



**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ  
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
BIOMEDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA**

**TRABAJO DE TESIS**

**SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS Y  
HEMOFLAGELADOS EN PEREZOSOS DE PANAMÁ  
OESTE 2013 – 2018.**

**Por:  
RITA J. CORRALES**

**DIRECTORES DE TESIS:  
Dr. SANDRA LÓPEZ-VERGES  
Dr. AZAEL SALDAÑA**

**Tesis presentada como uno  
de los requisitos para optar  
al grado de Maestría en  
Ciencias Biomédicas**

**PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ  
2023**

## **DEDICATORIA**

*Dedico este trabajo a mi madre Juliana Caballero, a mi padre Genaro Corrales y a mi hermano Pitter Corrales ya que me enseñaron a ser perseverante y paciente en las alegrías y las penas. Sin su apoyo incondicional esta obra no se hubiera podido lograr.*

## AGRADECIMIENTO

Agradezco en Primer Lugar a mis mentores en este trabajo de grado, la Dra. Sandra Lopez-Verges, jefa del Departamento de Investigación en Virología y Biotecnología del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES) y el Dr. Azael Saldaña profesor titular de Parasitología del del Departamento de Microbiología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá (UP) por la confianza depositada en mí para conferirme este delicado e importante tema. Su inteligencia, sabiduría y en principio darme un espacio físico donde pude desarrollar en primera instancia esta investigación.

Agradezco también la asesoría técnica y científica del Departamento de Parasitología e Investigación en especial a la Licda. Vanesa Pineda, por sus consejos y otorgarme la habilidad de trabajar en grupo en estos laboratorios. Además, agradezco al Departamento de Investigación en Virología y Biotecnología por su apoyo en la realización de los experimentos para este trabajo de grado y su apoyo incondicional.

De igual manera al grupo de Proyecto Dengue y Arbovirosis Urbanas por su constante colaboración en este trabajo. En especial a Jeymi Trujillo por su excelente ayuda y disposición en temas administrativos. Además, a el apoyo estadístico de Josefrancisco Galue y Carlos Lezcano para los análisis que se realizaron en este trabajo.

También agradezco a CREATE-NEO por haber aportado la oportunidad de viajar como presentadora de poster al Congreso Anual de la Sociedad Americana de Medicina Tropical e Higiene (TropMed 2022) que fue celebrado en Seattle, Estados Unidos en el año 2022. Y Zeuz Capitán por la excelente gestión en este proceso.

Siempre conservaré un especial agradecimiento a la Mgstr. Yamilka Díaz (Dpto. de investigación en Virología y Biotecnología del ICGES), a la Licda. Mabel Martínez (Depto. de Salud Poblacional/ Sección Inmunovirología, LCRSP del ICGES), Dra. Rosa De Jesús (INDICASAT- AIP), Lic. Yaneth Pittí (Dpto. de investigación en Virología y Biotecnología del ICGES), Lisseth Saénz (Dpto. de investigación en Virología y Biotecnología del ICGES), Dr. Kadir González (Dpto. de Parasitología e Investigación) y en especial a la Dra. Griselda Arteaga, (Profesora de Inmunología del Departamento de Microbiología Humana de la Facultad de Medicina), cuyos consejos me han motivado a terminar mi proyecto y continuar en el área de la Investigación.

Por último, un agradecimiento a la Secretaria Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación-SENACYT, que por medio del Sistema Nacional de Investigación-SNI, me pudo brindar los fondos necesarios para ejecutar este trabajo.

A todos ellos, mil gracias.

# INDICE GENERAL

<i>RESUMEN</i> .....	<i>viii</i>
<i>ABSTRACT</i> .....	<i>ix</i>
<b><i>CAPITULO I: INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO</i></b> .....	<b><i>11</i></b>
<b>1.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2 OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
1.2.1 Objetivos Generales:.....	14
1.2.2 Objetivos Específicos:.....	14
<b>1.3 HIPOTESIS</b> .....	<b>14</b>
<b>1.4 MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
1.4.1 Enfermedades Zoonóticas, Generalidades.....	15
1.4.2 Clasificación de Enfermedades Zoonóticas: Virus y Parásitos.....	16
1.4.3 Enfermedades Zoonóticas Emergentes y Reemergentes .....	18
1.4.4 Rol de los Vectores .....	19
1.4.5 Rol de los Reservorios.....	23
1.4.6 Perezosos .....	26
1.4.7 Arbovirus .....	33
1.4.8 Hemoflagelados Parásitos .....	46
<b><i>CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS</i></b> .....	<b><i>54</i></b>
<b>2.1 METODOLOGÍA</b> .....	<b>55</b>
2.1.1 Tipo de Estudio .....	55
2.1.2 Población.....	55
2.1.3 Descripción del área de muestreo.....	55
2.1.4 Obtención de la muestra.....	55
2.1.5 Determinación virológica .....	58
2.1.5.1 Materiales y métodos .....	58
2.1.5.2 Preparación de líneas celulares.....	59
2.1.5.3 Producción viral .....	62
2.1.5.4 Titulación viral .....	65
2.1.5.5 Prueba de Neutralización en Placa (PRNT) .....	67
2.1.6 Determinación virológica Determinación Parasitológica.....	69
2.1.6.1 Materiales y métodos .....	69
2.1.6.2 Obtención del Antígeno .....	70
2.1.6.3 Producción de anticuerpos policlonales anti-Inmunoglobulinas de perezoso.....	70
2.1.6.4 Detección de sueros anti-hemoflagelados en perezosos .....	75
<b><i>CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i></b> .....	<b><i>77</i></b>
<b>3.1 RESULTADOS</b> .....	<b>78</b>
<b>3.2 DISCUSIÓN</b> .....	<b>92</b>
<b><i>CAPÍTULO IV: CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES</i></b> .....	<b><i>100</i></b>
<b>4.1 CONCLUSIONES</b> .....	<b>101</b>
<b>4.2 RECOMENDACIONES</b> .....	<b>102</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>103</b>

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	<i>Ejemplos de prevalencia de enfermedades zoonóticas y transmitidas por vectores en Panamá.....</i>	19
FIGURA 2.	<i>Ejemplos de Mosquitos- vector, Familia/ virus, ciclo de transmisión (Pando et al., 2020).....</i>	21
FIGURA 3.	<i>Familia/ virus, mosquito y hospedero vertebrado de arbovirus (Marí &amp; Peydró, 2010). .....</i>	24
FIGURA 4.	<i>Distribución de Perezosos en América Central y América del Sur .....</i>	28
FIGURA 5.	<i>(1) Choleopus hoffmanni (Tomada por Rita Corrales) y (2) Bradypus variegatus (Tomada por Brian Gratwicke) .....</i>	28
FIGURA 6.	<i>Patrones de transmisión eco-epidemiológica de Trypanosoma cruzi en Panamá.....</i>	32
FIGURA 7.	<i>División de familias de Arbovirus: Los arbovirus se dividen en 3 grandes familias .....</i>	33
FIGURA 8.	<i>Mecanismos de transmisión en virus transmitidos por mosquitos. ....</i>	34
FIGURA 9.	<i>Ciclos de transmisión endémica y epidémica del virus de la encefalitis equina venezolana.....</i>	35
FIGURA 10.	<i>Algunos Arbovirus detectados o identificados en Panamá.....</i>	44
FIGURA 11.	<i>Ciclos de transmisión de los arbovirus y diferentes estrategias de vigilancia.....</i>	46
FIGURA 12.	<i>Estadios de los hemoflagelados que infectan al humano .....</i>	47
FIGURA 13.	<i>La leishmaniosis se transmite por la picadura de hembras infectadas de Phlebotomus.....</i>	49
FIGURA 14.	<i>El ciclo inicia cuando el insecto vector pica al ser humano, o a cualquier otro mamífero reservorio y posteriormente defeca .....</i>	51
FIGURA 15.	<i>Procedimiento de toma de muestra sanguínea a perezosos (Choleopus hoffmanni y Bradypus variegatus).....</i>	56
FIGURA 16.	<i>Mapa que ubica a las Comunidades de las Pavas (La Chorrera), Trinidad de las Minas y Lídice (Capira). .....</i>	57
FIGURA 17.	<i>Mapa de Cubierta Forestal cercanas a las áreas donde se realizaron las capturas de perezosos... 57</i>	57
FIGURA 18.	<i>Células Vero (1) y BHK (2) en 100 % de Confluencia en flask de 75 cm<sup>3</sup> con MEM 1x 10% SFB. ....</i>	61
FIGURA 19.	<i>Control Negativo de Células VERO (1) , Células VERO infectadas con CHIKV a los 4 días (2). .</i>	63
FIGURA 20.	<i>Control Negativo de Células BHK (1) , Células BHK infectadas con DENV-2 a los 6 días (2). ....</i>	64
FIGURA 21.	<i>Primera fase de la titulación .....</i>	65
FIGURA 22.	<i>Segunda fase de la titulación .....</i>	66
FIGURA 23.	<i>Preparación de dilución de muestra .....</i>	67
FIGURA 24.	<i>Stock viral + sueros diluidos (interacción Antígeno-Anticuerpo) .....</i>	68
FIGURA 25.	<i>Titulación del Stock de virus .....</i>	68
FIGURA 26.	<i>Diálisis del precipitado con sulfato de amonio 50% del suero de perezosos (anticuerpos).....</i>	71
FIGURA 27.	<i>Proteínas reducidas (se indican las inmunoglobulinas a 150 kDa, 50 kDa y 25 kDa).....</i>	72
FIGURA 28.	<i>Tinción de Copper Staining o de CICu<sub>2</sub>.....</i>	73
FIGURA 29.	<i>Corte de Bandas.....</i>	74
FIGURA 30.	<i>Evaluación de la especificidad del suero policlonal de ratón anti-Igs de perezosos mediante la técnica de Western Blotting.....</i>	75
FIGURA 31.	<i>Esquema de detección mediante Western Blot de anticuerpos específicos anti hemoflagelados en suero de perezosos. ....</i>	76
FIGURA 32.	<i>Titulos de Virus utilizados para la PRNT.....</i>	80
FIGURA 33.	<i>Ejemplos de PRNT Positivos con sus títulos .....</i>	81
FIGURA 34.	<i>Pooles de anti Igs de perezoso capaces de reconocer la proteína purificada y deznaturalizada.....</i>	85
FIGURA 35.	<i>Diluciones y reconocimiento de suero de perezosos por anti-50 kDa .....</i>	86
FIGURA 36.	<i>Diluciones y reconocimiento de suero de perezosos por anti-150 kDa .....</i>	86
FIGURA 37.	<i>Presencia de sueros positivos para T. rangeli, T. cruzi y L. panamensis .....</i>	87

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	<i>Clasificación de Enfermedades zoonóticas según agentes virales y parasitarios (Chomel, 2009; CDC, 2015).....</i>	17
Tabla 2.	<i>Especies de flebótomos encontradas en Panamá Central.....</i>	22
Tabla 3.	<i>Diferentes mamíferos infectados por T. rangeli.....</i>	52
Tabla 4.	<i>Materiales y Reactivos para procedimientos virológicos .....</i>	58
Tabla 5.	<i>Diluciones en preparación de platos de líneas celulares .....</i>	62
Tabla 6.	<i>Materiales y Reactivos para procedimientos parasitológicos .....</i>	69
Tabla 7.	<i>Características de los perezosos colectado en el periodo de 2013 a 2018, para arbovirus (n=60)..</i>	78
Tabla 8.	<i>Títulos de anticuerpos neutralizante para 10 arbovirus por técnica de PRNT en muestras de perezosos (n=60). .....</i>	82
Tabla 9.	<i>Características asociadas a la seroprevalencia por Arbovirus en perezosos, análisis bivariado* .</i>	83
Tabla 10.	<i>Características de los perezosos colectado en el periodo de 2013 a 2018, para hemoparasitos (n=51).....</i>	84
Tabla 11.	<i>Muestras Positivas de perezos para T. rangeli en sus distintos Pesos Moleculares .....</i>	88
Tabla 12.	<i>Frecuencias de pesos Moleculares (PM) de proteínas de T. rangeli en muestras de perezosos. ....</i>	89
Tabla 13.	<i>Peso Molecular de muestras positivas en 4 perezosos para T.cruzi y T. rangeli .....</i>	90
Tabla 14.	<i>Características asociadas de seroprevalencia de hemoflagelados en perezosos, análisis bivariado* .....</i>	91

## GLOSARIO

1	<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
2	<b>EID</b>	Enfermedades Infecciosas Emergentes
3	<b>VEEV</b>	Virus de la Encefalitis Equina Venezolana
4	<b>DENV-1</b>	Virus del Dengue serotipo 1
5	<b>DENV-2</b>	Virus del Dengue serotipo 2
6	<b>DENV-3</b>	Virus del Dengue serotipo 3
7	<b>DENV-4</b>	Virus del Dengue serotipo 4
8	<b>ICGES</b>	Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud
9	<b>MIDA</b>	Ministerio de Desarrollo Agropecuario
10	<b>CHIKV</b>	Virus Chikungunya
11	<b>YFV</b>	Virus de la Fiebre Amarilla
12	<b>ZIKV</b>	Virus del Zika
13	<b>SIDA</b>	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
14	<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
15	<b>MAYV</b>	Virus Mayaro
16	<b>UNAV</b>	Virus UNA
17	<b>MADV</b>	Virus Madariaga
18	<b>PTV</b>	Virus Punta Toro
19	<b>BTV</b>	Virus Lengua Azul
20	<b>EHDV</b>	Enfermedad Hemorrágica Epidémica
21	<b>CGLV</b>	Virus Changuinola
22	<b>EEEV</b>	Virus de la Encefalitis Equina del Este
23	<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
24	<b>PRNT</b>	Técnica de Neutralización en Placa
25	<b>BHK</b>	Riño de Hámster Bebé
26	<b>MEM</b>	Medio Mínimo Esencial
27	<b>NC</b>	Nitrocelulosa
28	<b>RP</b>	Razón de Prevalencia
29	<b>FRA</b>	Fracción Rica en Anticuerpos
30	<b>IGS</b>	Inmunoglobulinas
31	<b>DTT</b>	Ditiotreitol
32	<b>CFW</b>	Ratón Swiss Webster

## RESUMEN

Panamá ha jugado un papel importante en el descubrimiento y control de enfermedades zoonóticas emergentes con impacto en la salud pública. Estos agentes etiológicos con potencial para causar brotes involucran a diferentes reservorios, como los perezosos *Choleopus* spp. y *Bradypus* spp. Los perezosos se vinculan con los ciclos biológicos de agentes parasitarios como *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* y *Leishmania* spp. y de un gran número de arbovirus. A pesar del aislamiento de *T. cruzi*, *T. rangeli* y de arbovirus como el Oropuche, el virus del grupo de Punta Toro (PTV) y el virus Utive en la década de 1980, se desconoce la situación eco epidemiológica actual de los perezosos y principalmente su papel como reservorios en Panamá. Este estudio tiene como objetivo principal determinar la seroprevalencia actual frente a arbovirus y parásitos tripanosomátidos con potencial epizoótico en 50 perezosos capturados en áreas rurales de la provincia de Panamá Oeste (La Chorrera y Capira) endémicas para enfermedad de Chagas, Leishmaniasis y Dengue. Para la detección de anticuerpos neutralizantes contra arbovirus: PTV (grupo de virus de Punta Toro), Madariaga (MADV), Mayaro (MAYV), Encefalitis Equina Venezolana (VEEV), Una (UNAV BT 1495), Chikungunya (CHIKV), Fiebre Amarilla (YFV), Dengue serotipo 2 (DENV-2) y los virus Pan Sloth 149 y D50 del género Orbivirus, se utilizó el ensayo de neutralización en placa. Para determinar la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi*, *Leishmania* spp. y *T. rangeli*, se utilizó la metodología de Western Blotting (WB). Como no se disponía de un anticuerpo anti-perezoso comercial, se procedió a inmunizar ratones CFW, utilizando las proteínas de inmunoglobulina completa (150kDa), la cadena Pesada (50Kda) y la cadena Ligera (25 kDa), purificadas por electroforesis SDS-PAGE. Los sueros hiperinmunes generados fueron utilizados como anticuerpos secundarios en la técnica de WB. Los resultados del PRNT indican que el 6.7% de los sueros de los perezosos tienen anticuerpos neutralizantes para el VEEV, el 6.7% para el MADV, el 23.3 % para el Pan Sloth 149, 53.3 % Pan-Sloth D50, mientras que todos fueron negativos para el UNAV, el MAYV, CHIKV, PTV Y DENV-2. La evaluación/estandarización de los antisueros hiperinmunes anti-50 kDa/25 kDa y 150 kDa reveló que el más eficaz en el reconocimiento de las inmunoglobulinas nativas era el anti-150 kDa. Con este antisuero se pudo determinar que el 7.8 % de los perezosos analizados presentaron anticuerpos contra *T. cruzi*, el 5.9 % para *L. panamensis* y el 78.5 % contra *T. rangeli*. La presencia de arbovirus zoonóticos y tripanosomátidos con potencial emergente en los perezosos de la provincia de Panamá Oeste, región sometida a una creciente deforestación y urbanización, sugiere que existe un factor de riesgo de emergencia de muchos de estos patógenos.

## ABSTRACT

Panama has played an important role in the discovery and control of emerging zoonotic diseases with public health impact. These etiological agents with the potential to cause outbreaks involve different reservoirs, such as sloths *Choleopus* spp. and *Bradypus* spp. Sloths are linked to the biological cycles of parasitic agents such as *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. and of many arboviruses. Despite the isolation of *T. cruzi*, *T. rangeli* and arboviruses such as Oropuche, Punta Toro group virus (PTV) and Uti virus in the 1980s, the current eco epidemiological situation of sloths and mainly their role as reservoirs in Panama is unknown. The main objective of this study is to determine the current seroprevalence against arboviruses and trypanosomatids parasites with epizootic potential in 50 sloths captured in rural areas of the province of West Panama (La Chorrera and Capira) endemic for Chagas disease, Leishmaniasis and Dengue. For the detection of neutralizing antibodies against arboviruses: PTV (Punta Toro virus group), Madariaga (MADV), Mayaro (MAYV), Venezuelan Equine Encephalitis (VEEV), Una (UNAV BT 1495), Chikungunya (CHIKV), Yellow Fever (YFV), Dengue serotype 2 (DENV-2) and the Pan Sloth 149 and D50 viruses of the genus Orbivirus, the plaque neutralization assay was used. Western blotting (WB) methodology was used to determine the presence of antibodies against *T. cruzi*, *Leishmania* spp. and *T. rangeli*. As no commercial anti-sloth antibody was available, CFW mice were immunized using the complete immunoglobulin proteins (150kDa), the heavy chain (50kDa) and the light chain (25 kDa), purified by SDS-PAGE electrophoresis. The generated hyperimmune sera were used as secondary antibodies in the WB technique. PRNT results indicate that 6.7% of the sloth sera have neutralizing antibodies for VEEV, 6.7% for MADV, 23.3 % for Pan Sloth 149, 53.3 % Pan-sloth D50, while all were negative for UNAV, MAYV, CHIKV, PTV and DENV-2. Evaluation/standardization of the hyperimmune anti-50 kDa/25 kDa and 150 kDa antisera revealed that the most effective in recognizing native immunoglobulins was the anti-150 kDa. With this antiserum it was possible to determine that 7.8 % of the sloths tested showed antibodies against *T. cruzi*, 5.9 % for *L. panamensis* and 78.5 % against *T. rangeli*. The presence of zoonotic arboviruses and trypanosomatids with emerging potential in sloths in the province of West Panama, a region subject to increasing deforestation and urbanization, suggests that there is a risk factor for the emergence of many of these pathogens.

CAPITULO I:  
INTRODUCCIÓN Y  
MARCO TEÓRICO

## 1.1 INTRODUCCIÓN

El entorno que comparte el ser humano con diversas especies de animales silvestres y domésticos tiene un impacto en el desarrollo de enfermedades zoonóticas (*World Health Organization (WHO), 2019*). Estas se han visto descritas desde la antigüedad, las cuales estiman ser un 60% de las enfermedades transmitidas por patógenos (ej. leptospirosis, cisticercosis, equinococosis, toxoplasmosis, ántrax, brucelosis, rabia, fiebre Q, enfermedad de Chagas, entre otras) compartidos con animales salvajes o domésticos (*Karesh et al., 2012*). Dicha relación humano-animal, da origen a estas infecciones emergentes consideradas en la actualidad como un reto para la salud pública. El poco registro y lo difícil que es detectar el lugar de origen de estas enfermedades, sobre todo en lugares donde el acceso a la atención médica es limitado, complica su identificación, control y eliminación (*Johnson et al., 2020*). Lo que dió inicio a diferentes iniciativas como es: “ONE HEALTH” (Una Salud) en donde surge la unión de la OMS (Organización Mundial de la Salud), la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) y la OIE (la Organización Mundial de Sanidad Animal) (*Humboldt-Dachroeden et al., 2020*) para coordinar planes estratégicos de forma conjunta contra enfermedades zoonóticas y emergentes (*Humboldt-Dachroeden et al., 2020*).

Los reservorios animales tienen un papel fundamental en el mantenimiento de ciclos enzoóticos de microorganismos (virus, bacterias, parásitos y hongos). Los reservorios silvestres aparecen como una condición esencial de la persistencia de las zoonosis en una determinada área geográfica e incluso se atribuye que la intensidad de ciertas transmisiones no sólo tiene relación con el vector, sino más bien con la densidad de reservorios animales (*Cabello C & Cabello C, 2008; Calzada et al., 2015*). El mundo está experimentando un aumento de nuevas infecciones. Esto se debe principalmente a los cambios provocados por el hombre en la biosfera y la globalización. Un ejemplo clave es la pandemia por COVID-19, en donde un agente biológico patogénico (SARS-CoV2) tuvo la habilidad de transmitirse al ser humano, lograr adaptarse rápidamente y con las vías disponibles para su rápida diseminación. Una vez más, la disrupción de los entornos ecológicos de fauna silvestre ha resultado en la exposición de población humana a un

nuevo virus (SARS-CoV2) para el que toda la humanidad era susceptible (*Neumann & Kawaoka, 2019*) antes de la vacunación.

El calentamiento global, el “desarrollo” irrestricto de los recursos naturales como los bosques y la pesca, la urbanización, la migración humana y la industrialización de la cría de animales han causado la destrucción y fragmentación del medio ambiente. Estos cambios en la biosfera conducen al surgimiento local de biomas naturales zoonóticas y sus interacciones con animales domésticos y humanos (*Cabello C & Cabello C, 2008*).

Hay reservorios silvestres en zonas intervenidas, como los perezosos (*Choloepus spp.* y *Bradypus spp.*), a los cuales se atribuye una vinculación a distintas enfermedades (leishmaniasis y enfermedad de Chagas, entre otros) que pueden llegar a infectarlos hasta cierto punto sin expresar síntomas y signos de infección. Su metabolismo lento podría estar asociado a una viremia de larga duración para muchos virus y parásitos, lo que podría aumentar la estabilidad de la transmisión. También se ven vinculados en diferentes ciclos de vidas como un probable huésped importante.

Una teoría es que “el descansar sujetado de sus garras y sus movimientos lentos evita que elimine rápidamente insectos (ácaros, triatominos, mosquitos, entre otros) que pueden alimentarse de su sangre” y a su vez transmitirle patógenos. Algunos de estos microorganismos patógenos que se han detectado como capaces de infectar los perezosos son algunos arbovirus (Punta Toro Virus, Utive virus, entre otros) y hemoparásitos (*Leishmania spp.*, *Trypanosoma spp.*, entre otros) (*Seymour et al., 1982*) que han sido aislados de estos.

Por lo tanto, el estudiar la presencia de anticuerpos específicos en reservorios como los perezosos nos ayudaría entender la presencia y frecuencia de interacción de los perezosos con estos agentes (virus y parásitos) implicados en dichas enfermedades y su potencial importancia en el ciclo de vida de los patógenos. Esto permitiría mejorar el conocimiento necesario para la prevención de estas enfermedades zoonóticas, al implementar vigilancias epidemiológicas activas y pasivas de los animales silvestres aplicando una amplia gama de herramientas auxiliares.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivos Generales:

- Determinar la seroprevalencia frente a arbovirus y parásitos tripanosómатidos con potencial epizootico en muestras de suero de perezosos capturados en áreas rurales de la provincia de Panamá Oeste (La Chorrera y Capira) entre los años 2013 a 2018.

### 1.2.2 Objetivos Específicos:

- Demostrar la presencia y frecuencia de anticuerpos neutralizantes contra por lo menos 10 distintos tipos de arbovirus (*Madariaga virus*, *Mayaro virus*, *virus de la Encefalitis equina venezolana*, *Una virus*, *Chikungunya*, *Virus de la Fiebre amarilla*, *Dengue 2 virus*, *Pan-sloth D50*, *Pan-Sloth 149* y *Punta Toro Virus*) por medio de prueba de neutralización por reducción de placa.
- Producir y estandarizar un suero hiperinmune murino anti-inmuoglobulinas de perezoso.
- Determinar la presencia y frecuencia de anticuerpos contra *T. cruzi*, *T. rangeli* y *Leishmania spp.* en perezosos mediante la técnica de Western Blotting.

## 1.3 HIPOTESIS

Se espera demostrar la presencia y frecuencia de la respuesta inmune humoral de perezosos (*Choloepus spp.* y *Bradypus spp.*) específicas contra arbovirus (*Madariaga virus*, *Mayaro virus*, *virus de la Encefalitis equina venezolana*, *Una virus*, *Chikungunya*, *Virus de la Fiebre amarilla*, *Dengue 2 virus*, *Pan-sloth D50*, *Pan-Sloth 149* y *Punta Toro Virus*) y hemoflagelados (*T. cruzi*, *T. rangeli* y *Leishmania spp.*) reportados como agentes etiológicos endémicos en Panamá.

## 1.4 MARCO TEÓRICO

### 1.4.1 Enfermedades Zoonóticas, Generalidades

El término "zoonosis" proviene del griego "Zoon", que significa animal, y "nosos", que significa enfermedad. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), cualquier enfermedad o infección que pueda transmitirse naturalmente de vertebrados a humanos o de humanos a animales se clasifica como una enfermedad zoonótica. De los patógenos humanos, alrededor del 61% son zoonóticos. El papel que juegan los seres humanos en conjunto con los animales y el medio ambiente es importante en la aparición y propagación de enfermedades infecciosas emergentes (EID), que representan una importante carga económica y de salud pública a nivel mundial. Estudios atribuyen entre 1940 y 2004 un aumento en el tiempo de eventos de EID, en donde las enfermedades zoonóticas dominaron 60,3 % de estos eventos y 71,8% se originaron en animales salvajes (por ejemplo, SARS, Ébola).

Las enfermedades zoonóticas son una amenaza directa para la salud humana e incluso pueden causar la muerte. A nivel mundial, las 13 enfermedades zoonóticas más comunes (brucelosis, tuberculosis, anthrax, leptospirosis, entre otras) afectan más a los ganaderos pobres en países de ingresos bajos y medianos, causando aproximadamente 2400 millones de infecciones y 2,7 millones de muertes cada año (*Rahman et al., 2020*). Además del impacto negativo en la salud humana, la mayoría de estas enfermedades afectan también la salud de los animales y reducen la producción ganadera, lo que genera pérdidas económicas significativas.

Factores como el cambio climático, la deforestación, la urbanización, la migración, el comercio de animales, los viajes, el turismo, la biología de los vectores y algunos factores antropogénicos y naturales influyen en gran medida en la aparición, reproducción, distribución, patrón clínico y la eco-epidemiología de las enfermedades zoonóticas, aumentando la probabilidad de emergencia de nuevas enfermedades o la reemergencia de enfermedades previamente controladas. Un ejemplo clave es la actual pandemia por la COVID-19, una nueva enfermedad zoonótica viral emergente de probable origen en los murciélagos, que ha afectado la salud de millones de seres humanos junto con consecuencias económicas y sociales devastadoras a nivel mundial (*Kate E. Jones et al., 2008; Rahman et al., 2020*). La aplicación de las medidas de "Una sola salud" es muy recomendable para la prevención y el control eficaz de potenciales zoonosis.

#### **1.4.2 Clasificación de Enfermedades Zoonóticas: Virus y Parásitos**

Las enfermedades zoonóticas son causadas por distintos agentes patógenos. Según su etiología, las enfermedades zoonóticas se dividen en zoonosis bacterianas (como ántrax, salmonelosis, tuberculosis, enfermedad de Lyme, brucelosis y peste), zoonosis víricas (como la rabia, los síndromes de inmunodeficiencia adquirida-SIDA, el ébola y la gripe aviar) y zoonosis parasitarias (por ejemplo, tripanosomiasis, leishmaniasis, triquinosis, toxoplasmosis, trematodiasis, giardiasis, paludismo y enfermedad hidatídica), entre otras. En la siguiente tabla (Tabla N°1) se destacan algunas enfermedades relacionadas con virus y parásitos específicamente.

**Tabla 1.** Clasificación de Enfermedades zoonóticas según agentes virales y parasitarios (Chomel, 2009; CDC, 2015).

Enfermedad	Etiología	Hospedero Animal	Síntomas/ Órganos o sistema involucrados
<b>Virales</b>			
Chikungunya	Virus Chikungunya Genero <i>Alphavirus</i> Familia <i>Togaviridae</i>	primates no humanos, aves y roedores	Fiebre alta, dolor articular intenso, dolor muscular y erupción cutánea
Dengue	Virus del Dengue Género <i>Flavivirus</i> Familia <i>Flaviviridae</i>	primates no humanos y perros	Fiebre alta, erupción cutánea, hemorragia cutánea y shock
Infección por Hantavirus (Síndrome Pulmonar por Hantavirus))	Hantavirus Género <i>Orthohantavirus</i> Familia <i>Hantaviridae</i>	Ratones de ciervo, ratas de algodón, ratas del arroz, ratones de patas blancas, musarañas y topos	Problemas respiratorios, fiebre alta, mareos, escalofríos y problemas abdominales
Zika fever	Virus Zika Género <i>Flavivirus</i> Familia <i>Flaviviridae</i>	Simios y primates no humanos	Fiebre, dolor y conjuntivitis
West Nile fever	Virus del Oeste del Nilo Género <i>Flavivirus</i> Familia <i>Flaviviridae</i>	Caballos, aves, y reptiles	Dolor de cabeza, erupción cutánea, inflamación de los ganglios linfáticos, rigidez de cuello, desorientación, coma, temblores, convulsiones y parálisis
Severe acute respiratory syndrome (SARS)	SARS coronavirus (SARS-CoV) Género <i>Coronavirus</i> Familia <i>Coronaviridae</i>	Murciélagos, perros, gatos, hurones, bisontes, tigres y leones	Síntomas parecidos a los de la gripe, fiebre, dolores musculares, los casos graves evolucionan hacia una enfermedad respiratoria y una neumonía
<b>Parasitarias</b>			
Trypanosomiasis	<i>Trypanosoma brucei</i>	Antílopes, ganado, camellos y caballos	fiebre crónica e intermitente, cefalea, prurito, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia y trastornos del sueño
Leishmaniasis	<i>Leishmania infantum</i>	Gatos, perros, caballos y murciélagos	Lesiones cutáneas, hepatoesplenomegalia y emaciación
Enfermedad de Chagas	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Cerdos y gatos domésticos; los reservorios de fauna silvestre incluyen zarigüeyas, armadillos, mapaches y ratas de bosque	Miocarditis grave, meningoencefalitis, hinchazón o enrojecimiento de la piel, fiebre, inflamación de los ganglios linfáticos, dolores de cabeza o del cuerpo, fatiga, náuseas, vómitos y diarrea
Trichinellosis	<i>Trichinella</i> spp.	Cerdos, perros, gatos, ratas y otras especies salvajes	Gastrointestinal, por ejemplo, náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal
Hidatidosis	<i>Echinococcus granulosus</i>	Búfalos, ovejas, cabras y perros callejeros o pastores adultos	Quistes hidatídicos en el hígado, los pulmones, los huesos, los riñones, el bazo, dolor abdominal y problemas respiratorios
Fascioliasis	<i>Fasciola hepatica</i> , <i>Fasciola gigantica</i>	Bovinos, ovinos, caprinos y otros rumiantes	Hemorragia interna intensa, fiebre, náuseas, hígado hinchado, erupciones cutáneas y dolor abdominal extremo
SIDA/ HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana	Primates no humanos	Fiebre, Dolor de cabeza, Dolor muscular y articular, Erupción, Dolor de garganta y llagas dolorosas en la boca, Ganglios linfáticos inflamados, principalmente en el cuello, Diarrea, Pérdida de peso, Tos y Sudores nocturnos.
Influenza aviar	En la actualidad, los subtipos del virus de influenza A endémicos en seres humanos son los virus H3N2 y H1N1	Aves de corrales	Tos, Fiebre, Dolor de garganta, Dolores musculares, Dolor de cabeza, Falta de aire  Algunas personas también tienen náuseas, vómitos o diarrea. Además, en algunos casos, una infección leve en el ojo (conjuntivitis) es el único indicio de la enfermedad

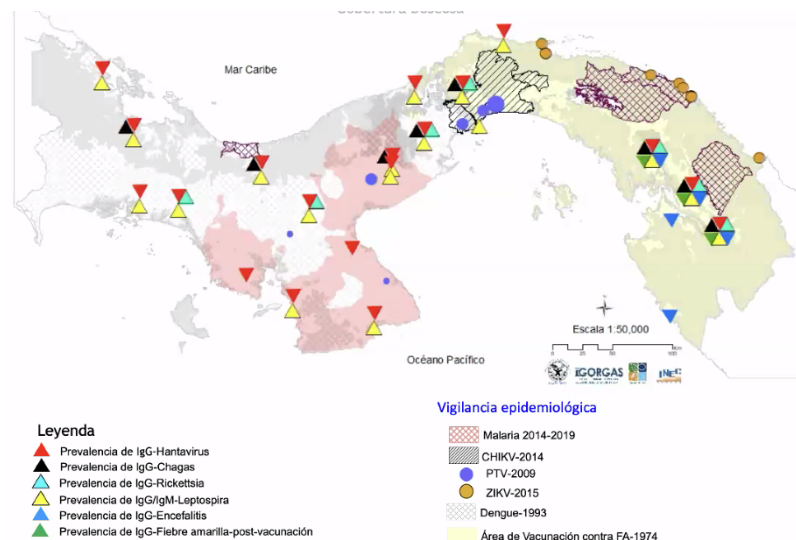
### 1.4.3 Enfermedades Zoonóticas Emergentes y Reemergentes

Una enfermedad zoonótica emergente es una zoonosis recién identificada que se ha desarrollado recientemente o que ya había aparecido anteriormente, pero con una mayor incidencia o con un nuevo rango geográfico, de huéspedes o de vectores ampliado. Se consideran reemergentes si la emergencia previa había sido controlada y la enfermedad no se detectaba o inducía solo casos esporádicos hasta la nueva emergencia. Algunos estudios mencionan que de 1,407 patógenos reconocidos en humanos, el 58% son por zoonosis. De ellos, 177 se consideraban emergentes o reemergentes (*Kruse et al., 2004*). Los patógenos zoonóticos tienen el doble de probabilidades de entrar en esta categoría que los patógenos no zoonóticos. Los patógenos emergentes y reemergentes no están fuertemente asociados con tipos específicos de huéspedes no humanos, pero es probable que tengan el rango de huéspedes más amplio (*Mahy & Brown, 2000*). Enfermedades zoonóticas emergentes y reemergentes se asocian directamente a los cambios en el uso del suelo y la agricultura, así como los cambios demográficos y sociales. Varias enfermedades zoonóticas tienen origen en zonas tropicales y subtropicales, donde la biodiversidad es alta (*Cutler et al., 2010*). A menudo, los bosques selváticos de estas zonas son cada vez más atractivos para quienes buscan un destino de vacaciones aventurero o inusual (*Cutler et al., 2010*).

Aunque los patógenos que causan las enfermedades zoonóticas son las fuentes más probables de enfermedades emergentes y reemergentes, sólo unos pocos han demostrado causar grandes epidemias en las poblaciones humanas. Estas epidemias pueden ser causadas por la adquisición de nuevas mutaciones o combinaciones de genes en el patógeno que alteran su potencial de infección y transmisión y por ejemplo induce un cambio de huésped o de vector (ej. la adaptación del virus Chikungunya al *Aedes albopictus* causando la epidemia del 2004) (*Mahy & Brown, 2000*). O al modificar el comportamiento del huésped o sus características socioeconómicas, ambientales o ecológicas. El retraso en el desarrollo de los síntomas clínicos y la aparición a menudo insidiosa pueden dificultar el diagnóstico adecuado y el tratamiento de los pacientes. Muchas regiones están experimentando un resurgimiento de patógenos zoonóticos, en parte debido al colapso de los programas de salud pública durante los disturbios políticos y las crisis económicas (*Mahy & Brown, 2000*). A su vez, decisiones políticas y otras acciones implementan las normas y prácticas que resultan de las interacciones políticas

globales entre todos los sectores que afectan la salud, son lo que llamamos "determinantes políticos globales de la salud" (Cabezas-Sánchez, 2015). Es imposible eliminar las inequidades sanitarias inaceptables entre los países y dentro de ellos, solo a través del sector de la salud, medidas tecnológicas o solo a nivel de país; es necesaria una solución política mundial. La gobernanza mundial de la salud debe estar impulsada por un compromiso con la solidaridad mundial y basada en un compromiso a la responsabilidad compartida. El desarrollo sostenible y saludable para todos requiere la existencia de un sistema económico y político mundial que sirva a una población mundial saludable. En Panamá, por medio de institutos como el MINSA (Ministerio de Salud), el Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la salud (ICGES), el Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA) y más recientemente el Ministerio de Ambiente (MiAmbiente), se tratan de implementar medidas para poder determinar, vigilar, detectar al inicio y controlar diferentes tipos de zoonosis que son un problema de salud pública a nivel regional y mundial (Figura N°1).

FIGURA 1. Ejemplos de prevalencia de enfermedades zoonóticas y transmitidas por vectores en Panamá  
Dr. Blas Armión y DIEEZ-CIEEZ. Fondo MEF-SENACYT



#### 1.4.4 Rol de los Vectores

Las enfermedades emergentes transmitidas por vectores son un importante problema sanitario mundial, con la aparición de muchos patógenos transmitidos por vectores en nuevas zonas y el aumento de la prevalencia de muchas enfermedades endémicas en las dos últimas décadas (Gorla, 2021). Aunque a menudo se piensa que la introducción y la emergencia local son procesos distintos, muchos patógenos endémicos emergentes invaden de hecho el ámbito local, coincidiendo con los cambios de hábitat. Destacamos

importantes diferencias en la dinámica y la carga de la enfermedad resultantes del aumento de la transmisión de patógenos tras el cambio de hábitat en comparación con la introducción de patógenos en nuevas áreas. La verdadera emergencia *in situ* suele estar impulsada por cambios en los factores antropogénicos y la mejora de los ciclos de los animales endémicos, mientras que la invasión de patógenos está causada por el comercio y los viajes antropogénicos y las condiciones adecuadas para el patógeno, incluidos el huésped, el vector y el clima (Kate E. Jones, et. al, 2008).

Dengue, malaria, enfermedad de Chagas, leishmaniasis, esquistosomiasis, fiebre amarilla. Chikungunya, filariasis linfática, oncocercosis y virus del Nilo Occidental. Estas son 10 enfermedades transmitidas por vectores propagadas por mosquitos, garrapatas, moscas y otros vectores que ponen en riesgo a personas del Continente Americano (OMS, 2020). Algunos de estos vectores pueden ser: *Aedes aegypti* (YFV, DENV, CHIKV), *Aedes albopictus* (DENV, CHIKV), *Haemagogus spp.* y *Sabethes spp.* (YFV ciclo selvático), *Anopheles spp.* (Malaria), *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, Triatominos selváticos (Enfermedad de Chagas) y *Lutzomyia spp.* (Leishmaniasis en América) (OPS, 2020).


#### 1.4.4.1 En Arbovirus

La especie *Aedes* es el vector arboviral más importante. Las dos especies más importantes de *Aedes* -*Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* son vectores de virus de importancia médica, como el CHIKV, el DENV, el ZIKV y el YFV. De estos dos, el *Ae aegypti* prevalece en la mayor parte del mundo, incluyendo Asia, África, Estados Unidos, Sudamérica y partes de Australia, mientras que el *Ae albopictus* prevalece en Asia (Kraemer et al., 2015). El calentamiento global, la deforestación y la urbanización han provocado una rápida expansión de los hábitats de estos vectores y han provocado un aumento masivo de las enfermedades transmitidas por vectores en todo el mundo. El aumento de los viajes internacionales, el turismo, el transporte marítimo y la industrialización pueden resultar en el transporte de huevos/larvas de mosquitos infectados a diferentes nichos nuevos, lo que facilita el rápido desarrollo de estas etapas en mosquitos. Estos mosquitos infectados pueden picar a individuos desprevenidos, provocando grandes brotes debido a la baja inmunidad colectiva. Por el contrario, el Caribe y los Estados Unidos informaron recientemente brotes grandes y rápidos de infecciones por CHIKV y ZIKV,

respectivamente, a pesar de que estos mosquitos han existido en el Caribe y Florida durante siglos (Agarwal et al., 2017).

Estudios revelan la existencia de especies, algunas de ellas muy frecuentes en los humedales de nuestro país y fuertemente antropófilas como *Aedes vexans*, *Culex modestus*, *Culex pipiens* u *Ochlerotatus caspius*, con una elevada capacidad para transmitir flavivirus como el virus West Nile o el virus Usutu. Además, el establecimiento y expansión del mosquito tigre, *Aedes albopictus*, abre una preocupante vía para la aparición de posibles brotes como el Dengue o Chikungunya (Marí & Peydró, 2010) (Figura N°2).

FIGURA 2. Ejemplos de Mosquitos- vector, Familia/ virus, ciclo de transmisión (Pando et al., 2020).



Vector	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Aedes albopictus</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>	<i>Haemagogus</i> spp.
Ciclo de transmisión	Urbano	Urbano y rural	Urbano y rural	Selvático y rural
Patógenos que transmite	DENV, ZIKV, CHIKV, YFV	DENV, CHIKV, ZIKV	WNV, JEV	YFV, MAYV

#### 1.4.4.2 En Hemoflagelados

La leishmaniasis causa una importante morbilidad y mortalidad en África, Asia, América Latina y las regiones mediterráneas. El agente causante de la leishmaniasis se transmite del animales al hombre a través de un pequeño insecto llamado *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. En Panamá se encuentran algunas especies de *Lutzomyia* como: *Lutzomyia panamensis*, *Lutzomyia gomezi*, *Lutzomyia ovallesi*, entre otros (Tabla N° 2). Morfológicamente se parecen mucho entre sí. Se conocen aproximadamente 600 especies de flebotominos, pero sólo el 10% de ellos actúan como vectores de la enfermedad, y cerca de 30 especies son importantes desde el punto de vista de la salud pública. Estos insectos generalmente son más activos al amanecer, atardecer y durante la noche, pero pican si se los molesta en sus sitios de reposo (madrigueras de animales, huecos en los árboles, cavernas, casas y demás lugares relativamente frescos y húmedos), durante el día. Son atraídos por la luz y pueden ingresar a los edificios por la noche (Sharma & Singh, 2008).

También, existen otros artrópodos como las garrapatas (*Dermacentor variabilis* y *Rhipicephalus sanguineus*) y las pulgas caninas que pueden potencialmente servir como portadores mecánicos. En áreas donde la *Leishmania* es transmitida por flebotominos, las

garrapatas y las pulgas pueden no ser importantes en la epidemiología de la enfermedad; sin embargo, pueden estar asociadas con casos menos comunes de transmisión de perro a perro en otros lugares. En cuanto a los mamíferos, pueden infectarse sin síntomas durante largos períodos de tiempo y permanecen infectados de forma crónica incluso después de la curación clínica. Los animales con infección subclínica pueden transmitir *Leishmania* a los flebótomos. Entre los animales domésticos, los perros son las especies más afectadas. La mayoría de los casos de leishmaniasis canina son causados por *L. infantum*, pero también se pueden encontrar otras especies de organismos. Además, ocasionalmente se observan casos clínicos en gatos, caballos, burros y mulas infectados con varias especies de *Leishmania* spp. La leishmaniasis no es una enfermedad significativa en el ganado bovino excepto en los equinos, aunque se han observado casos aislados y raros de leishmaniasis cutánea en ovinos, caprinos y bovinos en África y en un cerdo en América del Sur (Aslan et al., 2016).

**Tabla 2.** Especies de flebótomos encontradas en Panamá Central.

Composición de especies de flebótomos en tres áreas de muestreo de Panamá Central: Achiotte, Barro Colorado y Las Pavas (Monteiro et al., 2018).

Especies	Nomenclatura en Galati
<i>Lutzomyia panamensis</i>	<i>Psychodopygus panamensis</i>
<i>Lutzomyia carrerai thula</i>	<i>Psychodopygus thula</i>
<i>Lutzomyia gomezi</i>	<i>Lutzomyia gomezi</i>
<i>Lutzomyia trapidoi</i>	<i>Nyssomyia trapidoi</i>
<i>Lutzomyia olmeca bicolor</i>	<i>Bichromomyia olmeca bicolor</i>
<i>Lutzomyia sanguinaria</i>	<i>Lutzomyia sanguinaria</i>
<i>Lutzomyia ylephiletor</i>	<i>Nyssomyia ylephiletor</i>
<i>Lutzomyia aclydifera</i>	<i>Psathyromyia aclydifera</i>
<i>Lutzomyia camposi</i>	<i>Pressatia camposi</i>
<i>Lutzomyia carpenteri</i>	<i>Psathyromyia carpenteri</i>
<i>Lutzomyia dysponeta</i>	<i>Pressatia dysponeta</i>
<i>Lutzomyia galindoi</i>	<i>Brumptomyia galindoi</i>
<i>Lutzomyia nordestina</i>	<i>Lutzomyia nordestina</i>
<i>Lutzomyia ovallesi</i>	<i>Pintomyia ovallesi</i>
<i>Lutzomyia shannoni</i>	<i>Psathyromyia shannoni</i>
<i>Lutzomyia trinidadensis</i>	<i>Micropygomyia trinidadensis</i>
<i>Lutzomyia triramula</i>	<i>Trichopygomyia triramula</i>
<i>Lutzomyia vespertilionis</i>	<i>Dampfomyia vespertilionis</i>

La enfermedad de Chagas se transmite a través de materia fecal contaminada de vectores pertenecientes a los géneros *Rhodnius*, *Triatoma*, *Meccus* y *Panstrongylus*, que se agrupan en 154 especies, todas potenciales vectores de la enfermedad de Chagas. Durante su ciclo doméstico, estos insectos viven en grietas y agujeros en casas rurales y suburbanas, donde se esconden durante el día y se alimentan por la noche. Su principal fuente de alimento es la sangre de los mamíferos o de forma accidental los seres humanos (todas las especies son hematófagos). Estos insectos pican las áreas expuestas de la piel y defecan cerca del sitio de la picadura; cuando una persona se rasca debido a la picazón causada por la picadura, las heces contaminadas con el parásito ingresan por el sitio de la picadura a la piel del huésped accidental, llámese mamífero o humano (Monteiro et al., 2018).

Además, son insectos que tienen una metamorfosis incompleta: el desarrollo de insecto a adulto consta de cinco etapas de ninfa. En su mayoría, las especies de triatomíneos son nocturnas y permanecen en sus nidos durante el día, aunque en situaciones de estrés alimentario pueden salir durante el día en busca de alimento. Una de sus características principales es que, debido a la ingestión de grandes cantidades de sangre, la membrana que los cubre se estira cuando terminan de alimentarse y su abdomen se expande significativamente, dándoles una apariencia de globo. Algunas especies defecan fácilmente cuando se alimentan (*Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*, *T. barberi*, *T. dimidiata* y *T. rubida*, entre otros), otras defecan rápidamente, incluso abandonando su fuente de alimentación, manteniendo las heces alejadas de los sitios de atracción. Este comportamiento determina si son buenos o malos transmisores de la enfermedad de Chagas (Campos et al., 2017).

#### **1.4.5 Rol de los Reservorios**

La amplia gama de vertebrados que albergan estos patógenos humanos incluye todos los grupos de mamíferos. Las aves son el segundo grupo más grande de animales que albergan enfermedades zoonóticas. Se han hecho grandes avances en la comprensión del desarrollo de las enfermedades y de los orígenes de los animales, con importantes contribuciones de campos como la paleopatología y el análisis del ADN aplicado a antiguos restos óseos humanos. La investigación sobre enfermedades antiguas como la brucelosis y la tuberculosis se beneficia de estos métodos. A medida que surgen nuevas enfermedades causantes de pandemias, y que algunas enfermedades previamente

erradicadas vuelven a surgir en algunas zonas, las enseñanzas obtenidas de estas enfermedades antiguas se pueden aplicar al estudio de las enfermedades emergentes y reemergentes actuales. Los esfuerzos mundiales se centran en la prevención de nuevas epidemias a partir de los conocimientos de la investigación (Jahan et al., 2021).

### 1.4.5.1 En Arbovirus

La rápida sucesión de enfermedades arbovirales pandémicas como el dengue, el Nilo Occidental, el chikungunya y el Zika ha intensificado la investigación sobre estas y otras enfermedades arbovirales en todo el mundo. El estudio de un solo modo de transmisión vectorial requiere una comprensión clara del papel de los vertebrados. Un obstáculo importante para esta comprensión es la ambigüedad de la definición de arbovirus establecida originalmente por la Organización Mundial de la Salud (Kuno et al., 2017). La falta de información relevante sobre la transmisión de arbovirus en ese momento contribuyó a la idea de que los vertebrados desempeñan un papel de huésped en el ciclo de transmisión de arbovirus. Dado que este concepto es una característica destacada de la definición de arbovirus. Algunos ejemplos de hospederos vertebrados son, primates, marsupiales, aves, roedores, entre otros. Estos forman parte del ciclo de vida de arbovirus que contagian al ser humano (Figura N°3).

FIGURA 3. Familia/ virus, mosquito y hospedero vertebrado de arbovirus (Mari & Peydró, 2010).

Familia / virus	Mosquito vector	Hospedador vertebrado	Ciclos de transmisión <sup>b</sup>	Afección humana <sup>a</sup>	Distribución geográfica
<b>Togaviridae</b>					
<i>Chikungunya</i> <sup>a</sup>	<i>Aedes</i>	Humanos, primates	U,S,R	FS	África, Asia, Australia
<i>Ross River</i> <sup>a</sup>	<i>Aedes</i>	Humanos, marsupiales	R,S,U	FS	Australia, Pacífico sur
<i>Mayaro</i> <sup>a</sup>	<i>Aedes</i>	Aves	R	FS	Sur América
<i>O'nyong-nyong</i> <sup>a</sup>	<i>Anopheles</i>	Desconocido	R,S,U	FS	África
<i>Sindbis</i>	<i>Aedes, Culex, Culiseta</i>	Aves	R	FS	África, Asia, Australia, Europa
<i>Encefalitis equina del Este</i>	<i>Aedes, Coquillettidia, Culex, Culiseta</i>	Aves	R	FS,ME	América
<i>Encefalitis equina del Oeste</i>	<i>Aedes, Culex</i>	Aves	R	FS,ME	América
<i>Encefalitis equina de Venezuela</i> <sup>a</sup>	<i>Aedes, Anopheles, Culex</i>	Roedores	R	FS,ME	América
<b>Flaviviridae</b>					
<i>Dengue 1-4</i> <sup>a</sup>	<i>Aedes</i>	Humanos, primates	U,S,R	FS,FH	Mundial (trópicos)
<i>Fiebre Amarilla</i> <sup>a</sup>	<i>Aedes</i>	Humanos, primates	R,S,U	FS,FH	África, Sur América
<i>Encefalitis japonesa</i>	<i>Culex</i>	Aves, cerdos	R,	S FS,ME	Asia, Pacífico
<i>Encefalitis del Valle de Murray</i>	<i>Culex</i>	Aves	R	FS,ME	Australia
<i>Encefalitis de San Luis</i>	<i>Culex</i>	Aves	R,S,U	FS,ME	América
<i>Usutu</i>	<i>Aedes, Culex, Culiseta</i>	Aves	R	FS	África, Europa
<i>Virus West Nile</i> <sup>a</sup>	<i>Aedes, Anopheles, Coquillettidia, Culex, Ochlerotatus</i>	Aves	R,S,U	FS,ME	África, Asia, Europa, Norte América
<b>Bunyaviridae</b>					
<i>Inkoo</i>	<i>Ochlerotatus</i>	Bóvidos, roedores	R	FS,ME	Norte de Europa

#### 1.4.5.2 En Hemoflagelados

También se encuentra en varios animales salvajes como lobos, zorros, zorros grises y perros de monte. Se han informado infecciones por *L. infantum* en una variedad de animales domésticos y salvajes, incluidos gatos, caballos, agutí salvaje (*Dasyprocta agouti*), zarigüeya de orejas blancas (*Didelphis albiventris*), lince ibérico (*Lynx pardinus*), roedores, focas y al menos una especie de murciélago (*Carollia perspicillata*). Algunas de estas especies, al igual que los felinos, pueden actuar como reservorios secundarios en determinadas zonas (Aslan et al., 2016; Institute For International Cooperation in Animal, 2010). Las especies del Nuevo Mundo que causan la leishmaniasis cutánea suelen permanecer en los animales del bosque. Se desconoce el huésped principal de *L. braziliensis*, sin embargo, se ha informado que varias especies, como carnívoros, roedores y perisodáctilos, así como perros, gatos y equinos, están infectadas con esta especie. Diferentes reservorios y transportadores pueden ser importantes en diferentes regiones (Institute For International Cooperation in Animal, 2010).

Los reservorios importantes para otras especies del Nuevo Mundo incluyen perezosos infectados con *L. guyanensis*/*L. panamensis*, armadillos con *L. naiiffi* y roedores con *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. lainsoni*. Los marsupiales, incluidos los miembros de los géneros *Didelphis*, *Philander*, *Marmosa*, *Caluromys* y *Metachirus*, así como los zorros arbustivos, también pueden ser infectados con *L. amazonensis*, aunque los roedores se consideran el hospedador principal. Los perros son el único huésped conocido de *L. peruviana*, que causa leishmaniasis cutánea en humanos en los Andes peruanos. Se sospecha que los mamíferos arbóreos son reservorios de *L. shawi* y se han detectado en monos (Blackbeard sakí, *Chiropotes satanas*), perezosos (*Choloepus didactylus* y *Bradypus tridactylus*) y mapaches (*Nasua nasua*). Al igual que se han informado reservorios de *L. venezuelensis* en humanos y gatos, pero no se conoce si realmente juegan un rol en el ciclo de transmisión (Institute For International Cooperation in Animal, 2010).

En cuanto a los reservorios hay un total de 180 especies de mamíferos pertenecientes a los siguientes ordenes: Didelphidomorpha, Lagomorpha, Chiroptera, Rodentia, Pilosa, Cingulata, Carnivora, Primata, Perisodactyla, que se han encontrado naturalmente infectados por *T. cruzi*, incluyendo al hombre, el cual además de padecer de la enfermedad actúa como reservorio. Otros grupos de vertebrados como aves, anfibios, reptiles y peces

son refractarios a este hemoflagelado por incompatibilidad antigénica, ausencia de reconocimiento y señalización celular, así como niveles inadecuados de temperatura sistémica.

En la enfermedad de Chagas se ha considerado como reservorio de este parásito a aquel hospedador que posee dos características:

1. Mantiene a las poblaciones de los parásitos por largo tiempo en cada ecosistema.
2. Presenta una carga parasitaria que garantiza su transmisibilidad.

Otro aspecto a considerar es que las especies de hospedadores actúan como reservorios en función del fenómeno de especificidad hospedadora, aspecto este que viene condicionado por la información genética de ambos asociados (hospedador y parásito) y el nicho que ocupan en los ecosistemas lo cual hace posible la simpatria obligatoria o facultativa y consecuentemente condiciona el encuentro hospedador-parásito y el éxito adaptativo de la infección (*HERRERA, 2010*).

## **1.4.6 Perezosos**

### **1.4.6.1 Generalidades**

Los perezosos (*Choloepus* spp. y *Bradypus* spp.), son mamíferos con una alimentación herbívora y un metabolismo de características peculiares (lento), homeotermos imperfectos porque no pueden mantener una temperatura corporal constante consecuencia de su dieta estrictamente folívora. Habitan en zonas tropicales y tienen una extensa gama de artrópodos parásitos y comensales que incluyen piojos, garrapatas, ácaros, triatomíneos, entre otros, que se han aislado en este animal e incluso los vinculan en diferentes ciclos de vidas de parásitos y virus como un huésped importante. Una teoría es que “el descansar sujetado de sus garras y sus movimientos lentos que evitan que elimine rápidamente insectos que pueden alimentarse de su sangre” y a su vez transmitirle patógenos, pero a ciencia cierta se desconoce el rol que desempeñan. El pelo de los perezosos es de especial interés por la presencia en él de algas simbióticas en determinadas épocas. Los perezosos tienen dos pelajes distintos, uno formado por un pelo largo y áspero, pero sedoso, que proporciona el color distintivo del animal, y otro formado por un pelaje corto, fino y suave, que se encuentra debajo. Se atribuye que las diferencias morfológicas del pelo apoyan aún más la asignación de los dos géneros de perezosos

vivos a familias distintas (*María A. Montilla-Rodríguez, Julio C. Blanco-Rodríguez, 2016*). Entre los géneros que se encuentran en Panamá tenemos al *Choloepus hoffmanni* (perezoso de dos dedos) y que está distribuido desde la selva baja hasta las mayores altitudes de los bosques de montaña al sur de Nicaragua, pasando por Centroamérica y en Colombia, Venezuela, Guayana Francesa, Ecuador, Perú, Brasil y Bolivia (*Figura N° 4*). Las orejas son redondeadas y gruesas y casi siempre están cubiertas de pelo. Se ha informado de que los ojos pueden estar parcialmente retraídos cuando los párpados están bien cerrados. Esto puede hacer que el perezoso parezca tener los ojos saltones durante los periodos de estrés o antes del inicio del comportamiento agresivo, cuando los párpados parecen levantarse de sus órbitas (*Figura N° 5*). *Bradypus variegatus* (perezosos de tres dedos) la distribución de la especie va desde Honduras en Centroamérica hasta Suramérica, encontrándose en las costas de Ecuador, a través de Colombia y Venezuela (excepto en llanos y delta del río Orinoco), continuando además por la áreas forestales de Ecuador, Perú, Bolivia, Brasil y extendiéndose a la porción del Norte de Argentina (*Figura#12*). Posee pelaje de color gris a marrón o beis. Sobre los ojos presenta una máscara oscura, y posee pelaje blanco sobre la frente. El pelo de la cabeza puede ser más corto y denso. El macho presenta una mancha de color anaranjado con una línea central negra, o bien, manchas negras, sobre la parte media del lomo (*Figura N°5*) (*Gilmore et al., 2001; Seymour et al., 1982*). Más recientemente también se describe el Perezoso *Bradypus pygmaeus*, en la isla “Escudo de Veraguas” como un especialista folívoro de los manglares (*Kaviar et al., 2012*).

FIGURA 4. Distribución de Perezosos en América Central y América del Sur (Kaup et al., 2021).

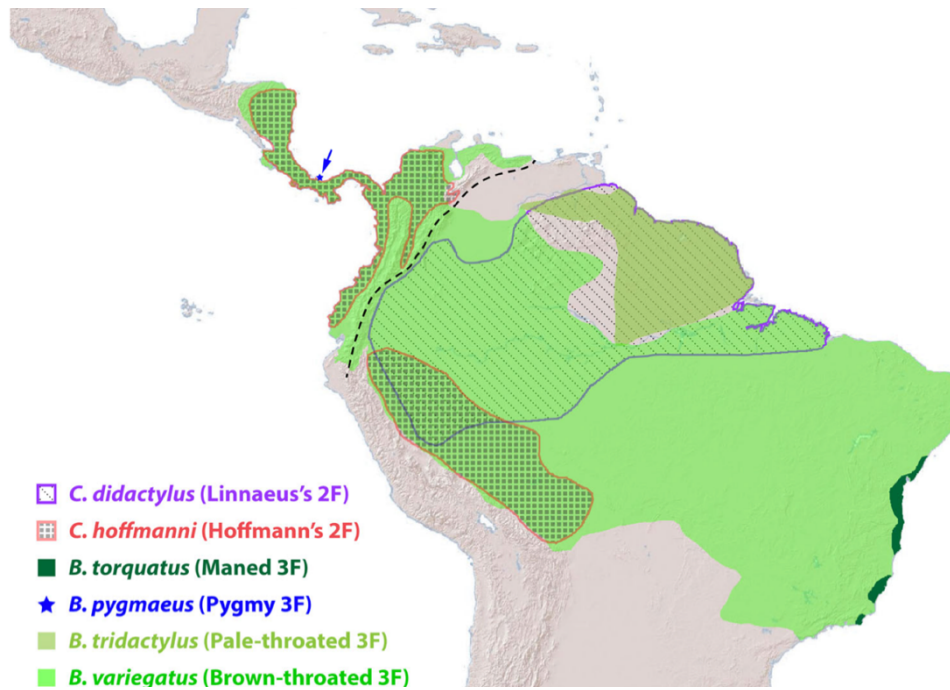


FIGURA 5. (1) *Choleopus hoffmanni* (Tomada por Rita Corrales) y (2) *Bradypus variegatus* (Tomada por Brian Gratwicke)



#### 1.4.6.2 Relación con vectores

Entre algunos de los ejemplos de diferentes artrópodos relacionados de forma directa e indirecta con los perezosos se han registrado los siguientes:

- Garrapatas del género *Ambylomma* en perezosos de dos y tres dedos en América Central y del Sur, como *Ambylomma geayi* y *Ambylomma varium*, vectores de enfermedades como Rickettsiosis y Fiebre de las montañas entre otros. Están

realmente especializadas en vivir en los perezosos, ya que estas garrapatas rara vez se encuentran en otros huéspedes (Kaup et al., 2021).

- Escarabajos (*Trichilium adisi* y *Uroxys gorgon*), ácaros y polillas comensales se encuentran en asociación con los perezosos (*Bradypus variegatus*) y su estiércol en la isla de Curari, en la región del Amazonas Central, Bolivia, Brasil, Colombia y Panamá (Kaup et al., 2021).
- También hay hallazgos de ácaros chupadores de sangre (*Liponissus inheringi*, *Lobalges trouessarti* y *Edentalges bradypus*) en perezosos (*Bradypus* spp.) de tres dedos reportados en el sur de Brasil. Se ha observado el ácaro *Edentalges choloepi* en *Choloepus didactylus*. Al parecer, existe una relación interesante entre los ácaros *Macrocheles impae* y *Macrocheles uroxys* y los escarabajos perezosos *Uroxys besti* y *Trichilium adisi* en los que aparecen (Kaup et al., 2021).
- Por medio de estudios moleculares realizados en Triatominos (*Panstrongylus geniculatus*) se han determinado uno de los animales usados como “blood feeding” o generador de sangre para alimentación, son los perezosos (*Choloepus didactylus*) (Gilmore et al., 2001).
- En estudios realizados en Panamá en donde se recogieron vectores de *R. pallescens* en diferentes tipos de hábitat a lo largo de un gradiente de perturbación antropogénica, se analizó el ADN para identificar los posibles “blood meals”, estos fueron significativamente mayor en los hábitats deforestados en comparación con los bosques contiguos. Los perezosos *C. hoffmanni* predominaron, a lo que pueden ser una comida de sangre atractiva para *R. pallescens*, y buenos huéspedes para los tripanosomas y las poblaciones de insectos que se alimentan mediante el acicalamiento o el rascado, permitiendo que los bichos se alimenten, defecuen en el hospedador y ayuden a mantener la transmisión de *T. cruzi* (Gottdenker et al., 2012a).
- Atribuyen que las altas tasas de transmisión de *L. (V) panamensis* pueden darse en áreas de bosque antiguo con altas densidades de población del perezoso de dos dedos (*Choloepus hoffmanni*), y estos pueden servir como reservorios secundarios de estos parásitos en Panamá, pero sus roles epidemiológicos no se han investigado plenamente. Una razón probable por la que la transmisión de ACL no se produce en entornos domésticos en las zonas endémicas de Panamá es que los perros y los

humanos parecen ser huéspedes finales muertos para *L. (V) panamensis* (Dutari & Loaiza, 2014).

- Los perezosos también son portadores de diversos virus asociados a artrópodos (“arbovirus”; por ejemplo, flebovirus, flavivirus, virus de la encefalitis y ortobunyavirus) y protozoos transmitidos por insectos (Celone *et al.*, 2021). Estos patógenos pueden transmitirse por picaduras de artrópodos (libres o epibióticos) a la sangre, pero también pueden encontrarse en la piel o dentro del pelaje de los perezosos (Gilmore *et al.*, 2001).

#### 1.4.6.3 Rol como reservorio de Arbovirus

En América Latina, regiones como Brasil reportan seroprevalencia en perezosos ( $n= 22$  en total,  $n= 15$ , *B. torquatus* y  $n= 7$ , *B. variegatus*) contra distintos arbovirus obteniendo un total de individuos positivos en *B. torquatus* (50%; CI 30.7–69.3) y *B. variegatus* (42.9%; CI 15.8–75.0). Se describió la seroprevalencia de los arbovirus: género Flavivirus ((*DENV-1* 9.1 %, *DENV-2* 22.7 %, *DENV-3* 22.7 %, *DENV-4* 9.1 %, *Utinga virus (UTIV)* 4.1 %, *ILHV* (Ilehus Virus) 9.1 %, *BSQV* (Bussuquara Virus) 4.5 %, *ROCV* (Rocio Virus) 9.1 %)), género alfavirus (*EEEV* 4.5 %), género orthobunyavirus (*Carparu virus (CARV)* 18.2 %)). También se obtuvieron resultados de reacciones monotípicas en *EEV* 1/22, *DENV-3* 2/22, *CARV* 3/22, *UTIV* 1/22 a través de estudios longitudinales realizados de 2006 al 2014. Muchos de estos arbovirus se comparten entre el ganado, otras especies domesticadas y afectan al ser humano (Catenacci *et al.*, 2018). En Costa Rica también se muestran estudios a través de pruebas serológicas en perezosos (*Bradypus variegatus* y *Choloepus hoffmanni*) confirmando la exposición de las poblaciones de perezosos en un 80% de seroprevalencia detectable contra el SLEV, el 67% contra el ILHV, el 32% contra el virus de Punta Toro, el 30% contra el virus de Changuinola, el 15% contra el WNV, el 14% contra el VSV (Virus de la Estomatitis Vesicular), el 11% contra el virus de la VEEV y el 10% contra el virus de Río Grande (Medlin, Deardorff, Hanley, Vergneau-grosset, Dallwig, et al., 2016).

En Panamá investigaciones publicadas en 1983 en los lugares de Cerro Azul, Ancón, Gorgona, Aguacate y Arraiján en perezosos como *Bradypus variegatus* ( $n= 167$ ) y *Choloepus hoffmanni* ( $n=99$ ) indica el aislamiento y seroprevalencia de distintos arbovirus. Por ejemplo, existe una alta seroprevalencia de SLEV en los perezosos principalmente en *Choloepus hoffmanni*. Este virus, que puede causar encefalitis humana, está presente en todo el continente americano, desde Canadá hasta Argentina, pero en los trópicos se

presume que es enzoótico. Los animales infectados no muestran signos manifiestos de enfermedad, lo que los convierte en un posible reservorio, sin embargo, es desconocido su rol. También se han encontrado anticuerpos contra el virus Utiwe, los virus del complejo Changuinola, del complejo PTV en perezosos *B. variegatus* y *C. hoffmani*. Se informó del aislamiento de un agente infeccioso no identificado previamente (el virus Bradypus-4) de un perezoso macho (*B. variegatus*) (Seymour et al., 1982). La gran variedad de arbovirus relacionados con los perezosos pueden ubicarse como arbovirus específicos de ellos o accidentales. El rol de los perezosos en los ciclos naturales de estos agentes es todavía incierto en Panamá debido a los pocos estudios (Gilmore et al., 2001).

#### 1.4.6.3 Rol como reservorios de Hemoflagelados

Desde estudios realizados en 1980 se atribuye al perezoso (*C. hoffmanni* y *B. variegatus*) como un reservorio de *Leishmania* spp. al menos de cinco especies de *Leishmania* (*L. (V) colombiensis*, *L. (V) equatoriensis*, *L. (V) guyanensis*, *L. (V) panamensis* y *L. (V) shawi*, responsables de la leishmaniasis cutánea y/o mucosa humana. Por ejemplo, en Panamá se muestran perezosos (n= 95) como *C. hoffmanni* con una tasa de infección por *L. (V) guyanensis* elevada entre todos los mamíferos del bosque en los que se habían demostrado infecciones naturales por *Leishmania*. En aislados de piel (33,7% de prevalencia) y visceras (42,1% de prevalencia). Al igual muestran aislamiento de *L. (V) panamensis* en *B. variegatus* aunque se infecta ocasionalmente, las tasas de infección eran proporcionales a la edad de los animales, siendo más altas en los perezosos jóvenes que los adultos. En Guyana Francesa se descubrió *L. (V) guyanensis* en *Choloepus didactylus* en zonas donde la leishmaniasis cutánea era frecuente entre los humanos. Y por último en Brazil se vincula perezosos de dos dedos como reservorios de *L. (V) braziliensis*. (H. Christensen et al., 1984; H. A. Christensen et al., 1982; Gentile et al., 1981; Kreutzer et al., 1991). Lo que ha determinado a los perezosos desde entonces como un posible reservorio de *Leishmania*.

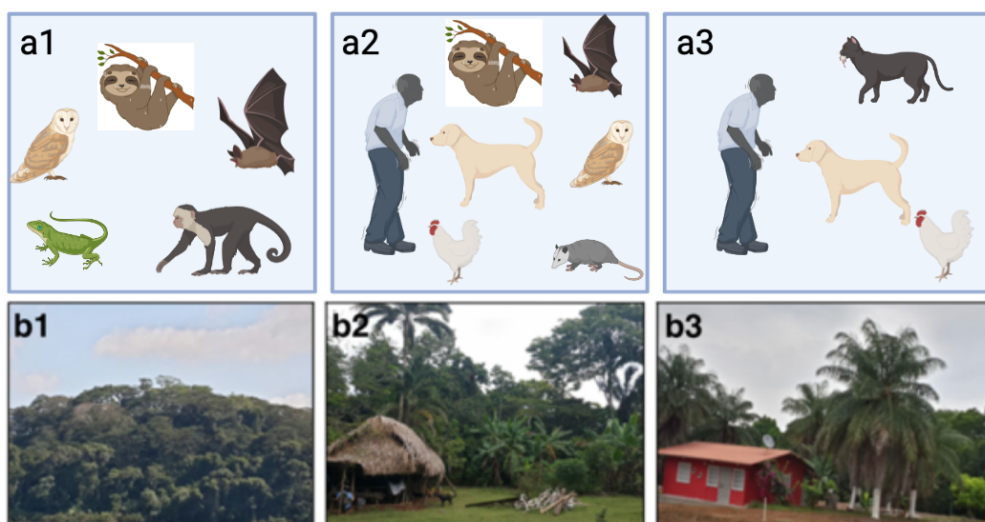
Estudios realizados entre los últimos 10 años, siguen vinculando al perezoso como reservorio de *Leishmania* en donde la emergencia y reemergencia de esta enfermedad en toda América Latina exige estudios adicionales para identificar las especies reservorio asociadas a la transmisión enzoótica. En Costa Rica y Panamá, en el año 2015, por técnica moleculares (PCR) y aislados de muestras sanguíneas de perezosos (*C. hoffmanni*), estos fueron positivos para *L. (V) panamensis* (González et al., 2015), el principal parásito causante del LCA en humanos en Panamá.

En cuanto a los hemoflagelados del género *Trypanosoma*, tenemos que desde estudios realizados en 1972 se relacionó a los perezosos como reservorio, en donde tenemos al *C. hoffmanni* y *Bradypus infuscatus* encontrados con *T. cruzi* en 14.2% de los animales examinados de cada especie (Sousa, 1972). En el año 1985 y 1989, se realizaron varios estudios confirmando la presencia de tripanosomas en varios países de Centro América y Sur América. Por ejemplo: Brasil y Guyana Francesa fueron aislado *Trypanosoma mesnilbrimonti* y *Trypanosoma preguici* en *Choloepus didactylus*. En Costa Rica y Panamá se ha identificado *Trypanosoma preguici* en *Choloepus hoffmanni* (Shaw JJ, 1985; Travi et al., 1989). En la actualidad sigue siendo mencionado como un reservorio de *T. cruzi* (L.c & J.r, 2014) (Figura N°6).

El último hemoflagelado muy vinculado propiamente a perezosos se descubrió en 1908 un enigmático flagelado intraeritrocítico procedente de un perezoso de dos dedos de la Guayana francesa (*Choloepus didactylus*) y lo denominaron *Endotrypanum schaudinni*. Su localización intracelular se confirmó posteriormente mediante microscopía electrónica. Son parientes filogenéticos más cercanos de *Leishmania* (en su forma eritrocitaria se ven epimastigotes, pero en cultivo se observan amastigotes). Se destacan también los *E. colombiensis* y *E. herreri* que también son capaces de infectar diferentes células blancas en la sangre de los perezosos (Albanaz et al., 2021).

FIGURA 6. Patrones de transmisión eco-epidemiológica de *Trypanosoma cruzi* en Panamá

a1, a2, a3- Hospederos y/o reservorios animales de *T. cruzi* a través de un gradiente de degradación del hábitat forestal. Entre ellos el *C. hoffmanni* y *B. variegatus*. b1 transmisión endémica de *T. cruzi* en focos enzooticos selváticos (transmisión en humanos accidental). b2 ). b2 Transmisión epidémica en hábitats alterados por el bosque (comunidades indígenas). b3 Transmisión esporádica en hábitats muy alterados (campesinos) (Albanaz et al., 2021).

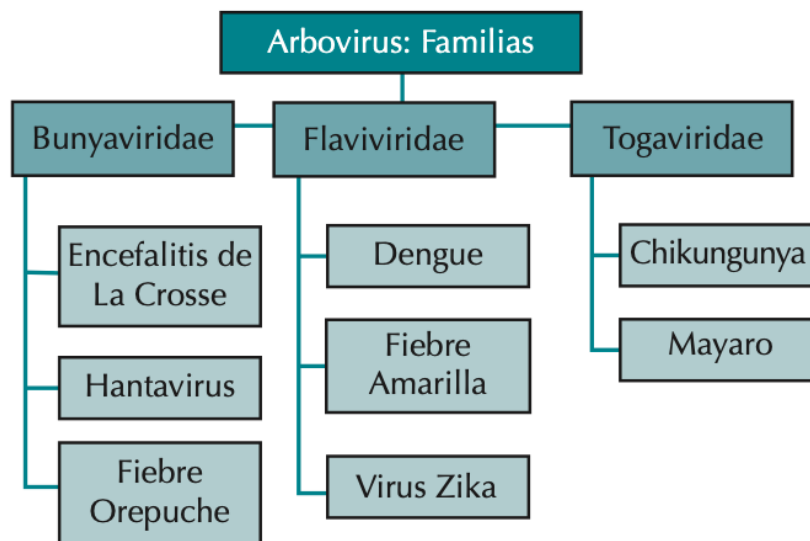


## 1.4.7 Arbovirus

### 1.4.7.1 Generalidades

Descritos desde 1967 según la OMS (Organización Mundial de la Salud) como virus transmitidos por artrópodos, son un grupo de más de 500 virus de los cuales 150 producen afecciones al humano. Los arbovirus iniciaron como una zoonosis utilizando en su ciclo de vida reservorios no humanos los cuales potencian la viremia necesaria para ser captadas por vectores. Además se considera que un 17% de las enfermedades infecciosas son transmitidas por artrópodos como mosquitos, garrapatas y pulgas entre otras, siendo los arbovirus transmitidos por mosquitos los más comunes (Arredondo-García et al., 2016; Ribeiro et al., 2020; Scott C. Weaver, Caroline Charlier, 2018). Los arbovirus se pueden clasificar en 3 grandes familias (Bunyaviridae, Flaviviridae, Togaviridae) (Figura N°7.)

FIGURA 7. División de familias de Arbovirus: Los arbovirus se dividen en 3 grandes familias (Arredonde-Garcia et al., 2016)



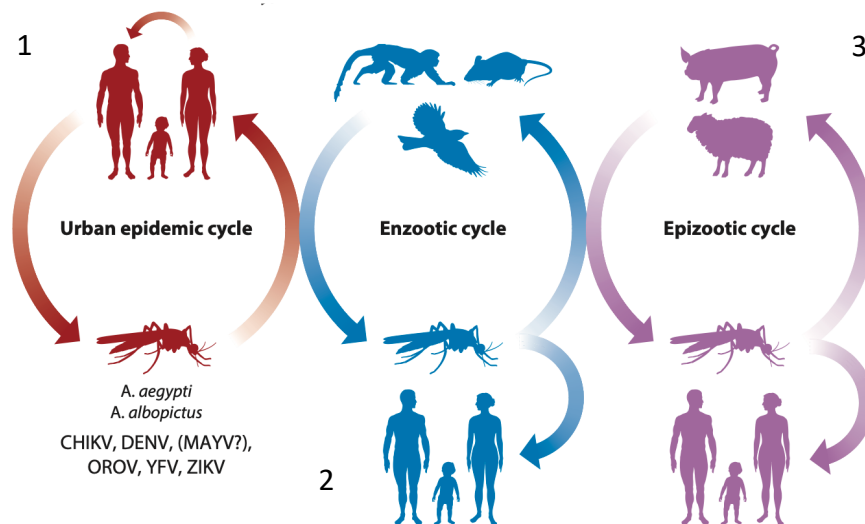
### 1.4.7.2 Arbovirus, su relación con vectores y reservorios

Entre los virus transmitidos por mosquitos, la infección de los seres humanos se produce a través de tres mecanismos principales (Figura N°8). El primer mecanismo es el contagio directo, en el que un vector enzoótico o puente transmite el virus de un huésped enzoótico a un humano. El segundo mecanismo es la amplificación en animales domésticos, seguida de la propagación a los seres humanos. En los mecanismos de propagación y

amplificación secundaria en el ganado, los humanos generalmente no desarrollan una viremia de magnitud suficiente para contribuir a la transmisión en curso. El tercer mecanismo es la transición del ciclo enzoótico a un ciclo humano-mosquito-humano, en el que las personas sirven de huéspedes de amplificación y los mosquitos (*Aedes (Stegomyia) aegypti*, *A. (Steg.) albopictus* y otros) transmiten el virus, a menudo en entornos urbanos (Scott C. Weaver, Caroline Charlier, 2018).

FIGURA 8. Mecanismos de transmisión en virus transmitidos por mosquitos.

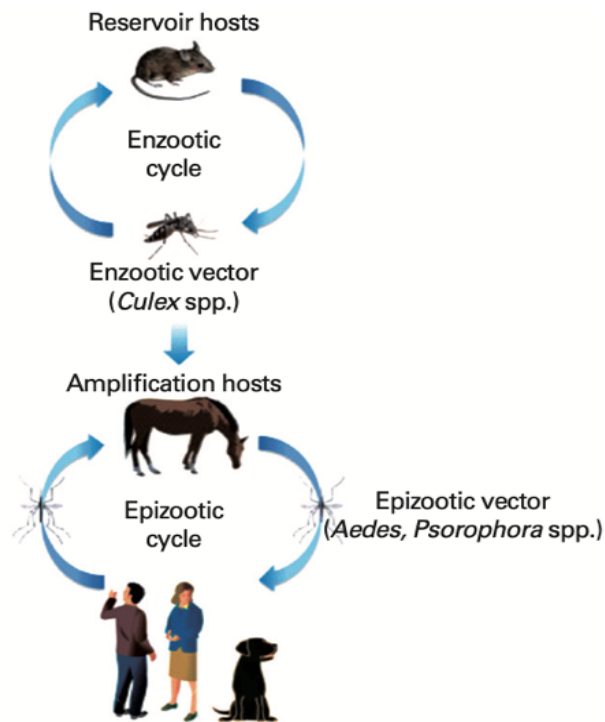
Conformado por: 1. Ciclo urbano epidémico (Mosquito-humano), 2. Ciclo enzoóticos (Mosquito-animal selvático-humano) y 3. ciclos epizoótico (Mosquito-animales domesticos-humano). Los virus con un historial de aparición urbana utilizan principalmente primates no humanos como huéspedes enzoóticos y también infectan a las personas a través de la propagación directa (Scott C. Weaver, Caroline Charlier, 2018).



Ejemplos del caso 1 de transmisión: Flavivirus como el virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus del dengue (DENV) y alfavirus como chikungunya (CHIKV) son arbovirus con un trasfondo marcado por la transmisión humano-mosquito-humano apoyada en un ciclo urbano, la cual se identifica como uno de los mecanismos más peligrosos, ya que está relacionado directamente el humano. Estas infecciones son intensificadas por el hombre, a pesar de que también se producen en regiones más pobladas por mosquitos *Aedes (Stegomyia) aegypti* y *Aedes (Stegomyia) albopictus*. Algunos de estos arbovirus (principalmente Flavivirus) son capaces de producir infecciones asintomáticas, además sus signos y manifestaciones son confundidos con una gripe, pero son capaces de desencadenar manifestaciones más peligrosas (como hemorragias, fallo multiorgánico, encefalitis, etc). Otros arbovirus pueden usar tanto el ciclo 1 urbano como el 2 selvático. Otro ejemplo, es el VEEV cuyo ciclo enzoóticos se mantiene entre roedores y otros

vertebrados (ratas de algodón, ratas espinosas, murciélagos y zarigüeyas) como reservorios y mosquitos del subgénero *Culex* (*Melanoconion*) como vectores primarios. Estos ciclos enzoóticos (selváticos) tienen una distribución limitada y suelen encontrarse en bosques tropicales húmedos o en pantanos de toda América. En cambio, en los ciclos epizoóticos, los équidos son hospedadores de amplificación eficientes con una viremia alta para la misión de los mosquitos (p. ej., *Aedes* y *Psorophora* spp.). Es decir, las infecciones de los caballos se transmitirán a los humanos durante las epizootias de EEEV en los caballos (Go et al., 2014) (Figura N°9).

FIGURA 9. Ciclos de transmisión endémica y epidémica del virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV).



El ciclo endémico de VEEV es entre roedores y otros vertebrados como huéspedes, con mosquitos del subgénero *Melanoconion* como vector principal. Por el contrario, las cepas circulantes de VEEV son transmitidas a los caballos huéspedes amplificados susceptibles por varios mosquitos vectores (p. ej., *Aedes* y *Psorophora* spp.). Durante los ciclos zoonóticos o epidémicos, los caballos son huéspedes eficientes para la amplificación de la hiperviremia transmitida por mosquitos (Go et al., 2014).

### 1.4.7.3 Familias de arbovirus

**Bunyaviridae:** La familia Bunyaviridae es la mayor familia de virus de ARN, y consta de más de 350 virus, divididos en cinco géneros según sus propiedades serológicas, morfológicas y bioquímicas: ortobunyavirus, nairovirus, virus de la mancha blanca, hantavirus y virus Tospo, y otros virus no clasificados. Los virus de esta familia, denominados colectivamente bunyavirus, tienen todos genomas de ARN de sentido negativo o ambiguo, tripartitos, con genes virales situados en uno de los tres segmentos, el segmento grande (L) de sentido negativo, que codifica un ARN dependiente de ARN de sentido negativo o doble (tospovirus) fragmentos medios (M) que codifican polimerasas para la transcripción y replicación, glicoproteínas virales Gn y Gc y proteínas no estructurales de función desconocida (NSm), y fragmento pequeño (S). La proteína N-nucleocápside (N), en algunos géneros, otras proteínas no estructural (NS) que puede desempeñar un papel en la respuesta inmunitaria innata de marcos de lectura superpuestos o no superpuestos (*Horne & Vanlandingham, 2014*).

**Flaviviridae:** incluyen 53 especies de virus reconocidas, 40 de las cuales se sabe que causan enfermedades en los seres humanos. Las partículas de flavivirus son pequeñas (50 nm) y contienen un genoma de ARN monocatenario de casi 11,000 bases de longitud. El genoma es de polaridad positiva, lo que significa que una vez que el ARN genómico viral entra en la célula huésped, actúa como ARN mensajero y se traduce inmediatamente.

El genoma de los flavivirus codifica sólo un marco de lectura abierto, que se traduce en una gran poliproteína. Esta poliproteína se escinde rápidamente en 10 productos individuales. Tres de estas proteínas, llamadas proteínas estructurales, son necesarias para la formación de las partículas virales: las proteínas de la envoltura viral (E) y de la membrana (M) rodean la bicapa lipídica del huésped, que a su vez rodea la proteína de la cápside viral unida al ARN (C).

Las siete proteínas no estructurales restantes (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) no forman parte de las partículas infecciosas del virus, pero son esenciales para el establecimiento de sitios en la membrana del retículo endoplásmico llamados complejos de replicación viral donde se produce el ARN viral. Generalmente las proteínas no estructurales tienen múltiples funciones, incluidas las defensas antivirales que inhiben o modulan el ensamblaje del huésped. Además, el único marco de lectura abierto de la poliproteína está flanqueado por ARN cortos no codificantes que regulan la replicación. Un pequeño ARN subgenómico específico de los flavivirus, denominado ARN de

picoriovirus o ARNf, se origina en la región no codificante 3' y también ayuda a evadir las respuestas inmunitarias del huésped (*Best, 2016*).

**Togaviridae:** La familia Togaviridae comprende cuatro géneros: Alphavirus (con 26 especies), Rubivirus (una especie), Pestivirus (tres especies) y Arterivirus (una especie). Las principales características de los virus miembros de esta familia son: las partículas virales esféricas, de 50-70 nm de diámetro, incluyendo una envoltura con proyecciones superficiales que incorporan dos o tres polipéptidos, generalmente glicosilados; la nucleocápside comprende una proteína del núcleo y una sola hebra de ARN de sentido positivo, con un peso molecular de aproximadamente  $4 \times 10^6$ . Las proteínas son componentes altamente específicos: la proteína estructural nucleocapside C, glucoproteínas de la envoltura (E1 y E2) con especificidades para el grupo y tipo del virus. Los carbohidratos dependen de la enzima glucotransferasa del hospedador. Tienen un ires y es traducido en dos poliproteínas distintas, una con proteínas S y la otra con las NS.

Cuando se caracteriza, el ARN tiene una "tapa" m7G en el extremo 5' y está poliadenilado en el extremo 3'. la maduración se produce por brotación de nucleocápsides esféricas de 30-35 nm de diámetro, con simetría icosaédrica probada o presunta, a través de las membranas citoplasmáticas (*J S Porterfield, J Casals, M P Chumakov, S Y Gaidamovich, C Hannoun, I H Holmes, M C Horzinek, M Mussgay, N Oker-Blom, P K Russell, 1985*).

#### **1.4.7.4 Virus utilizados en el estudio**

- **Virus del Dengue**

El virus del Dengue es un virus transmitido por artrópodos (arbovirus) del género Flavivirus que incluye cuatro serotipos diferentes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4). La OMS considera que la fiebre del dengue es un importante desafío de salud pública mundial que enfrentan los países tropicales y subtropicales. Debido a situaciones climáticas adversas como el calentamiento global, deforestación y edificaciones de poblaciones zonas no urbanizadas, entre otros; se evidencia un aumento mundial prominente entre 1960 y 2010 por casos de la enfermedad del Dengue y un aumento de la zona geográfica de riesgo. La fiebre del dengue es una enfermedad grave parecida a la gripe que afecta a bebés, niños, adolescentes y adultos, aunque rara vez es mortal. Los síntomas aparecen después de un período de incubación de 4 a 10 días después de la

picadura de un mosquito infectado, que suelen durar de 2 a 7 días (*Hasan et al., 2016; Scott C. Weaver, Caroline Charlier, 2018*).

El virus del dengue ingresa al cuerpo del huésped a través de la piel después de ser picado por un mosquito infectado. La inmunidad innata del huésped, la inmunidad celular y la respuesta inmunitaria humoral están implicadas en la progresión de la enfermedad. Los síntomas clínicos más graves aparecen después de que el virus se elimina rápidamente del huésped. Por tanto, las manifestaciones clínicas más graves durante el proceso de infección no tienen nada que ver con el aumento de la carga viral. Se atribuyen cambios en la permeabilidad microvascular y mecanismos de regulación de trombos causados por los monocitos, linfocitos T, sistema del complemento y moléculas inflamatorias (*Halstead, 1988; Hasan et al., 2016; Thomas et al., 2007*).

En África, donde es originario, y en algunas zonas de Asia, los primates no humanos y los mosquitos silvestres tienen un rol en el mantenimiento de un ciclo enzoótico del DENV. (*Thoisly et al., 2009*) A diferencia de otros arbovirus, los mamíferos silvestres no tienen un papel confirmado en el ciclo del dengue en el neotrópico, aunque los estudios serológicos han sugerido un posible ciclo de amplificación secundario en el que participan mamíferos distintos de los primates no humanos. Estudios en la Guayana Francesa, donde está presente los cuatro serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4), la enfermedad es endémica con brotes. Para determinar si los mamíferos salvajes pueden ser infectados por el DENV, se capturaron roedores, marsupiales y murciélagos durante varios períodos, y se detectaron ARN representativos a los 4 serotipos del DENV. Queda por responder la pregunta de si los mamíferos mantienen el DENV en ciclos enzoóticos y pueden desempeñar un papel en su reemergencia en las poblaciones humanas (*Thoisly et al., 2009*).

- **Virus de la Fiebre Amarilla**

El virus de la fiebre amarilla es la especie prototipo de la familia Flaviviridae, el virus original de la "fiebre hemorrágica viral". Dos propiedades biológicas, visceral y neurogénica, son inherentes a todas las cepas del virus de la fiebre amarilla de tipo salvaje y se asocian con frecuencia con el shock severo y el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), posiblemente mediados por citoquinas, proinflamatorias

y desregulación de citoquinas. Los humanos y los primates no humanos fueron anfitriones amplificados en los tres ciclos de transmisión

El genoma de YFV es un genoma de ARN monocatenario de cadena positiva de 11 kb que codifica una poliproteína que se procesa postraduccionalmente y cotraduccionalmente en tres proteínas estructurales y siete no estructurales. La proteína estructural más grande, la proteína de la envoltura (E), es el principal componente de la superficie del virión. Es el inmunógeno primario y juega un papel central en la unión del receptor y la fusión de membranas. Estructura del dominio extracelular (porción N-terminal soluble, que consta de 395 residuos) de la proteína E. El ORF codifica tres proteínas estructurales en el extremo 5' (proteínas de la cápside (C), de la premembrana (preM) y de la envoltura (E)), seguidas por 7 proteínas no estructurales (NS) (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5). El virión maduro incluye estas tres proteínas estructurales, mientras que las proteínas NS son responsables de la replicación y el procesamiento de la poliproteína, incluyendo la división de la poliproteína en proteínas. La proteína C interactúa con el ARN genómico para formar la nucleocápside del virión, ancla la nucleocápside al retículo endoplásmico y proporciona la secuencia de señales a la proteína preM. La glicoproteína preM (27 kDa) forma un heterodímero intracelular para estabilizar la proteína E durante la exocitosis. Durante la exocitosis, la proteína preM es procesada por una proteasa similar a la furina dejando una pequeña proteína estructural M anclada en la envoltura del virus del virión extracelular.

- **Virus Mayaro**

El virus Mayaro (MAYV) es un alfavirus de ARN monocatenario, positivo y envolvente, perteneciente al complejo Semliki. El MAYV es el agente causante de la fiebre de Mayaro. El complejo Semliki está formado por ocho virus de importancia médica y veterinaria: Bebaru, Chikungunya, Getah, Mayaro, O'nyongnyong, Ross River, Semliki Forest y Una. Dado que estos ocho virus pertenecen al mismo complejo serológico, es difícil obtener un diagnóstico preciso del virus fuera de un laboratorio bien equipado. Además, el virus está estrechamente relacionado y se transmite juntamente con la encefalitis equina venezolana y el virus chikungunya.

El MAYV se mantiene en un ciclo endémico a través de la evolución continua mediante la transmisión entre mosquitos diurnos del dosel y primates no humanos, roedores, marsupiales y aves. Al igual que el ciclo vital del virus de la fiebre amarilla, se cree que la transmisión del MAYV a los seres humanos se produce en un ciclo rural, en el que los

mosquitos transmiten el virus a los seres humanos que viven cerca o utilizan con frecuencia los hábitats forestales. Hasta la fecha, los casos humanos de fiebre de Mayaro se han debido principalmente al contagio accidental del ciclo silvestre (*Diagne et al., 2020*).

- **Virus Chikungunya**

El virus Chikungunya (CHIKV) es un patógeno considerado como arbovirus que pertenece al género *Alfavirus* de la familia *Togaviridae*, complejo *Semliki*. La infección por el CHIKV en individuos infectados suele dar lugar a una enfermedad leve y autolimitada caracterizada por fiebre, sarpullido, mialgias y artralgias que puede durar de semanas a meses. Los síntomas suelen aparecer entre 4 y 7 días después de la exposición al CHIKV. Aunque el chikungunya es una enfermedad autolimitada con una baja tasa de mortalidad asociada, afecta a niños pequeños, ancianos y personas con enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedades renales y hepáticas crónicas y puede inducir una artralgia crónica que impacta la calidad de vida de los pacientes (*Khongwichit et al., 2021*).

Los huéspedes vertebrados no humanos desempeñan un papel importante en el mantenimiento de los arbovirus en ciclos de infección endémicos. Diversos estudios se han relacionado a algunos mamíferos con viremia positiva para CHIKV, al igual que anfibios y reptiles (pitón de bola, pitón de Birmania, serpiente de liga, iguana verde, entre otros), y la seroconversión se produjo en todos los reptiles virémicos, en los sapos de Texas y en los murciélagos. Además, se encontraron niveles de anticuerpos neutralizantes positivo para mamíferos domésticos, granjeros, salvajes, perro, cerdo, caballo, ternero, cabra, armadillo y mapache y una pequeña proporción de aves (*Matusali et al., 2019*).

- **Virus UNA**

El virus Una (UNAV) de la familia *Togaviridae* es un *alfavirus* miembro del complejo del virus del bosque *Semliki*. El UNAV se aisló originalmente del mosquito *Psorophora ferox* en el estado de Pará, Brasil. Sin embargo, está ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales de América Central y del Sur (Brasil, Colombia, Guayana Francesa, Panamá, Surinam, Trinidad y Venezuela) con una baja seroprevalencia. Aunque se ha informado previamente de infecciones por UNAV en seres humanos, no están asociadas a ningún tipo de enfermedad en particular. (*Diaz et al.,*

2003). Estudios en Argentina indican detección de anticuerpos neutralizantes contra el UNAV en aves y caballos. Al igual que una seroprevalencia en humanos baja (títulos de 1:20 a 1:40) pero existente (*Diaz et al., 2003*).

- **Virus de la Encefalitis Equina Venezolana**

El virus de la encefalitis equina venezolana es un patógeno que en los humanos es potencialmente mortal transmitido por un grupo de mosquitos tropicales poco estudiados (*Ochlerotatus taeniorhynchus* y *Aedes taeniorhynchus*) (Smith et al., 2008; Scott C. Weaver et al., 2004). Se transmite en animales endémicos y durante los ciclos epidémicos. Los grandes brotes humanos suelen estar asociados a un gran número de caballos infectados con cepas circulantes del VEEV que se vuelven virémicas e infectan a los mosquitos que a su vez son capaces de transmitir a los caballos y a los humanos.

Los estudios experimentales de la infección por el VEEV en caballos con cepas del virus aisladas durante brotes han mostrado diferencias considerables en la capacidad de las cepas epidémicas y virulentas para utilizar los caballos como huésped eficaz para la amplificación (J.-P. Carrera et al., 2013). Estudios indican que la propagación geográfica de VEEV, su buena adaptación y replicación en equinos puede deberse a cepas enzooticas de VEEV que representan los progenitores de los subtipos epizooticos (13 subtipos, 7 que no son del género Alphavirus (IAB, Ie como las más comunes) (*S C Weaver et al., 2004*).

También se han descrito otros posibles huéspedes a través de infecciones experimentales en el laboratorio, informes de infecciones naturales o serología en animales salvajes, incluidos otros roedores, murciélagos, jabalíes, ciervos, conejos y zarigüeyas. Estos hospedadores también tienen el potencial de actuar como reservorios, y se necesitan más estudios de campo en las áreas del VEEV para determinar la contribución de cada hospedador a su ciclo animal local (*Azar et al., 2020*).

- **Virus Madariaga**

El virus Madariaga (MADV) y el virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV) son virus de ARN monocatenario de sentido positivo transmitidos por mosquitos (Togaviridae, Alphavirus). El Madariaga (MADV, antes conocido como EEEV sudamericano) no estuvo asociado a un brote humano hasta 2010, cuando se notificó el primer brote humano conocido de MADV en Darién, Panamá. Durante este brote, el MADV y el VEEV se propagaron juntos, con más de 100 casos sospechosos y 19

pacientes hospitalizados con encefalitis. Se confirmaron 13 casos de MADV, 11 de VEEV y un caso de doble infección (*J.-P. Carrera et al., 2013*).

La identificación de los huéspedes del MADV endémico es fundamental para comprender la dinámica de transmisión, especialmente tras la aparición del MADV como patógeno humano. Los hospedadores reservorios son susceptibles a la infección, producen altos títulos de viremia persistente y también albergan artrópodos vectores capaces de transmitirla. Las pruebas de serología y viremia se utilizan para examinar inicialmente a los posibles huéspedes de amplificación con el fin de identificar las especies actualmente infectadas o las especies previamente expuestas al virus. En estudios anteriores sobre la infección por MADV en animales salvajes se ha encontrado viremia en roedores *Oryzomys*, zarigüeyas comunes (*Didelphis marsupialis*) y varias aves. Al igual que ratas de algodón (*Sigmodon hispidus berlandieri*) y gorriones (*Passer domesticus*) (*Vittor et al., 2016*).

- **Punta Toro Virus**

Es una especie de virus perteneciente a la familia *Bunyaviridae* y al género *Phlebovirus*. Los viriones poseen envoltura nuclear de una sola capa y nucleocápside. Los viriones son de apariencia esférica y pleomórfica, sin protusiones aparentes y con unas dimensiones entre 80-20 nm. Su genoma está formado por tres segmentos de ARN monocatenario circular con sentido negativo y ambisense. Se había determinado que el vector eran los flebotomos del género *Lutzomyia* (implicados también en la transmisión de la Leishmaniasis), aunque existen algunos transmitidos por garrapatas, pero aún se desconoce el papel de los diferentes vectores en la infección humana y animal. El PTV miembro del grupo de la fiebre de la mosca de la arena, se describió inicialmente en humanos en 1966 tras ser aislado de un soldado en Panamá que tenía fiebre, dolor de cabeza, mialgia y leucopenia. Las cepas del PTV (PaAR 2381, GML 902876 y GML 902878) se aislaron de flebotomos y hámsters centinelas durante los estudios de campo sobre arbovirus realizados por el Instituto Conmemorativo Gorgas en el distrito de Bayano (Panamá) en 1975-1976.

En el 2009, el Instituto Conmemorativo Gorgas de Ciudad de Panamá analizó muestras negativas de dengue de un brote en ese año para detectar alfavirus, flavivirus y phlebovirus y detectó el complejo de especies de virus de Punta Toro (PTV) en algunas muestras. La filogenética de la PTV se ha caracterizado exhaustivamente, pero nuestra

búsqueda en la literatura no reveló informes de otros casos de PTV en humanos (*Gundacker et al., 2017; Mattar V & González Tous, 2017; Palacios et al., 2015*).

### **Pan Sloth Virus 149 y Pan Sloth Virus D50**

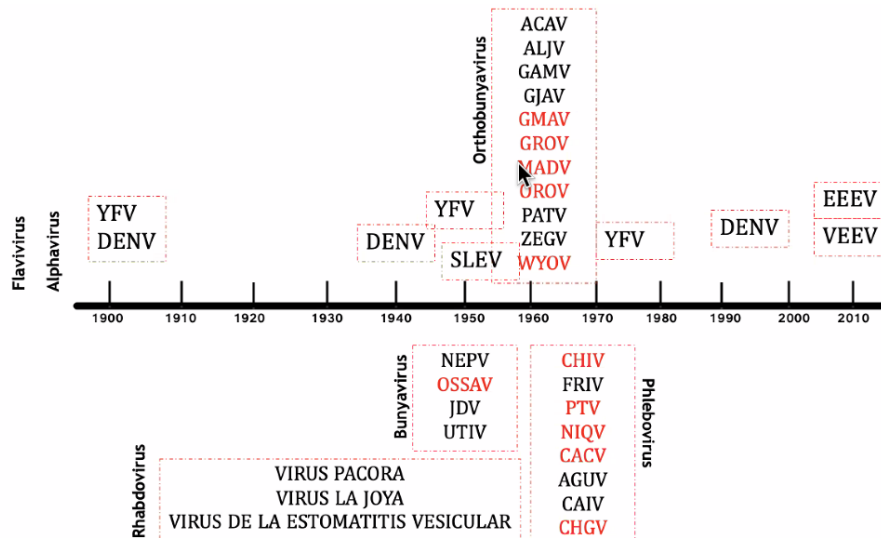
Los virus del género Orbivirus de la familia Reoviridae son virus de ARN de doble cadena, tienen un genoma que consta de 10 segmentos de RNA que codifican siete proteínas estructurales (VP1 a VP7) y tres o cuatro proteínas no estructurales (NS1 a NS4) del virus. Una de las características de los virus de ARN con genomas segmentados es que pueden ocurrir reordenamientos entre segmentos genéticos de diferentes ancestros para formar nuevos genomas (*H Attoui et al., 2016; Roy, 1996*). Se han descrito reordenamientos genéticos naturales en circovirus como la lengua azul (BTV), la enfermedad hemorrágica epidémica (EHDV) (*Houssam Attoui et al., 2009*). Estudios realizados en Panamá en donde se determinó secuencias codificantes completas de 5 cepas divergentes (GBT 1144, D50, VP 91 E, VP 188 G, VP 202 A) del virus Changuinola (CGLV), donde se utilizó metagenómica viral. En especial el D50 que es uno de los que se ha utilizado en este estudio, su fuente de mosquitos (*Haemagogus spp.*) ubicado en Panamá y colectado en 1967. Donde los análisis genéticos de estas cepas panameñas del virus revelaron una probable reasignación entre múltiples segmentos del virus (*Phan et al., 2020*). Ambos virus Pan-sloth 149 y Pan-sloth D50 probablemente vinculados con este género.

#### **1.4.7.5 Arbovirus en Panamá**

En 1978 Pedro Galindo en un artículo de revisión bibliográfica muestra 40 diferentes tipos de arbovirus encontrados en Panamá (*Pedro Galindo, 1978*). En cada virus se incluye un resumen conciso de los conocimientos de ese entonces sobre el agente, incluyendo su sistemática, historia y estatus, huésped vertebrado y artrópodo, interrelaciones con otros arbovirus, patogénesis y otra información relacionada e incluyendo una breve discusión sobre las interrelaciones ecológicas de los arbovirus de Panamá. Desde ese entonces se han vistos a través del tiempo diferentes identificaciones de arbovirus que han causado brotes como es el caso de DENV, VEEV y EEEV, CHIKV, ZIKV, PTV entre otros (Figura N° 10) (*J.-P. Carrera et al., 2013; J. P. Carrera et al., 2017; Ribeiro et al., 2020; Yamilka et al., 2019*). La Figura 5 muestra una línea de tiempo

con los arbovirus más importantes por los brotes inducidos y con los virus descritos por primera vez en Panamá durante el siglo 20 y la primera decena del 21.

FIGURA 10. Algunos Arbovirus detectados o identificados en Panamá (Yamilka et al., 2019)



#### 1.4.7.6 Control y Vigilancia

La prevención y el control de arbovirus juega un papel importante a nivel mundial, debido a la que la disposición de vacunas y medicamentos antivirales es casi nula contra la mayoría de estos virus. Una vigilancia efectiva nos garantiza una menor gravedad y la disminución de probabilidades de largos brotes. Los arbovirus tienen ciclos de transmisión complejos con tropismo de doble huésped: se replican en huéspedes vertebrados (como aves o mamíferos) y en vectores artrópodos hematófagos (como mosquitos o garrapatas). Hay que tener en cuenta esta complejidad, y un sistema de vigilancia ideal debe basarse en diferentes fuentes de información y puede incluir datos meteorológicos, pruebas de infección por el virus en huéspedes vertebrados, estudios entomológicos, detección del virus en los vectores e informes de enfermedades humanas o animales. La escala de la vigilancia puede variar regionalmente y es particularmente difícil en lugares remotos o en áreas con recursos e infraestructura limitados.

En los casos humanos o animales depende de que los hospitales, laboratorios y profesionales de la salud notifiquen a las autoridades de salud pública los casos confirmados o sospechosos de infección por arbovirus que se produzcan en la población. Por ejemplo, en diferentes países (Estados Unidos, Australia, Brasil, Argentina, entre

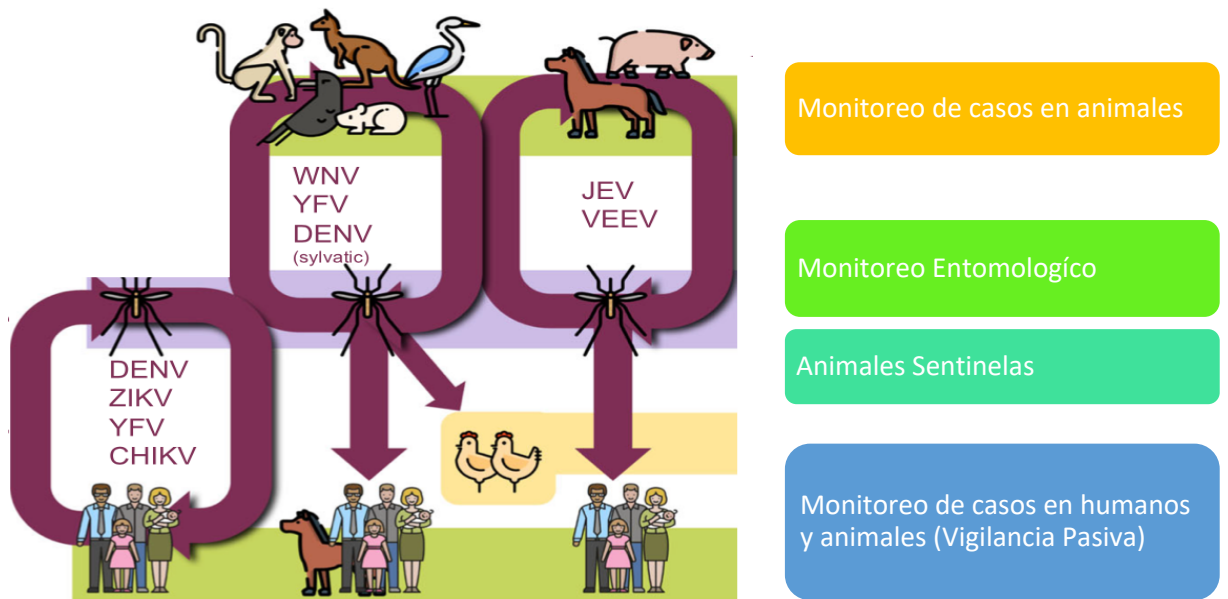
otros) hay redes de vigilancia activa de arbovirus (ArboNET, VNO, NNDSS, entre otros). Requieren definiciones estrictas de los casos y criterios de pruebas de diagnóstico de laboratorio, así como información demográfica, clínica, de laboratorio y epidemiológica.

Una de las principales limitaciones del seguimiento de casos humanos y animales es que, en muchos países con recursos limitados, no se dispone de pruebas de laboratorio confirmatorias, por lo que el diagnóstico de enfermedades por arbovirus se basa en síntomas clínicos. Sin embargo, los síntomas pueden superponerse entre patógenos arbovirus y no arbovirus, lo que complica el diagnóstico clínico diferencial. Además, la mayoría de las infecciones por arbovirus son leves o subclínicas, lo que puede dar lugar a un subregistro. En última instancia, el uso de datos de casos humanos y animales no es ideal porque sugiere que se ha producido una transmisión activa más difícil de controlar.

El uso de animales centinelas aportan pruebas de la actividad viral y del aumento del riesgo para un animal o población objetivo. Para ello, los animales inmunológicamente ingenuos se colocan en lugares específicos, se desangran de acuerdo con un calendario establecido y se someten a pruebas de seroconversión que pueden indicar la presencia de anticuerpos específicos contra el virus. El aislamiento del virus o la detección molecular en muestras de sangre previas a la seroconversión pueden proporcionar aislados y/o secuencias para el genotipado de las cepas de virus circulantes. Un animal centinela adecuado debe ser susceptible al virus que se vigila; producir una respuesta de anticuerpos detectable en las pruebas serológicas; tener una baja morbilidad y mortalidad; ser atractivo para el vector, ser fácil de usar, permitir un muestreo múltiple.

Al igual que la vigilancia debe ser basada en el monitoreo de vectores (mosquitos), en donde los mosquitos se recolectan, identifican, agrupan por especie u otra taxonomía y se envían a un laboratorio para analizar su estado de infección viral. En áreas con baja infestación de mosquitos o al comienzo de la temporada de transmisión, se debe realizar una vigilancia específica en los "puntos calientes" donde se sospeche una alta incidencia de arbovirus; a medida que el número de vectores aumenta más adelante en la temporada, se deben expandir los sitios de muestreo para una vigilancia más amplia (*Ramírez et al., 2018*) (*Figura N° 11*).

FIGURA 11. Ciclos de transmisión de los arbovirus y diferentes estrategias de vigilancia (monitoreo de casos en animales silvestres, monitoreo entomológico, uso de animales centinelas, y monitoreo en casos de humanos y animales domésticos y agropecuarios) (Ramírez et al., 2018).



## 1.4.8 Hemoflagelados Parásitos

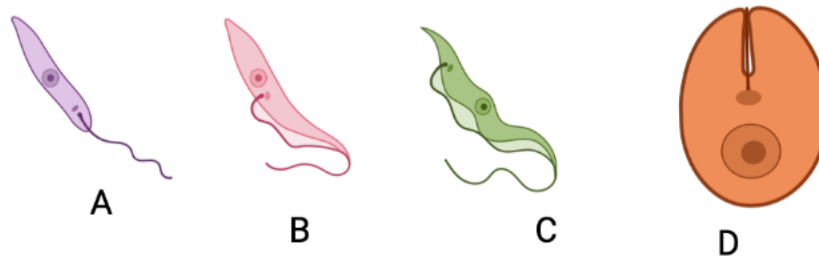
### 1.4.8.1 Generalidades

Los hemoflagelados incluyen parásitos protozoarios de importancia médica para los seres humanos y otros vertebrados. Dos géneros con impacto global en la salud humana son *Leishmania* y *Trypanosoma*. El primer género contiene especies que causan leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral; el segundo género incluye los patógenos de la enfermedad de Chagas y la enfermedad del sueño africana en el hemisferio occidental (Schuster & Sullivan, 2002).

Una característica que define al orden hemoflagelados es un orgánulo único que contiene ADN (cinetoplastos) asociado a la mitocondria del organismo. Son polimórficos y presentan diferentes estadios en su ciclo vital. Morfológicamente, estos estadios difieren en la forma, la posición de los cinetoplastos y la extensión de los flagelos. Los flagelos pueden aparecer como estructuras muy acortadas (típicas del estadio intracelular de los amastigotes de *Leishmania spp.* y *Trypanosoma cruzi*), como un orgánulo extendido que actúa como una membrana ondulante (forma sanguínea de *Trypanosoma spp.*), o más típicamente como protozoos flagelados (estadio de promastigote de *Leishmania*) (Figura N° 12).

FIGURA 12. Estadios de los hemoflagelados que infectan al humano

(A) Estadio de promastigote de *Leishmania* spp. que se encuentra dentro del insecto vector; (B) estadio de epimastigote típico de *Trypanosoma* spp. en el insecto vector; (C) estadio de tripomastigote correspondiente a la forma sanguínea de *Trypanosoma* spp.; (D) estadio de amastigote, forma intracelular de *T. cruzi* y *Leishmania* spp. Creado en Biorender (*Schuster & Sullivan, 2002*).



Además de las diferencias morfológicas, existen distinciones fisiológicas, bioquímicas y metabólicas de estos parásitos que reflejan los hábitats en los vertebrados (huésped definitivo) o en los insectos vectores (*Schuster & Sullivan, 2002*).

La alternancia de vertebrados a insectos requiere un cambio de hospedadores poiquilotérmicos a homeotérmicos, y el cambio de temperatura impone un estrés al parásito. Un insecto adquiere parásitos infecciosos al tomar una alimentación sanguínea de un mamífero infectado. El parásito sigue un ciclo de desarrollo dentro del insecto para producir un estadio infeccioso para los mamíferos, que luego se transmite a través de la picadura del insecto (a través de la probóscide) o a través de un depósito de heces en la superficie de la piel con la subsiguiente contaminación de la lesión en la piel inducida por el insecto.

#### 1.4.8.2 Género *Leishmania*

La Leishmaniasis es una enfermedad transmitida por vectores (género *Lutzomyia*, *Phlebotomus* y otros) y causada por protozoos flagelados del género *Leishmania*. La enfermedad está muy extendida en las regiones tropicales y subtropicales y se da en 98 países de Europa, África, Asia y América. (*Steverding, 2017*).

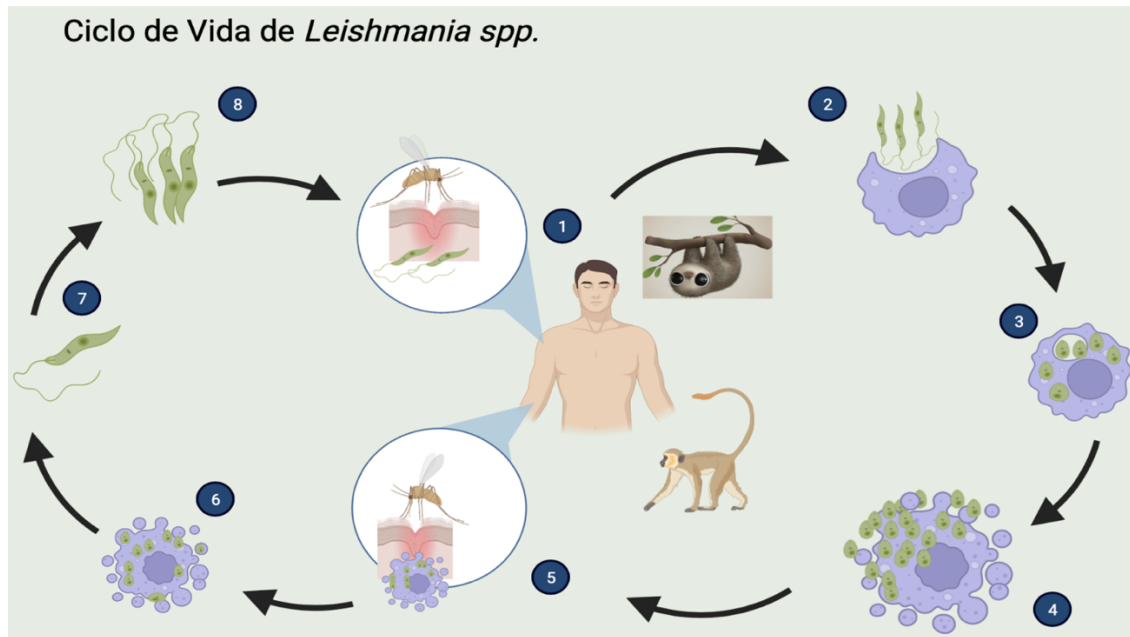
Hay diferentes tipos de Leishmaniasis:

Leishmaniasis visceral: También conocida como *Kala Azar*, si no hay un tratamiento suele ser fatal en más del 95% de los casos. Se caracteriza por fiebre irregular, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia y anemia. La mayoría de los casos se han registrado en Brasil, África Oriental e India. Se estima que se producen entre 50 000 y 90 000 casos nuevos en todo el mundo cada año, de los cuales solo entre el 25 y el 45 % se notifican a la Organización Mundial de la Salud. Sigue siendo una de las principales enfermedades parasitarias capaz de causar brotes y muertes. En 2020, más del 90 % de los casos nuevos notificados a la OMS ocurrieron en 10 países: Brasil, China, Eritrea, Etiopía, India, Kenia, Somalia, Sudán, Sudán del Sur y Yemen (*World Health Organization (WHO), 2022a*).

Leishmaniasis cutánea: Es la forma más frecuente y produce, en las zonas expuestas del cuerpo, lesiones cutáneas, sobre todo ulcerosas, que dejan cicatrices de por vida y causan discapacidad grave. Aproximadamente el 95% de los casos se producen en las Américas, la cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia Central. En 2020, más del 85% de los nuevos casos aparecieron en 10 países: Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, Iraq, Libia, Pakistán, Perú, República Árabe Siria y Túnez. Se calcula que cada año hay en el mundo entre 600 000 y 1 millón de nuevos casos (*Megías Montijano et al., 2001*). Leishmaniasis mucocutánea: La leishmaniasis mucocutánea se define como la afectación de la mucosa de las vías respiratorias superiores, caracterizada por lesiones inflamatorias y destructivas que suelen afectar a la nariz, el paladar, la faringe y, raramente, la laringe. Más del 90% de los casos se dan en el Estado Plurinacional de Bolivia, Brasil, Etiopía y Perú (F. et al., 2018; Megías Montijano et al., 2001; World Health Organization (WHO), 2022a).

FIGURA 13. La leishmaniosis se transmite por la picadura de hembras infectadas de *Phlebotomus*

(en Eurasia y África) y *Lutzomyia* (en América). Los flebótomos inyectan el estadio infeccioso (es decir, los promastigotes) desde su probóscide durante la ingesta de sangre (1). Los promastigotes que llegan a la lesión de punción son fagocitados por los macrófagos y otros tipos de células fagocíticas mononucleares (2). Los promastigotes se transforman en estas células en la fase tisular del parásito (amastigotes), que se multiplican por división simple y proceden a infectar otras células fagocíticas mononucleares (3). El parásito, el huésped y otros factores influyen en que la infección sea sintomática y en que se produzca una leishmaniosis cutánea, mucocutánea o visceral. Los Flebotominos se infectan al ingerir células infectadas durante las ingesta sanguíneas (5). En los flebotominos, los amastigotes se transforman en promastigotes (6) se desarrollan en el intestino (en el intestino posterior para las especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*; en el intestino medio para las especies del subgénero *Leishmania*) y migran a la probóscide (7,8) Creado con Biorender (Center for Disease Control and Prevention, 2020).



### 1.4.8.3 Género *Trypanosoma*

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad infecciosa zoonótica que afecta a los seres humanos en América Latina. La enfermedad está causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* que vive y se multiplica en las células de diversos tejidos. El parásito suele transmitirse a través de las heces de chinches hematófagos pertenecientes a la subfamilia Triatominae (chinches besuconas) siendo *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus megistus* los vectores más importantes. Como *T. cruzi* no puede penetrar en la piel intacta, entra en el cuerpo humano a través de microlesiones que se han introducido y contaminado con heces del vector cuando las personas se rascan debido a la picadura del vector. Sin embargo, *T. cruzi* es capaz de atravesar las membranas mucosas intactas (como la conjuntiva y el epitelio gástrico) (Gottdenker et al., 2012a). Otras formas de transmisión son las transfusiones de sangre, los trasplantes de órganos, la leche materna, la transmisión congénita a través de la placenta y la ingestión de alimentos y bebidas contaminados.

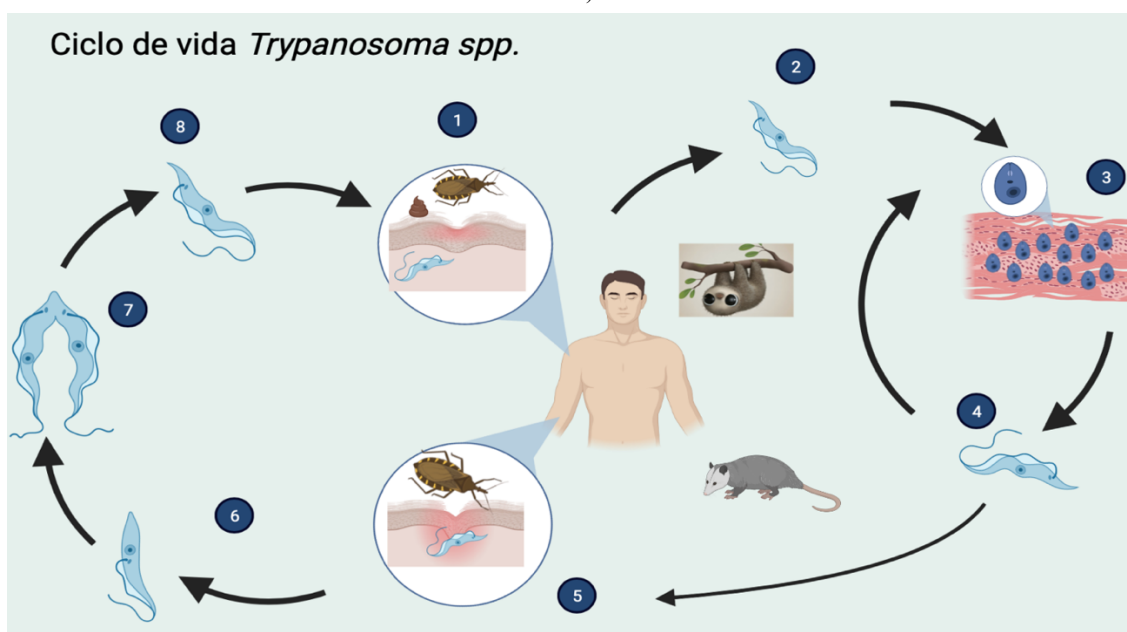
En cuanto a las fases clínicas de la enfermedad, después de la fase aguda (2 meses), la infección se convierte en crónica, sin embargo, sólo un pequeño porcentaje de individuos infectados presenta síntomas clínicos suficientes para su identificación y tratamiento. Las personas afectadas suelen ser asintomáticas durante muchos años. El 30-40% de las personas infectadas crónicamente desarrollan síntomas años después de la infección. El desarrollo de los síntomas clínicos es inicialmente insidioso y no evidente. El corazón, el tracto gastrointestinal y, en menor medida, el sistema nervioso central (SNC) son los principales órganos o sistemas que constituyen la enfermedad clínica (*World Health Organization (WHO), 2021a*). Algunos de los signos y síntomas asociados enfermedad crónica del Chagas son:

*Signos y síntomas asociados con falla cardíaca:* braditritmia, taquirritmia: Palpitaciones, síncope, presíncope, desmayo, muerte súbita. Falla cardíaca: disnea de esfuerzo. Congestión hepática: dolor en la región hipocondríaca derecha. Congestión pulmonar: ortopnea, disnea paroxística nocturna. Eventos tromboembólicos venosos y sistémicos.

*Signos y síntomas asociados con falla digestiva:* Disfagia: en relación con los sólidos/líquidos; cambios con el calor/frío; localización de la disfagia. Regurgitación: activa (tras la ingestión) o pasiva (en casos avanzados, generalmente en decúbito). Dolor torácico retroesternal, Odinofagia, Tos nocturna, Sialorrea.

FIGURA 14. El ciclo inicia cuando el insecto vector pica al ser humano, o a cualquier otro mamífero reservorio y posteriormente defeca

(1). El parásito fue depositado junto con las heces en forma de tripomastigota metacíclico. Este puede penetrar en el nuevo hospedero a través de la herida o atravesando las membranas mucosas con ayuda del flagelo. También puede penetrar por los rasguños y heridas que se produce el hospedero al rascarse el sitio de la picada. La superficie celular del hospedero contiene algunas macromoléculas, entre ellas laminina, fibronectina y sulfato de heparina, las cuales son esenciales para permitir la adhesión del parásito y para el proceso de invasión celular (2). Cuando el parásito penetra las células del hospedero, experimenta una reducción del flagelo, y se transforma en amastigota (3). Tras varias reproducciones, se ha originado una gran cantidad de amastigotas, las cuales forman un pseudoquiste, posteriormente los amastigotas se transforman nuevamente en tripomastigotas y ocurre la lisis celular (4). Cuando un insecto vector (Triatomino) ingiere la sangre de un ser humano, o cualquier otro mamífero infectado, algunos tripomastigotas son ingeridos también (5). Cuando los parásitos alcanzan el intestino del insecto, se transforman en epimastigotas, los cuales pueden reproducirse por mitosis, constituyendo la segunda fase reproductiva. Transcurridos entre 15 días y un mes, los parásitos migran al recto del insecto y se transforman en tripomastigotas metacíclicos (6,7). Más tarde, cuando el insecto se alimenta nuevamente y defeca, los tripomastigotas serán depositados junto con las heces, y comenzará nuevamente el ciclo (8). Creado en Biorender.(Center for Disease Control and Prevention, 2019).



Otra especie de tripanosoma es *Trypanosoma rangeli*, aunque este parásito infecta a una amplia variedad de mamíferos en la región geográfica de América Central y del Sur, no se considera patógeno para los humanos. Comparte huéspedes, vectores y muchos antígenos con *T. cruzi*, lo que a menudo conduce a un diagnóstico erróneo de la enfermedad de Chagas (Azambuja et al., 2017). *Trypanosoma rangeli* infecta a varias especies de triatominos del género *Rhodnius* y mamíferos en Sudamérica. Se sabe que su transmisión se produce cuando un insecto sano se alimenta de un mamífero infectado o cuando un insecto infectado pica a un mamífero sano. A pesar de nuestro conocimiento del proceso de transmisión, siguen existiendo lagunas en nuestra comprensión de la interacción triatómido-parásito-mamífero. Hasta la fecha, no ha quedado claro cómo se mantienen los parásitos en estos huéspedes debido a hallazgos contradictorios. Aparentemente, no existen formas de replicación intracelular como *T. cruzi* y *Leishmania*,

ni formas proliferativas en el torrente sanguíneo como *T. brucei* y *T. conorhini*. Sin embargo, *T. rangeli* se encuentra abundantemente en la naturaleza e infecta a varias especies de triatominos y a una amplia variedad de mamíferos (De Lima Ferreira et al., 2015; Ferreira et al., 2010).

**Tabla 3.** *Diferentes mamíferos infectados por T. rangeli*

Orden	Especie
Carnivora	<i>Canis familiaris, Nasua nasua, Procyon cancrivorus</i>
Cingulata	<i>Priodontes maximus</i>
Chiroptera	<i>Carollia perspicillata</i>
Didelphimorphia	<i>Didelphis albiventris, Didelphis aurita, Didelphis marsupialis, Philander opossum.</i>
Primates	<i>Alouatta belzebul, Alouatta caraya, Sapajus libidinosus, Saguinus bicolor bicolor</i>
Rodentia	<i>Coendou prehensilis, Trinomys dimidiatus</i>

#### 1.4.8.4 Control y Vigilancia de Hemoflagelados

##### 1.4.8.4.1 En cuando a la Leishmaniasis:

La prevención y el control de la leishmaniasis requieren una combinación de estrategias de intervención, ya que la transmisión tiene lugar en un sistema biológico complejo que engloba el huésped humano o reservorio animal, el parásito y el flebótomo vector. Las principales estrategias tienen en cuenta lo siguiente:

- El diagnóstico temprano y la atención eficaz a los casos reducen la prevalencia de la enfermedad y previenen la discapacidad y la muerte, ayudando a reducir la transmisión y a controlar la propagación y la carga de la enfermedad.
- Actualmente hay fármacos muy eficaces y seguros contra la leishmaniasis, especialmente contra la forma visceral, aunque su uso puede resultar difícil.
- El acceso a estos medicamentos ha mejorado de forma significativa gracias a un programa de precios negociado por la OMS y a un programa de donación de medicamentos a través de la Organización.
- La lucha anti vectorial ayuda a reducir o interrumpir la transmisión de la enfermedad porque reduce el número de flebótomos. Entre los métodos de control figuran los insecticidas en aerosol, los mosquiteros tratados con insecticida, la gestión del medio ambiente y la protección personal.
- La vigilancia eficaz de la enfermedad es importante para su monitorización oportuna y la adopción de medidas durante las epidemias y las situaciones en las que hay una elevada tasa de letalidad a pesar del tratamiento.

- El control de los reservorios animales resulta complejo y debe adaptarse a la situación local.
- La movilización y la formación de las comunidades con intervenciones eficaces para modificar las pautas de comportamiento deben adaptarse siempre al ámbito local.
- Las alianzas y la colaboración con diferentes partes interesadas y otros programas de lucha contra enfermedades transmitidas por vectores son esenciales a todos los niveles (*World Health Organization (WHO), 2022*).

#### 1.4.8.4.2 En la enfermedad de Chagas

La prevención y el control de la enfermedad de Chagas, a causa del gran número de animales silvestres que sirven de reservorio a este parásito en las Américas, no puede erradicarse. En vez de ello, los objetivos de control consisten en eliminar la transmisión y lograr que la población infectada y enferma tenga acceso temprano a la atención de salud. Hasta el día de hoy, no existen vacunas contra la enfermedad de Chagas. *T. cruzi* puede infectar a muchas especies de triatominos, la gran mayoría de los cuales se encuentran en la Región de las Américas. El control de vectores ha sido el método más eficaz de prevención en esta región. El cribado de la sangre es necesario para prevenir la infección por transfusiones sanguíneas y el trasplante de órganos y para aumentar la detección y el cuidado de la población afectada en todo el mundo.

Según la zona geográfica, la OMS recomienda los siguientes métodos de prevención y control:

- Rociamiento de las casas y sus alrededores con insecticidas de acción residual.
- Mejora de las viviendas y su limpieza para prevenir la infestación por el vector.
- Medidas preventivas personales, como el empleo de mosquiteros, buenas prácticas higiénicas en la preparación, el transporte, el almacenamiento y el consumo de los alimentos.
- Desarrollo de actividades de información, educación y comunicación contextualizadas para los diferentes actores y escenarios sobre las medidas preventivas y los instrumentos de vigilancia.
- El tamizaje en donaciones sanguíneas, en trasplantes de órganos, tejidos o células donados y en los receptores de estos.

- Acceso al diagnóstico y el tratamiento para las personas en las que esté indicado o recomendado el tratamiento antiparasitario, especialmente los niños y las mujeres en etapas tempranas del embarazo y tamizaje de los recién nacidos y otros hijos de madres infectadas que no hayan recibido antes tratamiento antiparasitario para diagnosticarlos y tratarlos a tiempo (World Health Organization (WHO), 2021b).

#### **1.4.8.5 Hemoflagelados en Panamá**

El istmo de Panamá es el enlace geográfico entre Centroamérica y Sudamérica, proporcionando un corredor biológico entre Colombia y Costa Rica, que aumenta el riesgo de entrada de patógenos, vectores y reservorios de Centroamérica y Sudamérica. Investigaciones publicadas en la época de los 70s indican la prevalencia de enfermedades como la Enfermedad de Chagas en la población panameña siendo las zonas rurales más afectadas. Al igual que una lista de distintos reservorios y vectores de *T. cruzi* y *T. rangeli* en nuestro país (Sousa, 1972). Por otra parte, estudios epidemiológicos realizados en los 80s sobre Leishmaniasis cutánea brindan información sobre reservorios, vectores y la parasitosis en humanos haciéndose ver presente en nuestro país (H. Christensen et al., 1984). Lo que indica los primeros estudios publicados sobre diferentes hemoflagelados que hasta hoy en día siguen siendo un problema de salud pública en nuestro país.

# CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

## **2.1 METODOLOGÍA**

### **2.1.1 Tipo de Estudio**

El estudio fue de tipo descriptivo y experimental. En donde se evaluó la seroprevalencia de hemoflagelados y arbovirus en perezosos, capturados en áreas rurales de la provincia de Panamá Oeste.

### **2.1.2 Población**

Se evaluaron muestras de 60 sueros de perezosos de “2 y 3 dedos” (*Choloepus hoffmanni* y *Bradypus variegatus*) almacenados a -20°C en el banco de sueros del Departamento de Investigaciones en Parasitología del ICGES. Estos sueros fueron obtenidos durante investigaciones previas realizadas en comunidades rurales de los distritos de La Chorrera y Capira durante los años 2013-2018. Para el análisis de seroprevalencia de arbovirus se utilizaron 60 muestras de suero y para el análisis de seroprevalencia de hemoflagelados 51 muestras de suero.

### **2.1.3 Descripción del área de muestreo**

Realizamos este estudio en comunidades rurales de la provincia de Panamá Oeste: Las Pavas, ubicada en el Distrito de La Chorrera, Trinidad de las Minas y Lídice ubicadas en el distrito de Capira. Los perezosos silvestres fueron capturados con la autorización de Mi Ambiente (Código SE/A-101-13) (CIUCAL- 01/2021) y los dueños de las propiedades, en las tres comunidades (Figura N°17 y Figura N°18).

### **2.1.4 Obtención de la muestra**

Para la toma de muestras sanguíneas de los perezosos (*Bradypus variegatus* y *Choloepus hoffmanni*) se procedió a rasurar una pequeña área del antebrazo de cada animal, en la cual se pudo palpar un leve rebote de la vena cefálica y cubital colateral. Debido al grosor de la piel y la profundidad a la que se encuentran las venas en estas especies, se realizó de esta manera, se anestesió al perezosos con  $2,67 \pm 0,25$  (2,5–3) mg/kg de clorhidrato de ketamina (Ketaminol 10, Intervet International B.V., European Union). (Figura N°16) (Código SE/A-101-13).

FIGURA 15. Procedimiento de toma de muestra sanguínea a perezosos (*Choloepus hoffmanni* y *Bradypus variegatus*)



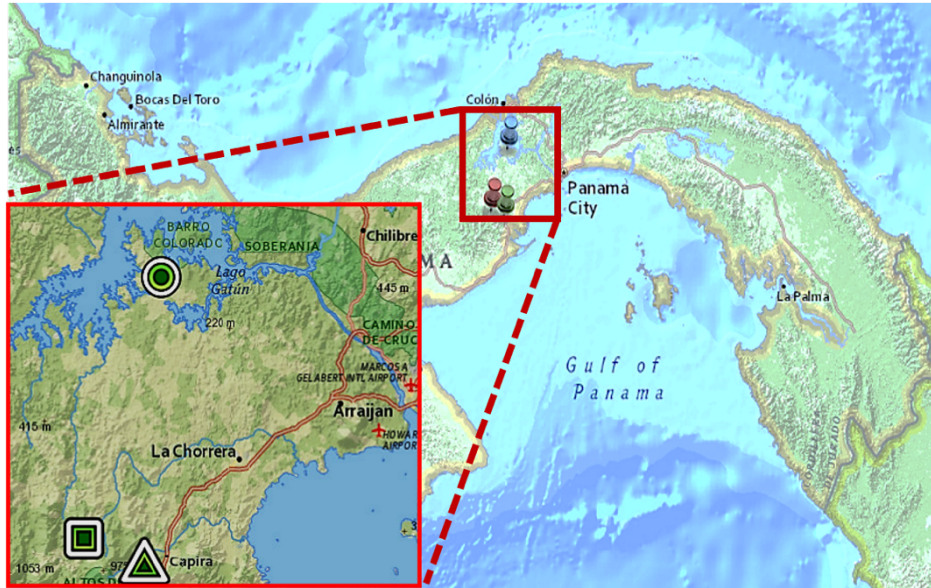
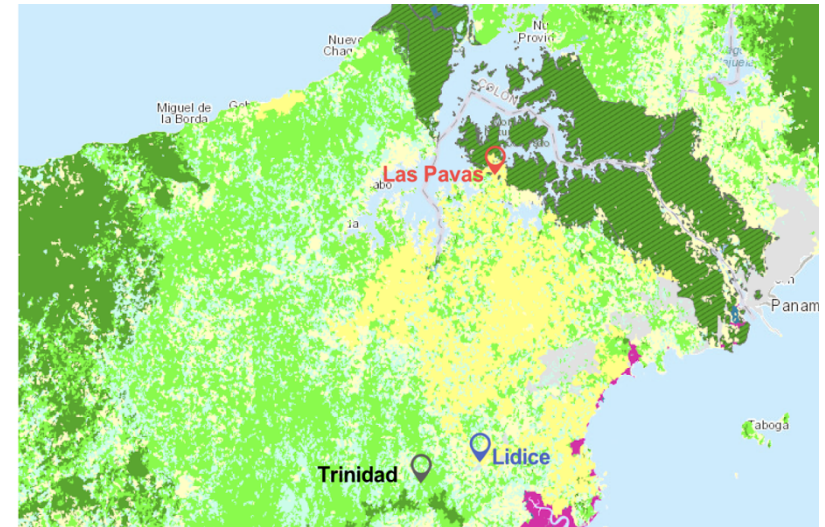


FIGURA 17. Mapa de Cubierta Forestal cercanas a las áreas donde se realizaron las capturas de perezosos.  
(Realizado por R. Corrales, 2022)

FIGURA 16. Mapa que ubica a las Comunidades de las Pavas (La Chorrera), Trinidad de las Minas y Lídice (Capira).  
(Realizado por el Departamento de Parasitología e Investigación ICGES, 2021)

- Agua
- Albinas
- Bosque Intervenido
- Bosque Inundable Mixto
- Bosque Maduro
- Bosque Secundario Maduro
- Bosque de Orey Homogéneo
- Cativo Homogéneo
- Cativo Mixto
- Manglar
- Otros Usos
- Plantaciones
- Rastrojos (Bosque Pionero)
- Uso Agropecuario
- Uso Agropecuario de Subsistencia
- Vegetación Baja Inundable



## 2.1.5 Determinación virológica

### 2.1.5.1 Materiales y métodos

Tabla 4. *Materiales y Reactivos para procedimientos virológicos*

<b>Materiales y Reactivos</b>	<b>Aplicación</b>
<b>Platos de cultivo de 6 pocillos</b>	Se utilizó para preparación de células VERO en procedimientos como producción de virus, titulación de virus, prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT).
<b>Pipetas serológicas 5, 10, 25 mL</b>	Se utilizó para dispensación de diferentes volúmenes de células (VERO, BHK) o reactivos, en los diferentes experimentos de virología. Además de volúmenes específicos en preparación de cultivo celulares como: MEM, 0.25% Trypsina-EDTA, Anfotericina B, Penicilina/ Estreptomicina y realización de SDS-PAGE.
<b>Frasco de 75cm<sup>3</sup></b>	Se utilizó para el crecimiento y mantenimiento de cultivo de hemoflagelados.
<b>Crioviales de rosca externa</b>	Se utilizó para almacenamiento de líquidos de pequeños volúmenes como virus y sueros que sean resistentes a temperaturas de bajas -20° C, -80° C y en nitrógeno líquido.
<b>Micropipetas de 0.5 uL-10 uL, 10 uL-100uL, 20uL-200uL, 1000uL</b>	Se utilizó para dispensación de volúmenes pequeños en procedimientos como: western blotting, en producción de virus, titulación de virus, prueba de tamizaje (Screening Test) de neutralización en placas y Prueba de neutralización en placa (PRNT).
<b>Pipeteador automático</b>	Se utilizó para dispensación de líquidos para preparación de células VERO en procedimientos como producción de virus, titulación de virus, prueba de tamizaje (Screening Test) de neutralización en placas y Prueba de neutralización en placa (PRNT).
<b>MEM 1X (Minimum Essential Medium)</b>	Medio esencial se utilizó para el crecimiento de cultivo celular.
<b>HBSS (Hanks Balanced Salt Solution)</b>	Medio de cultivo que proporcionó un entorno que ayuda a mantener la integridad estructural y fisiológica de las células in vitro.
<b>Agarosa</b>	Se utilizó para para preparar la solución de OVERLAY, en procedimientos como titulación de virus, prueba de tamizaje (Screening Test) de neutralización en placas y Prueba de neutralización en placa (PRNT).
<b>Formaldehído</b>	Se utilizó para la fijación de platos en procedimientos como titulación de virus, prueba de tamizaje (Screening Test) de neutralización en placas y Prueba de neutralización en placa (PRNT).
<b>0.25% Tripsina-EDTA</b>	Se utilizó para inhibición de adherencia celular en pasajes y mantenimiento de líneas celulares.
<b>PBS 10% (Solución Tampón Fosfato Salina al 10%)</b>	Se utilizó para el lavado de las células.
<b>Suero Fetal Bovino</b>	Se utilizó en enriquecimiento en la preparación de cultivo celulares.
<b>Anfotericina B</b>	Anti fúngico que se utilizó en la preparación de cultivos celulares.
<b>Penicilina/ Estreptomicina</b>	Antibiótico que se utilizó para la preparación de medio celular
<b>Filtros para medio de cultivos</b>	Se utilizó para preparación de medios de cultivos para el crecimiento de cultivo de líneas celulares para que no tengan partículas menores a 0.45um.
<b>Violeta de Cristal</b>	Se utilizó para teñir platos con pocillos de 6 en titulación de virus.
<b>DMSO</b>	Congelación de virus producido
<b>Tubo AMICON</b>	Concentración de viral de virus producido

## 2.1.5.2 Preparación de líneas celulares

*Las líneas celulares utilizadas fueron:*

Vero (ATCC® CCL-81): células de Riñón, derivadas de organismo *Cercopithecus aethiops* especie de primate catarrina, llamado mono verde.

BHK (ATCC® CCL-10): abreviación de “Baby Hámster Kidney”, línea celular derivada de los fibroblastos de los riñones de cría de hámster.

### 2.1.5.2.1 Procedimientos para mantener y producir las Líneas Celulares

#### 2.1.5.2.1.1 Preparación de MEM IX

*Generalidades:* El cultivo celular se realizó en medios artificiales preparados mediante la mezcla de componentes purificados o de soluciones orgánicas complejas, en el interior de instrumentos que mantienen las condiciones físico-químicas adecuadas y sobre soportes o recipientes que los contienen y aíslan del medio exterior.

*Reconstituir:* Se diluyó el contenido del medio de cultivo MEM preparado liofilizado en un envase con un litro de agua destilada estéril o agua ultra pura (Purificador Thermo Scientific Sart2pure) en un erlenmeyer de 2 litros y un agitador magnético para homogenizar la solución. Se agregó 10 ml de penicilina-estreptomina por cada litro de medio que esté preparando. Se retiró 10 ml de esta solución para luego agregar 10 ml de suero fetal bovino (SFB) inactivado previamente en un baño maría a 56° C por 30 minutos. Esta solución quedó a una concentración final al 1% SFB. Se ajustó el pH a 7.4 utilizando bicarbonato de sodio 7.5% (p/v) o hidróxido de sodio, y ácido clorhídrico, según sea el caso. Se repitió de la misma utilizando 100 mL de SFB (10% SFB) y 20 mL de SFB (2% SFB).

*Filtrar:* Terminado esto, se procedió a filtrar el medio de mantenimiento con un filtro de 0.2 um. La etapa de filtro se debe realizar obligatoriamente en cámara de flujo laminar. Igualmente realizar cuando se pueda todas las etapas anteriores en cámara de flujo laminar para disminuir probabilidad de contaminaciones.

*Almacenamiento:* Luego se filtró todo el medio de cultivo, sirviéndolo en botellas de vidrio estériles previamente rotuladas, todo en cabina de flujo laminar, y guárdelas a 4°C. Se tomó una muestra para el control de calidad en un tubo cónico de 50 mL y manténgalo a temperatura ambiente o en la incubadora a 37°C por 24 horas y luego proceder a sus respectivos controles de calidad.

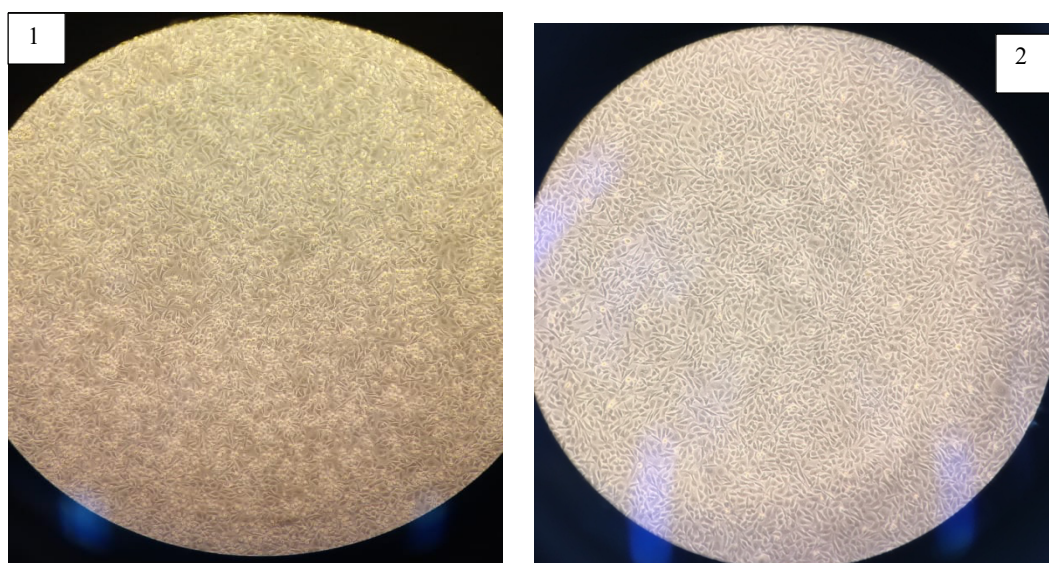
#### 2.1.5.2.1.2 Descongelación de células

La descongelación debe ser muy rápida, puesto que esto previene la formación de cristales en el momento en que la temperatura sube de -50° C a 0° C, si el proceso se lleva a cabo lentamente causa daño celular y pérdida de viabilidad. El proceso de descongelación se realizó con mayor rapidez porque el agente de congelación DMSO es tóxico para las células a temperatura ambiente.

Se retiró el vial directamente al baño maría a 37° C y se transfirió la suspensión lentamente en un tubo cónico de 15 ml con 10 ml de medio de crecimiento (RPMI).

Se centrifugó a 1500 rpm por 3 minutos y resuspendió el botón de células en medio de crecimiento para sembrar. Esto permite eliminar enseguida el crioprotector que es tóxico, esto es recomendable para mayoría de las líneas celulares. Se agregó el medio de crecimiento necesario (10% SFB, puede ser hasta 20% SFB para células muy sensibles o únicas) a 37°C y mover suavemente. Se incubó a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Luego se cambió el medio por medio de crecimiento fresco a las 24 horas para eliminar efectos tóxicos de los crioprotectores. Para posteriormente obtener una monocapa al 100% de confluencia lista para usarse (Figura N°19) (*Sociedad Colombiana de Obstetricia y Ginecología. et al., 2006*).

FIGURA 18. Células Vero (1) y BHK (2) en 100 % de Confluencia en flask de 75 cm<sup>3</sup> con MEM 1x 10% SFB.



#### 2.1.5.2.1.3 Preparación de reserva (back up) celular

Primero se parte de una reserva de líneas celulares (Vero y BHK) ya descongeladas y con un estimado mínimo de pasajes que permiten su crecimiento en el mejor estado en frasco de 75 cm<sup>3</sup>. Posterior a esto se descartó el medio del frasco de crecimiento de 75 cm<sup>3</sup> y se lavó con solución de PBS 10%, se utilizó 3 mL solución de 0.25% Tripsina-EDTA para despegar las células adherentes, se incubó por 5 minutos a 37C y se revisó al microscopio invertido, donde se observan las células totalmente sueltas. Una vez sueltas las células, se agrega 7 mL de MEM1X al 10% SFB, para inactivar la acción de la Tripsina-EDTA. Como resultado se obtiene 10 mL de células resuspendidas listas para preparar platos para los experimentos o más flasks para producción viral o reserva de células para experimentos ulteriores.

#### 2.1.5.2.1.4 Preparación de platos

Una vez obtenido los 10 mL de células resuspendidas se procedió a realizar diluciones con el MEM 1X al 10% SFB. Esto depende de la cantidad de platos que se necesita, la confluencia de las células y el día a utilizarlas (Tabla N° 5). Para titulación de virus de los géneros alfavirus y orbivirus, se utilizaron las células con una confluencia de 90% a 95%. Para titulación de virus del género flavivirus, se utilizaron las células con una confluencia de 70% a 80%. Para PRNT de virus de los 3 géneros de interés, se utilizaron las células con una confluencia de 80 a 85%.

**Tabla 5.** *Diluciones en preparación de platos de líneas celulares in vitro según el momento de uso pos-siembra y la cantidad de pocillos por platos (que determina la superficie de cada pocillo).*

24 horas		48 horas	
Pocillos	Diluciones	Pocillos	Diluciones
12 pocillos	1:5	12 pocillos	1:10
24 pocillos	1:7	24 pocillos	1:20

Finalmente se agrega 2mL (platos de 24 pocillos) y 3mL (platos de 12 pocillos) de la dilución por pocillo para obtener una monocapa.

### 2.1.5.3 Producción viral

- *Tipos de Virus utilizados*

Para cada virus, se indica la especie, la cepa específica cuando sea necesario (ejemplo la cepa vacunal TC-83 del VEEV), el número de aislado, el número de pasaje en las células VERO.

#### Alfavirus:

TC-83 VEEV (Virus de la Encefalitis Equina Venezolana): VERO 4, 252296

MADV (Virus Madariaga): VERO 3, 19889755

UNAV (Virus UNA): VERO 5, BT1495

MAYV (Virus Mayaro): VERO 4, 26401714

CHIKV (Virus de Chikungunya): VERO 5, 256137

PTV (Punta Toro Virus): VERO 5, 483391

#### Flavivirus:

DENV-2 (Virus del Dengue 2): VERO 4, 487625

YFV (Virus de la Fiebre Amarilla): VERO 3, L-196VFA0397

#### Orbivirus:

Pan-sloth D50: VERO 2

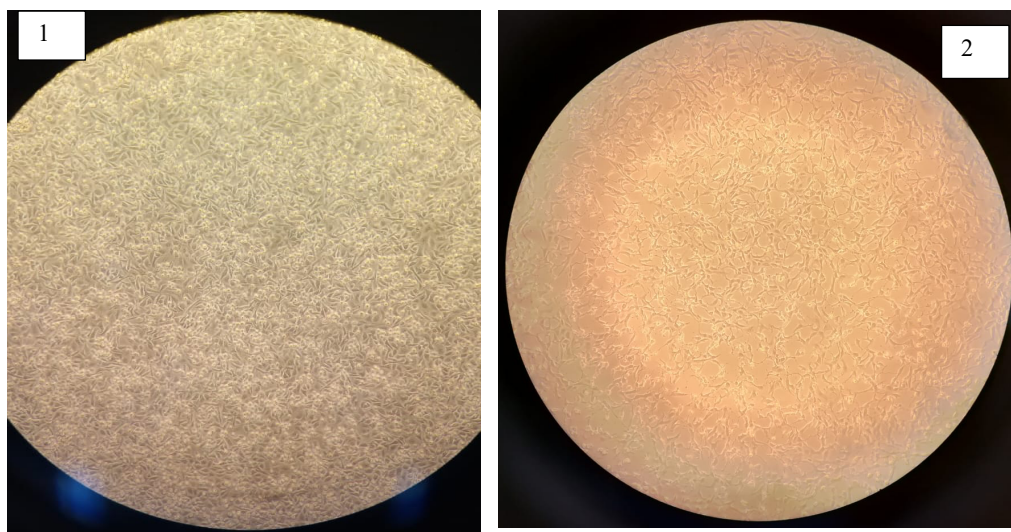
Pan-sloth 149: VERO 4

- *Producción de Alfavirus y Orbivirus*

Se produjeron 2 frascos de 150 cm<sup>3</sup> de cultivo celular de la línea Vero en un 70% a 80% de confluencia y como control negativo un frasco de 25 cm<sup>3</sup>.

Primero, se descarta el MEM1X 10% SFB que tiene la botella, luego se procede a utilizar alícuotas (500uL) de stock de virus guardadas en el congelador -80°C del Departamento de Investigación en Virología y Biotecnología. Se inocularon alrededor de 4 alícuotas (cada una de 500uL) por frasco de 150 cm<sup>3</sup> y se agrega 25 mL de MEM 1X sin SFB a cada flask. Se incubó a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, se procede a observar las botellas con el cultivo celular para evaluar su desarrollo y morfología (en cruces +, cada cruz corresponde a 25% de efecto citopático en las células infectadas), hasta que el virus sea capaz de replicarse y llegar a 3- 4 días (Figura N°20) El control negativo se somete al mismo tratamiento a excepción del inóculo del virus. Una vez los virus logren inducir un efecto citopático a 75% o más de las células en el frasco, se procede a cosechar.

FIGURA 19. Control Negativo de Células VERO (1), Células VERO infectadas con CHIKV a los 4 días (2).



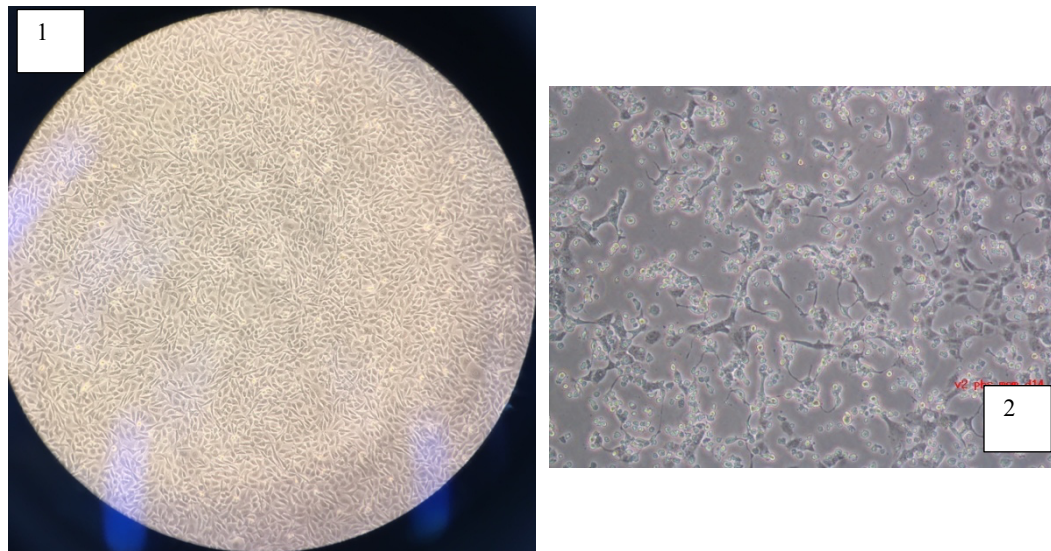
- *Producción de Flavivirus*

Se procedió a producir 2 flasks de 150 cm<sup>3</sup> de cultivo celular de la cepa BHK, en un 70% a 80% de confluencia y como control negativo un flask de 25cm<sup>3</sup>.

Primero se descarta el MEM1X 10% SFB que tiene la botella, luego se procede a utilizar alícuotas (500uL) de stock de virus guardadas en el congelador -80C del Departamento de Investigación en Virología y Biotecnología. Se inocula alrededor de 4 alícuotas (500uL) por Flask de 150 cm<sup>3</sup> y se agrega 25 mL de MEM 1X Sin SFB a cada flask. Luego, incubar a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y se procede a observar las botellas con el cultivo

celular para evaluar su desarrollo (en cruces, +) y morfología, hasta que el virus es capaz de replicarse y llegar a 5-6 días (Figura N°21). El control negativo se somete al mismo tratamiento a excepción del inoculo del virus. Una vez listos se procede a cosechar.

FIGURA 20. Control Negativo de Células BHK (1), Células BHK infectadas con DENV-2 a los 6 días (2).



- *Cosecha de virus*

Al obtener el efecto citopático deseado, se procedió a usar una escobilla para raspar la monocapa adherida, resuspender el sobrenadante del cultivo 3 veces con un poco de fuerza en la base de la botella y escurrir con fuerza el sobrenadante 3 o 4 veces en la pared donde estaba la monocapa (deshace grumos celulares y monocapa celular). Luego, se agregó el sobrenadante a un tubo cónico (15 ml o 50 ml) y centrifugar a 2000 rpm durante 5 o 10 min a 4°C (aceleración-9, freno-9).

Extraer el sobrenadante centrifugado con cuidado de no tomar nada del precipitado y añadir a otro tubo cónico, manteniendo la muestra en la hielera.

Al final, se agregó 500 uL de volumen del sobrenadante con virus a crioviales etiquetados según el formato requerido (en el caso de los Alfavirus y Orbivirus).

- *Concentración de virus (Flavivirus)*

En el caso de los Flavivirus, en su cosecha una vez extraído y centrifugado con cuidado de no tomar del precipitado, se añadió 15 ml al tubo AMICON para concentración y se centrifugó el sobrenadante con virus a la máxima revolución del equipo (4000 rpm) por un tiempo estimado (30 min) que varía según la concentración que desea llevar a la

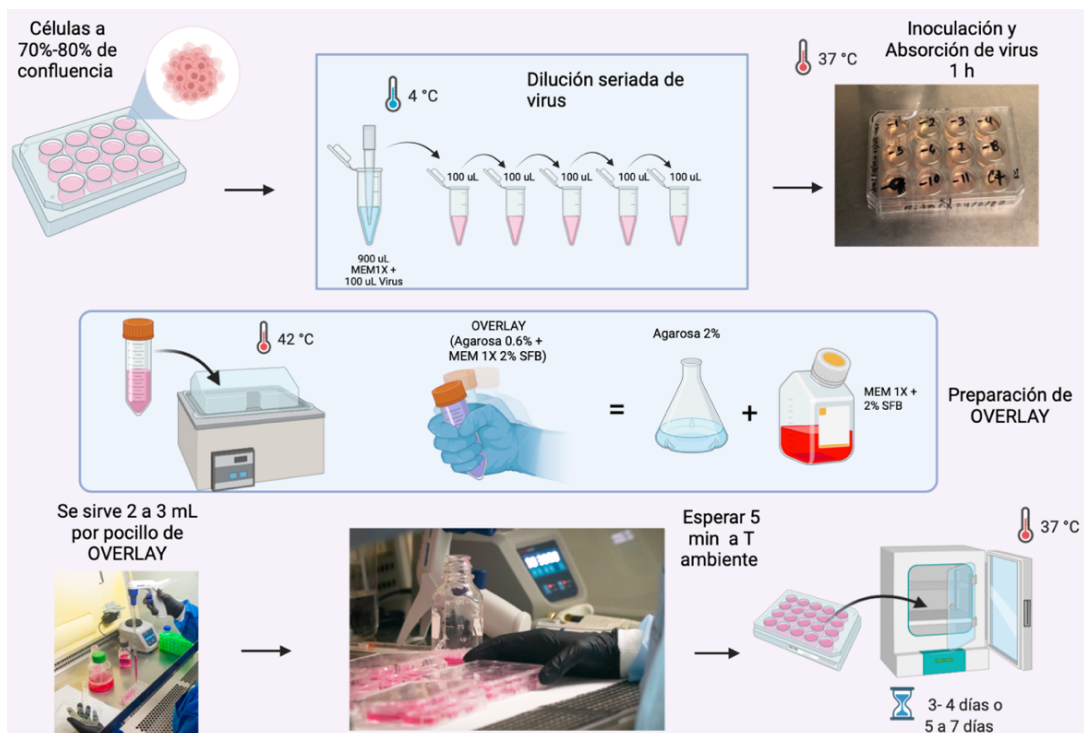
muestra (250 ul, 500 ul, 1000 ul, 1500 ul) en la columna de concentración a 4°C (aceleración-9, freno-9). En nuestro caso utilizamos un volumen total de 500 uL. Se resuspendió alrededor de 5 a 10 veces hasta homogeneizar el volumen concentrado de virus en la columna y extraer 20 uL del concentrado para añadir a crioviales etiquetados con la información del virus y finalmente almacenar las alícuotas de virus concentrado a -80°C para su posterior uso (Milagros Ramos Gómez, 2008).

#### 2.1.5.4 Titulación viral

- *Titulación Viral Alfavirus, Orbivirus, PTV y YFV*

*Fase #1:* Se preparó diluciones seriadas de virus con MEM 1X sin SFB partiendo de una dilución 1:10 (900 uL de MEM 1X + 100 uL de stock de virus), luego se aplicó 300 uL en platos de 6 o 200 uL en platos de 12 pocillos previamente preparados con células VERO en el caso de alfavirus, Orbivirus, PTV. Se hizo un periodo de absorción de un periodo de 1 h a 37C, realizando movimientos circulares cada 15 minutos. Luego se prepara la solución OVERLAY (MEM1X 2% + Agarosa al 0.6%), el MEM 1X 2% SFB debe estar en una temperatura de 42C preferiblemente antes de agregar la Agarosa. Luego, se agregó de 2 a 3 mL de esta solución por pocillo a temperatura ambiente (25°C) y se incubó por un periodo de 3 a 5 días (Figura N°22).

FIGURA 21. Primera fase de la titulación



*Fase #2:* Se observó la formación de placas (el tiempo necesario depende del virus), se procedió a utilizar solución de Formaldehído al 10% para su fijación de 15 minutos a 30 minutos y posterior tinción utilizando 500 uL de Violeta de Cristal al 0.25% por pocillo. El tinte se descartó en menos de 5 minutos. Lavamos los pocillos con agua hasta que salga todo el tinte de las muestras y dejamos secar durante 24h para visualizar las placas de reducción formado por las partículas virales. Se realizó el conteo de las placas formadas por las partículas virales. Se tomó la dilución donde las placas estuvieron de una forma separada y fáciles de contar y así se obtuvo el estimado del título del virus (Figura N° 23).

FIGURA 22. Segunda fase de la titulación



- *Titulación de DENV*

*Fase #1:* Se utilizó el protocolo de preparación de líneas celulares para frascos o platos, se preparó 1 plato de 24 pocillos con un 70% a 80% de confluencia de células *BHK*. Luego en un plato a parte de 96 pocillos de fondo U, se preparó diluciones seriadas 1:10 (250 ul (HBSS 1X) + 25 ul (virus concentrado)) del virus con 2 réplicas preferiblemente. Se retiró el medio de mantenimiento de cada pozo del plato, con cuidado de no dañar la monocapa celular y agregar 200 ul del inóculo de la dilución viral a cada pocillo e incubar las muestras con cada dilución del inóculo durante 2 horas y mover en periodos de 15 minutos el plato de un lado al otro para cubrir toda la monocapa celular.

Se adicionó a cada pocillo 1 ml de la solución de Carboximetilcelulosa (CMC) al 1.6 % esterilizada + MEM 10% SFB una relación 1:1 (10 ml de CMC 1.6% + 10 ml MEM10%

SFB). Incubar en un periodo aproximado de 6 a 7 días, e ir observando la formación de placas.

Fase #2: Una vez se observen las placas al microscopio, descartar el medio de cada pocillo con mucho cuidado y adicionar 500 ul de formaldehído al 10% a cada pocillo y dejar fijando durante 15 a 20 min. Luego descartar cuidadosamente el formaldehído en una botella de residuo etiquetada. Se agregó 300-400 ul de tinte de cristal violeta a 0.25% y dejar teñir por 2 a 3 min y se retiró el tinte con cuidado. El tinte se descartó. Se lavó los pocillos con agua de grifo hasta que salga todo el tinte de las muestras y dejaron secar durante un tiempo (1 día) y se visualizó las placas. Se realizó un conteo de las placas formadas por las partículas virales. Se tomó la dilución donde las placas estuvieron de una forma separada y fáciles de contar y así se obtuvo el estimado del título del virus.

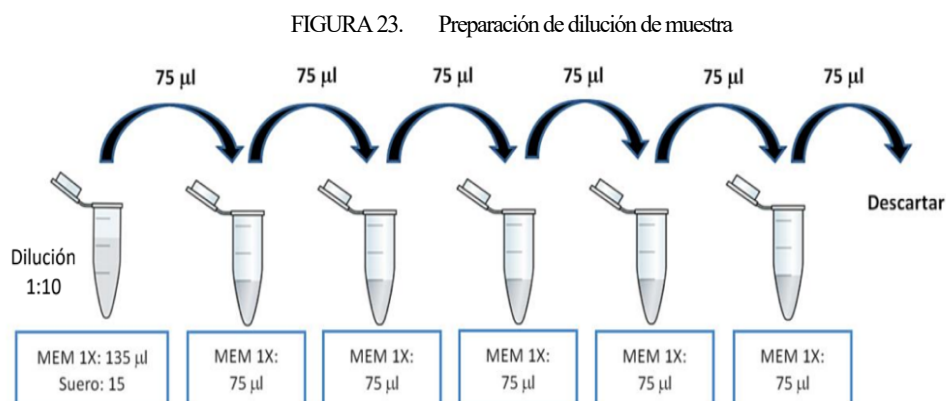
$$\text{Cálculos de Titulación (Unidad formadora de placas o PFU)} = \frac{\# \text{ de placas (título)}}{\text{Volumen de inóculo}}$$

### 2.1.5.5 Prueba de Neutralización en Placa (PRNT)

Para detectar anticuerpos específicos contra cada virus, se utilizó la técnica para la obtención del título de anticuerpos neutralizantes PRNT descrita por Scott Weaver (*Carrera et al., 2013*) para determinar el título de los anticuerpos, correspondiente a la dilución máxima en la cual los anticuerpos del suero son capaces de neutralizar el virus. Se realizó de forma in vitro en líneas celulares.

- Preparación de la muestra

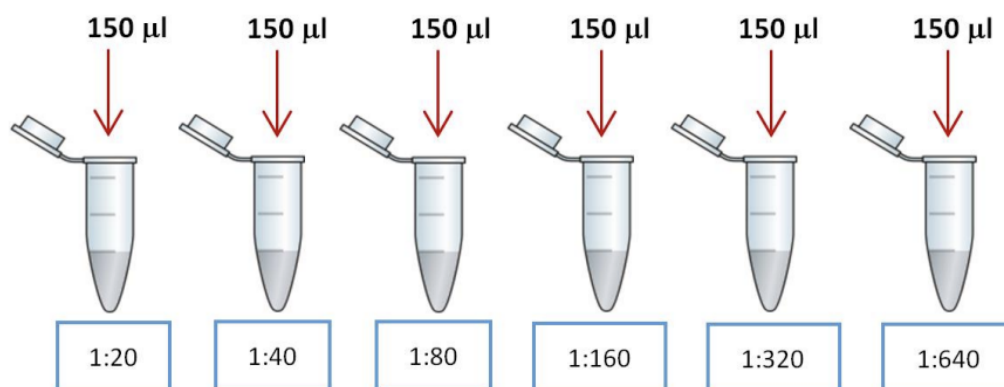
Se procedió a realizar alícuotas de las muestras de suero para su posterior inactivación a 56 °C utilizando el baño maría por 1 hora. Se preparó diluciones seriadas de los sueros en MEM 1X, 75 µl/tubo (Iniciando con una dilución 1:10) (Figura N°24).



- Stock de virus

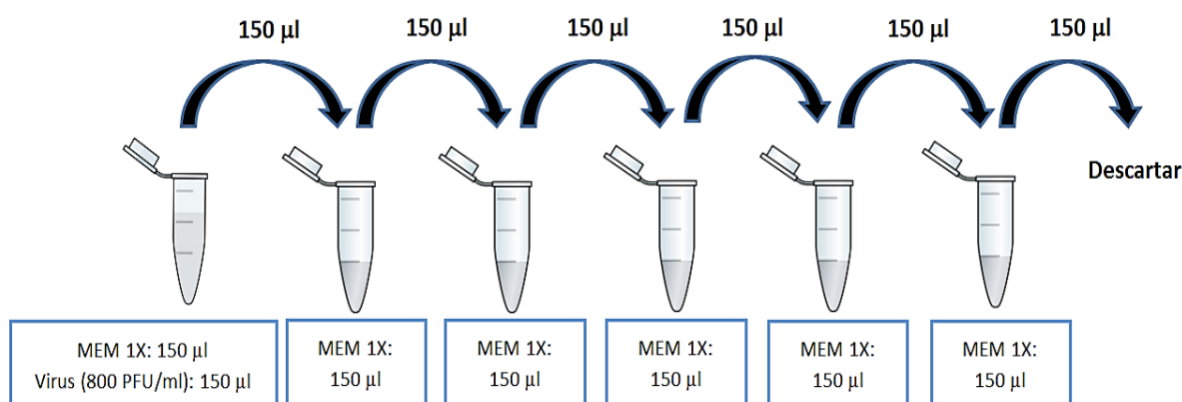
Se preparó el stock de trabajo del virus a partir de la producción viral de reserva a una capacidad de 800 PFU/ml. Por cada 75 µl de suero diluido, se agregó 75 µl de stock de virus (relación 1:1), y se mezcló utilizando un vortex. Se incubó a 37°C por 1 hora o 4°C por 24 horas para que haya una interacción virus-anticuerpos (Figura N°25).

FIGURA 24. Stock viral + sueros diluidos (interacción Antígeno-Anticuerpo)



A la vez, se realizó una titulación del stock de virus en 800 PFU/mL en MEM 1X, se utilizó 150 uL del virus en stock (800 PFU/mL) y 150 uL de MEM 1X (Figura#). En cada experimento de PRNT se realiza esta titulación de virus. Esto permite calcular el corte, a partir de la cantidad de placas detectadas en la dilución 1:2 de la titulación viral. Se considera que hay neutralización del virus si hay menos del 20% de placas contadas a esa dilución de la titulación viral. Punto de corte de PRNT= cantidad de placas correspondientes a Dil.v. 1:2 x 20% (Figura N°26).

FIGURA 25. Titulación del Stock de virus



Posterior a esto, la mezcla de suero/virus y la titulación del virus se incubó a 37° C, 5 % CO<sub>2</sub> por 1 hora o 4 °C (moviendo los platos cada 15 minutos).

Se agregó 100 µl de la mezcla suero/virus y la titulación del virus al pocillo de células VERO o BHK (en el caso de DENG<sub>V</sub>) dependiendo del Virus; se incubó a 37 °C por 1 hora, mover los platos cada 15 minutos.

Cubrimos cada pocillo con 2.5 mL de MEM1X 2% SFB + agarosa al 0,6%, incubar a 37 °C hasta que aparezcan las placas. A excepción de DENG<sub>V</sub> donde utilizamos carboximetilcelulosa una relación 1:1 con MEM1X 2% SFB.

Se fijó los platos con Formaldehído al 10 %. Teñir los platos con violeta cristal al 0,25% de igual forma que se realiza en el protocolo de titulación.

Leer título de los sueros, la dilución más alta del suero en el cual se inhibe el 80 % de las Placas, esto corresponde al último pocillo en donde el número de placas es ≤ 20 % de números de placas presentes en la titulación 1:2 del virus del experimento a analizar.

## 2.1.6 Determinación virológica Determinación Parasitológica

### 2.1.6.1 Materiales y métodos

Tabla 6. *Materiales y Reactivos para procedimientos parasitológicos*

<b>Materiales y Reactivos</b>	<b>Aplicación</b>
<b>Pipetas serológicas 5, 10, 25 mL</b>	Se utilizó para realizar de SDS-PAGE.
<b>Crioviales de rosca externa</b>	Se utilizó para almacenamiento de líquidos de pequeños volúmenes como virus y sueros que sean resistentes a temperaturas de bajas -20° C, -80° C y en nitrógeno.
<b>Micropipetas de 0.5 uL-10 uL, 10 uL-100uL, 20uL-200uL, 1000uL</b>	Se utilizó dispensación de volúmenes pequeños en procedimientos como: western blotting, en producción de virus, titulación de virus.
<b>Pipeteador automático</b>	Se utilizó para dispensación de líquidos para preparación de preparación de geles de western blotting
<b>Anfotericina B</b>	Se utilizó anti fúngico se en la preparación de cultivos de parásitos.
<b>Flask de 75 y 150 cm3</b>	Se utilizó para el crecimiento y mantenimiento de cultivo cultivo de hemoflagelados.
<b>PBS esteril 0.5% (tampón fosfato salino o buffer fosfato salino)</b>	Se utilizó en lavado de hemoflagelados para su mantenimiento, para preparación de soluciones tampones y lavados en western blotting.
<b>DAB (Diaminobencidina)</b>	Se utilizó como componente químico en donde actúa el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre ella.
<b>DTT (Ditiotreitol)</b>	<i>Se utilizó como agente reductor de proteínas</i>
<b>Cámara de electroforesis y transferencia, soporte de geles, vidrios, entre otros. (kit de Western Blotting)</b>	Se utilizó un kit para realizar SDS-PAGE y Western blotting
<b>Solución de Bis-Acrilamida</b>	Se utilizó como solución para preparar los geles para la electroforesis.
<b>Western blotting disoluciones y tampones</b>	Se utilizó Tris(hidroximetil)aminometano Tampón (10x Tris/Glycine/SDS y 10x Tris/Glycine). Utilizado para proceso de Western Blotting en estandarización de anticuerpos policlonales anti- perezoso.
<b>Papel filtro</b>	Se utilizó para realizar la transferencia en Western blotting
<b>Membrana de Nitrocelulosa</b>	Se utilizó para obtener las bandas en las transferencias en Western Blotting.
<b>Marcador de peso molecular</b>	Se utilizó para obtener el peso molecular de las proteínas en los hemoflagelados a utilizar en el Western Blotting.
<b>Tampón de muestra para SDS-PAGE</b>	Se utilizó para la estabilidad de la muestra a la hora de realizar la separación de proteínas.

### 2.1.6.2 Información de parásitos

*Leishmania (Viannia) panamensis*: cepa MHOM/PA/LS94

*Trypanosoma cruzi*: cepa 1551 A

*Trypanosoma rangeli*: cepa PL 011

### 2.1.6.2 Obtención del Antígeno

Para la obtención de los antígenos de tripanosomátidos utilizados en las pruebas inmunológicas, se utilizaron 3 aislados mantenidos en N2 líquido en el DIP (*Leishmania (Viannia) panamensis*: cepa MHOM/PA/LS94, *Trypanosoma cruzi*: cepa 1551 A, *Trypanosoma rangeli*: cepa PL 011), estos aislados fueron expandidos en flask de 75 cm<sup>3</sup> + medios de cultivo BHI (Brain Heart Infusion) enriquecidos con SFB al 15% para epimastigotas (*Trypanosomas*) y para promastigotes (*Leishmania*) Medio Drosophila de Schneider enriquecido con SFB al 25%.

Se observó al microscopio invertido su crecimiento hasta obtener una cantidad considerable de parásitos. Luego se agregan los parásitos en un tubo cónico de 50 mL para realizar diversos lavados con PBS al 10% y centrifugando a 2500 rpm por 15 minutos hasta obtener el pellet de parásitos.

### 2.1.6.3 Producción de anticuerpos policlonales anti-Inmunoglobulinas de perezoso.

- Purificación y precipitación de suero de perezoso con sulfato de amonio

Para la purificación de las inmunoglobulinas de perezoso a partir del suero, se utilizó la metodología descrita por (*Saldaña A, Harris RA, Orn A, 1998*).

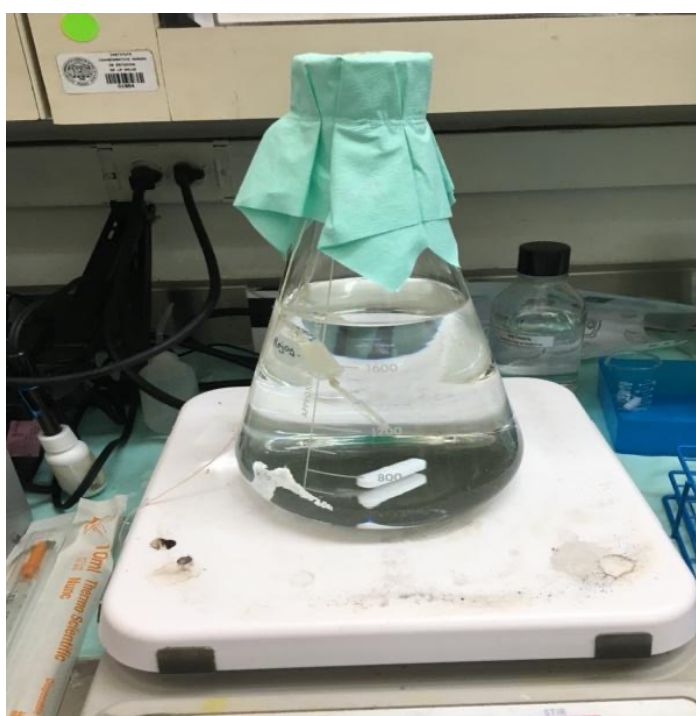
Primero se prepararon soluciones de Sulfato de Amonio: Saturada: 7.61g de Sulfato de Amonio + 10ml dH<sub>2</sub>O y 50% de saturación: 13.14g de Sulfato de Amonio + 10 ml de dH<sub>2</sub>O. Se diluyó las muestras de suero 1:3 con solución salina, la cual mantuvimos en baño de hielo.

Posterior a esto, colocamos el suero diluido en un vaso químico con una barra agitadora, adicionamos suficiente solución de Sulfato de Amonio saturado para llevar la solución hasta un 50% de sulfato de Amonio. Agregamos el Sulfato de Amonio muy lentamente, con agitación constante y en baño de hielo (1.0 ml de sulfato de amonio por cada ml de solución de suero diluido 1:3). Luego de 30 minutos de agitación lenta, se centrifugó a

1000g/4°C por 15 minutos. Se separó el precipitado y se lavó (resuspendió) con igual volumen de 50% Sulfato de Amonio, se centrifugó nuevamente.

Se resuspendió el precipitado en PBS utilizando la mitad del volumen inicial de la solución de suero 1:3. Se transfirió la solución de anticuerpos a un tubo de diálisis y dializamos a 3 cambios de PBS toda la noche (Figura N°27) Luego, se removió la solución de suero (anticuerpos) del tubo de diálisis y centrifugamos para remover cualquiera sustancia no soluble. Y por último almacenamos la fracción de suero purificada o fracción rica en Anticuerpos (FRA) con Sulfato de Amonio a -80°C.

FIGURA 26. Diálisis del precipitado con sulfato de amonio 50% del suero de perezosos (anticuerpos)



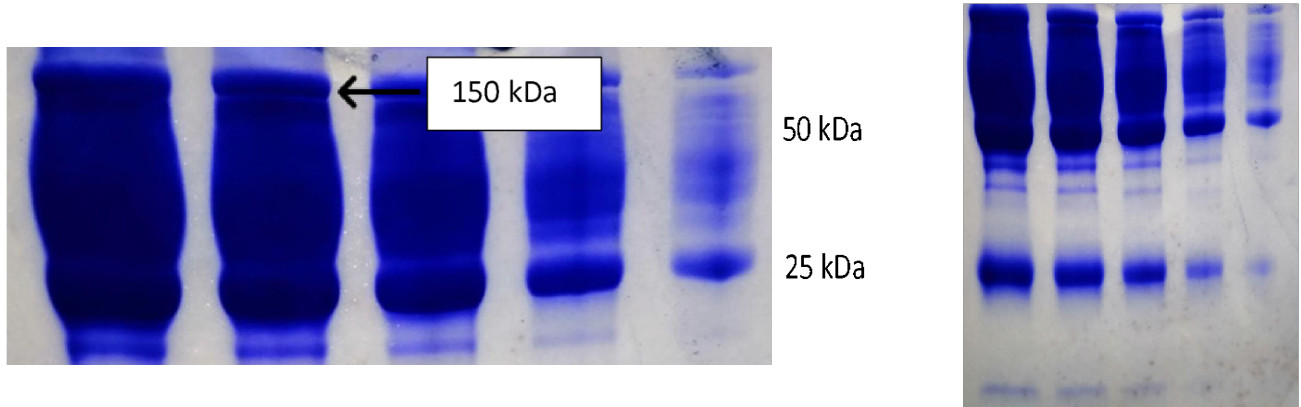
#### Selección de bandas de polipéptidos (Igs) para inmunización

Se realizó análisis de la Fracción Rica en Anticuerpos (FRA) por SDS-PAGE 12% para la selección específica de las bandas de polipéptidos (antígenos de Igs) a utilizar durante las inmunizaciones: Igs no reducidas (anticuerpo completo o 150 kDa) y Igs reducidas (cadena ligera o 25 kDa y cadena pesada 50 kDa) (Dong *et al.*, 2011).

Primero preparamos la FRA en dos tipos de muestras: Condición no reducida (50 uL de FRA + 200 uL de sample buffer), obteniendo una fracción proteica de 150 kDa y Condición reducida, obteniendo fracciones proteicas de 50 kDa y 25 kDa (50 uL de FRA + 200uL simple buffer + DTT (Ditiotreitoll)) (Figura N°28). Se armó dos geles por

separado con la cámara de electroforesis de BIORAD-Modelo a 200 V por 1 hora. Luego se tiñió el gel con Azul Brillante de Comassi por unos 10 minutos.

FIGURA 27. Proteínas reducidas (se indican las inmunoglobulinas a 150 kDa, 50 kDa y 25 kDa).

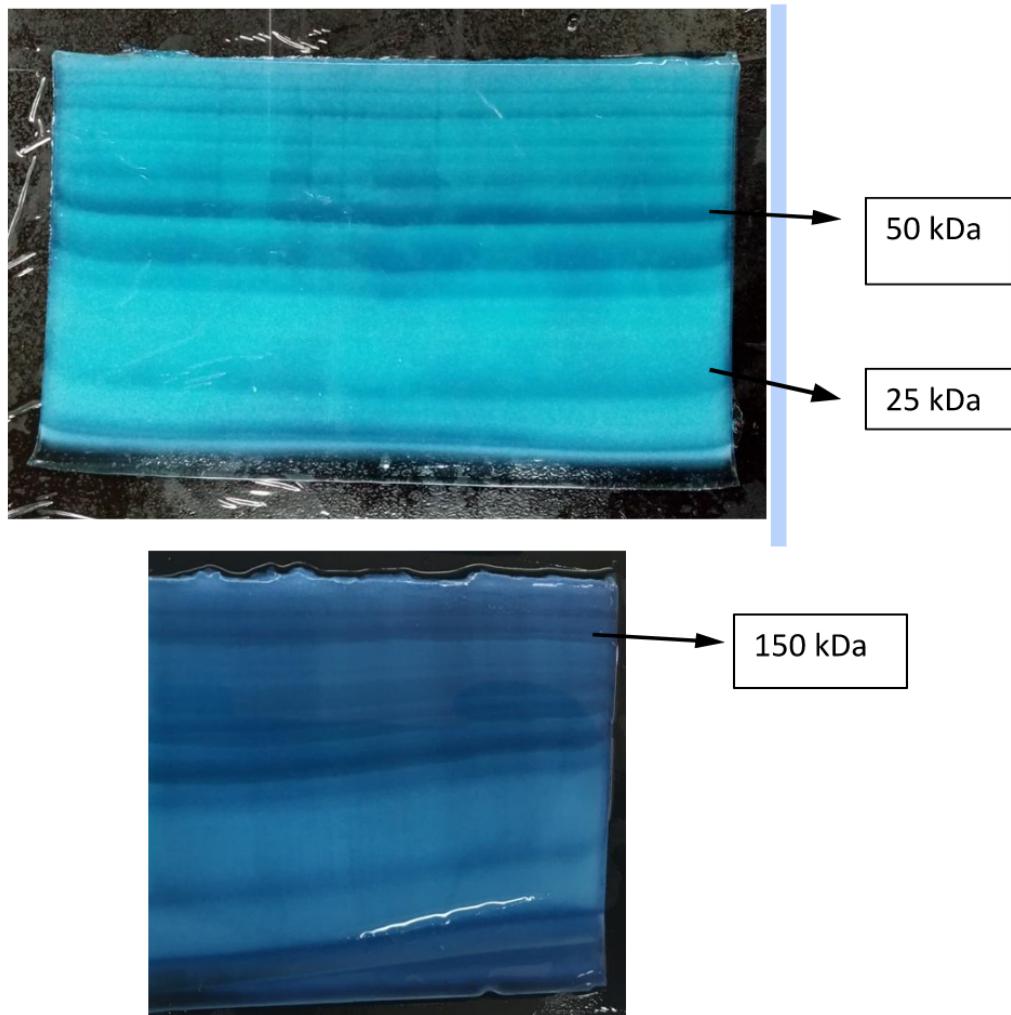


- Tinción de Cooper Staining

Una vez identificadas las proteínas utilizadas para inmunización, realizamos una tinción con Cloruro de Cobalto III (*Tsutomu Arakawa, 2001*). Primero se realizó una corrida electroforética con 4 geles al 12% de Bis-Acrilamida por 1 hora a 200 V. En donde se utilizó 600 uL de muestra FRA +200 uL sample buffer (4X), para obtener la fracción proteica no reducida de Igs (150kDa). Y de igual manera se utilizó 600 uL de muestra FRA + 200 uL de simple buffer (4X) + 10.8mg de DTT para obtener las fracciones reducidas de Igs (50 kDa y 25 kDa). Agregando 200 uL por gel.

Una vez terminada la electroforesis, se colocó los geles en dH<sub>2</sub>O (agua destilada) por no más de 30 seg, luego se agregó los geles en la solución de Cloruro Cúprico 0.3M (4.04 g de CuCl<sub>2</sub> + 100 mL de H<sub>2</sub>) por 10 min. Incubamos con agitación por 5 minutos. Luego se lavó el gel por varios minutos con dH<sub>2</sub>O. Observamos contra un fondo oscuro las bandas de interés (Igs). (Figura N°29)

FIGURA 28. Tinción de Copper Staining o de ClCu2



- Corte y Elución de bandas

Se cortó con un escalpelo las bandas de Igs de perezoso. Banda de 150 KDa (no reducida) y las bandas de 50/25 Kda (reducidas) (Figura N°30). Luego, las bandas cortadas en 0.25M EDTA-0.25M Tris por varios minutos hasta que las bandas quedaran totalmente transparentes. Se lavó las bandas por algunos minutos en dH2O. Posterior a esto cortamos las bandas en pedazos bien pequeños, colocamos los pedazos de gel en 5mM NaHC03 al 0.1% SDS (solo suficiente buffer para cubrir los pedacitos de gel). Dejamos a 37°C toda la noche con agitación en un vaso químico pequeño.

Separamos con una micropipeta el buffer conteniendo la proteína (Igs) purificada y finalmente utilizamos esta fracción para inmunizar 3 ratones CFW.

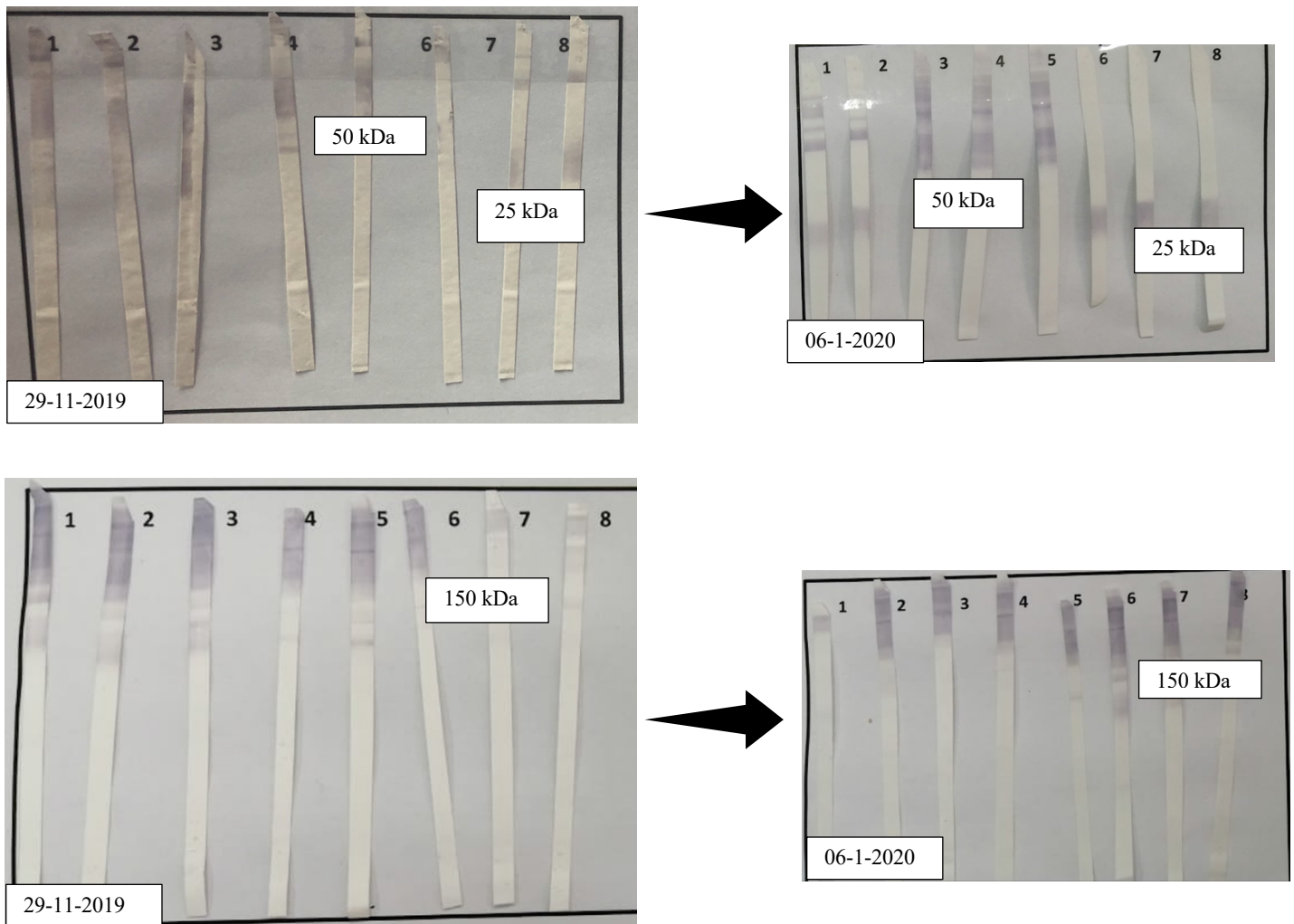
FIGURA 29. Corte de Bandas



- Inmunización, obtención y selección de antisueros

Una vez obtenida la fracción purificada de Igs de perezoso se procedió a la inmunización de ratones CFW para obtener un antisuero que contenga los anticuerpos policlonales anti perezoso (*de Almeida et al., 2018*). La inmunización se realizó utilizando adyuvante de Freud con la proteína purificada (150 kDa, 50 kDa o 25 kDa), en un periodo de 3 meses, 1 dosis por mes. Se tomó muestras sanguíneas de 0.100 uL retrovital para dar seguimiento al desarrollo de anticuerpos anti-perezosos en los murinos. Posterior a esto se evaluó la especificidad de este suero policlonal anti Igs de perezosos mediante la técnica de Western Blotting que nos asegura que los anticuerpos policlonales anti-perezosos han sido viables y están listos para utilizarse en la detección de Igs de lo hemoflagelados en estudio (Figura N°31).

FIGURA 30. Evaluación de la especificidad del suero policlonal de ratón anti-Igs de perezosos mediante la técnica de Western Blotting



#### 2.1.6.4 Detección de sueros anti-hemoflagelados en perezosos

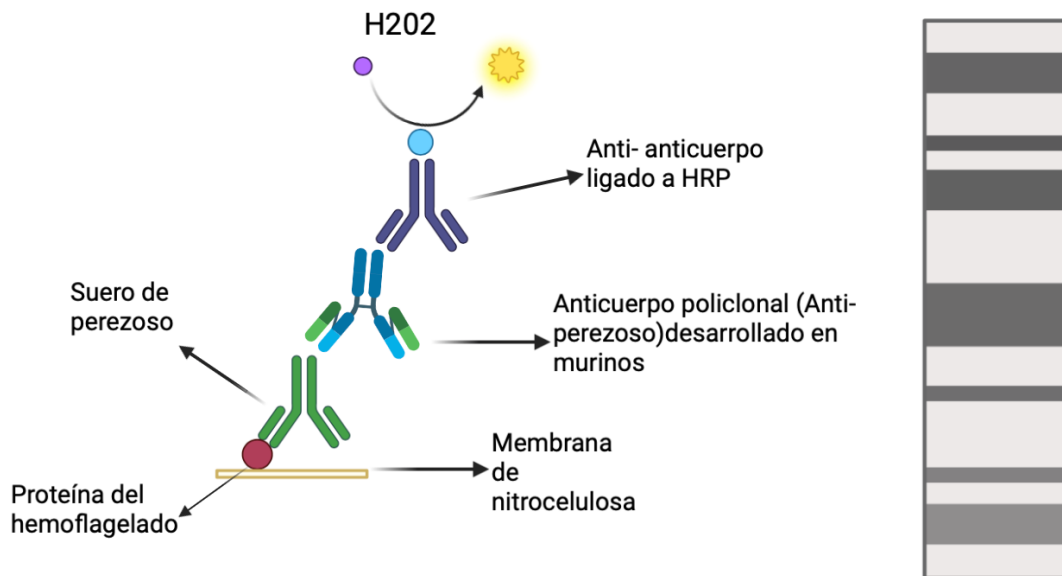
Antes de la detección de anticuerpos específicos anti hemoflagelados (*T. cruzi*, *T. rangeli* y *L. panamensis*) se realizó un SDS-PAGE al 12% e Bis-Acrilamida siguiendo el protocolo (Oliveira et al., 2008). En donde se usó 200 uL de sample buffer + 10.8 mg de DTT + pellet de hemoflagelados), electroforesis 200 V, 5 Am, 1 h y transferencia 100 V, 5 Am, 1h. Obtuvimos membranas de nitrocelulosa (NC), las cuales fueron cortadas en tiras de 4mm) con las fracciones polipeptídicas de los hemoflagelados.

Se agregó inicialmente una solución de leche descremada al 5% para bloquear las reacciones inespecíficas en las tiras de nitrocelulosa en una dilución 1:100 con sueros de perezosos (990 uL de Leche al 5% + 10 uL de suero de perezoso) por 24 horas. Transcurrido el tiempo se lavó 3 veces con PBS al 10% y se añadió el anticuerpo policlonal anti-Igs de perezoso conjugado estandarizado en casa a una dilución 1:100 (990

uL de PBS + 10 uL de anti-Igs deperezoso). Se incubó por un periodo de 2 horas. Se volvió a lavar 3 veces con PBS al 10% y se agrega el anticuerpo secundario (Anti-mouse ligado a peroxidasa catálogo) por 1 hora. Procedemos con el último lavado 3 veces con PBS al 10% y se agregó el sustrato (24 mL PBS al 10% + 9 mg de DAB (Diaminobencidina) + 6 mL de NiCl<sub>2</sub> + 30 uL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de 5 a 10 minutos, se detuvo la reacción con agua destilada.

Las tiras de NC, con el perfil electroforético reconocido (*T. cruzi*, *T. rangeli* o *L. panamensis*) fueron secadas entre dos hojas de papel filtro para su posterior análisis (Figura N°32).

FIGURA 31. Esquema de detección mediante Western Blot de anticuerpos específicos anti hemoflagelados en suero de perezosos.



# CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 RESULTADOS

#### 3.1.1 Colecta de perezosos para Arbovirus

Entre los años 2013 y 2018, se capturaron 60 ejemplares de perezosos de las especies *C. hoffmani* ( $n= 55$ ) 91.7 % y *B. variegatus* ( $n= 5$ ) 8.3 %. Los animales procedieron de ambientes silvestres cercanos a comunidades rurales de la provincia de Panamá Oeste. En el Distrito de Capira se colectaron en sitios cercanos a la comunidad de El Lídice 27 (45.0 %) animales y en Trinidad de las Minas 23 (38.3 %). En el Distrito de La Chorrera en Las Pavas 10 (16.7 %). En cuanto al sexo, 30 (53.6 %) fueron machos, 26 (46.4 %) hembras y 4 (6.67 %) de sexo no determinado, (Tabla N°7). Fueron colectados 23 (38.3%) en el año 2013, 13 (21.7%) en 2014, 6 (10.0%) en 2015, 18 (30.0%) en 2018) Luego de ser anestesiados con Ketamina, a cada animal se le tomó una muestra de dos ml de sangre venosa. El suero fue separado por centrifugación y almacenado a -20°C hasta su uso.

**Tabla 7.** Características de los perezosos colectado en el periodo de 2013 a 2018, para arbovirus ( $n=60$ )

<b>Características</b>	<b>N (%)</b>
<b>Año de colecta</b>	
2013	23 (38.3 %)
2014	13 (21.7 %)
2015	6 (10.0 %)
2018	18 (30.0 %)
<b>Sitio de colecta</b>	
Lidice	27 (45.0 %)
Las pavas	10 (16.7 %)
Trinidad de Las Minas	23 (38.3%)
<b>Especie</b>	
Choloepus hoffmanni	55 (91.7 %)
Bradypus variegatus	5 (8.3 %)
<b>Sexo</b>	
Macho	30 (50.0 %)
Hembra	26 (43.3 %)

### 3.1.2 Detección de anticuerpos neutralizantes contra diferentes arbovirus

Antes de implementar la técnica de PRNT para detección de anticuerpos contra 10 arbovirus distintos en perezosos se realizaron los títulos de los diferentes virus (Figura N°33), se pudo determinar que 0 % (0/60) de los perezosos tenían anticuerpos neutralizantes contra el flavivirus DENV-2; igualmente no se pudo detectar la presencia de anticuerpos contra los alfavirus altrálgicos MAYV, CHIKV y UNAV, ni contra el phlebovirus PTV en el suero de estos animales. Sin embargo, estos sueros tuvieron actividad neutralizante en 6.7 % (4/60) contra los alfavirus neurológicos VEEV y MADV mostrando presencia de anticuerpos contra estos virus de manera específica, ya que no hubo perezosos con anticuerpos con actividad neutralizante para ambos virus. Igualmente, 6.7 % (4/60) tuvieron actividad neutralizante contra YFV. Otros virus, como los Orbivirus Pan-Sloth 149 y Pan-Sloth D50 mostraron una seroprevalencia elevada en 23.3 % (14/60) y 53.3 % (32/60) de los perezosos, respectivamente (Grafica N°1).

La técnica de PRNT además de detectar la presencia de los anticuerpos neutralizantes, permite obtener el título de estos en el suero positivo. Los perezosos parecen tener títulos bajos de anticuerpos neutralizantes contra los arbovirus, logrando títulos iguales o superiores a 1/160 solo para los orbivirus. Las 4 muestras positivas para VEEV obtuvieron títulos bajos de 1/20 (3 perezosos) y 1/40 (1), igualmente las 4 muestras positivas contra MADV tenían un título bajo de 1/10. Para el flavivirus YFV, se observa el mismo fenómeno, las 4 muestras positivas tienen títulos bajos (1/10 y 1/20, en 1 y 3 perezosos, respectivamente). Mientras que los títulos de anticuerpos neutralizantes contra los Orbivirus Pan-sloth D50 y Pan-Sloth D149 son variables de 1/10 a 1/320: Pan-sloth D50, 32 muestras positivas con títulos en 1/10 (4), 1/20 (9), 1/40 (2), 1/80 (5), 1/160 (7), 1/320 (4), 1/1280 (1) y Pan-Sloth 149, 14 muestras positivas con títulos en 1/10 (1), 1/20 (7), 1/80 (2), 1/160 (3) y 1/320 (1) (Figura N° 34) (Tabla N°8).

FIGURA 32. Títulos de Virus utilizados para la PRNT

Virus	Título
a. CHIKV	$1.5 \times 10^{-7}$
b. MAYV	$2.5 \times 10^{-6}$
c. MADV	$2.5 \times 10^{-7}$
d. VEEV	$1.5 \times 10^{-9}$
e. UNAV	$6.5 \times 10^{-6}$
f. DENGV	$3.0 \times 10^{-6}$
g. YFV	$5.0 \times 10^{-7}$
h. PTV	$5.5 \times 10^{-5}$
i. PANSLOTH D50	$4.8 \times 10^{-8}$
j. PANSLOTH 149	$1.5 \times 10^{-4}$

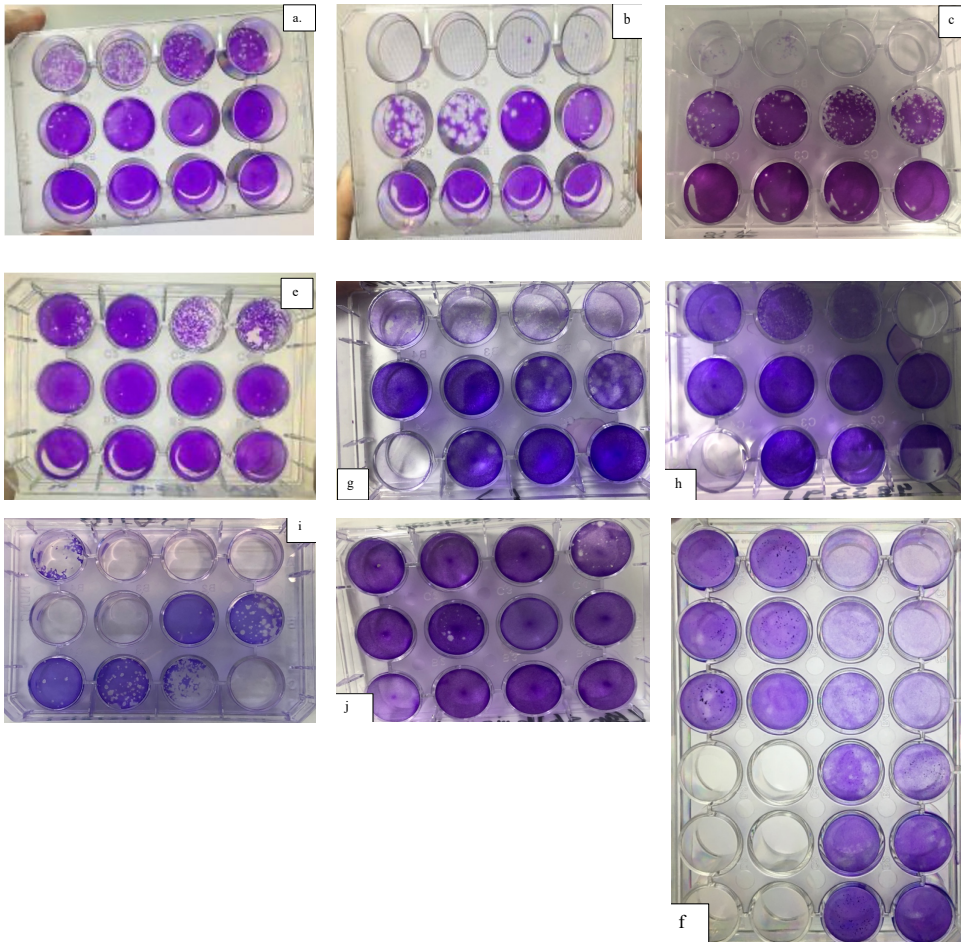
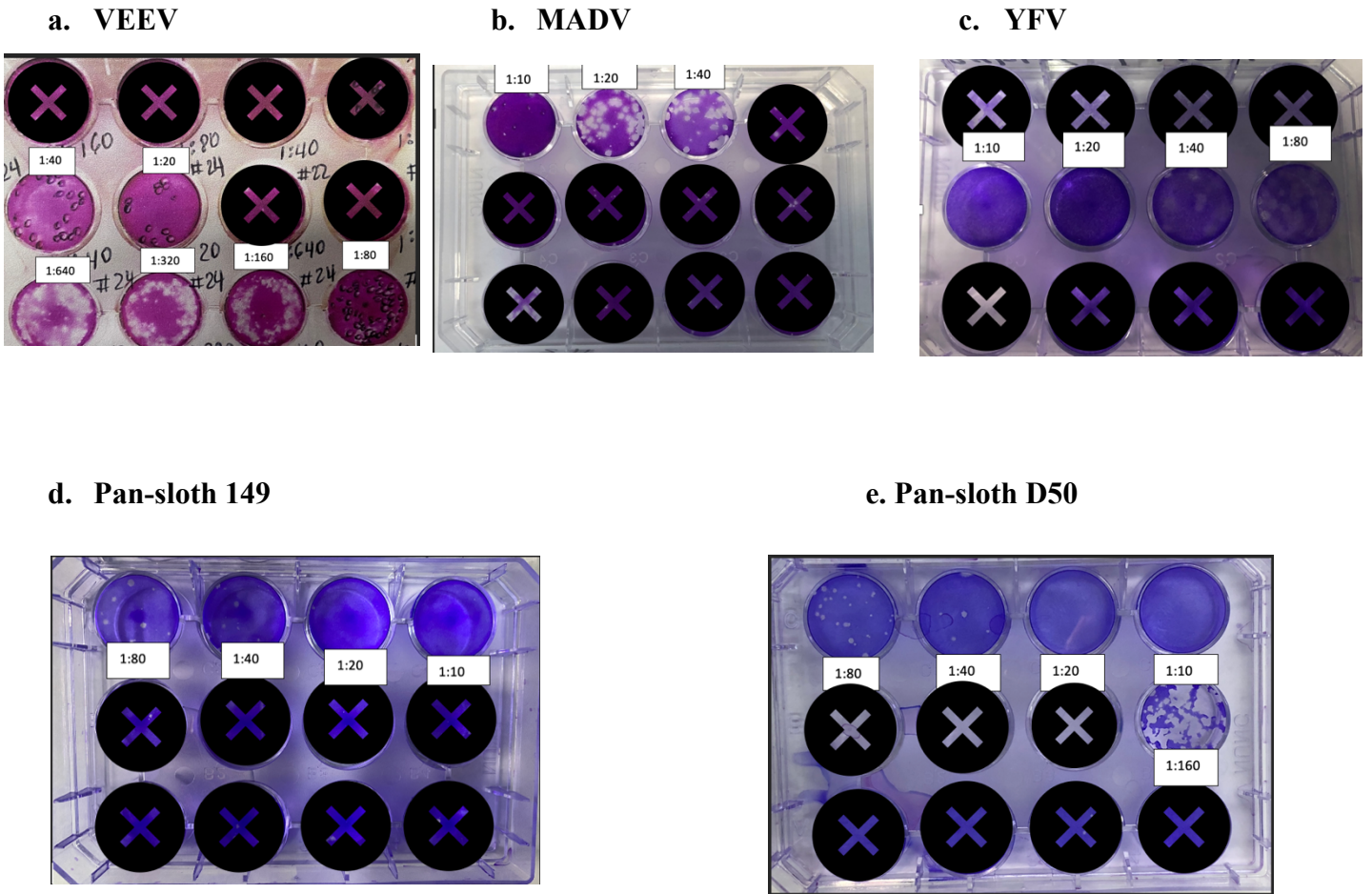
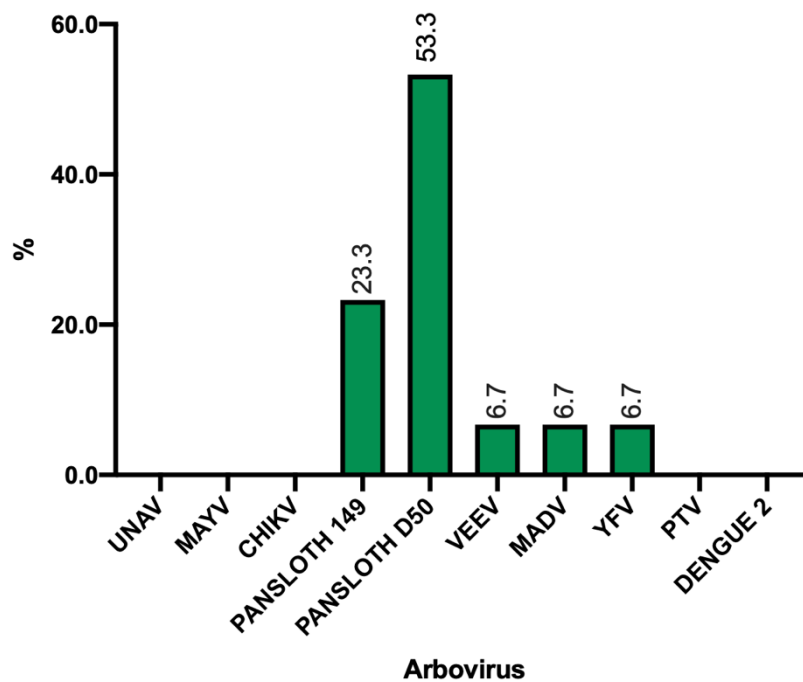


FIGURA 33. Ejemplos de PRNT Positivos con sus títulos



Grafica N°1. Frecuencia de muestras positivas por PRNT en muestras de perezosos n=60



**Tabla 8.** *Títulos de anticuerpos neutralizante para 10 arbovirus por técnica de PRNT en muestras de perezosos (n=60).*

Virus	Total de Muestras de Perezosos Positivas	Títulos de anticuerpos por PRNT								
		1/10	1/20	1/40	1/60	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1 280
UNAV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MAYV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VEEV	4	0	3	1	0	0	0	0	0	0
CHIKV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MADV	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Pan-Sloth D50	32	4	9	2	0	5	7	4	0	1
Pan-Sloth 149	14	1	7	0	0	2	3	1	0	0
YFV	4	3	1	0	0	0	0	0	0	0
PTV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DENV-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Utilizando el análisis estadístico de Chi2 (Fisher), se detallan características de asociación en cuanto a la presencia y ausencia de arbovirus por Sexo, Sitio de Colecta y Especie (Tabla N°9), mostrando ninguna diferencia significativa. Según el sexo de los perezosos, Macho 6 (7.5 %) y Hembra 8 (6.5 %), se observa una ausencia de infección por Arbovirosis, mientras que la presencia es de: Macho 24 (22.5 %), Hembra 18 (19.5 %), con una  $p=0.655$ . Según el sitio de colecta, en el Lidice se muestra una ausencia de 4 (6.8 %) y presencia de 23 (20.2 %), en Las Pavas 3 (2.5 %) de ausencia y 7 (7.5 %) de presencia, en Trinidad de las Minas 8 (5.8 %) de presencia y de ausencia 15 (17.2 %), con un valor  $p=0.265$ . Según el género y especie resultó para *C. hoffmanni* un 13 (13.8 %) en ausencia y 42 (41.2 %) de presencia de arbovirosis. En *B. variegatus* un 2 (1.2 %) ausencia y 3 (3.8 %) de presencia dando un valor  $p=0.591$  para infección de arbovirus.

**Tabla 9.** Características asociadas a la seroprevalencia por Arbovirus en perezosos, análisis bivariado\*

Características	Seroprevalencia Arbovirus		p
	Ausencia (n=15)	Presencia (n=45)	
	n (%)	n (%)	
<b>Sexo</b>			0.655
Macho	6 (7.5)	24 (22.5)	
Hembra	8 (6.5)	18 (19.5)	
Desconocido	1 (1.0)	3 (3.0)	
<b>Sitio de colecta</b>			0.265
Lidice	4 (6.8)	23 (20.2)	
Las Pavas	3 (2.5)	7 (7.5)	
Trinidad de las M.	8 (5.8)	15 (17.2)	
<b>Especie</b>			0.591
<i>Choloepus hoffmanni</i>	13 (13.8)	42 (41.2)	
<i>Bradypus variegatus</i>	2 (1.2)	3 (3.8)	

\*Análisis bivariado; Chi cuadrado (Chi2).

### 3.1.3 Evaluación de perezosos para la infección con tripanosomátidos de importancia médica

De igual manera se utilizaron los mismos perezosos (n=51) 51 de las especies *C. hoffmani* (n= 46) 90.2 % y *B. variegatus* (n= 5) 9.8% procedentes de los mismos sitios: Trinidad de las Minas 17 (33.3 %), El Lídice 10 (19.6 %), Las Pavas 24 (47.1%) en los años del 2013 (17, 33.3%), 2014 (12, 23.5 %) 2015 (6, 11.8%) y 2018 (16, 31,4 %) (Tabla N°10).

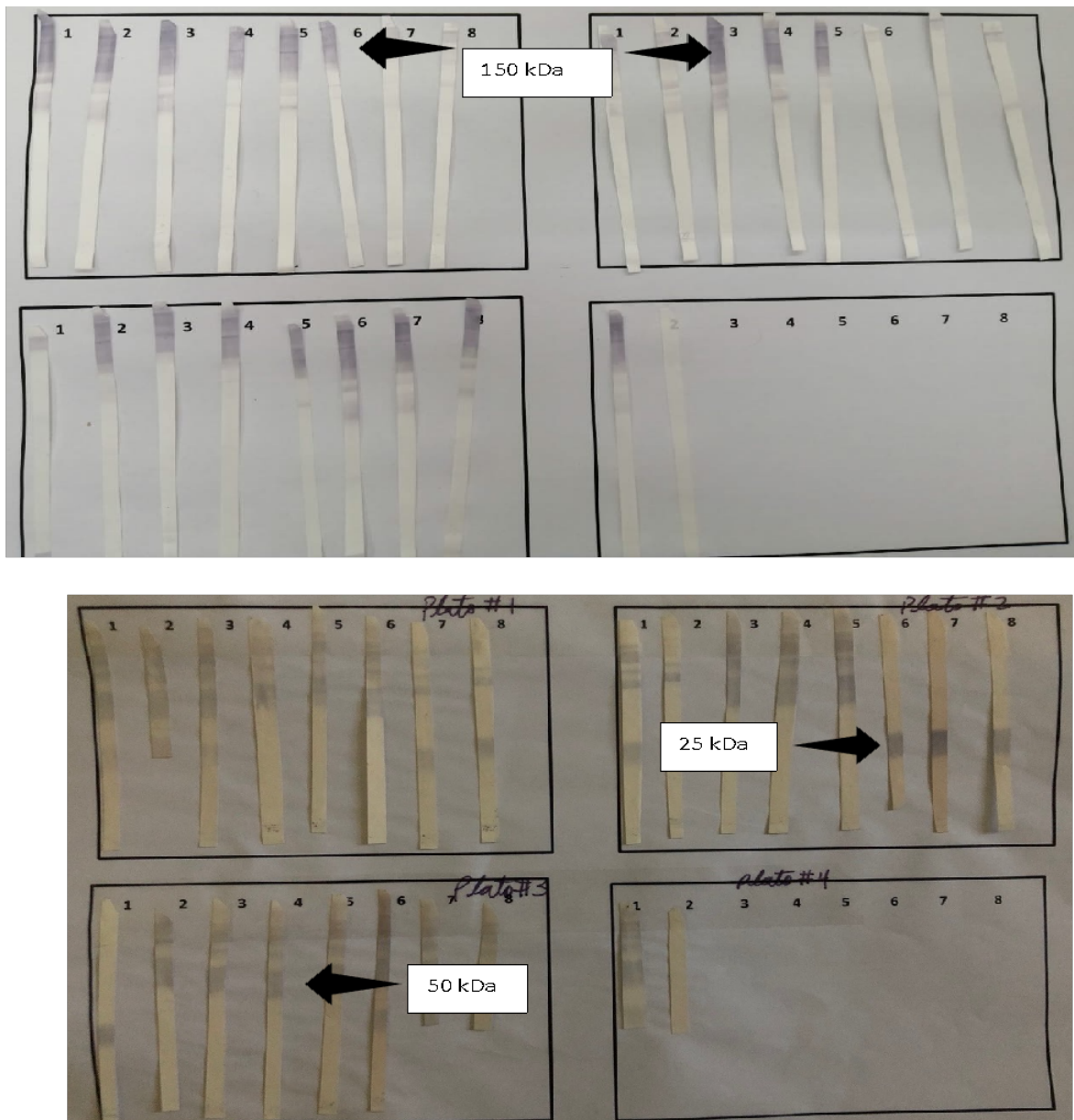
**Tabla 10.** Características de los perezosos colectado en el periodo de 2013 a 2018, para hemoparasitos (n=51)

Características	N (%)
<b>Año de colecta</b>	
2013	17 (33.3 %)
2014	12 (23.5 %)
2015	6 (11.8 %)
2018	16 (31.4 %)
<b>Sitio de colecta</b>	
Lidice	10 (19.6 %)
Las pavas	24 (47.1 %)
Trinidad de Las Minas	17 (33.3 %)
<b>Especie</b>	
<i>Choloepus hoffmanni</i>	46 (90.2 %)
<i>Bradypus variegatus</i>	5 (9.8 %)
<b>Sexo</b>	
Macho	25 (49.0 %)
Hembra	22 (43.1 %)

### Determinación de respuesta inmune humoral anti hemoflagelados de importancia médica

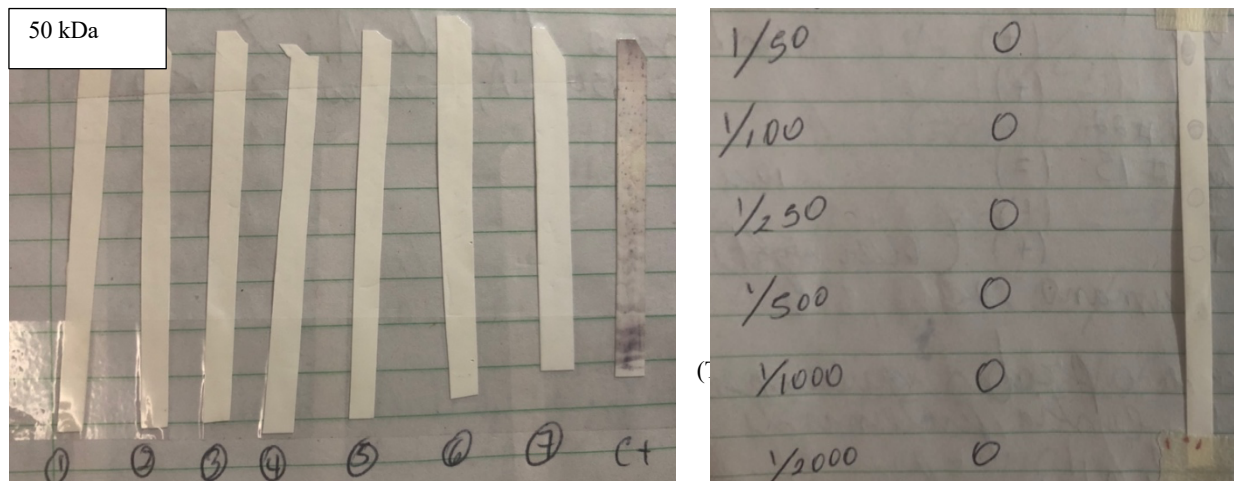
Para detectar ausencia y presencia de anticuerpos contra hemoflagelados, primero se produjo y caracterizó un suero hiperinmune anti-anticuerpos de perezoso, que se obtuvo mediante inmunización de ratones. Se obtuvieron tres pools de sueros anti las Igs de perezosos: uno anti la cadena ligera (25 kDa), otro anti la cadena pesada (50 kDa) y otro que reconoció la molécula completa (150 kDa).

FIGURA 34. Pools de anti Igs de perezoso capaces de reconocer la proteína purificada y deznaturalizada  
reconocimiento de molécula completa (150 kDa) (1), reconocimiento de la cadena ligera (25 kDa) y cadena pesada (50 kDa) (2).



En primera instancia eligió el pool de Anti-50 kDa, para realizar la detección de anticuerpos anti los antígenos de diferentes tripanosomátidos, pero los resultados fueron negativos. Se verificó utilizando el Anti-50 diluido a diferentes concentraciones, pero solo era capaz de reconocer la proteína (50kDa) en su estado dividido desnaturalizado más no la molécula en su forma natural nativa (**Figura N°36**)

FIGURA 35. Diluciones y reconocimiento de suero de perezosos por anti-50 kDa



Posterior a esto decidimos utilizar el pool anti- 150 kDa (anticuerpo completo), esta mostró reconocimiento de los sueros de perezosos previamente confirmados positivos por PCR para hemoflagelados (*T. rangeli*, *T. cruzi*, *L. panamensis*) (Figura N° 37).

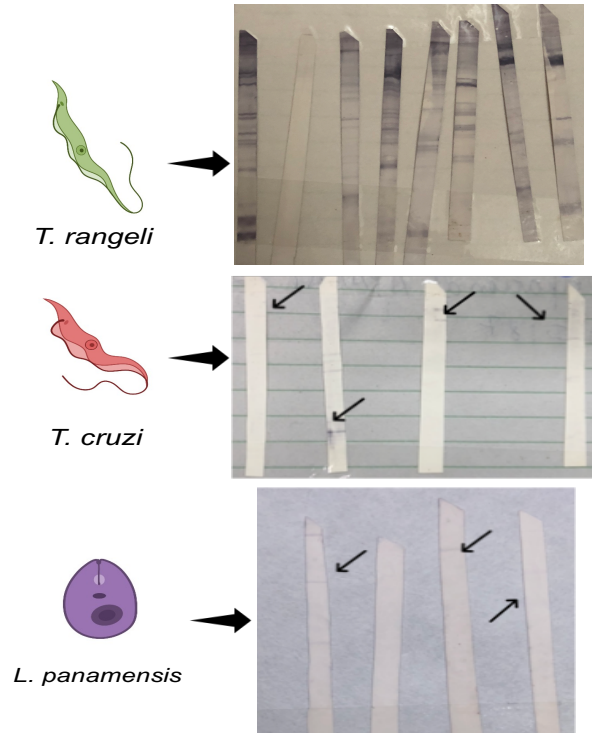
FIGURA 36. Diluciones y reconocimiento de suero de perezosos por anti-150 kDa



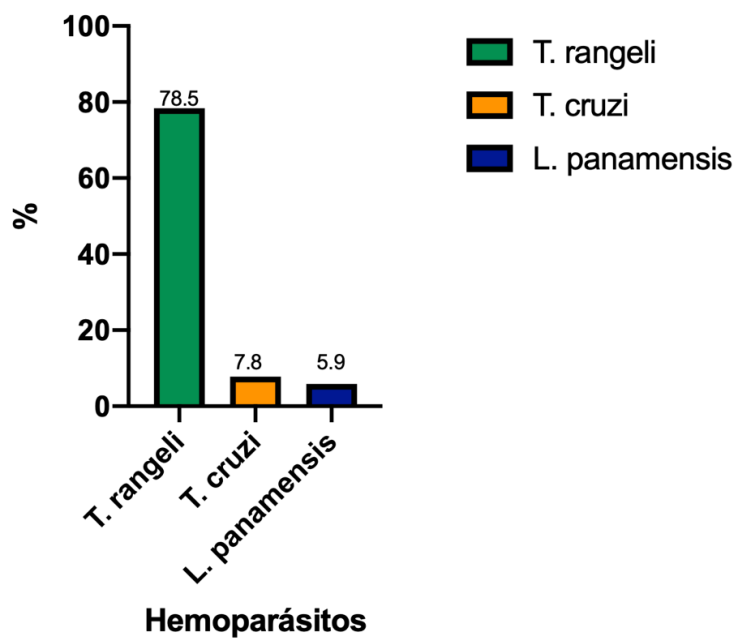
Utilizando el anticuerpo total (Anti-150 kDa) como anticuerpo primario, realizamos la técnica Western Blotting para evidenciar la presencia o ausencia de anticuerpos anti hemoflagelados de importancia médica en perezosos. Los resultados muestran la presencia de anticuerpos anti- *T. rangeli* en un 78.4 % (40/51) de las muestras. El reconocimiento de las bandas antigénicas fue registrado (Tabla N°11). En cuanto a *T.*

*cruzi* se encontraron anticuerpos en 7.8 % (4/51) de las muestras y para *L. panamensis* en 5.9 % (3/51) (Gráfica N°2.). Se puede visualizar N (%) de muestras con presencia y ausencia de hemoflagelados la seroprevalencia de los parásitos en general (Figura N° 38).

FIGURA 37. Presencia de sueros positivos para *T. rangeli*, *T. cruzi* y *L. panamensis*



Grafica N°2. Muestras positivas para anticuerpos anti hemoflagelados en perezosos (n=51)



De los 3 antígenos de hemoflagelados utilizados, el de *T. rangeli* fue el más reconocido por los sueros evaluados, mostrando un mayor reconocimiento de diferentes bandas de polipéptidos (Tabla N°12). Se realizó una tabla de frecuencias por peso molecular detectado para las diferentes bandas de proteínas de *T. rangeli* en donde se muestra una mayor frecuencia en proteínas con pesos moleculares de 113 kDa (45 %), 57 kDa (33 %), 74 kDa (25 %), 67 kDa (23 %), 18 kDa (23 %), 87 kDa (20 %), 119 kDa (18 %), 30 kDa (18 %), 20 kDa (18 %), 71 kDa (15 %), 60 kDa (15 %), 27 kDa (15 %), 101 kDa (10 %), 44 kDa (10 %), 26 kDa (10 %), 108 kDa (8 %) (Tabla N°11).

**Tabla 11.** Muestras Positivas de perezos para *T. rangeli* en sus distintos Pesos Moleculares

Muestras	.PESO MOLECULAR															
	18	20	26	27	30	44	57	60	67	71	74	87	101	108	113	119
PL-18-06																
PT 15																
PL-18-01																
P 15-02																
PT 24																
PT 04																
PT 18-11																
PT 13																
PL 18-19																
PT 02																
PL 18-18																
PL 18-12																
PL 18-21																
PL-10																
PL-15-01																
PT 16																
PT 01																
PT 14																
PT 21																
PT 08																
PT 18-09																
PL 18-13																
PL 18-15																
P20																
PT 18																
PL 02																
PL 03																
PL 22																
P 15-06																
PL 18																
P-23																
PL- 18-07																
PT 12																
PT 17																
P 15-04																
PL 18-08																
PL 18-05																
PL 18-02																
PT 05																
PL 18-03																

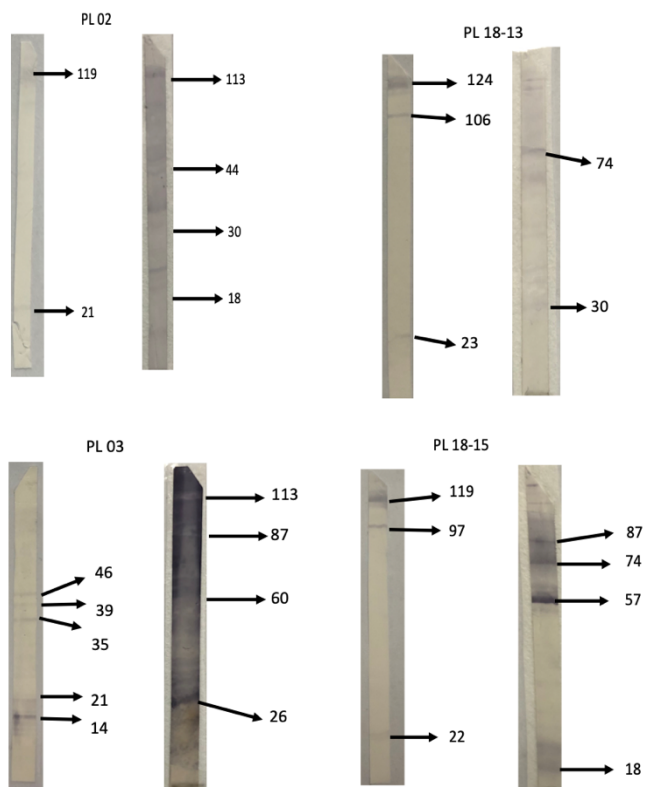
**Tabla 12.***Frecuencias de pesos Moleculares (PM) de proteínas de T. rangeli en muestras de perezosos.*

Peso Molecular	Frecuencia	F. relativa	Porcentaje
119 kDa	7	0.175	18%
113 kDa	18	0.45	45%
108 kDa	3	0.075	8%
101 kDa	4	0.1	10%
87 kDa	8	0.2	20%
74 kDa	10	0.25	25%
71 kDa	6	0.15	15%
67 kDa	9	0.225	23%
60 kDa	6	0.15	15%
57 kDa	13	0.325	33%
44 kDa	4	0.1	10%
30 kDa	7	0.175	18%
27 kDa	6	0.15	15%
26 kDa	4	0.1	10%
20 kDa	7	0.175	18%
18 kDa	9	0.225	23%
	40		

Además, se encontró que 4 muestras Positivas para *T. rangeli* eran también Positivas para *T. cruzi*. Para estos sueros se comparó si había reconocimiento de estas proteínas según su PM sin embargo para ambos hemoflagelados el perfil electroforético reconocido fue diferente en las 4 muestras (Tabla N°13).

**Tabla 13.** *Peso Molecular de muestras positivas en 4 perezosos para T.cruzi y T. rangeli*

MUESTRA	T. cruzi (PM)	MUESTRA	T. rangeli (PM)
PL 02	119.14	PL 02	113.09
	21.81		44.05
			30.21
			17.99
PL 03	45.91	PL 03	113.09
	39.01		87.26
	35.54		59.85
	20.82		26.23
	14.35		
PL-18-13	124.82	PL-18-13	73.99
	106.06		30.21
	23.38		
PL 18-15	119.14	PL 18-15	87.26
	96.64		73.99
	21.81		57.09
			17.99



Al igual que en los arbovirus se tomaron en cuenta características de asociación en cuanto a la presencia y ausencia de anticuerpos contra hemoflagelados por Sexo, Sitio de Colecta y Especie utilizando el análisis estadístico de Chi2 (Fisher).

En donde según el sexo de los perezosos Machos 5 (5.4 %) y Hembras 4 (4.7 %) se observó una ausencia de seroprevalencia en hemoflagelados y una presencia en Macho 20 (19.6 %), Hembra 18 (17.3 %) como resultado una  $p= 0.377$ . Según el sitio de colecta en El Lídice se muestra una ausencia de 7 (5.2 %) y presencia de 17 (18.8 %), en Las Pavas 1 (2.2 %) de ausencia y 9 (7.8 %) de presencia, en Trinidad de las Minas 3 (3.7 %) de presencia y de ausencia 14 (13.3 %) de presencia dando como resultado un valor  $p= 0.487$ .

Según el género y especie resultó para *C. hoffmanni* un 9 (9.9 %) en ausencia y 37 (36.1 %) de presencia de arbovirosis. En *B. variegatus* un 2 (1.1 %) ausencia y 3 (3.9 %) de presencia dando un valor  $p=0.292$  para infección de arbovirus (Tabla N°15).

**Tabla 14.** Características asociadas de seroprevalencia de hemoflagelados en perezosos, análisis bivariado\*

Características	Seroprevalencia de hemoparásitos		p	
	Ausencia (n=11) n (%)	Presencia (n=40) n (%)		
	<b>Sexo</b>			
	Macho	5 (5.4)	20 (19.6)	
	Hembra	4 (4.7)	18 (17.3)	
<b>Sitio de colecta</b>			0.487	
	Lidice	7 (5.2)	17 (18.8)	
	Las Pavas	1 (2.2)	9 (7.8)	
	Trinidad de las M.	3 (3.7)	14 (13.3)	
<b>Especie</b>			0.292	
	<i>Choloepus hoffmanni</i>	9 (9.9)	37 (36.1)	
	<i>Bradypus variegatus</i>	2 (1.1)	3 (3.9)	

\*Análisis bivariado; Chi cuadrado (Chi2).

## 3.2 DISCUSIÓN

### 3.2.1 Los perezosos tienen interacción con diferentes arbovirus y producen anticuerpos neutralizantes contra estos

Los resultados de los análisis de la seroprevalencia en perezosos para 10 diferentes arbovirus muestran que los perezosos (de ambas especies *Choloepus* spp. y *Bradypus* spp.) en comunidades rurales de Panamá Oeste presentan anticuerpos contra diferentes arbovirus esperados. Sin embargo, no encontraron anticuerpos contra algunos arbovirus, endémicos en el país, como DENV, ni contra otros arbovirus como el virus del complejo PTV. En efecto, a diferencia de estudios realizados en Brasil donde detectaron en los perezosos *B. torquatus* y *B. variegatus*, una seroprevalencia de 22.7% (5/22) para DENV-2, 9.1 % para DENV-1, 22.7 % para DENV-3 y 9.1 % para DENV-4 (Catenacci et al., 2018), nuestro estudio no encontró ningún perezoso con anticuerpos neutralizantes contra DENV-2, a pesar de que es uno de los serotipos con más alta circulación en el país (Yamilka et al., 2019). Se necesita realizar a futuro un estudio de seroprevalencia de DENV en perezosos y otras especies de mamíferos silvestres y domésticos que conviven cerca del ser humano para determinar si los perezosos tienen o no interacción con el DENV como descrito en otros países, aunque se ha demostrado que este virus es principalmente urbano y no necesita pasar por un reservorio animal para mantener su ciclo de transmisión (Valderrama et al., 2017).

Igualmente, en el caso del phlebovirus PTV, no logramos detectar anticuerpos neutralizantes en ningún perezoso del estudio, un resultado inesperado debido a que en estudios realizados en Panamá en 1982 en las comunidades de Majé, Cerro Azul, El Llano-Cartí y Aguacate (regiones de Panamá Centro y Este en la provincia de Panamá) se detectaron anticuerpos contra PTV en 7.5% de *B. variegatus* (8/106) y en 16.7% de *C. hoffmanni* (11/66) (Seymour et al., 1982). En un estudio reciente en Costa Rica también detectaron anticuerpos contra PTV en 32.4% (12/37) de los *C. hoffmanni* evaluados en el 2006 (Medlin, Deardorff, Hanley, Vergneau-grosset, Siudak-campfield, et al., 2016). Futuros estudios longitudinales a nivel nacional son necesarios para determinar si hay una diferencia de seroprevalencia de PTV en perezosos dependiendo de la región, y si hay una variación de la misma a través del tiempo. PTV se transmite normalmente por *Lutmozia* (Palacios et al., 2015), hay que determinar si las especies asociadas a la transmisión de PTV se alimentan de sangre de perezoso.

Con relación a los alfavirus, se observa una distinción entre alfavirus altrálgicos y neurológicos. No se pudo detectar la presencia de anticuerpos contra los alfavirus altrálgicos MAYV, CHIKV y UNAV. Este resultado es similar al obtenido en un estudio previo en Brasil, en el cual los perezosos de otras especies (*B. torquatus* y *B. variegatus*) obtuvieron resultados negativos para los anticuerpos contra MAYV y CHIKV, mientras que no existía información previa sobre la seroprevalencia de UNAV en estos animales (Catenacci et al., 2018). En el caso de los alfavirus neurológicos, obtuvimos resultados positivos de 6.7 % (4/60) de los perezosos contra VEEV y MADV. Es importante resaltar que los perezosos positivos para VEEV no fueron los mismos que para MADV, descartando alguna reacción cruzada. Un resultado esperado, debido a que en Panamá se han descrito perezosos positivos (*Bradypus* y *Choloepus spp.*) con anticuerpos contra VEEV (Grayson y Galindo 1969; Seymour et al., 1982). En Costa Rica se ha detectado en perezosos una seroprevalencia contra VEEV de 12/109 (11 %) en perezosos de dos y tres dedos (Medlin, Deardorff, Hanley, Vergneau-grosset, Siudak-campfield, et al., 2016). Es importante resaltar de que este virus está relacionado estrechamente con roedores y diferentes mamíferos manteniendo un ciclo de vida epizoótico causando brotes en humanos y en caballos como huésped accidental en Panamá Este (Darién) (J.-P. Carrera et al., 2013). Estudios futuros son necesarios para comparar la seroprevalencia contra VEEV en los perezosos con la de otros animales viviendo en la misma comunidad. En Brasil se han detectado perezosos positivos en un 4.5% (1/22) al EEEV u otro virus neurológico, estos tenían los mismos títulos de anticuerpos (1:20) a lo largo del tiempo, cuando se compara la primera captura en 2006, seguida de otras tres capturas entre 2006 y 2008 (Catenacci et al., 2018).

Otro Flavivirus con importancia en salud pública, que tiene riesgo de reemergencia en Panamá, a pesar de tener una vacuna, ya que en los últimos años ha causado brotes en Brasil y otros países de Suramérica, es el YFV. De manera sorprendente, obtuvimos resultados positivos para la actividad neutralizante contra YFV en 6.7 % (4/60) de estos perezosos. sin reacción cruzada contra DENV y ZIKV. Esto sugiere una posible circulación en un ciclo enzoótico de este virus en zonas selváticas y zonas rurales al límite con la selva en nuestro país, como se ha observado en Brasil (Catenacci et al., 2018). Se observan que las 4 muestras positivas tienen títulos bajos (1:10 y 1:20, en 1 y 3 perezosos, respectivamente), lo que sugiere que puede ser una reacción cruzada debido a interacciones con otros flavivirus selváticos desconocidos (Houghton-Triviño et al.,

2008). De igual forma es importante resaltar que este es un virus no se ha detectado en nuestro país desde 1972, lo que nos alerta a extender estudios longitudinales en perezosos, otros mamíferos, así como en primates no humanos, en esta área. De manera interesante, en Brasil (país con zonas endémicas para YFV), estudios previos en perezosos no detectaron anticuerpos contra este Flavivirus, a pesar de que 3.6% (4/110) de los mamíferos no-humanos como *L. chrysomelas* y *S. xanthosternos* obtuvieron resultados positivos para anticuerpos neutralizantes contra YFV con títulos bajos 1:20 (Catenacci et al., 2018).

Los Orbivirus Pan-Sloth 149 y Pan-Sloth D50 mostraron una seroprevalencia elevada en 23.3 % (14/60) y 53.3 % (32/60) de los perezosos, respectivamente, con títulos que van hasta 1/1290. Estos Orbivirus han sido aislados de perezosos en el Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud en los años 70s-80s. Es importante mencionar que el Pan-Sloth D50 conforma una de las probables cepas divergentes de virus Changuinola (CGLV), en donde análisis genéticos de las cinco cepas del virus panameño revelaron una probable reasignación entre múltiples segmentos de los virus (Phan et al., 2020). La alta seroprevalencia de estos virus en los perezosos y el hecho de que estos fueron identificados casi 20 años antes en perezosos, sugiere que circulan continuamente entre estos animales que podrían ser su reservorio. Ningún perezoso tenía síntomas lo que sugiere que estos virus no son patógenos para ellos, estudios futuros son necesarios para determinar si pueden infectar humanos y causar enfermedad y con qué frecuencia.

En nuestro estudio no encontramos una asociación estadísticamente significativa en cuanto a la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes en perezosos según su sexo, sitio de colecta y especie. En particular esta última ya que la mayoría de las muestras fueron de la especie *C. hoffmani*. Esta falta de asociación puede deberse a limitaciones específicas del estudio como el bajo número de animales analizados, con pocos individuos para cada categoría (año de colecta, edad, sexo) y el hecho de que la mayoría son de una sola especie. Estudios futuro con una cohorte más numerosa y longitudinal de perezosos son indispensables para poder caracterizar mejor el ciclo de transmisión de estos arbovirus, el rol de los perezosos en el mismo, y los factores de riesgo asociados a la infección.

### **3.2.2. Determinación de la presencia de anticuerpos anti hemoflagelados de importancia médica**

En primera instancia se eligió un suero murino hiperinmune (anti-perezoso) capaz de reconocer la cadena pesada de las inmunoglobulinas (50 kDa) mediante análisis de Western Blotting. Sin embargo, al utilizarlos en el reconocimiento de inmunoglobulinas anti hemoflagelados presentes en el suero de perezosos, este anticuerpo policlonal no reconoció ninguna muestra. En base a este resultado se confirmó que este suero hiperinmune anti la cadena pesada, reacciona muy bien en pruebas de western blot en donde el antígeno (inmunoglobulinas) ha sido desnaturalizado/reducido, pero no presentaba reconocimiento del antígeno nativo (inmunoglobulinas unidas a las bandas polipeptídicas). Debido a estos resultados, decidimos utilizar los anticuerpos desarrollados contra la Inmunoglobulina entera (150 kDa), desarrollada a partir de inmunoglobulinas purificadas del suero de perezoso. Con este antisuero sí fue posible la detección de las inmunoglobulinas en estado nativo presentes en las pruebas de western blot, con reconocimiento positivo de las bandas polipeptídicas de diferentes hemoflagelados de importancia médica. Lo anterior nos indica que quizás hay algunas pérdidas de reconocimiento en epítomos importantes en el suero purificado cuando se obtiene en su forma reducida/desnaturalizada (50 kDa y 25 kDa), a diferencia cuando tenemos la inmunoglobulina entera (150 kDa). Es probable que el antisuero anti-50 KDa sólo reconozca epítomos relacionados con la estructura primaria de las moléculas de los polipéptidos. Mientras que al utilizar la molécula de 150 KDa, se mantiene el reconocimiento de algunos epítomos particulares.

Según la literatura muchas veces la disposición espacial de los distintos epítomos en una misma molécula proteica puede influir en la unión de los anticuerpos de varias maneras. En el caso de las proteínas, la formación de algunos epítomos depende sólo de la estructura primaria, y la formación de otros determinantes refleja la estructura terciaria, o la conformación (*Abbas A.K. Lichtman A. H. y Shiv Pillai, 2018*). Estas observaciones nos podrían dar una idea general en cuanto al origen de la especificidad y la utilidad práctica de estos sueros hiperinmunes anti 50 y 150 KDa.

Además, estos sueros hiperinmunes que generamos, podrían tener otras utilidades, por ejemplo, demostrar la presencia de anticuerpos específicos inducidos durante otras infecciones (bacterias, virus, hongos y parásitos), es decir para diagnóstico. También serían útiles para estudios dirigidos a caracterizar de manera general la respuesta inmune

en estos mamíferos: por ejemplo la caracterización estructural y antigénica de las Igs de perezoso. Estos anticuerpos también podrían ser utilizados en la identificación del tipo de ingesta sanguínea en algunos vectores (Triatominos, chitras, tábanos, etc), de manera específica para demostrar la presencia de sangre de perezoso.

En cuanto a los resultados sobre la detección de anticuerpos anti-parásitos hemoflagelados, se obtuvo una seroprevalencia anti *T. rangeli* de 78.4 % en los perezosos evaluados. *T. rangeli* es un parásito no patogénico para el ser humano pero de importancia ecoepidemiológica (Vallejo et al., 2015). La infección humana con este tripanosoma ha sido reportada en numerosas ocasiones en Panamá (Saldaña et al., 2005). La transmisión ocurre con la saliva del vector (*R. pallescens*), por lo que las infecciones en humanos y animales es más frecuente que con *T. cruzi* (V. J. Pineda et al., 2022).

A diferencia de *T. rangeli*, la seroprevalencia anti *T. cruzi* fue de 7.8 %, una proporción mucho más baja. *T. cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas, un parásito frecuente en animales y humanos en los sitios donde los perezosos fueron capturados (MINSA, 2018). Algunos estudios en Panamá señalan la infecciones de perezosos con *T. cruzi*, por lo que quizás estos resultados fueron no esperados para esta región del país (Sousa, 1972). De hecho, recientemente se reporta una alta tasa de incidencia de casos en humanos para Enfermedad de Chagas en Panamá Oeste (5.8 casos por 100,000 habitantes) en datos publicados por el MINSA hasta el 2017 (MINSA, 2018). La infección humana con estos parásitos fue reportada en un estudio realizado en el 2005 en la región de Panamá Oeste, el mismo reporta una prevalencia del 9,7% con una seroprevalencia del 2,9% contra *T. cruzi* y una predominancia de la infección por *T. rangeli* (6,8%) en niños de 3 a 14 años (Saldaña et al., 2005). Lo que indica que estos patógenos están presentes en estas regiones del país.

Como fue mencionado anteriormente, algunos estudios en América Latina sobre la relación del perezosos como reservorio de Tripanosomátidos los vinculan desde 1972 en perezosos como: *C. hoffmani* asilados con *T. cruzi* en 14.2% de los casos (Sousa, 1972). Por eso esperábamos una mayor prevalencia en este patógeno, no obstante, también se ha visto relacionado con otros tripanosomátidos a través del tiempo (1985 y 1989) por ejemplo: Brasil y Guyana Francesa aislaron *Trypanosoma mesnilbrimonti* y *Trypanosoma preguici* en *Choloepus didactylus*. En Costa Rica y Panamá se ha identificado *Trypanosoma preguici* en *Choloepus hoffmanni* (Shaw JJ, 1985; Travi et al., 1989).

La alta prevalencia en perezosos dentro de este estudio con *T. rangeli* puede estar vinculada por la relación que tiene este reservorio con *R. pallescens*. Aparentemente, este vector se alimenta con frecuencia de sangre de perezosos (Gottdenker et al., 2012b) lo que explicaría la frecuencia de infección observada.

*Trypanosoma rangeli* es también frecuente en diferentes tipos de mamíferos como, por ejemplo: *Didelphis Marsupiales*, primates no humanos (*Saguinus geoffroyi*, en capuchinos de cara blanca, *Cebus capucinus*, en monos ardilla, *Saimiri sciureus* y en monos araña negros) y *S. geoffroyi* y en *C. capucinus* (De Lima Ferreira et al., 2015; Sousa et al., 1974; Pineda et al., 2022) Lo que indica la alta prevalencia de este parásito en esta Región del país. Si bien *T. rangeli* no se relaciona con patologías en el huésped vertebrado (De Lima Ferreira et al., 2015), sí se vincula con un posible efecto modulador de la infección chagásica, debido a la alta similitud antigénica con *T. cruzi* y a varios factores que desencadenan la respuesta inmune humoral y celular (Basso, 2013; Johana et al., 2004).

La Leishmaniasis es otra enfermedad zoonótica endémica en esta región de Panamá, en donde datos recopilados desde el año 2000 hasta el 2014, registra un total de casos de 33,491 ubicando a Panamá Oeste (Oficial G., 2016). Los perezosos han sido reportados como reservorios importantes para parásitos causantes de la Leishmaniasis Tegumentaria en varios países de América Central y del Sur (González et al., 2015; Roque & Jansen, 2014). ), por lo que quizás esperábamos una mayor seroprevalencia en estos animales. No obstante, también se conoce que estos parásitos inducen una respuesta inmune humoral de baja intensidad, difícil de demostrar por lo menos durante la infección humana (Goncalves et al., 2020). Por otro lado, los perezosos con frecuencia están infectados con parásitos del género *Endotrypanum*, los cuales están muy relacionados antigénica y filogenéticamente con las leishmanias (Albanaz et al., 2021), por lo que se consideró también el hallazgo de anticuerpos cros reactantes al utilizar antígenos de promastigotes de *Leishmania* en nuestros análisis, situación que no pudo ser demostrada. La prolongada relación parásito-huésped (Leishmania-perezoso). (H. Christensen et al., 1984; H. A. Christensen et al., 1982; Gentile et al., 1981; Kreutzer et al., 1991), puede estar relacionada con esta pobre respuesta inmune; luego de millones de años de haberse establecido, estos parásitos pudieran estar comportándose más bien como comensales. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales para evaluar la respuesta inmune inducida por estos hemoflagelados.

Los anticuerpos presentes en los sueros de los perezosos evaluados reconocieron diferentes bandas polipeptídicas de *T. rangeli*, algunas de ellas con mayor frecuencia, por ejemplo: 113 kDa, 74 kDa, 57 kDa. Otras con menos frecuencias (71 kDa) pero ya descritas en otros estudios, su rol en la respuesta inmune ante este parásito y la posibilidad de tener reacciones cruzadas con *T. cruzi* (Sousa, Octavio E, 1996). Sólo la proteína de 71 kDa detectada en el suero de estos perezosos es una de las que se mencionan en relación con estudios previos. Un hallazgo interesante es que no se obtuvo reacciones cruzadas para muestras que resultaron positivas tanto para *T. cruzi* como *T. rangeli* en estos perezosos.

La respuesta inmune humoral contra *T. rangeli* en infecciones humanas y en animales ha sido parcialmente estudiada en Panamá (Horna et al., 1997; V. Pineda et al., 2005; Sousa, Octavio E, 1996; Vasquez, 2004), sin embargo, no se había reportado un reconocimiento antigénico tan frecuente, diverso e intenso como el encontrado en el presente estudio. La explicación para esto no nos queda claro al momento, puede estar relacionada directamente con una respuesta inmune particular de estos animales filogenéticamente diferentes con los hasta ahora estudiados (Gaudin, 2004; Ruiz-García et al., 2020).

También puede vincularse con las coinfecciones con otros tripanosomátidos presentes en estos reservorios (Gilmore et al., 2001). En cualquier caso, este hallazgo merece la realización de estudios adicionales, sobre todo orientados a la evaluación del efecto de estos anticuerpos anti-*T. rangeli* y la infección con *T. cruzi*.

Además, se realizó un análisis estadístico Chi<sup>2</sup> (Fisher) se detallan características de asociación en cuanto a la presencia y ausencia de seroprevalencia contra los 3 hemoflagelados evaluados por Sexo, Sitio de Colecta y Especie (Tabla N°3). Al respecto no se encontró una asociación en cuanto a la presencia o ausencia de anticuerpos específicos en perezosos según su sexo, sitio de colecta y especie. En particular esta última ya que la mayoría de las muestras fueron de la especie *C. hoffmani*. También se realizó un Análisis bivariado y una regresión múltiple en estas mismas características (Tabla N°4.) de igual forma los valores fueron no significativos lo que reafirma que no hay una asociación en lo antes presentado en este estudio.

Para la interpretación de estos resultados, es necesario tener en cuenta no sólo la respuesta y la memoria inmunitarias a largo plazo de estos huéspedes en particular, sino también las características inmunogénicas/antigénicas de cada parásito.

En este estudio se comprobó la infección de perezosos de la provincia de Panamá Oeste con arbovirus y tripanosomátidos de importancia médica. Esta región del país está sometida a una creciente deforestación y urbanización, lo que sugiere un factor de riesgo de emergencia para enfermedades causadas por algunos de estos patógenos (*ICES, 2016; Ortiz et al., 2021*). Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de comprender el posible papel de los perezosos como reservorios de patógenos zoonóticos endémicos en nuestro entorno. Estudios dirigidos a determinar la presencia, frecuencia y diversidad de infecciones zoonóticas en perezosos ayudará con el establecimiento de programas de vigilancia, prevención y control de estas enfermedades.

# **CAPÍTULO IV: CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES**

## 4.1 CONCLUSIONES

- Se confirma la presencia de anticuerpos contra arbovirus y tripanosomátidos de importancia médica en perezosos capturados en la provincia de Panamá Oeste.
- El suero murino hiperinmune, producido en este estudio contra inmunoglobulinas de perezoso, puede ser utilizado en análisis dirigidos a evaluar la presencia de anticuerpos anti tripanosomátidos de importancia médica.
- Primeros datos documentados de seroprevalencia de los Orbivirus Pan-Sloth D50 y Pan-Sloth D149 en perezosos.
- La elevada seroprevalencia de los virus Pan-SlothD50 y 149 sugiere que los perezosos de la región siguen estando habitualmente en contacto con estos orbivirus.
- No se han detectado reacciones cruzadas entre los anticuerpos neutralizantes del VEEV y del MADV en estos perezosos. La seroprevalencia en los perezosos de esa región es similar entre estos dos alfavirus selváticos. Los perezosos analizados no presentaron anticuerpos neutralizantes contra el CHIKV urbano ni siquiera durante la epidemia en la ciudad de Panamá.
- También se confirmaron anticuerpos contra el YFV, un arbovirus no endémico en nuestro país.
- Se demostró una alta seroprevalencia (78.3 %) de anticuerpos anti *T. rangeli* en estos animales.
- Se encontró una baja presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* (7.8 %) y *L. panamensis* (5.8 %) en los perezosos evaluados.
- Los anticuerpos presentes en los sueros de los perezosos evaluados reconocieron diferentes bandas polipeptídicas en el perfil electroforético de *T. rangeli* (colocar peso de las bandas 113 kDa, 57 kDa, 74 kDa, 67 kDa, 18 kDa, 87 kDa, 119 kDa, 30 kDa, 20 kDa, 71 kDa, 60 kDa, 27 kDa, 101 kDa, 44 kDa, 26 kDa, 108 kDa).

## 4.2 RECOMENDACIONES

- Es pertinente realizar en futuros estudios longitudinales con georreferenciación, datos demográficos y clínicos de los perezosos y de los habitantes de las comunidades aledañas. Estos permitirían dar seguimiento a los perezosos y las personas a lo largo del tiempo, teniendo las coordenadas exactas de colectas de los perezosos con relación a las casas, para, además de medir su seroprevalencia y su papel como reservorio con una "n" mayor de individuos, realizar estudios epidemiológicos y de riesgo para entender mejor el ciclo de transmisión y el rol de los perezosos en el mismo.
- Realizaremos un análisis de secuenciación metagenómica para los Orbivirus aislados de los perezosos para realizar una caracterización molecular completa.
- Son necesarios estudios adicionales sobre la frecuencia, diversidad e intensidad del reconocimiento antigénico encontrado para *T. rangeli* por anticuerpos de perezosos, sobre todo en el contexto de la infección chagásica.

## BIBLIOGRAFIA

- Abbas A.K. Lichtman A. H. y Shiv Pillai. (2018). “Inmunología celular y molecular”. *Sanunders-Elsevier, 9na*, 111.
- Agarwal, A., Parida, M., & Dash, P. K. (2017). Impact of transmission cycles and vector competence on global expansion and emergence of arboviruses. *Reviews in Medical Virology*, 27(5), 1–12. <https://doi.org/10.1002/rmv.1941>
- Albanaz, A. T. S., Gerasimov, E. S., Shaw, J. J., Sádlová, J., Lukeš, J., Volf, P., Opperdoes, F. R., Kostygov, A. Y., Butenko, A., & Yurchenko, V. (2021). Genome analysis of *Endotrypanum* and *Porcisia* spp., closest phylogenetic relatives of *Leishmania*, highlights the role of amastins in shaping pathogenicity. *Genes*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/genes12030444>
- Arredondo-García, J., Mendez-Herrera, A., & Medina-Cortina, H. (2016). *Arbovirus en Latinoamérica*. 37(2), 111–131.
- Aslan, H., Oliveira, F., Meneses, C., Castrovinci, P., Gomes, R., Teixeira, C., Derenge, C. A., Orandle, M., Gradoni, L., Oliva, G., Fischer, L., Valenzuela, J. G., & Kamhawi, S. (2016). New insights into the transmissibility of *leishmania infantum* from dogs to sand flies: Experimental vector-transmission reveals persistent parasite depots at bite sites. *Journal of Infectious Diseases*, 213(11), 1752–1761. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw022>
- Attoui, H., Nomikou, K., Maan, S., Belaganahalli, M., & Mertens, P. P. C. B. T.-R. M. in B. S. (2016). *Orbiviruses* ☆. Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02628-3>
- Attoui, Houssam, Maan, S., Anthony, S. J., & Mertens, P. P. C. (2009). Chapter 3 - Bluetongue virus, other orbiviruses and other reoviruses: Their relationships and taxonomy. In P. S. Mellor, M. Baylis, & P. P. C. Mertens (Eds.), *Bluetongue* (pp. 23–52). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012369368-6.50007-1>
- Azambuja, P., Garcia, E. S., Waniek, P. J., Vieira, C. S., Figueiredo, M. B., Gonzalez, M. S., Mello, C. B., Castro, D. P., & Ratcliffe, N. A. (2017). *Rhodnius prolixus*: from physiology by Wigglesworth to recent studies of immune system modulation by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Journal of Insect Physiology*, 97, 45–65. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.11.006>
- 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>
- Basso, B. (2013). Modulation of immune response in experimental Chagas disease. *World Journal of Experimental Medicine*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.5493/wjem.v3.i1.1>
- Best, S. M. (2016). Flaviviruses. *Current Biology*, 26(24), R1258–R1260. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.09.029>
- Cabezas-Sánchez, C. (2015). Reemergentes Y Sus Determinantes. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 32(1), 7–8.
- Campos, A. A., Rubio Ortiz, M., Itandehui, T., Cuevas, M., Alberto, L., Osorio, H., Calvillo, S. M., Manning, R. G., & C. (2017). Enfermedad de Chagas: Vectores. *Ciencia*, 68(1), 30–33. <https://biblat.unam.mx/es/revista/ciencia-academia-mexicana-de-ciencias/articulo/enfermedad-de-chagas-vectores>
- 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/nejmoa1212628>
- Carrera, J. P., Díaz, Y., Denis, B., Barahona de Mosca, I., Rodriguez, D., Cedeño, I., Arauz, D., González, P., Cerezo, L., Moreno, L., García, L., Sáenz, L. E., Atencio, M. A., Rojas-Fermin, E., Vizcaino, F., Perez, N., Moreno, B., López-Vergès, S., Valderrama, A., & Armién, B. (2017). Unusual pattern of chikungunya virus epidemic in the Americas, the Panamanian experience. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(2), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005338>
- Catenacci, L. S., Ferreira, M., Martins, L. C., Vleeschouwer, K. M. De, Cassano, C. R., Oliveira, L. C., Canale, G., Deem, S. L., & Tello, J. S. (2018). Surveillance of Arboviruses in Primates and Sloths in the Atlantic Forest, Bahia, Brazil. *EcoHealth*. <https://doi.org/10.1007/s10393-018-1361-2>
- CDC. (2015). *Contagio de los virus de la influenza aviar A entre animales y personas | Influenza aviar (gripe)*. 2015. <https://espanol.cdc.gov/flu/avianflu/virus-transmission.htm>
- Celone, M., Okech, B., Han, B. A., Forshey, B. M., Anyamba, A., Dunford, J., Rutherford, G., Mita-Mendoza, N. K., Estallo, E. L., Khouri, R., de Siqueira, I. C., & Pollett, S. (2021). A systematic review and meta-analysis of the potential non-human animal reservoirs and arthropod vectors of the Mayaro virus. In *PLoS Neglected Tropical Diseases* (Vol. 15, Issue 12). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010016>
- Center for Disease Control and Prevention. (2019). *Life Cycle of Chagas Disease*.
- Center for Disease Control and Prevention. (2020). *Leishmaniasis - Biology*. Global Health, Division of Parasitic Diseases and Malaria. <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>
- Chomel, B. B. (2009). Zoonoses. In *Encyclopedia of Microbiology, 3rd Ed. Elsevier Inc.*, 820–829.
- Christensen, H. A., Arias, J. R., de Vasquez, A. M., & de Freitas, R. A. (1982). Hosts of sandfly vectors of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the central Amazon of Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 31(2), 239–242. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1982.31.239>
- Christensen, H., Johnson, C., & de Vázquez, A. M. (1984). Leishmaniasis Cutanea en Panama. In *Revista Médica de Panamá* (Vol. 9, pp. 182–187).
- Cutler, S. J., Fooks, A. R., & Van Der Poel, W. H. M. (2010). Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerging Infectious Diseases*, 16(1), 1–7. <https://doi.org/10.3201/eid1601.081467>
- De Lima Ferreira, L., Pereira, M. H., & Guarneri, A. A. (2015). Revisiting trypanosoma rangeli transmission involving susceptible and non-susceptible hosts. *PLoS ONE*, 10(10), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140575>
- Diagne, C. T., Bengue, M., Choumet, V., Hamel, R., Pompon, J., & Missé, D. (2020). Mayaro virus pathogenesis and transmission mechanisms. *Pathogens*, 9(9), 1–23. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090738>
- Diaz, L. A., Spinsanti, L. I., Almiron, W. R., & Contigiani, M. S. (2003). Una virus: First report of human infection in Argentina. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 45(2), 109–110. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652003000200012>
- Dutari, L. C., & Loaiza, J. R. (2014). American Cutaneous Leishmaniasis in Panama: A historical review of entomological studies on anthropophilic *Lutzomyia* sand fly species. *Parasites and Vectors*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-218>

- F., A., G., B., S., B., V., G., S., M., C., M., G., M. O., B., P., S., R., J., R., A., S., N., S.-W., M., W., S., W., E.E., Z., B., A., & J., A. (2018). Recent Development of Visceral Leishmaniasis Treatments: Successes, Pitfalls, and Perspectives. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), 1–30. <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L625481358%0Ahttp://dx.doi.org/10.1128/CMR.00048-18>
- Ferreira, L. L., Lorenzo, M. G., Elliot, S. L., & Guarneri, A. A. (2010). A standardizable protocol for infection of *Rhodnius prolixus* with *Trypanosoma rangeli*, which mimics natural infections and reveals physiological effects of infection upon the insect. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(1), 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.05.013>
- Gaudin, T. J. (2004). Phylogenetic relationships among sloths (Mammalia, Xenarthra, Tardigrada): The craniodental evidence. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 140(2), 255–305. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2003.00100.x>
- Gentile, B., Le Pont, F., Pajot, F. X., & Besnard, R. (1981). Dermal leishmaniasis in French Guiana: the sloth (*Choloepus didactylus*) as a reservoir host. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(4), 612–613. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(81\)90223-6](https://doi.org/10.1016/0035-9203(81)90223-6)
- Gilmore, D. P., Da Costa, C. P., & Duarte, D. P. F. (2001). Sloth biology: An update on their physiological ecology, behavior and role as vectors of arthropods and arboviruses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34(1), 9–25. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2001000100002>
- Go, Y. Y., Balasuriya, U. B. R., & Lee, C. (2014). Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 3(1), 58. <https://doi.org/10.7774/cevr.2014.3.1.58>
- Goncalves, R., Christensen, S. M., & Mosser, D. M. (2020). Humoral immunity in leishmaniasis – Prevention or promotion of parasite growth? *Cytokine: X*, 2(4), 100046. <https://doi.org/10.1016/j.cyttox.2020.100046>
- González, K., Calzada, J. E., Saldaña, A., Rigg, C. A., Alvarado, G., Rodríguez-Herrera, B., Kitron, U. D., Adler, G. H., Gottdenker, N. L., Chaves, L. F., & Baldi, M. (2015). Survey of wild mammal hosts of cutaneous leishmaniasis parasites in Panamá and Costa Rica. *Tropical Medicine and Health*, 43(1), 75–78. <https://doi.org/10.2149/tmh.2014-30>
- Gorla, D. E. (2021). Cambio Climático Y Enfermedades Transmitidas Por Vectores En Argentina. *Medicina (Argentina)*, 81(3), 432–437.
- Gottdenker, N. L., Chaves, L. F., Calzada, J. E., Saldaña, A., & Carroll, C. R. (2012a). Host Life History Strategy, Species Diversity, and Habitat Influence *Trypanosoma cruzi* Vector Infection in Changing Landscapes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(11), 5–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001884>
- Gottdenker, N. L., Chaves, L. F., Calzada, J. E., Saldaña, A., & Carroll, C. R. (2012b). Host Life History Strategy, Species Diversity, and Habitat Influence *Trypanosoma cruzi* Vector Infection in Changing Landscapes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(11), 5–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001884>
- Gundacker, N. D., Carrera, J. P., Castillo, M., Díaz, Y., Valenzuela, J., Tamhane, A., Moreno, B., Pascale, J. M., Tesh, R. B., & López-Vergès, S. (2017). Clinical manifestations of punta toro virus species complex infections, Panama, 2009. *Emerging Infectious Diseases*, 23(5), 872–874. <https://doi.org/10.3201/eid2305.161925>
- Halstead, S. B. (1988). Pathogenesis of dengue: Challenges to molecular biology.

- Science*, 239(4839), 476–481. <https://doi.org/10.1126/science.3277268>
- Hasan, S., Jamdar, S. F., Alalowi, M., & Al Ageel Al Beaiji, S. M. (2016). Dengue virus: A global human threat: Review of literature. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*, 6(1), 1–6. <https://doi.org/10.4103/2231-0762.175416>
- HERRERA, L. (2010). Una revisión sobre reservorios de Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. *Scielo*, 50.
- Horna, A. E., Saldaña, A., Orn, A., & Sousa, O. E. (1997). Experimental Trypanosoma rangeli infection in a murine model. *Revista de Biología Tropical*, 44–45(3), 125–129.
- Horne, K. M. E., & Vanlandingham, D. L. (2014). Bunyavirus-vector interactions. *Viruses*, 6(11), 4373–4397. <https://doi.org/10.3390/v6114373>
- Houghton-Triviño, N., Montaña, D., & Castellanos, J. E. (2008). Dengue-yellow fever sera cross-reactivity; challenges for diagnosis. *Revista de Salud Publica*, 10(2), 299–307. <https://doi.org/10.1590/S0124-00642008000200010>
- ICES. (2016). *Estudio de Crecimiento Urbano: Estudio base para Ciudad de Panamá*. [http://ud-iadb.azurewebsites.net/iadb/index\\_studies.html?lang=ES#?city=PAC&page=1](http://ud-iadb.azurewebsites.net/iadb/index_studies.html?lang=ES#?city=PAC&page=1)
- Institute For International Cooperation in Animal. (2010). Leishmaniasis ( Cutánea y Visceral ). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, II(10), 1–13.
- J S Porterfield, J Casals, M P Chumakov, S Y Gaidamovich, C Hannoun, I H Holmes, M C Horzinek, M Mussgay, N Oker-Blom, P K Russell, D. W. T. (1985). *Togaviridae*.
- Jahan, N. A., Lindsey, L. L., & Larsen, P. A. (2021). The Role of Peridomestic Rodents as Reservoirs for Zoonotic Foodborne Pathogens. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 21(3), 133–148. <https://doi.org/10.1089/vbz.2020.2640>
- Johana, A., Meneses, M., Teresa, M., Castaño, P., Antonio, C., & Martí, Z. (2004). Trypanosoma rangeli: lo que se conoce y el impacto de su presencia. *Med UNAB*, 166–171.
- Kate E. Jones, Nikkita G. Patel, Marc A. Levy, Adam Storeygard, Deborah Balk, J. L. G. & P. D. (2008). *Global trends in emerging infectious diseases*.
- Kaup, M., Trull, S., & Hom, E. F. Y. (2021). On the move: sloths and their epibionts as model mobile ecosystems. *Biological Reviews*, 96(6), 2638–2660. <https://doi.org/10.1111/brv.12773>
- Kaviar, S., Shockey, J., & Sundberg, P. (2012). Observations on the Endemic Pygmy Three-Toed Sloth, Bradypus pygmaeus of Isla Escudo de Veraguas, Panamá. *PLoS ONE*, 7(11), 7–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049854>
- Khongwichit, S., Chansaenroj, J., Chirathaworn, C., & Poovorawan, Y. (2021). Chikungunya virus infection: molecular biology, clinical characteristics, and epidemiology in Asian countries. *Journal of Biomedical Science*, 28(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00778-8>
- Kraemer, M. U. G., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q. N., Shearer, F. M., Barker, C. M., Moore, C. G., Carvalho, R. G., Coelho, G. E., Van Bortel, W., Hendrickx, G., Schaffner, F., Elyazar, I. R. F., Teng, H.-J., Brady, O. J., Messina, J. P., Pigott, D. M., Scott, T. W., Smith, D. L., ... Hay, S. I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors Aedes aegypti and Ae. albopictus. *ELife*, 4, e08347. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>
- Kreutzer, R. D., Corredor, A., Grimaldi, G., Grogl, M., Rowton, E. D., Young, D. G., Morales, A., McMahon-Pratt, D., Guzman, H., & Tesh, R. B. (1991).

- Characterization of *Leishmania colombiensis* sp. n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 44(6), 662–675. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.662>
- Kruse, H., Kirkemo, A. M., & Handeland, K. (2004). Wildlife as source of zoonotic infections. *Emerging Infectious Diseases*, 10(12), 2067–2072. <https://doi.org/10.3201/eid1012.040707>
- Kuno, G., Mackenzie, J. S., Junglen, S., Hubálek, Z., Plyusnin, A., & Gubler, D. J. (2017). Vertebrate Reservoirs of Arboviruses: Myth, Synonym of Amplifier, or Reality? *Viruses*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/v9070185>
- L.c, D., & J.r, L. (2014). American Cutaneous Leishmaniasis in Panama: A historical review of entomological studies on anthrophilic *Lutzomyia* sand fly species. *Parasites and Vectors*, 1–10.
- Mahy, B. W., & Brown, C. C. (2000). Emerging zoonoses: crossing the species barrier. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 19(1), 33–40. <https://doi.org/10.20506/rst.19.1.1212>
- Mari, R. B., & Peydró, R. J. (2010). Situación actual en España y eco-epidemiología de las arbovirosis transmitidas por mosquitos culícidos (Diptera: Culicidae). *Revista Espanola de Salud Publica*, 84(3), 255–269.
- María A. Montilla-Rodríguez, Julio C. Blanco-Rodríguez, R. N. N.-C. y L. J. M.-M. (2016). *Anatomical Description of Bradypus variegatus in the Colombian Amazonia*. 57(1), 3–14.
- Mattar V, S., & González Tous, M. (2017). The puzzle of new etiological agents in the Americas: Punta del Toro virus another piece? *Revista MVZ Córdoba*, 22(1), 5607–5609. <https://doi.org/10.21897/rmvz.920>
- Matusali, G., Colavita, F., Bordi, L., Lalle, E., Ippolito, G., Capobianchi, M. R., & Castillett, C. (2019). Tropism of the chikungunya virus. *Viruses*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/v11020175>
- Medlin, S., Deardorff, E. R., Hanley, C. S., Vergneau-grosset, C., Dallwig, R., Travassos, A., Tesh, R. B., & Pia, M. (2016). *SEROSURVEY OF SELECTED ARBOVIRAL PATHOGENS IN FREE-RANGING, TWO-TOED SLOTHS (CHOLOEPUS HOFFMANNI) AND THREE-TOED SLOTHS (BRADYPUS VARIEGATUS) IN COSTA RICA, 2005 – 2007*. 52(4), 1–10. <https://doi.org/10.7589/2015-02-040>
- Medlin, S., Deardorff, E. R., Hanley, C. S., Vergneau-grosset, C., Siudak-campfield, A., Dallwig, R., Travassos, A., Tesh, R. B., Martin, M. P., Weaver, S. C., Vaughan, C., Ramirez, O., Kurt, K., Rica, C., Biológicas, E. D. C., Nacional, U., & Rica, C. (2016). *SEROSURVEY OF SELECTED ARBOVIRAL PATHOGENS IN FREE-RANGING, TWO-TOED SLOTHS (CHOLOEPUS HOFFMANNI) AND THREE-TOED SLOTHS (BRADYPUS VARIEGATUS) IN COSTA RICA, 2005–07*. 52(4), 883–892. <https://doi.org/10.7589/2015-02-040.SEROSURVEY>
- Megías Montijano, A., Gómez Campdera, J. A., Bertó, J., Navarro Gómez, M. L., & Hernanz, J. M. (2001). Leishmaniasis cutánea. *Acta Pediatrica Espanola*, 59(8), 450–453.
- MINSAs. (2018). *Boletín Epidemiológico de Enfermedad de Chagas, 2017*. 1–4.
- Monteiro, F. A., Weirauch, C., Felix, M., Lazoski, C., & Abad-Franch, F. (2018). Evolution, Systematics, and Biogeography of the Triatominae, Vectors of Chagas Disease. *Advances in Parasitology*, 99, 265–344. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2017.12.002>
- Oficial, G. (2016). “*Guía Para El Abordaje Integral De La Leishmaniasis En Panamá, 2015*.” 28150, 1–70.

- OMS. (2020). *Enfermedades transmitidas por vector*.
- OPS. (2020). *Enfermedades transmitidas por vectores*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
- Ortiz, D. I., Piche-Ovares, M., Romero-Vega, L. M., Wagman, J., & Troyo, A. (2021). The Impact of Deforestation, Urbanization, and Changing Land Use Patterns on the Ecology of Mosquito and Tick-Borne Diseases in Central America. *Insects*, *13*(1). <https://doi.org/10.3390/insects13010020>
- Palacios, G., Wiley, M. R., Travassos da Rosa, A. P. A., Guzman, H., Quiroz, E., Savji, N., Carrera, J. P., Bussetti, A. V., Ladner, J. T., Ian Lipkin, W., & Tesh, R. B. (2015). Characterization of the Punta Toro species complex (genus Phlebovirus, family Bunyaviridae). *Journal of General Virology*, *96*(8), 2079–2085. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000170>
- Pando, V., Ortega, A., & Huerta, H. (2020). Mosquitos vectores de arbovirus. *Ciencia*, *71*(1), 24–33.
- Pedro Galindo. (1978). *Los Arbovirus de Panama*.
- Phan, T., Tesh, R. B., Guzman, H., & Delwart, E. (2020). Genomic characterization of Changuinola viruses from Panama: evidence for multiple genome segment reassortment. *Virus Genes*, *56*(4), 527–530. <https://doi.org/10.1007/s11262-020-01758-0>
- Pineda, V. J., González, K. A., Perea, M., Rigg, C., Calzada, J. E., Chaves, L. F., Vásquez, V., Samudio, F., Gottdenker, N., & Saldaña, A. (2022). Surveillance and genotype characterization of zoonotic trypanosomatidae in Didelphis marsupialis in two endemic sites of rural Panama. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *17*(December 2021), 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2021.12.002>
- Pineda, V., Sousa, O. E., Solis, K., & Zapateiro, P. (2005). *Detección de Anticuerpos Anti- Trypanosoma rangeli en Infecciones Humanas*. 87.
- Rahman, M. T., Sobur, M. A., Islam, M. S., Ievy, S., Hossain, M. J., Zowalaty, M. E. E., Rahman, A. M. M. T., & Ashour, H. M. (2020). Zoonotic diseases: Etiology, impact, and control. *Microorganisms*, *8*(9), 1–34. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091405>
- Ramírez, A. L., Van Den Hurk, A. F., Meyer, D. B., & Ritchie, S. A. (2018). Searching for the proverbial needle in a haystack: Advances in mosquito-borne arbovirus surveillance. *Parasites and Vectors*, *11*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2901-x>
- Ribeiro, G. S., Hamer, G. L., Diallo, M., Kitron, U., Ko, A. I., & Weaver, S. C. (2020). Influence of herd immunity in the cyclical nature of arboviruses. *Current Opinion in Virology*, *40*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.02.004>
- Roque, A. L. R., & Jansen, A. M. (2014). Wild and synanthropic reservoirs of Leishmania species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *3*(3), 251–262. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.004>
- Roy, P. (1996). MINIREVIEW Orbivirus Structure and Assembly. *Virology*, *216*, 1–11.
- Ruiz-García, M., Chacón, D., Plese, T., & Shostell, J. M. (2020). Molecular Phylogenetics of Bradypus (Three-Toed Sloth, Pilosa: Bradypodidae, Mammalia) and Phylogeography of Bradypus variegatus (Brown-Throated Three-Toed Sloth) with Mitochondrial Gene Sequences. *Journal of Mammalian Evolution*, *27*(3), 461–482. <https://doi.org/10.1007/s10914-019-09465-w>
- Saldaña, A., Samudio, F., Miranda, A., Herrera, L. M., Saavedra, S. P., Cáceres, L., Bayard, V., & Calzada, J. E. (2005). Predominance of Trypanosoma rangeli infection in children from a Chagas disease endemic area in the west-shore of the

- Panama canal. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(7), 729–731. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000700008>
- Schuster, F. L., & Sullivan, J. J. (2002). Cultivation of clinically significant hemoflagellates. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3), 374–389. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.374-389.2002>
- Scott C. Weaver, Caroline Charlier, N. V. and M. L. (2018). Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. *The Annual Review of Medicine*. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050715-105122>
- Seymour, C., Peralta, P. H., & Montgomery, G. G. (1982). Viruses Isolated from Panamanian Sloths \*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 32(6), 1435–1444. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1983.32.1435>
- Sharma, U., & Singh, S. (2008). Insect vectors of Leishmania: Distribution, physiology and their control. *Journal of Vector Borne Diseases*, 45(4), 255–272.
- Shaw JJ. (1985). The hemoflagellates of sloths, vermilinguas (anteaters) and armadillos. *Montgomery GG (Editor)*, 279-292.
- Smith, D. R., Adams, A. P., Kenney, J. L., Wang, E., & Weaver, S. C. (2008). Venezuelan equine encephalitis virus in the mosquito vector *Aedes taeniorhynchus*: Infection initiated by a small number of susceptible epithelial cells and a population bottleneck. *Virology*, 372(1), 176–186. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.10.011>
- Sousa, Octavio E, A. saldaña. (1996). *Trypanosoma rangeli: epimastigote immunogenicity and cross-reaction with Trypanosoma cruzi*. 82(2), 363–366.
- Sousa, O. E. (1972). Anotaciones sobre la enfermedad de Chagas en Panamá. Frecuencia y distribución de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*. *Revista de Biología Tropical*, 20(2), 167–169.
- Sousa, O. E., Rossan, R. N., & Baerg, D. C. (1974). The prevalence of trypanosomes and microfilariae in Panamanian monkeys. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 23(5), 862–868. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1974.23.862>
- Steverding, D. (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>
- Thoisy, B. De, Lacoste, V., Germain, A., Muñoz-Jordán, J., Colón, C., Mauffrey, J. F., Delaval, M., Catzeflis, F., Kazanji, M., Matheus, S., Dussart, P., Morvan, J., Setién, A. A., Deparis, X., & Lavergne, A. (2009). Dengue infection in neotropical forest mammals. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9(2), 157–169. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0280>
- Thomas, E. A., John, M., & Bhatia, A. (2007). Cutaneous manifestations of dengue viral infection in Punjab (north India). *International Journal of Dermatology*, 46(7), 715–719. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2007.03298.x>
- Travi, B. L., Zea, A., & D'Alessandro, A. (1989). *Trypanosoma (Herpetosoma) leeuwenhoekii* in *Choloepus hoffmanni* and *Didelphis marsupialis* of the Pacific Coast of Colombia. *The Journal of Parasitology*, 75(2), 218–224.
- Valderrama, A., Díaz, Y., & López-Vergès, S. (2017). Interaction of Flavivirus with their mosquito vectors and their impact on the human health in the Americas. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 492(4), 541–547. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.050>
- Vallejo, G. A., Suárez, J., Olaya, J. L., Gutierrez, S. A., & Carranza, J. C. (2015). *Trypanosoma rangeli*: un protozoo infeccioso y no patógeno para el humano que contribuye al entendimiento de la transmisión vectorial y la infección por *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 39(150), 111. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.143>

- Vasquez, A. m. (2004). *Eco-epidemiological aspects of trypanosoma cruzi, trypanosoma rangeli and their vector in panama.*
- 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>
- Weaver, S C, Anishchenko, M., Bowen, R., Brault, A. C., Estrada-Franco, J. G., Fernandez, Z., Greene, I., Ortiz, D., Paessler, S., & Powers, A. M. (2004). Genetic determinants of Venezuelan equine encephalitis emergence. *Archives of Virology. Supplementum*, *18*, 43–64. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0572-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0572-6_5)
- Weaver, Scott C., Ferro, C., Barrera, R., Boshell, J., & Navarro, J. C. (2004). Venezuelan Equine Encephalitis. *Annual Review of Entomology*, *49*, 141–174. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123422>
- World Health Organization (WHO). (2021a). *La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana)*. World Health Organization (WHO). [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- World Health Organization (WHO). (2021b). *La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana)*. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- World Health Organization (WHO). (2022a). *Leishmaniasis*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- World Health Organization (WHO). (2022b). *Leishmaniasis*. World Health Organization (WHO). <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- Yamilka, D., Quiroz, E., Carrera, J., Cisneros, J., Mosca, I. B. De, Armi, B., Chen, R., & Vasilakis, N. (2019). *Molecular Epidemiology of Dengue in Panama* : 1–21.