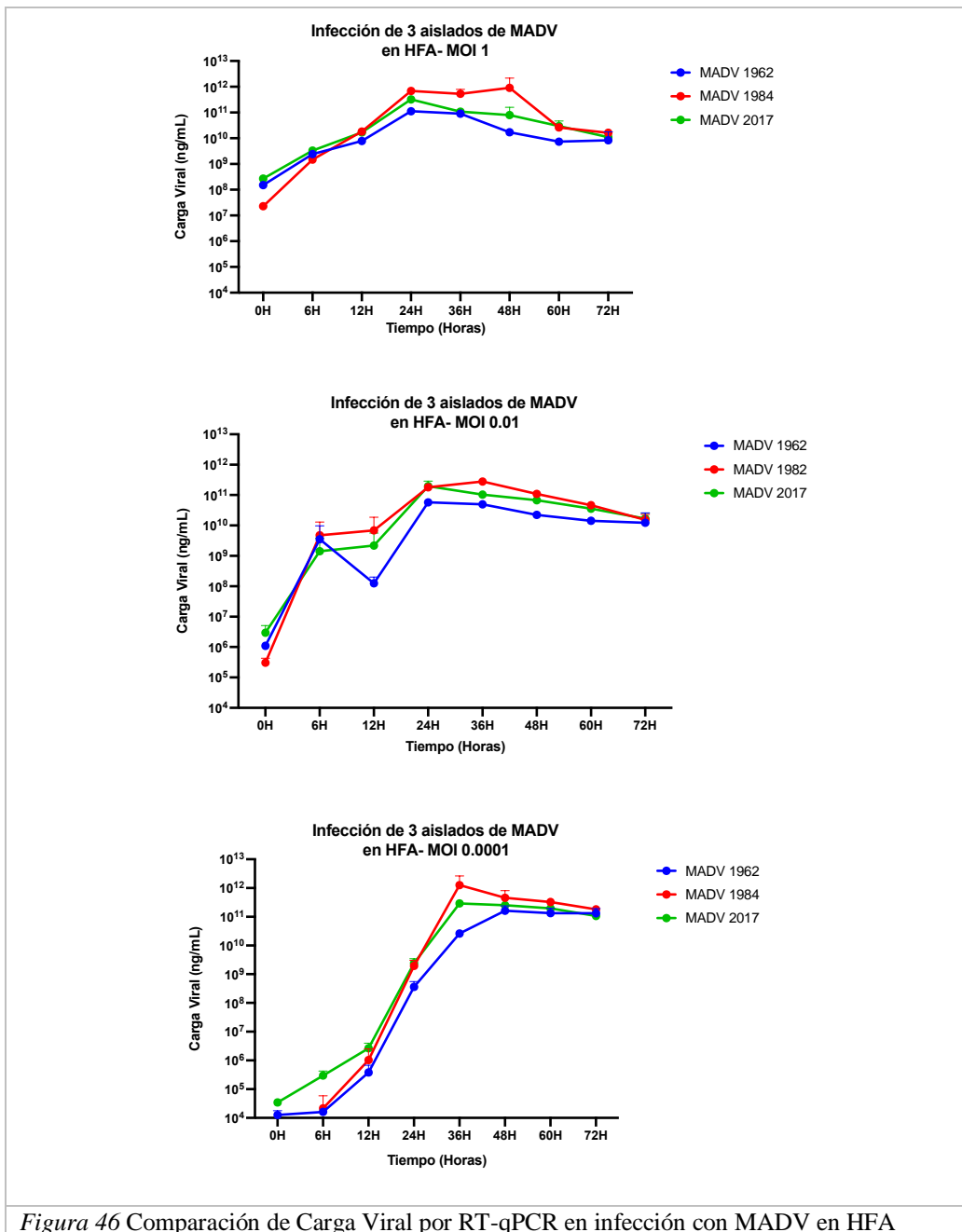


Figura 46 Comparación de Carga Viral por RT-qPCR en infección con MADV en HFA

## CUANTIFICACIÓN DE CARGA VIRAL POR RT-QPCR EN TIEMPO REAL DE HFN

Carga Viral de HFN infectados con MADV MOI 1									
	HFN infectado con MADV 1962			HFN infectado con MADV 1984			HFN infectado con MADV 2017		
0H	5.88E+07	5.43E+07	9.54E+07	1.99E+08	1.60E+08	2.09E+08	5.74E+08	2.10E+08	4.38E+08
6H	1.38E+09	1.35E+09	8.27E+08	8.06E+08	1.30E+09	1.38E+09	8.76E+09	8.21E+09	3.83E+09
12H	2.08E+10	1.18E+10	3.20E+10	9.64E+10	8.46E+11	9.44E+10	1.13E+12	4.94E+11	9.45E+11
24H	9.33E+10	6.69E+10	8.97E+10	5.07E+11	2.54E+11	4.25E+11	3.07E+12	1.88E+12	3.02E+12
36H	2.10E+11	1.60E+11	1.85E+11	8.84E+10	4.67E+10	2.75E+10	1.49E+12	9.19E+11	1.76E+12
48H	8.92E+11	6.62E+11	2.29E+12	2.86E+10	2.16E+10	7.70E+09	1.08E+12	6.10E+11	2.58E+11
60H	2.43E+11	2.62E+11	2.78E+11	6.64E+09	2.07E+09	5.68E+09	1.77E+11	1.03E+11	9.93E+10
72H	1.36E+11	1.34E+11	1.38E+11	9.64E+09	7.77E+09	6.81E+09	1.32E+11	8.86E+11	7.59E+10

Tabla 24 Carga Viral de HFN infectadas con MADV MOI 1

Carga Viral de HFN infectados con MADV MOI 0.01									
	HFN infectado con MADV 1962			HFN infectado con MADV 1984			HFN infectado con MADV 2017		
0H	7.06E+05	1.42E+06	1.18E+06	1.92E+05	4.37E+05	2.91E+05	2.35E+06	5.32E+06	1.22E+06
6H	1.24E+07	1.06E+10	8.07E+06	1.42E+10	9.07E+06	1.17E+07	2.47E+07	4.24E+09	1.60E+07
12H	1.33E+08	1.95E+08	4.53E+07	2.04E+10	1.06E+08	4.81E+07	2.62E+08	6.15E+09	1.00E+08
24H	5.11E+10	6.62E+10	5.60E+10	2.08E+11	1.58E+11	1.73E+11	3.01E+11	1.33E+11	1.54E+11
36H	6.37E+10	5.34E+10	3.16E+10	2.99E+11	2.31E+11	3.06E+11	1.30E+11	6.75E+10	1.13E+11
48H	2.63E+10	1.97E+10	2.06E+10	8.17E+10	1.15E+11	1.32E+11	8.04E+10	4.66E+10	7.57E+10
60H	1.93E+10	1.23E+10	1.13E+10	4.58E+10	5.01E+10	4.40E+10	3.58E+10	2.70E+10	4.40E+10
72H	5.08E+09	2.81E+10	3.47E+09	9.49E+09	2.41E+10	1.27E+10	1.31E+10	1.10E+10	2.66E+10

Tabla 25 Carga Viral de HFN infectadas con MADV MOI 0.01

Carga Viral de HFN infectados con MADV MOI 0.0001									
	HFN infectado con MADV 1962			HFN infectado con MADV 1984			HFN infectado con MADV 2017		
0H	2.82E+04	3.92E+04	3.52E+04	4.61E+04	7.68E+03	1.10E+04	3.15E+04	5.93E+04	2.29E+04
6H	2.08E+05	6.33E+04	5.60E+04	4.98E+04	2.42E+04	3.00E+03	5.75E+04	5.93E+04	3.24E+04
12H	2.25E+06	1.31E+06	1.93E+06	1.32E+07	1.13E+07	3.87E+06	4.03E+06	4.36E+06	7.90E+06
24H	6.34E+06	7.82E+07	2.60E+07	2.61E+11	9.56E+10	1.19E+11	1.63E+12	1.69E+12	1.51E+12
36H	4.39E+08	4.73E+08	3.70E+08	5.32E+11	6.65E+11	1.68E+12	2.64E+12	2.46E+12	2.86E+12
48H	1.58E+09	5.43E+09	1.10E+10	4.75E+11	7.78E+11	2.70E+11	1.10E+12	1.17E+12	1.18E+12
60H	1.32E+10	4.94E+10	3.52E+10	1.05E+11	4.94E+11	9.67E+10	2.13E+11	2.31E+11	3.98E+11
72H	6.39E+10	8.85E+11	3.06E+10	4.71E+10	8.15E+10	4.00E+10	1.01E+11	1.09E+11	7.89E+10

Tabla 26 Carga Viral de HFN infectadas con MADV MOI 0.0001

## GRÁFICAS DE CARGA VIRAL POR RT-QPCR EN TIEMPO REAL DE HFN

En los HFN el virus que mayor carga produjo fue MADV 2017 a las 24h para las MOI de 1 y 0.01 y a las 36h para la más baja. La cepa de MADV 1962 logró alcanzar su pico más alto a las 48h con MOI de 1 (Figura 47).

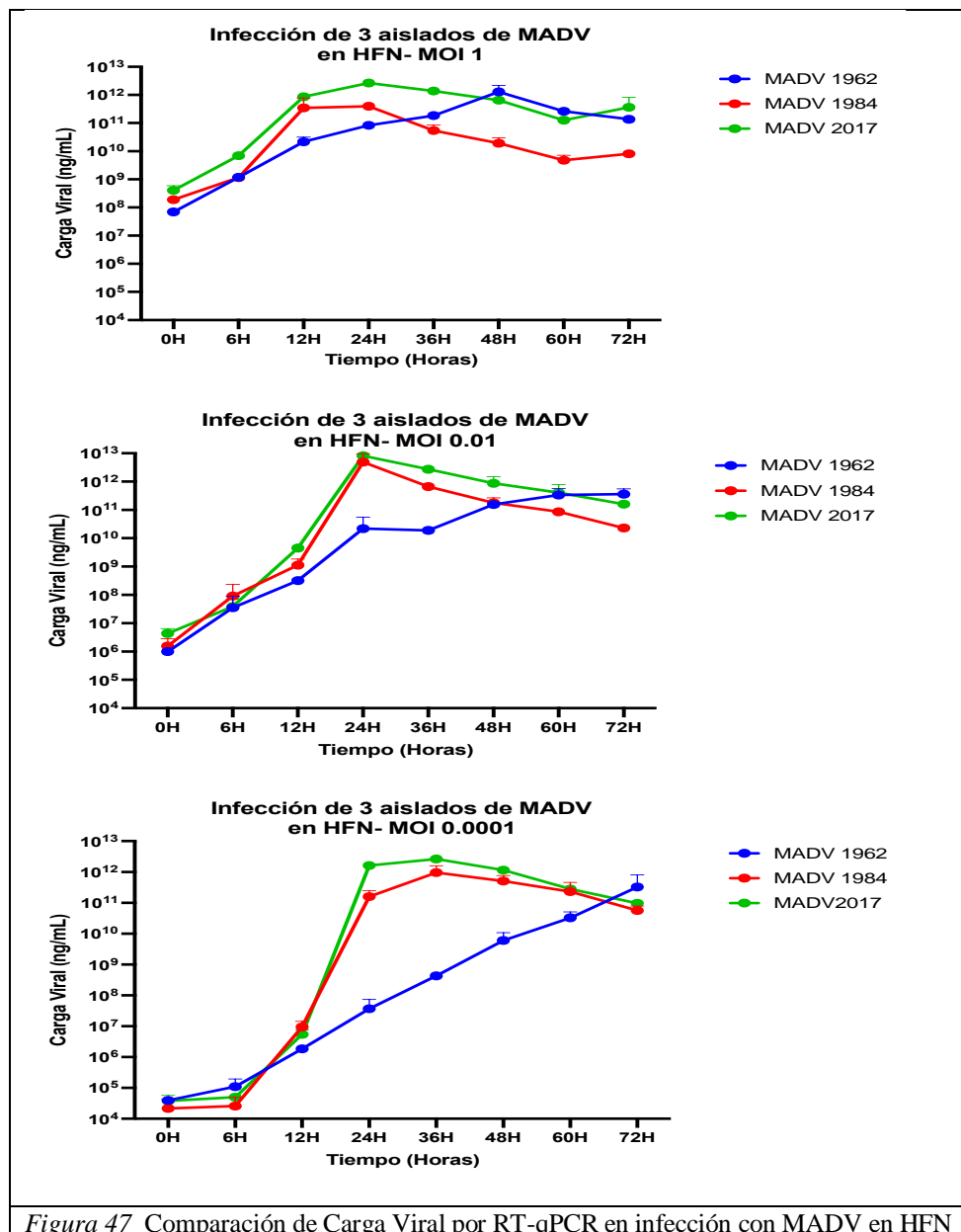


Figura 47 Comparación de Carga Viral por RT-qPCR en infección con MADV en HFN

## CUANTIFICACIÓN DE CARGA VIRAL POR RT-QPCR EN TIEMPO REAL DE BS153

Carga Viral de BS153 infectados con MADV MOI 1									
	BS153 infectado con MADV 1962			BS153 infectado con MADV 1984			BS153 infectado con MADV 2017		
0H	45426392	37522076	51987776	16076662	14340792	13575873	1E+08	62575084	72789288
6H	1.58E+09	1.32E+09	9.52E+08	2.43E+09	2.01E+09	3.68E+09	1.6E+09	1.68E+09	2.23E+09
12H	2.15E+10	1.17E+10	3.18E+10	2.77E+10	4.98E+10	2.95E+10	1.04E+10	1.32E+10	2.3E+10
24H	9.38E+10	6.73E+10	9.62E+10	3.34E+11	1.09E+12	3.08E+11	5.48E+10	7.38E+10	1.01E+11
36H	1.61E+11	1.61E+11	1.98E+11	4.92E+11	6.04E+11	8.18E+11	8.73E+10	8.88E+10	1.53E+11
48H	7.17E+11	5.32E+11	1.3E+12	1.69E+12	2.1E+12	3.74E+12	6.26E+11	2.92E+11	4.07E+11
60H	2.31E+11	3.09E+11	2.87E+11	6.37E+09	8.04E+11	8.95E+13	6.35E+11	8.3E+10	2.41E+11
72H	1.44E+11	1.36E+11	1.54E+11	9.49E+11	3.35E+12	1.62E+12	2.53E+11	1.54E+11	1.44E+11

Tabla 27 Carga Viral de BS153 infectadas con MADV MOI 1

Carga Viral de BS153 infectados con MADV MOI 0.01									
	BS153 infectado con MADV 1962			BS153 infectado con MADV 1984			BS153 infectado con MADV 2017		
0H	6.74E+05	4.05E+05	4.81E+05	3.70E+04	4.07E+04	4.60E+04	7.26E+05	7.25E+05	3.14E+05
6H	1.12E+07	5.28E+06	6.17E+06	1.84E+07	4.91E+06	1.07E+07	2.48E+07	2.12E+07	1.47E+07
12H	2.01E+08	2.25E+08	1.33E+08	2.16E+08	1.80E+08	2.21E+08	3.06E+08	4.29E+08	1.87E+08
24H	1.95E+09	1.75E+09	6.12E+10	6.59E+09	6.42E+09	1.24E+10	6.90E+09	2.44E+09	7.03E+09
36H	2.04E+10	2.29E+10	1.07E+10	5.97E+10	8.15E+10	9.53E+10	1.82E+10	1.33E+10	1.20E+10
48H	1.01E+11	1.61E+11	1.91E+11	1.04E+12	1.35E+12	1.48E+12	9.45E+10	6.56E+10	4.92E+10
60H	1.80E+11	1.96E+11	4.87E+11	5.06E+13	3.32E+12	5.87E+12	6.51E+10	1.52E+11	5.07E+10
72H	3.42E+11	1.65E+11	4.03E+11	2.78E+12	3.80E+12	4.76E+12	1.48E+11	2.06E+11	1.27E+11

Tabla 28 Carga Viral de BS153 infectadas con MADV MOI 0.01

Carga Viral de BS153 infectados con MADV MOI 0.0001									
	BS153 infectado con MADV 1962			BS153 infectado con MADV 1984			BS153 infectado con MADV 2017		
0H	5.74E+04	5.74E+04	5.74E+04	7.73E+03	7.73E+03	7.73E+03	2.07E+04	2.07E+04	2.07E+04
6H	1.66E+05	1.36E+05	1.06E+05	3.18E+04	4.85E+04	1.47E+04	2.53E+06	2.65E+05	2.03E+05
12H	2.77E+06	1.10E+06	1.55E+06	1.17E+07	2.33E+07	9.67E+05	5.56E+06	4.56E+06	2.97E+06
24H	2.91E+06	1.96E+07	2.12E+11	4.17E+07	4.17E+07	2.82E+07	4.47E+07	4.07E+07	1.01E+08
36H	2.58E+08	3.09E+08	2.08E+08	5.19E+08	4.02E+08	5.18E+08	2.30E+08	3.06E+08	1.34E+08
48H	1.50E+09	4.64E+09	9.68E+09	1.87E+12	7.72E+10	9.89E+09	8.26E+08	9.41E+08	1.73E+09
60H	1.10E+10	4.96E+10	3.83E+10	2.47E+10	4.02E+10	6.97E+10	4.30E+09	2.39E+09	3.30E+09
72H	6.88E+10	6.88E+11	3.41E+10	1.86E+11	5.18E+11	5.50E+11	4.22E+09	3.22E+09	3.66E+09

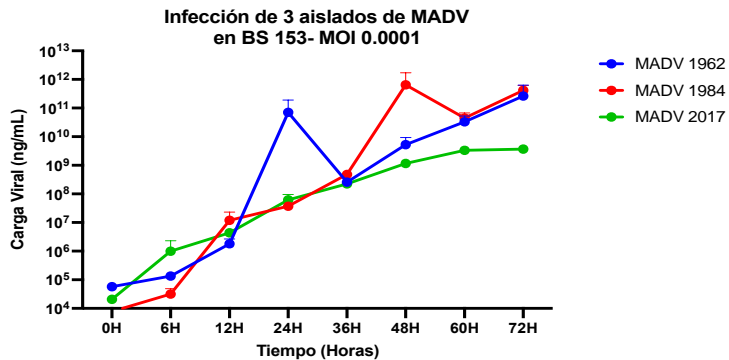
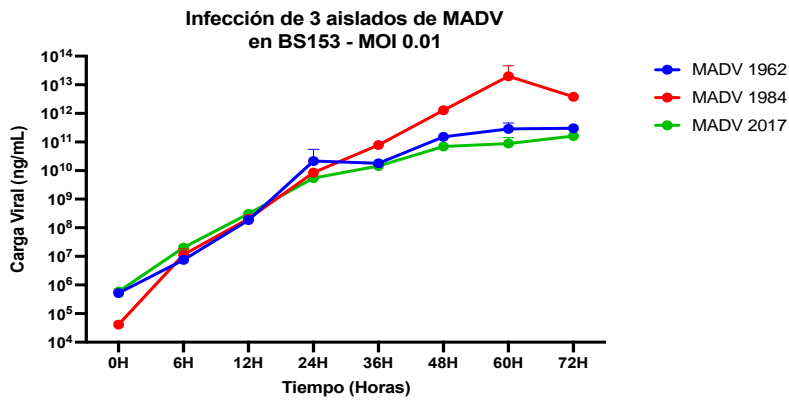
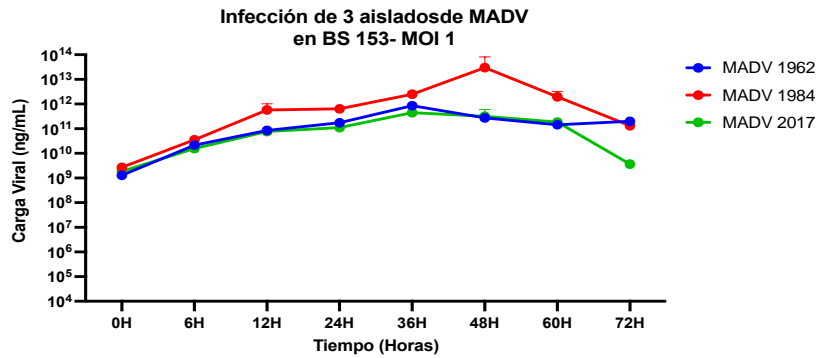
Tabla 29 Carga Viral de BS153 infectadas con MADV MOI 0.0001

**GRÁFICAS DE CARGA VIRAL POR RT-QPCR EN TIEMPO REAL DE BS153**

En la línea BS153 el virus que mayor carga produjo fue MADV 1984 entre las 48 y 60 horas, las cepas de 1962

2017 parecieran tener buena replicación en línea celular (Figura48).

y  
no  
esta



*Figura 48* : Comparación de Carga Viral por qRT-PCR en infección con MADV en BS153

### **COMPARACIÓN DE INFECTIVIDAD DE HFA VS HFN**

Comparamos los experimentos de titulación y el experimento de medición de carga viral por medio de RT-qPCR en tiempo real.

Encontramos que para ambos experimentos la línea celular que tuvo más carga viral fue la línea de Fibroblastos Neonatales, infectados con la cepa de MADV 2017 entre las 24 y 36horas (Figura 49 y 50).

Si bien hubo variaciones en los títulos esto podría deberse a que, en el experimento de titulación para la formación de una placa y su conteo, necesitamos virus infecciosos completos. En cambio, con la técnica de PCR cuantificamos partículas virales específicas del virus en una muestra, pero no se discrimina entre las partículas virales infecciosas de las no infecciosas. Es por esta alta sensibilidad que la técnica de PCR es utilizada en diagnóstico, para la detección en fase aguda de algunas enfermedades.

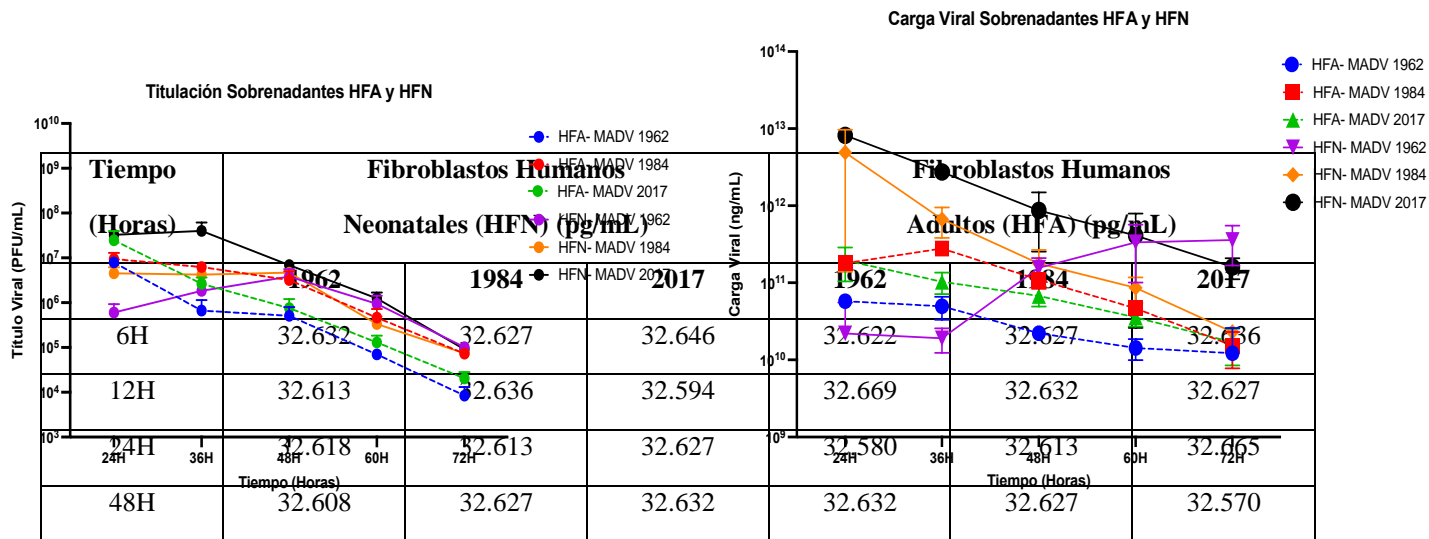


Figura 49 Tabla de Producción de IFN $\alpha$  en células HFA y HFN MOI 0.01

Figura 50 Carga viral de células infectadas con MADV MOI 0.01

### ELISA IFN $\alpha$

Resultados por años, y horas de expresión de IFN $\alpha$  en línea celular de fibroblastos humanos neonatales y fibroblastos humanos adultos (Tabla 30).

Las cepas de virus MADV infectados con una MOI de 1 no indujeron la producción de IFN $\alpha$  ni para HFN ni para HFA.

### ELISA IFN $\beta$

Resultados por años, y horas de expresión de IFN $\beta$  en línea celular de fibroblastos humanos neonatales y fibroblastos humanos adultos (Tabla 31).

Se observa la producción de IFN $\beta$  a partir de las 12h post infección con un pico a las 24h en HFA, mientras que los HFN no logran producir esta citocina antiviral

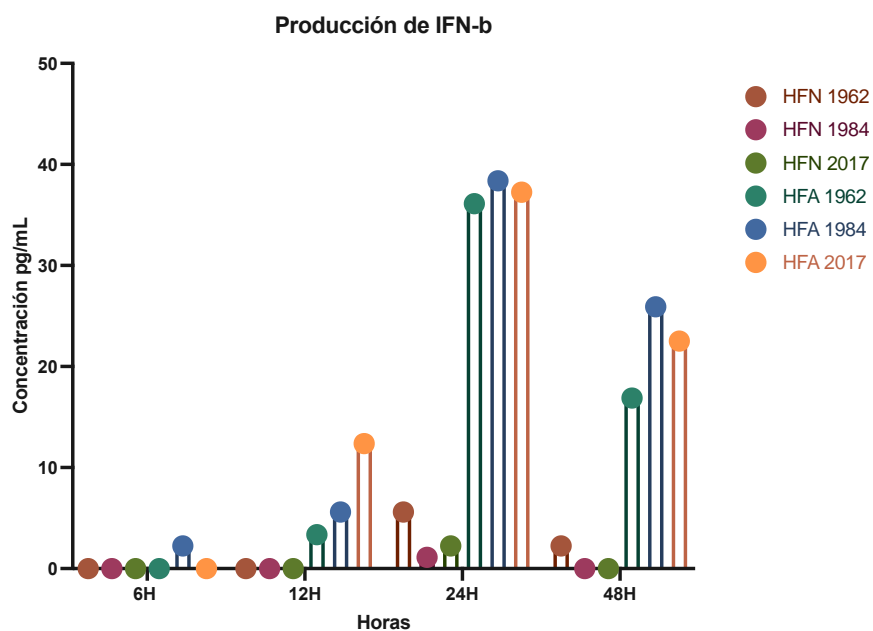


Figura 51 Gráfica de Producción de IFN en HFA y HFN

Tiempo (Horas)	Fibroblastos Humanos Neonatales (HFN) (pg/mL)			Fibroblastos Humanos Adultos (HFA) (pg/mL)		
	MADV 1962	MADV 1984	MADV 2017	MADV 1962	MADV 1984	MADV 2017
6H	0.000	0.000	0.000	0.000	2.246	0.000
12H	0.000	0.000	0.000	3.370	5.618	12.372
24H	5.618	1.123	2.246	36.113	38.382	37.248
48H	2.246	0.000	0.000	16.882	25.919	22.527

Tabla 31 Producción de IFN $\beta$  en HFA y HFN

## **IV DISCUSIÓN Y RECOEMENDACIONES**

## **CUANTIFICACIÓN DEL GENOMA VIRAL DE MADV POR BIOLOGÍA MOLECULAR**

La PCR en tiempo real se ha convertido en la técnica más utilizada en biología molecular para el diagnóstico de virus, teniendo un papel central en la pasada pandemia de COVID-19 y es la técnica de referencia para la detección de arbovirus como Dengue, Zika, Chikungunya, Fiebre Amarilla y Mayaro en muestras de fase aguda. Si bien, un resultado negativo con esta técnica no descarta la enfermedad debido a que depende de muchos factores que van desde la viremia, toma, y transporte de la muestra, así como de la sensibilidad de la misma reacción de amplificación, la RT-PCR en tiempo real sí es una técnica altamente confiable, específica y sensible ante un resultado positivo.

Una de las mayores problemáticas que tenemos en los países tropicales es la coexistencia y circulación de distintos arbovirus. Debido a que presentan síntomas muy similares, pueden confundirse clínicamente, lo que dificulta el diagnóstico. Esto tiene una importancia muy significativa cuando se habla de virus que no son endémicos o que son poco comunes, ya que podrían pasar desapercibidos o enmascarados bajo otro virus (Aguilar et al., 2011). En el caso de MADV, su detección en humanos se ha dado por la asociación con brote en equinos, presentación de encefalitis en humanos (Carrera et al., 2013) o por estudios de vigilancia de fiebres indiferenciadas dentro de epidemias de otros arbovirus o estudios en sitios centinelas, como fueron los casos de Haití y Brasil (Blohm et al., 2018; de Souza Costa et al., 2019; Lednicky et al., 2019). Lo más probable es que MADV esté pasando desapercibido, debido a que no es lo comúnmente buscado y las metodologías para su diagnóstico son laboriosas, de alto costo y necesitan personal altamente capacitado.

En este estudio, se diseñó y estandarizó una RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

para la detección de MADV, la cual logró la detección de hasta 100copias/mL. Además, esta PCR fue probada con los virus Chikungunya (CHIKV) y Mayaro (MAYV), virus del mismo género con los cuales pudimos corroborar la especificidad de la técnica. Sin embargo, no pudimos probar con EEEV-NA ya que no disponíamos de esta cepa, y su envío no fue posible dentro del tiempo de desarrollo de la tesis debido a los permisos especiales requeridos por ser considerado un agente selecto.

Aun así, el paso que hemos dado en el desarrollo de una técnica molecular para la detección de MADV es algo realmente novedoso e importante para la vigilancia de este virus. Con la implementación de una RT-qPCR en tiempo real se tendría un diagnóstico en un rango aproximado de 3-4 horas versus una semana o más que puede tomar hacer el aislamiento viral, PCR genérica para alfavirus y confirmación por secuenciación en muestras agudas. Esto significa para el sistema de salud, un ahorro de recursos, personal y tiempo de respuesta ante un brote de MADV.

### **Capacidad infecciosa y replicativa de MADV en células humanas**

Para analizar la capacidad infecciosa y replicativa de MADV, infectamos las líneas de Fibroblastos Humanos dermales de Adulto (HFA), Fibroblastos Humanos dermales de Neonatos (HFN) y la línea de glioblastoma BS153 con diferentes MOI de cada aislado en estudio para observar si a distintas concentraciones, el virus era capaz de infectar, replicarse y producir un efecto citopático (CPE). Se infectaron las células con una MOI conocida y se observaron cada 12 horas para observar cambios en la monocapa de células y se tomaron sobrenadantes para posterior análisis. Para los HFA y HFN la presentación de CPE que fue más notable y rápida, fue con la MOI de 1; la más alta utilizada en este trabajo. Dentro de los cambios mayormente observados, nos encontramos con cambios en la morfología celular.

Los fibroblastos tienden a ser alargados y luego de su infección, alrededor de las 24-36 horas, empezaban a encogerse y a presentar espacios entre ellos; también evidenciamos pérdida de adherencia celular causado por la muerte de las células; lo cual apreciábamos por las células flotando en el plato de cultivo y llegando a las 72 horas la mayoría de las células se encontraban suspendidas. Esto muestra que los fibroblastos humanos, tanto adultos como neonatos, son susceptibles a la infección por MADV. En cambio, para la línea BS153, la evidencia de CPE fue muy poca, con la MOI de 1 entre las 48 y 60 horas fue que se empezó a evidenciar cambios en la monocapa celular, mostrando ciertos espacios entre las células infectadas en comparación con el control no infectado. Algo característico de esta línea celular es que su reproducción es muy rápida, y a las 72 horas cuando terminábamos el experimento el control negativo tenía hasta 2 monocapas de células. Los resultados observados podrían deberse a que es una línea proveniente de un cáncer y tenga propiedades multiplicativas muy altas que puedan interferir en la replicación del virus y con la muerte celular, (Mohammad et al., 2015) por esta razón son necesarios estudios futuros con células primarias para poder concluir si las células glías son capaces de infectarse y replicar MADV.

Para complementar nuestras observaciones cualitativas, utilizamos la técnica de Inmunofluorescencia, donde se infectaron HFA, HFN y BS153 con una MOI de 0.1 y se detuvieron a las 24 horas. Gracias a esta técnica, pudimos visualizar que MADV logra infectar las líneas HFA, HFN y BS153 y producir nuevas proteínas virales, ya que en todas las líneas hubo unión del anticuerpo anti-MADV a las células infectadas. Sin embargo, a la misma MOI, la cantidad de células BS153 infectadas con MADV es inferior a HFA y HFN, sugiriendo el hecho que las BS153 son menos susceptibles a la infección. Por ende, el bajo efecto citopático observado en estas células se debe probablemente, tanto a una menor

susceptibilidad a la infección, como a una resistencia a la apoptosis y muerte celular. Futuros estudios son necesarios para determinar los mecanismos de escape implicados.

Además de las técnicas cualitativas, para analizar la capacidad infecciosa y replicativa de MADV utilizamos dos técnicas cuantitativas: titulación del sobrenadante recogido desde las 24 hasta las 72 horas y una RT-qPCR en tiempo real para cuantificación de la carga viral utilizando el plásmido construido desde la hora 0 hasta las 72h. Estos experimentos se realizaron en triplicados.

Nuestros resultados de titulación, nos mostraron que para HFA las 3 cepas de MADV tuvieron su mayor título a las 24h y que MADV 2017 tuvo un título hasta 10 veces mayor que las cepas de 1962 y 1984. Para los HFN la cepa de MADV 2017 igualmente fue la que obtuvo un título más alto en menos tiempo, logrando tener su mayor concentración a las 36h con un título 10 veces mayor en comparación con MADV 1984 y 100 veces mayor con relación a MADV 1962. Esto nos indica que ambas líneas de fibroblastos pueden infectarse con MADV y pareciese que la cepa que mejor infecto fue la de 2017, obteniendo títulos virales más altos en ambas líneas entre las 24 y 36 horas post-infección. Estudios futuros son necesarios para determinar si mutaciones en el genoma de MADV podrían permitir una mejor adaptación a las células que pudiera explicar, en parte, la observación de casos clínicos en humanos desde el 2010.

Por otra parte, para las BS153 la cepa que tuvo mayor título fue MADV 1984 a las 60 horas, mostrando nuevamente que a pesar que MADV logra replicar en estas células, estas no son totalmente susceptibles, logrando postergar el pico de replicación.

Con la técnica molecular para cuantificación de carga viral por RT-qPCR observamos que

para la línea de HFA la cepa que mejor replica en cuanto a cantidad, es la cepa de MADV 1984, llegando a su máxima concentración a las 36 horas, sin embargo, las cepas de 1962 y 2017 lograron llegar a su carga viral más alta en 24 horas. Para los HFN el virus que mayor carga obtuvo fue MADV 2017 entre las 24 y 36 horas post infección y para las BS153 el virus que mayor carga produjo fue MADV 1984 entre las 48 y 60 horas, las cepas de 1962 y 2017 parecieran no tener buena replicación en esta línea celular.

Estos resultados concuerdan con el experimento de titulación mostrando de igual manera que tanto los HFA como HFN pueden replicar MADV. Adicionalmente, este experimento nos muestra replications distintas entre HFA y HFN, mostrando en los HFA una mejor replicación para MADV 1984 y en HFN una mejor replicación para MADV 2017. Sin embargo, hay que tener presente que a pesar de que ambas técnicas son cuantitativas la información que nos brindan son distintas ya que con la prueba de titulación buscamos encontrar la cantidad de virus infeccioso que hay en la muestra, es decir la cantidad de virus que logra infectar de forma efectiva la célula, mientras que con la PCR buscamos la cantidad de genomas virales producidos, pero no discrimina entre cantidad de virus infeccioso y virus no infeccioso. Es decir que a pesar que en los HFA pareciese replicar mejor MADV 1984 si se analiza la carga viral, tal vez la producción a gran escala de partículas infecciosas, no sea tan efectiva como la de MADV 2017 que logra tener títulos mayores en la prueba de titulación.

Teniendo esto en cuenta, hicimos una comparación de los experimentos de titulación y el experimento de medición de carga viral por medio de RT-qPCR en tiempo real con MOI de 0.01 y encontramos que para ambos experimentos la línea celular que tuvo más carga y título viral fue la línea de HFN con la cepa de MADV 2017 entre las 24 y 36 horas; mostrando una

gran eficiencia de este aislado en estas células. Esto va acorde a nuestra hipótesis inicial mostrando que para las líneas humanas probadas HFA y HFN el virus Madariaga aislado más recientemente tiene una mejor infectividad y replicación en células humanas en comparación con aislados del virus anteriores al brote en humanos del año 2010.

Además tras estos hallazgos, llegamos a la conclusión que MADV es capaz de infectar tanto HFA como HFN, y replicar en estas líneas celulares, sin embargo, la línea BS153 a pesar de que se logra infectar, lo hace de manera menos eficiente y no logra replicar bien MADV y resiste al efecto citopático inducido por la infección. Esto es importante ya que aporta conocimiento sobre el posible tropismo celular de MADV, lo cuál ayudaría a entender mejor su patogénesis.

### **CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IFN I EN CÉLULAS HUMANAS INFECTADAS POR MADV**

Nuestro último objetivo era cuantificar la producción de IFN de tipo I en células humanas infectadas por MADV ya que existe evidencia de que este grupo de citocinas antivirales tienen un papel activo en el control de la infección de EEEV-NA y MADV (Aguilar et al., 2005; Armstrong et al., 1971; Mayer, 1962). Para esto, los sobrenadantes recolectados en los experimentos *in vitro* fueron cuantificados en búsqueda de IFN $\alpha/\beta$  por medio de kits de ELISA.

Con respecto al IFN $\alpha$ , observamos que la producción no era muy alta y no aumentó con la infección ni con el tiempo de infección, independientemente del aislado de MADV analizado y de las células infectadas, ya que se observó el mismo comportamiento tanto en los HFA como en los HFN. Esto sugiere que a pesar de que resultados previos sugieren que la vía del IFN $\alpha$  puede participar en la respuesta antiviral contra MADV cuando las células son

pretratadas con IFN $\alpha$  antes de la infección (Aguilar et al., 2005), en nuestros experimentos la infección por MADV con una MOI de 1 no indujo producción de IFN $\alpha$ . Futuros estudios con niveles de infección más altos, diferentes tiempos de análisis y utilizando diferentes técnicas que permitan analizar cada etapa de la vía de señalización para inducción de IFN $\alpha$ , son necesarios para determinar si la producción de IFN $\alpha$  por las células infectadas depende de la cantidad de virus a la cual han sido expuestas.

Para el IFN $\beta$ , igualmente existen estudios donde al pre tratar las células con IFN $\beta$  y luego infectarlas con MADV, este logra mantener suprimida la infección por MADV (Aguilar et al., 2005). En nuestros resultados encontramos que la mayor producción de IFN $\beta$  fue a las 24 horas, siendo esta casi 7 veces más alta en los HFA que en los HFN. La producción de IFN $\beta$  se detectó a partir de las 6 horas post infección en los HFA. Esta diferencia observada entre fibroblastos adultos y neonatos en la respuesta de IFN $\beta$  inducida por la infección, y el efecto demostrado por Aguilar et al. del IFN $\beta$  en la inhibición de la replicación, están alineadas con nuestra hipótesis de que la respuesta antiviral en adultos es más rápida y más intensa que en los niños, lo que podría explicar, en parte, la mayor severidad de casos en niños menores de 5 años por la infección por MADV.

## RECOMENDACIONES

Debido a que no existen muchos estudios *in vitro* con MADV, futuros estudios son necesarios para analizar el mecanismo de activación de la vía del IFN $\beta$ , así como otras vías de la respuesta antiviral en diferentes células humanas. Esto ayudaría a determinar si hay una posible diferencia asociada a la edad que pudiera explicar la patogénesis de la infección por este virus en niños y en adultos y el aumento de casos clínicos en humanos desde el 2010.

Tomando en cuenta que los casos fatales afectan sobretodo el Sistema Nervioso Central, se podrían incluir distintas líneas celulares como astrocitos y neuronas para entender mejor la interacción de MADV con las células huésped.

También es necesario la secuenciación de genoma completo de todos los aislados posibles de MADV para dilucidar si hay variaciones genéticas que puedan estar favoreciendo la propagación de este agente en humanos, la limitante aquí es que la mayoría de los aislados son obtenidos de muestras de equinos, y que pareciera que la viremia de MADV fuese corta, ya que la mayoría de los casos reportados, tanto en caballos como en humanos, son detectados por pruebas en fases convalecientes, lo que limita en gran manera las muestras para estos análisis. Es por eso que ligado a este punto recomendamos la implementación de metodologías diagnósticas menos laboriosas, como la RT-qPCR en tiempo real que desarrollamos, para poder tener una idea más clara de la carga de la enfermedad producida por MADV que pudiese estar pasando desapercibida.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar, P. V., Adams, A. P., Wang, E., Kang, W., Carrara, A.-S., Anishchenko, M., Frolov, I., & Weaver, S. C. (2008). Structural and Nonstructural Protein Genome Regions of Eastern Equine Encephalitis Virus Are Determinants of Interferon Sensitivity and Murine Virulence. *Journal of Virology*, 82(10), 4920–4930. <https://doi.org/10.1128/JVI.02514-07>
2. Aguilar, P. V., Paessler, S., Carrara, A.-S., Baron, S., Poast, J., Wang, E., Moncayo, A. C., Anishchenko, M., Watts, D., Tesh, R. B., & Weaver, S. C. (2005). Variation in Interferon Sensitivity and Induction among Strains of Eastern Equine Encephalitis Virus. *Journal of Virology*, 79(17), 11300–11310. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.17.11300-11310.2005>
3. Aguilar, P. V., Estrada-franco, J. G., Navarro-lopez, R., Ferro, C., Haddow, A. D., & Weaver, S. C. (2011). Hidden Under the Dengue Umbrella. *Future Virology*, 6(6), 721–740. <https://doi.org/10.2217/FVL.11.5.Endemic>
4. Aguilar, P. V., Robich, R. M., Turell, M. J., Guinn, M. L. O., Klein, T. A., Huaman, A., Guevara, C., Rios, Z., Tesh, R. B., Watts, D. M., Olson, J., & Weaver, S. C. (2007). ENDEMIC EASTERN EQUINE ENCEPHALITIS IN THE AMAZON REGION OF PERU. 76(2), 293–298.
5. Alice, F. (1956). *Infeccao humana pelo virus "leste" da encefalite equina* (p. Bol Inst Biol da Bahia (Brazil) 3: 3–9).
6. Armstrong, J. A., Freeburg, L. C., & Ho, M. (1971). Effect of Interferon on Synthesis of Eastern Equine Encephalitis Virus RNA. *Experimental Biology and Medicine*, 137(1), 13–18. <https://doi.org/10.3181/00379727-137-35502>
7. Arrigo, N. C., Adams, A. P., & Weaver, S. C. (2010). Evolutionary Patterns of Eastern Equine Encephalitis Virus in North versus South America Suggest Ecological Differences and Taxonomic Revision. *Journal of Virology*, 84(2), 1014–1025. <https://doi.org/10.1128/JVI.01586-09>
8. Asai, D. J. (2015). Immunofluorescence microscopy. *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*, 2015(May), 9.2.1-9.2.22. <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et0902s10>
9. Azar, S. R., Campos, R. K., Bergren, N. A., Camargos, V. N., & Rossi, S. L. (2020). Epidemic alphaviruses: Ecology, emergence and outbreaks. *Microorganisms*, 8(8), 1–35. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081167>
10. Bakar, F. A., & Ng, L. F. P. (2018). Nonstructural proteins of alphavirus—potential targets for drug development. *Viruses*, 10(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/v10020071>
11. Baust, J. M., Buehring, G. C., Campbell, L., Elmore, E., Harbell, J. W., Nims, R. W., Price, P., Reid, Y. A., & Simone, F. (2017). Best practices in cell culture: an overview. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 53(8), 669–672. <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0177-7>
12. Benvenuto, D., Cella, E., Fogolari, M., Florio, L. De, Donati, D., Garilli, F., Spoto, S., Ceccarelli, G., & Ciccozzi, M. (2019). The transmission dynamic of Madariaga Virus by bayesian phylogenetic analysis: Molecular surveillance of an emergent pathogen. *Microbial Pathogenesis*. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.039>
13. Blohm, G. M., Lednicky, J. A., White, S. K., Mavian, C. N., Márquez, M. C., González-García, K. P., Salemi, M., Morris, J. G., & Paniz-Mondolfi, A. E. (2018). Madariaga Virus: Identification of a Lineage III Strain in a Venezuelan Child With Acute Undifferentiated Febrile Illness, in the Setting of a Possible Equine Epizootic. *Clinical Infectious Diseases*, April, 10–12. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy224>
14. Bowie, A. G., & Unterholzner, L. (2008). Viral evasion and subversion of pattern-recognition

- receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 911–922. <https://doi.org/10.1038/nri2436>
15. Brault A.C., Powers A.M., Villareal Chavez C.L., Navarro Lopez R., Cachón M.F., Liera Gutierrez L.F., Kang W., Tesh R.B., Shope R.E., & Weaver S.C. (1999). Genetic and antigenic diversity among Eastern Equine Encephalitis Viruses from North, Central and South America. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61(4), 579–586.
  16. Brisse, M., & Ly, H. (2019). Comparative structure and function analysis of the RIG-I-like receptors: RIG-I and MDA5. *Frontiers in Immunology*, 10(JULY), 1–27. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01586>
  17. Carrera, J.-P., Cucunubá, Z., Neira, K., Lambert, B., Pittí, Y., Jackman, C., Liscano, J., Garzón, J., Beltran, D., Collado-Mariscal, L., Saenz, L., Sosa, N., Rodriguez-Guzman, L., González, P., Lezcano, A., Pereyra-Elías, R., Valderrama, A., Weaver, S., Vittor, A., ... Donnelly, C. (2020). *Endemic and epidemic human alphavirus infections in Eastern Panama; An Analysis of Population-based Cross-Sectional Surveys*. <https://doi.org/10.1101/2020.01.10.901462>
  18. Carrera, J.-P., Forrester, N., Wang, E., Vittor, A. Y., Haddow, A. D., López-Vergès, S., Abadía, I., Castaño, E., Sosa, N., Báez, C., Estripeaut, D., Díaz, Y., Beltrán, D., Cisneros, J., Cedeño, H. G., Travassos da Rosa, A. P., Hernandez, H., Martínez-Torres, A. O., Tesh, R. B., & Weaver, S. C. (2013). Eastern Equine Encephalitis in Latin America. *New England Journal of Medicine*, 369(8), 732–744. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal212628>
  19. Casals Jordi. (1963). *Antigenic Variants of Eastern Equine Encephalitis virus*. 547–565.
  20. Castaño María E., & Zapata., J. C. (2012). *Cultivos celulares* (Fondo Edit). <http://hdl.handle.net/20.500.12324/31101>
  21. Chen, R., Mukhopadhyay, S. A. M., Bolling, B., Nasar, F., Coffey, L. L., Powers, A., & Weaver, S. C. (2018). ICTV virus taxonomy profile: Togaviridae. *Journal of General Virology*, 99(6), 761–762. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001072>
  22. Chen, R., Mukhopadhyay, S., Merits, A., Bolling, B., Nasar, F., Coffey, L. L., Powers, A., & Weaver, S. C. (2018). ICTV Report Consortium. 2018, ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae. In *Journal of General Virology* (Vol. 99). [www.ictv.global/report/togaviridae](http://www.ictv.global/report/togaviridae)
  23. Choudhary, S., Neetu, N., Singh, V. A., Kumar, P., Chaudhary, M., & Tomar, S. (2021). Chikungunya virus titration, detection and diagnosis using N-Acetylglucosamine (GlcNAc) specific lectin based virus capture assay. *Virus Research*, 302(March), 198493. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198493>
  24. Christophersen, C. T., Wright, A.-D. G., & Vercoe, P. E. (2008). Plasmids 101. *Journal of Animal Science*, 86(2), 384–389.
  25. Corniou, B., Ardoin, P., Bartholomew, C., Ince W., M. V. (1972). *First Isolation of South American strain of Eastern Equine Virus from a case of Encephalitis in Trinidad*.
  26. Corrin, T., Ackford, R., Mascarenhas, M., Greig, J., & Waddell, L. A. (2021). Eastern Equine Encephalitis Virus: A Scoping Review of the Global Evidence. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 21(5), 305–320. <https://doi.org/10.1089/vbz.2020.2671>
  27. Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., Clement, T., & Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(6), 767–775. <https://doi.org/10.1177/1040638720905833>
  28. De Andrea, M., Ravera, R., Gioia, D., Gariglio, M., & Landolfo, S. (2002). The interferon system: An overview. *European Journal of Paediatric Neurology*, 6(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1053/ejpn.2002.0573>
  29. De la Rosa, A. (2020). Encefalitis equina en el Hospital del Niño Dr. José Renán Esquivel

- (Panamá): Revisión bibliográfica y revisión de casos . *Revista Pediátrica de Panamá*, 48(2), 23–28. <https://doi.org/10.37980/im.journal.rspp.20191565>
30. de Souza Costa, M. C., Siqueira Maia, L. M., Costa de Souza, V., Gonzaga, A. M., Correa de Azevedo, V., Ramos Martins, L., Chavez Pavoni, J. H., Gomes Naveca, F., & Dezengrini Silhessarenko, R. (2019). Arbovirus investigation in patients from Mato Grosso during Zika and Chikungunya virus introduction in Brazil, 2015–2016. *Acta Tropica*, 190, 395–402. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.12.019>
  31. del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M. J., Espinosa, M., & Díaz-Orejas, R. (1998). Replication and Control of Circular Bacterial Plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), 434–464. <https://doi.org/10.1128/membr.62.2.434-464.1998>
  32. Díaz, Y., Carrera, J. P., Cerezo, L., Arauz, D., Guerra, I., Cisneros, J., Armién, B., Botello, A. M., Araúz, A. B., Gonzalez, V., López, Y., Moreno, L., López-Vergès, S., & Moreno, B. A. (2015). Chikungunya virus infection: First detection of imported and autochthonous cases in Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(3), 482–485. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0404>
  33. Dietz, W. H., Galindo, P., & Johnson, K. M. (1980). Eastern equine encephalomyelitis in Panama: The epidemiology of the 1973 epizootic. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29(1), 133–140. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1980.29.133>
  34. Evans, M. J. (1993). Transgenesis techniques: Principles and protocols. *Trends in Genetics*, 9(10), 370. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(93\)90049-n](https://doi.org/10.1016/0168-9525(93)90049-n)
  35. Feinbaum, R. (1998). VECTORS DERIVED FROM PLASMIDS Introduction to Plasmid Biology. *Current Protocols in Molecular Biology*, 1–17.
  36. Fritsch, S. D., & Weichhart, T. (2016). Effects of interferons and viruses on metabolism. *Frontiers in Immunology*, 7(DEC), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00630>
  37. Gardner, C. L., Burke, C. W., Tesfay, M. Z., Glass, P. J., Klimstra, W. B., & Ryman, K. D. (2008). Eastern and Venezuelan Equine Encephalitis Viruses Differ in Their Ability To Infect Dendritic Cells and Macrophages: Impact of Altered Cell Tropism on Pathogenesis. *Journal of Virology*, 82(21), 10634–10646. <https://doi.org/10.1128/JVI.01323-08>
  38. Gil, L. H. V. G., Magalhaes, T., Santos, B. S. A. S., Oliveira, L. V., Oliveira-Filho, E. F., Cunha, J. L. R., Fraiha, A. L. S., Rocha, B. M. M., Longo, B. C., Ecco, R., Faria, G. C., Furtini, R., Drumond, S. R. M., Maranhão, R. P. A., Lobato, Z. I. P., Guedes, M. I. M. C., Teixeira, R. B. C., & Costa, E. A. (2021). Active circulation of madariaga virus, a member of the eastern equine encephalitis virus complex, in northeast Brazil. *Pathogens*, 10(8), 1–13. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080983>
  39. Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Screening bacterial colonies using X-Gal and IPTG: A-complementation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(12), 790–794. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot101329>
  40. Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
  41. Holmes, A. C., Basore, K., Fremont, D. H., & Diamond, M. S. (2020). A molecular understanding of alphavirus entry. *PLoS Pathogens*, 16(10), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008876>
  42. Hull, R., Nattanmai, S., Kramer, L. D., Bernard, K. a, & P, N. (2008). A duplex real-time RT-PCR assay for the detection of St. Louis encephalitis and Eastern equine encephalitis viruses. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 62(3), 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.07.004.A>
  43. Hyde, J. L., Chen, R., Trobaugh, D. W., Diamond, M. S., Weaver, S. C., Klimstra, W. B., &

- Wilusz, J. (2015). The 5' and 3' ends of alphavirus RNAs - Non-coding is not non-functional. *Virus Research*, 206, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.01.016>
44. Isaacs, A., & Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences*, 147(927), 258–267. <https://doi.org/10.1098/rspb.1957.0048>
45. Kang, X., Li, Y., Liu, H., Lin, F., Cai, X., Sun, T., Chang, G., Zhu, Q., & Yang, Y. (2010). A duplex real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for detecting western equine and eastern equine encephalitis viruses. *Virology Journal*, 7(1), 284. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-284>
46. Koyama, S., Ishii, K. J., Coban, C., & Akira, S. (2008). Innate immune response to viral infection. *Cytokine*, 43(3), 336–341. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.07.009>
47. Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2–3), 95–125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
48. Lambert, A. J., Martin, D. A., Lanciotti, R. S., & Al, L. E. T. (2003). *Detection of North American Eastern and Western Equine Encephalitis Viruses by Nucleic Acid Amplification Assays*. 41(1), 379–385. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.379>
49. Lazear, H. M., Schoggins, J. W., & Diamond, M. S. (2019). Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*, 50(4), 907–923. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.025>
50. Lednicky, J. A., White, S. K., Mavian, C. N., El Badry, M. A., Telisma, T., Salemi, M., O'Kech, B. A., Beau De Rochars, V. M., & Morris, J. G. (2019). Emergence of Madariaga virus as a cause of acute febrile illness in children, Haiti, 2015–2016. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(1), e0006972. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006972>
51. Ludert, J. E., Pujol, F. H., & Arbiza, J. (2017). Human virology in Latin America: From biology to control. *Alphavirus in Latin America and the Introduction of Chikungunya Virus*, Chapter 9(July), 169–192. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54567-7>
52. Malterer, M. B., Glass, S. J., & Newman, J. P. (2014). Interferon-stimulated genes: A complex web of host defenses. *Annual Review of Immunology*, 44(3), 735–745. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
53. Mayer, V. (1962). *Infection of Interferon-treated Virus Cells and with Eastern Equine Acid Encephalomyelitis The cells were suspended in either ( 1 ) 24 ml of the same medium as that used for the preparation of interferon ( control cultures ) or ( 2 ) 21 ml of this medium . 362, 359–362.*
54. McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., & O'Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nature Reviews Immunology*, 15(2), 87–103. <https://doi.org/10.1038/nri3787>
55. Medina, G., Gleiser, C. A., & Mackenzie, R. B. (1965). Brote de encefalomiелitis equina en la República de Panamá. *Boletín de La Oficina Sanitaria Panamericana*, 58(5), 390–394.
56. Mohammad, R. M., Muqbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H. Y., Lin, L. T., Siegelin, M. D., Fimognari, C., Kumar, N. B., Dou, Q. P., Yang, H., Samadi, A. K., Russo, G. L., Spagnuolo, C., Ray, S. K., Chakrabarti, M., Morre, J. D., Coley, H. M., Honoki, K., ... Azmi, A. S. (2015). Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 35, S78–S103. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.001>
57. Nasar, F., Palacios, G., Gorchakov, R. V., Guzman, H., Travassos Da Rosa, A. P., Savji, N., Popov, V. L., Sherman, M. B., Lipkin, W. I., Tesh, R. B., & Weaver, S. C. (2012). Eilat virus, a unique alphavirus with host range restricted to insects by RNA replication. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(36), 14622–14627. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204787109>
58. Obaldia, N., Dutary, B., Clavel, F., Zarate, J. L., Alvarez, O., Evans, E., Molina, A., Serrano, R., Villareal, A., Boyd, R. R., Gracia, A., Chalmers, F., Vega, B. J., George, M., Saa, E., Chen, C., & Giron, E. (1991). Encefalomiелitis Equina del Este, epizootia de 1986 en Panama. In *Notas Veterinarias: Vol. 1(3)* (pp. 4–7).
  59. Phelan, K., & May, K. M. (2016). Basic techniques in mammalian cell tissue culture. *Current Protocols in Toxicology*, 2016(November), A.3B.1-A.3B.22. <https://doi.org/10.1002/cptx.13>
  60. Powers, A. M. (2018). Asymptomatic or Mild Febrile Cases of Madariaga: The Base of the Iceberg? *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 67(4), 622–623. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy225>
  61. Powers, A. M., Brault, A. C., Shirako, Y., Strauss, E. G., Kang, W., Strauss, J. H., & Weaver, S. C. (2001). Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses. *Journal of Virology*, 75(21), 10118–10131. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.21.10118-10131.2001>
  62. Quilliam, D. N., Gosciminski, M., & Utpala Bandy, M. ; (2020). Eastern Equine Encephalitis Surveillance and Response, Rhode Island, 2019. *Rhode Island Medical Journal*, April, 68–70. <http://www.rimed.org/rimedicaljournal/2013/07/2013-07-37->
  63. Ramos-bello, D. (2008). *Interferón: 50 años después (1957-2007)*. 144(1), 55–65.
  64. Rao, S., & Taylor, A. (2021). Arthritogenic alphavirus capsid protein. *Life*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/life11030230>
  65. S. Jane Flint, Lynn W. Enquist, Vincent R. Racaniello, and A. M. S. (2009). Principles of Virology, Third Edition BUNDLE. In V. R. Racaniello, A. M. Skalka, S. J. Flint, & L. W. Enquist (Eds.), *Principles of Virology, Third Edition*. American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/9781555814434>
  66. Schoggins, J. W. (2019). Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annual Review of Virology*, 6, 567–584. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015756>
  67. Scott, T. W., & Weaver, S. C. (1989). *Eastern Equine Encephalomyelitis Virus : Epidemiology and Evolution of Mosquito Transmission*. 37.
  68. Simmons, J. D., White, L. J., Morrison, T. E., Montgomery, S. A., Whitmore, A. C., Johnston, R. E., & Heise, M. T. (2009). Venezuelan Equine Encephalitis Virus Disrupts STAT1 Signaling by Distinct Mechanisms Independent of Host Shutoff. *Journal of Virology*, 83(20), 10571–10581. <https://doi.org/10.1128/jvi.01041-09>
  69. Snyder, A. J., & Mukhopadhyay, S. (2012). The Alphavirus E3 Glycoprotein Functions in a Clade-Specific Manner. *Journal of Virology*, 86(24), 13609–13620. <https://doi.org/10.1128/jvi.01805-12>
  70. Stanifer, M. L., Pervolaraki, K., & Boulant, S. (2019). Differential regulation of type I and type III interferon signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms20061445>
  71. Stechina, O. S., Oria, G. I., Torres, C., Diaz, L. A., Contigiani, M., & Stein, M. (2019). First detection of madariaga virus in mosquitoes collected in a wild environment of Northeastern Argentina. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(4), 916–918. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0475>
  72. Strauss, J. H., & Strauss, E. G. (1994). The alphaviruses: Gene expression, replication, and evolution. *Microbiological Reviews*, 58(3), 491–562. <https://doi.org/10.1128/membr.58.3.491-562.1994>
  73. Tajudeen, Y. A., Oladunjoye, I. O., Mustapha, M. O., Mustapha, S. T., & Ajide-Bamigboye, N. T. (2021). Tackling the global health threat of arboviruses: An appraisal of the three holistic

- approaches to health. *Health Promotion Perspectives*, 11(4), 371–381. <https://doi.org/10.34172/hpp.2021.48>
74. Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2(5), 70–78. <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>
75. Vajjhala, P. R., Ve, T., Bentham, A., Stacey, K. J., & Kobe, B. (2017). The molecular mechanisms of signaling by cooperative assembly formation in innate immunity pathways. *Molecular Immunology*, 86, 23–37. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.02.012>
76. Vittor, A. Y., Armien, B., Gonzalez, P., Carrera, J. P., Dominguez, C., Valderrama, A., Glass, G. E., Beltran, D., Cisneros, J., Wang, E., Castillo, A., Moreno, B., & Weaver, S. C. (2016). Epidemiology of Emergent Madariaga Encephalitis in a Region with Endemic Venezuelan Equine Encephalitis: Initial Host Studies and Human Cross-Sectional Study in Darien, Panama. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004554>
77. Wallet, S., Puri, V., & Gibson, F. (2018). Linkage of Infection to Adverse Systemic Complications: Periodontal Disease, Toll-Like Receptors, and Other Pattern Recognition Systems. *Vaccines*, 6(2), 21. <https://doi.org/10.3390/vaccines6020021>
78. Weaver, S. C. (2005). Host range, amplification and arboviral disease emergence. *Archives of Virology. Supplementum*, 19, 33–44. [https://doi.org/10.1007/3-211-29981-5\\_4](https://doi.org/10.1007/3-211-29981-5_4)
79. Weaver, S. C., Hagenbaugh, A. M. Y., Bellew, L. I. Z. A., Gousset, L., Mallampalli, V., Holland, J. J., & Scott, T. W. (1994). *Evolution of Alphaviruses in the Eastern Equine Encephalomyelitis Complex*. 68(1), 158–169.
80. Weaver, S. C., Klimstra, W. B., & Ryman, K. D. (2008). Togaviruses: General Features. In *Encyclopedia of Virology* (pp. 107–116). <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00627-0>
81. Weaver, S. C., Winegar, R., Manger, I. D., & Forrester, N. L. (2012). Alphaviruses: Population genetics and determinants of emergence. *Antiviral Research*, 94(3), 242–257. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.04.002>
82. Weger-Lucarelli, J., Aliota, M. T., Wlodarchak, N., Kamlangdee, A., Swanson, R., & Osorio, J. E. (2016). Dissecting the Role of E2 Protein Domains in Alphavirus Pathogenicity. *Journal of Virology*, 90(5), 2418–2433. <https://doi.org/10.1128/jvi.02792-15>
83. Zink, S. D., Jones, S. A., Maffei, J. G., & Kramer, L. D. (2013). Quadruplex qRT-PCR assay for the simultaneous detection of Eastern equine encephalitis virus and West Nile virus. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 77(2), 129–132. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.06.019>

## **ANEXOS**

## CARTA DE COMITÉ DE BIOÉTICA

*República de Panamá*



**INSTITUTO CONMEMORATIVO GORGAS DE ESTUDIOS DE LA SALUD  
COMITÉ DE BIOÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN**

N° 169/CBI/ICGES/19  
12 de marzo de 2019

Doctora  
**SANDRA LÓPEZ VERGÉS**  
Investigador Principal

P/C:   
**DR. JUAN MIGUEL PASCALE**  
Director General del ICGES, encargado

Estimada Dra. López:

Reciba un cordial saludo. Acusamos recibo de su nota N°049-PEDP-ICGES-19 del 28 de febrero de 2019, en el cual somete el estudio titulado: **“Replicación del Virus Madariaga en células humanas e inducción de la respuesta interferón”**.

El Comité considera que el estudio no requiere la evaluación bioética del protocolo, tomando en cuenta que no implica datos, muestras o interacción con sujetos humanos.

Atentamente,

  
**DRA. MARÍA EUGENIA B. DE ANTINORI**  
Presidenta del Comité de Bioética de la  
Investigación del Instituto Conmemorativo  
Gorgas de Estudios de la Salud

jdeq

## **PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ARN VIRAL (QIAamp Viral RNA Mini)**

### **Preparación de Tampones:**

**Preparación de “Carrier”:** Añadir Buffer AVE al tubo que contiene el Carrier liofilizado para obtener una solución de 1 µg/µl (es decir, agregue 310 µl de tampón AVE a 310 µg de Carrier), divídalo en alícuotas de tamaño adecuado y guárdelo a una temperatura de -30 a -15 °C. No descongelar las alícuotas de Carrier más de 3 veces.

**Preparación de tampón AVL:** Calcular cuantas muestras se van a analizar y en base a eso, realizar mezcla necesaria de Carrier con tampón AVL. Tomando cuenta que para una muestra se requiere 5.6uL de Carrier + 560uL de AVL. Esta solución debe prepararse en fresco y es estable a 2–8 °C hasta por 48 h.

- Verifique el tampón AVL para ver si hay precipitado y, si es necesario, incube a 80°C hasta que se disuelva el precipitado.

**Preparación de tampón AW1:** Según la presentación añadir el volumen de etanol (96-100%) que indique el frasco. Para el catálogo 52904 añadir 25mL de etanol. El tampón AW1 es estable durante 1 año cuando se almacena cerrado a temperatura ambiente, pero solo hasta la fecha de vencimiento del kit.

**Preparación de tampón AW2:** Según la presentación añadir el volumen de etanol (96-100%) que indique el frasco. Para el catálogo 52904 añadir 30mL de etanol. El tampón AW1 es estable durante 1 año cuando se almacena cerrado a temperatura ambiente, pero solo hasta la fecha de vencimiento del kit.

### **Procedimiento:**

1. Mezcle 5.6uL de solución Carrier con 560uL de tampón AVL en un microtubo de 1.5mL
2. Añada 140 µl de plasma, suero, orina, sobrenadante de cultivo celular o líquido corporal libre de células al Buffer AVL-carrier. Mezclar por pulso-vórtex durante 15 s. Nota: Para asegurar una lisis eficiente, es esencial que la muestra se mezcle completamente con Buffer AVL para producir una solución homogénea. Muestras congeladas que solo han sido descongeladas una vez también se puede utilizar.
3. Incube a temperatura ambiente durante 10 min.

4. Centrifugue brevemente el tubo para eliminar las gotas del interior de la tapa.
5. Agregue 560  $\mu$ l de etanol (96–100 %) a la muestra y mezcle mediante agitación de vortex pulsado durante 15seg. Después mezclar, centrifugar brevemente el tubo para eliminar las gotas del interior de la tapa. Nota: Use solo etanol, ya que otros alcoholes pueden reducir el rendimiento y la pureza del ARN.
6. Aplique con cuidado 630  $\mu$ l de la solución del paso 5 a la columna QIAamp Mini (en un tubo colector) sin mojar el borde. Cerrar la tapa y centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 min. Coloque la columna QIAamp Mini en un tubo de recolector limpio de 2 ml, y deseche el tubo que contiene el filtrado. Nota: Cierre cada columna de centrifugado para evitar la contaminación cruzada durante el centrifugado.
7. Abra con cuidado la columna QIAamp Mini y repita el paso 6.
8. Abra con cuidado la columna QIAamp Mini y agregue 500  $\mu$ l de tampón AW1. Cierra la tapa, y centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 min. Coloque la columna QIAamp Mini en un tubo recolector limpio y deseche el tubo que contiene el filtrado.
9. Abra con cuidado la columna QIAamp Mini y agregue 500  $\mu$ l de tampón AW2. Cierre la tapa y centrifuge a máxima velocidad (20.000 x g; 14.000 rpm) durante 3 min.
10. Recomendado: Coloque la columna QIAamp Mini en un nuevo tubo de recolección de 2 ml (no provisto) y deseche el tubo de recolección viejo con el filtrado. Centrifugue a toda velocidad durante 1 minuto.
11. Coloque la columna QIAamp Mini en un microtubo limpio de 1,5 ml (no incluido). Deseche el viejo tubo de recolección que contiene el filtrado. Abra con cuidado el QIAamp Mini columna y añada 60  $\mu$ l de tampón AVE equilibrado a temperatura ambiente. Cierre la tapa y deje incubar a temperatura ambiente durante 1 min.
12. Centrifugue a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 min.

## **QIAQUICK PCR PURIFICATION KIT (catálogo 28106)**

Este protocolo es para la purificación de hasta 10 µg de productos PCR (100 pb a 10 kb en tamaño).

### **Preparación de Soluciones**

- Agregue etanol (96–100 %) al tampón PE antes de usar (consulte la etiqueta del frasco para conocer el volumen).
- Todos los pasos de centrifugación se llevan a cabo a 17 900 x g (13 000 rpm) en una microcentrífuga de sobremesa a temperatura ambiente.
- Agregue indicador de pH I en volumen 1:250 al tampón PB. El color amarillo del Buffer PB con pH, el indicador I indica un pH  $\leq 7,5$ . La adsorción de ADN a la membrana sólo es eficiente a pH  $\leq 7,5$ . Si el producto PCR purificado se va a utilizar en aplicaciones de microarrays sensibles, puede ser beneficioso utilizar Buffer PB sin la adición del indicador de pH I; no añada Indicador de pH I para amortiguar alícuotas.

### **Procedimiento**

1. Agregue 5 volúmenes de Buffer PB a 1 volumen de la reacción de PCR y mezcle. Si el color de la mezcla es de color naranja o violeta, agregue 10 µl de acetato de sodio 3 M, pH 5,0, y mezcle. El color de la mezcla se volverá amarilla.
2. Coloque una columna QIAquick en un tubo de recogida de 2 ml proporcionado o en  $\pi$  una cámara de vacío colector. Para obtener detalles sobre cómo configurar un colector de vacío, consulte el QIAquick Spin Manual.
3. Para unir el ADN, aplique la muestra a la columna QIAquick y centrifugue durante 30–60 s. Deseche el flujo continuo y vuelva a colocar la columna QIAquick en el mismo tubo.
4. Para lavar, añada 750 µl de tampón PE a la columna QIAquick y centrifugue durante 30–60 s.
5. Centrifugar la columna QIAquick una vez más en el tubo de recogida de 2 ml proporcionado durante 1 min para eliminar el tampón de lavado residual.

6. Coloque cada columna QIAquick en un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml.
7. Para eluir el ADN, agregue 50  $\mu$ l de tampón EB (Tris·Cl 10 mM, pH 8,5) o agua (pH 7,0–8,5) al centro de la membrana QIAquick y centrifugue la columna durante 1 min. para aumentar concentración de ADN, agregue 30  $\mu$ l de tampón de elución al centro de la membrana QIAquick, deje la columna reposar durante 1 min y luego centrifugar.
8. Si el ADN purificado se va a analizar en un gel, agregue 1 volumen de Loading Dye a 5 volúmenes de ADN purificado. Mezcle la solución pipeteando hacia arriba y hacia abajo antes de cargar el gel

## **PROTOCOLO DE EXTRACCION MINIPREPS**

- Elija una sola colonia de una placa selectiva recién sembrada e inocule un cultivo de 1–5 ml de medio LB que contiene el antibiótico selectivo adecuado. Incubar por 12–16 h a 37 °C con agitación vigorosa.

- Coseche las células bacterianas por centrifugación a >8000 rpm (6800 x g) en un microcentrífuga de sobremesa durante 3 min a temperatura ambiente.

Las células bacterianas también se pueden recolectar en tubos de centrífuga de 15 ml a 5400 x g para 10 min a 4°C. Elimine todos los restos de sobrenadante invirtiendo el tubo de centrífuga abierto hasta que todo el medio haya sido drenado

### **Preparación de Soluciones:**

- Agregue la solución de ARNasa A proporcionada al tampón P1 antes de usar. Usar 1 vial de ARNasa A por botella Tampón P1 para una concentración final de 100 µg/ml. Mezclar y almacenar a 2–8°C.
- Agregue etanol (96–100 %) al tampón PE antes de usar (consulte la etiqueta del frasco para conocer el volumen).
- Verifique los tampones P2 y N3 antes de usarlos para la precipitación de sal. Redisuelva cualquier precipitado por calentamiento a 37°C. No agite vigorosamente el tampón P2. Cierre el frasco que contiene el tampón P2 inmediatamente después de su uso para evitar la acidificación del tampón.

Opcional: agregue el reactivo LyseBlue provisto al tampón P1 y mezcle antes de usar. Usar 1 vial Reactivo LyseBlue por botella Tampón P1 para una dilución final de 1:1000

### **Procedimiento:**

1. Vuelva a suspender las células bacterianas sedimentadas en 250 µl de tampón P1 y transfíralas a un microtubo.
2. Añada 250 µl de tampón P2 y mezcle bien invirtiendo el tubo de 4 a 6 veces. Mezclar suavemente invirtiendo el tubo. No agite en vórtice, No permita que la reacción de lisis continúe durante más de 5 min. (Si se ha agregado LyseBlue al tampón P1, la suspensión de células se volverá azul después de la adición del tampón P2. La mezcla debe dar como resultado una suspensión de color homogéneo).

3. Añadir 350 µl de tampón N3. Mezcle inmediata y completamente invirtiendo el tubo de 4 a 6 veces. Para evitar la precipitación localizada, mezcle bien la solución, inmediatamente después de la adición del tampón N3. Los volúmenes de cultivo grandes (p. ej.,  $\geq 5$  ml) pueden requerir una inversión de hasta 10 veces.
4. Centrifugar durante 10 min a 13 000 rpm ( $\sim 17\,900 \times g$ ) en una microcentrífuga de mesa.
5. Aplique 800 µl del sobrenadante del paso 4 a la columna de centrifugación QIAprep 2.0 por pipeteo.
6. Centrifugar durante 30–60 s. Deseche el flujo
7. Recomendado: Lave la columna de centrifugación QIAprep 2.0 agregando 0,5 ml de tampón PB y centrifugar durante 30–60 s. Deseche el flujo
8. Lave la columna de centrifugación QIAprep 2.0 agregando 0,75 ml de tampón PE y centrifugando 30–60 s.
9. Deseche el flujo continuo y centrifugue a máxima velocidad durante 1 minuto adicional para eliminar tampón de lavado residual
10. Coloque la columna de centrifugación QIAprep 2.0 en un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml. para eluir ADN, añada 50 µl de tampón EB (Tris·Cl 10 mM, pH 8,5) o agua al centro de cada Columna giratoria QIAprep 2.0, deje reposar durante 1 min y centrifugue durante 1 min.