

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES**



**Tesina de grado**

**“Ciclo replicativo de miembros del complejo de Encefalitis Equina  
Venezolana: la clave para esclarecer aspectos críticos de su patogénesis”**

**Tesinista: Piris, Franco Martín**

**Directora: Dra. Ghietto, Lucía María**

**Co-director: Dr. Gil, Pedro Ignacio**

**INSTITUTO DE VIROLOGÍA “J.M. VANELLA”  
CÓRDOBA**

**2022**

**- Tesina para optar por título de Biólogo -**

**“Ciclo replicativo de miembros del complejo de Encefalitis Equina  
Venezolana: la clave para esclarecer aspectos críticos de su patogénesis”**

**Tribunal examinador:**

Nombre y apellido: ..... Firma: .....

Nombre y apellido: ..... Firma: .....

Nombre y apellido: ..... Firma: .....

Calificación: .....

Fecha: .....

## INDICE

RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN .....	5
Genero Alphavirus.....	5
Características estructurales del virión.....	7
Ciclo de replicación viral.....	8
Curva de crecimiento viral .....	10
OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS .....	12
Objetivos específicos: .....	12
MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
Cultivos celulares .....	12
Virus.....	13
Anticuerpos y colorantes.....	13
Protocolo de Adaptación .....	13
Protocolo de infección.....	13
Curso temporal de la infección del PIXV y del RNV en células Vero .....	14
Extracción de ARN y protocolo de RT-qPCR .....	14
Electroforesis en gel de agarosa .....	15
Titulación por Ensayo de Placa.....	15
Inmunofluorescencia indirecta .....	15
Análisis estadístico.....	16
RESULTADOS.....	16
Diseño y optimización de un ensayo de RT-PCR en tiempo real (qPCR).....	16
Adaptación del RNV y titulación de los inóculos del PIXV y del RNV.....	19
Optimización del protocolo de infección .....	20
Curva de crecimiento viral del PIXV y RNV.....	21
DISCUSIÓN .....	26
BIBLIOGRAFÍA.....	30

## RESUMEN

El complejo de Encefalitis Equina Venezolana (VEE) es uno de los serogrupos en los que se clasifican los Alphavirus del Nuevo Mundo. Son transmitidos por vectores hematófagos y causan brotes periódicos en América de Sur, tanto en caballos como en humanos. El objetivo general de la tesina fue caracterizar el ciclo de replicación del virus Pixuna (PIXV) y del virus Rio Negro (RNV) en células Vero mediante diferentes técnicas: ensayo de placa, RT-qPCR e inmunofluorescencia. En primer lugar, se adaptó el RNV a cultivos de células Vero. Posteriormente, y a partir de los resultados obtenidos, se describió el curso temporal de la infección, donde se observó que el intervalo de tiempo desde la infección hasta el comienzo de la fase estacionaria, tanto para el PIXV como para el RNV es de 24 horas, representando el tiempo requerido para completar la curva de crecimiento viral. Las primeras 4 horas postinfección (hpi) corresponden a la **fase eclipse**, donde el virus ingresa a la célula y se produce el desnudamiento de los viriones. Posterior a esta, desde las 4 hasta las 24 hpi, la infección progresa hacia una etapa de crecimiento rápido llamada **fase exponencial**, donde se observa el máximo rendimiento viral cuantificado, tanto por unidades formadoras de placa a partir de sobrenadantes de cultivo (virus extracelular), como por copias de ARN viral a partir de monocapas y sobrenadantes (virus intra y extracelular). Por la técnica de inmunofluorescencia, las proteínas virales comienzan a visualizarse a partir de las 6 hpi, coincidiendo con la traducción, maduración y ensamblaje. Finalmente, se observa la **fase estacionaria** donde todas las células han sido infectadas y comienzan a morir. Este trabajo es de gran importancia ya que se caracterizó por primera vez la dinámica de crecimiento del RNV en cultivos de células Vero y se complementó el estudio del curso temporal de la infección del PIXV mediante un ensayo de RT-PCR en tiempo real desarrollado y optimizado en este trabajo.

**Palabras claves:** Alfavirus, curso temporal de la infección, virus Pixuna, virus Rio Negro

## INTRODUCCIÓN

Los arbovirus son una división no taxonómica de un grupo de virus que se transmiten a huéspedes vertebrados por artrópodos hematófagos; de ahí su nombre del inglés "Arthropod-Borne Viruses" o "Virus transmitidos por artrópodos". Los arbovirus pueden ser amplificados por una amplia variedad de hospedadores incluyendo aves y algunos mamíferos (roedores, primates, equinos y otros). En dichos hospedadores, pueden provocar diversas manifestaciones clínicas como fiebre, hemorragias, encefalitis, poliartritis, etc. Existen más de 500 especies pertenecientes a los géneros Alphavirus, Flavivirus y Orthobunyavirus, de los cuales 150 causan enfermedad en el humano (CDC, 2020; Young, 2020). El género Alphavirus pertenece a la familia *Togaviridae*. Esta familia, y por ende los miembros que la componen, pertenecen al grupo IV de clasificación de Baltimore, ya que poseen ARN monocatenario de polaridad positiva (Griffin, 2013).

### Genero Alphavirus

Los alfavirus se clasifican en dos grandes grupos, Alfavirus del **Nuevo Mundo** y del **Viejo Mundo**, de acuerdo a la distribución geográfica de sus mosquitos vectores. A su vez, se han establecido siete serogrupos o complejos teniendo en cuenta la reacción serológica de las proteínas de membrana, dentro de los cuales se encuentra el complejo **Encefalitis Equina Venezolana (VEE)** (Weaver et al., 2012).

**Tabla 1.** Subtipos de Alfavirus miembros del complejo de VEE. Adaptado de Forrester y colaboradores (Forrester et al., 2017).

Virus	Subtipo	Primer aislamiento	Distribución geográfica	Hospedador	Vector
<b>Encefalitis equina venezolana</b>	IAB	Venezuela, 1938	Trinidad, Peru, Colombia, Guatemala-Mexico-Texas	Caballos/Humanos	<i>Aedes</i> y <i>Psorophora spp</i>
	IC	Colombia, 1962	Colombia, Venezuela, Peru	Caballos/Humanos	<i>Aedes</i> y <i>Psorophora spp</i>
	ID	Colombia, 1961	América central y Sudamérica	Roedores	<i>Culex (Melanoconion) spp.</i>
	IE	Panamá, 1961	América central	Roedores Caballos/Humanos	<i>Culex (Melanoconion) taeniopus</i> , <i>Psorophora</i> , <i>Aedes spp.</i>
<b>Everglades</b>	II	USA, 1963	Florida	Aves	<i>Culex (Melanoconion spp.)</i>
<b>Mucambo</b>	IIIA	Trinidad, 1954	Sudamérica	Desconocido	<i>Culex portesi</i>
<b>Tonate</b>	IIIB	Guyana francesa, 1973	América central y Sudamérica	Desconocido	Desconocido
<b>71D1252</b>	IIIC		Sudamérica	Desconocido	Desconocido
<b>Pixuna</b>	IV	Brasil, 1964	Sudamérica	Desconocido	Desconocido
<b>Cabassou</b>	V	Guyana francesa, 1968	Guyana francesa	Desconocido	<i>Culex portesi</i>
<b>Rio Negro (AG80663)</b>	VI	Argentina, 1980	Argentina	Desconocido	Desconocido
<b>Mosso das Pedras (78V3531)</b>	IF	Brasil, 1978	Brasil	Desconocido	<i>Culex (Melanoconion) sp.</i>

El criterio para demarcar las especies dentro del complejo incluye el análisis de las secuencias genéticas de las proteínas reguladoras, la información antigénica y la distribución geográfica, lo que llevo a incluir 6 especies virales, originalmente clasificadas como seis subtipos antigénicos (I-VI). El **virus Pixuna** (PIXV, subtipo IV), aislado por primera vez de mosquitos Anopheles en Brasil, en 1961 (Shoper et al., 1964), es un virus no patógeno para el humano que tiene la capacidad de replicar en distintos sistemas celulares, como las líneas celulares Vero (Gil et al., 2017), HeLa (Buckley, 1964), BHK-21 y cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo (Paglini et al., 2006), lo que favorece su utilización para muchos propósitos. Por otro lado, el **virus Rio Negro** (RNV, subtipo VI) se asocia con enfermedades febriles agudas en humanos (Pisano et al., 2010a; Pisano et al., 2010b). En 2012, se reportó la circulación del RNV y el PIXV en las regiones

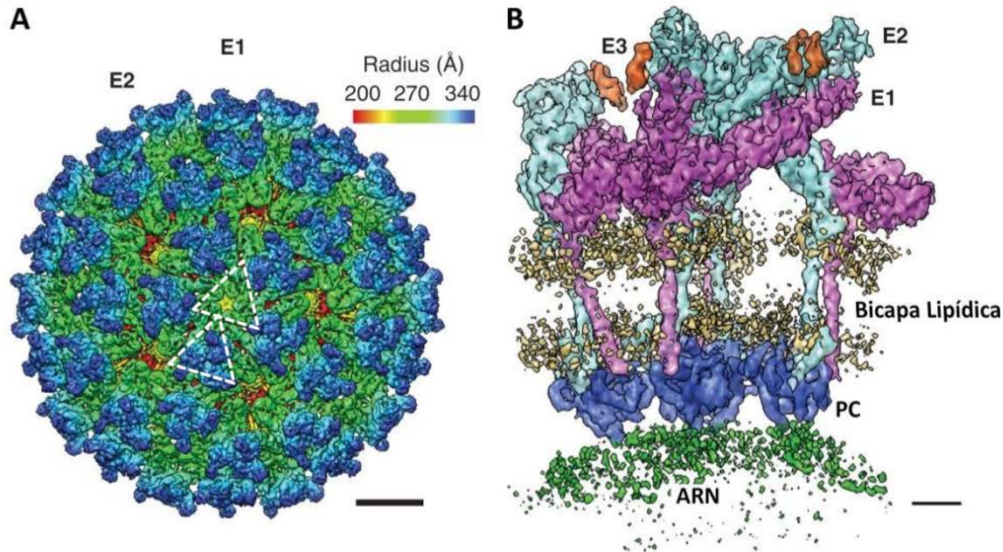
centrales de la Argentina, indicando una expansión de su distribución original y demostrando la circulación de más de un tipo enzoótico en nuestro país (Contigiani et al., 1993; Pisano et al., 2010a; Pisano et al., 2012; Pisano et al., 2014).

Por otro lado, el **virus de la Encefalitis Equina Venezolana** (VEEV) representa un serio problema a nivel de salud pública en América del Sur y Central, especialmente los subtipos IAB y IC que están asociados con las mayores epizootias en equinos y gran cantidad de casos en humanos. En los seres humanos, los primeros síntomas de la infección por VEEV son similares a los de la gripe, como fiebre, escalofríos, malestar general, dolor de cabeza intenso, mialgia, taquicardia y, en algunos casos, náuseas, vómitos y diarrea, siendo los niños los más propensos a sufrir daños neurológicos permanentes (Camilo Guzmán-Terán, 2020; Go et al., 2014).

### **Características estructurales del virión**

La partícula viral de los alfavirus posee un diámetro de aproximadamente 60 a 70 nm, con un genoma ARN simple de polaridad positiva (Griffin, 2013). Envolviendo al ARN se encuentra la nucleocápside de simetría icosaédrica, compuesta por la proteína C (PC, Figura 1 A). Estos son virus envueltos, por lo tanto, recubriendo a la cápside se encuentra una membrana bilipídica obtenida al salir de la célula hospedadora (Zhang et al., 2011). En la envoltura de membrana se insertan las glicoproteínas E1, E2 y E3 que son importantes en el reconocimiento y entrada del virus a la célula (Figura 1 B). Las mismas se agrupan formando picos, alrededor de la superficie del virión, conformados por trímeros de cada proteína, donde la E1 envuelve a la E2 y, por encima de esta, se encuentra la proteína E3 (Wei Zhang, 2002).

En los alfavirus, el ARN de simple cadena cuenta con una longitud aproximada de 11 a 12 kb nucleotídicas. Este porta la información para codificar las proteínas encargadas de la replicación del virus como así también, de aquellas proteínas que forman la estructura del virus (PC y E1, E2 y E3) (Zhang et al., 2011).



**Figura 1.** Reconstrucción en tres dimensiones de la estructura de un Alfavirus. A: Criomicroscopía electrónica de un virión de la cepa TC-83 VEEV, que muestra el triángulo E1 basal (verde) y saliente central E2 (azul) para cada pico. B: Representación de una de las espículas de la glicoproteína de la envoltura que contiene cuatro copias de E1 (magenta), E2 (cian), E3 (naranja), PC (azul), la membrana viral (amarillo) y el ARN genómico (verde) y donde se muestran los dominios transmembrana y la interacción de las colas de las proteínas E1 y E2 con las proteínas de la cápside. Barra de escala: A) 10 nm; B) 2 nm. La figura es una adaptación de (Zhang et al., 2011).

### Ciclo de replicación viral

Una infección viral eficiente depende de múltiples eventos e involucra una serie de etapas esenciales (Acheson, 2007; Kononchik et al., 2011), entre ellas:

1) *Reconocimiento y adsorción.* En esta etapa ocurre el reconocimiento y la unión entre las proteínas virales y los receptores ubicados en la superficie de la célula blanco. Esta adhesión se da vía interacciones iónicas las cuales son independientes a la temperatura. En esta etapa se pone en evidencia el tropismo, que está determinado por la expresión o ausencia de receptores específicos en la superficie celular de un tejido u órgano susceptible.

2) *Penetración y desnudamiento de la partícula viral a la célula.* La interacción entre el receptor celular y el virus activa cascadas de señalización intracelulares que promueven la internalización viral por diferentes mecanismos, como la fusión directa de la envoltura viral con la membrana celular, la endocitosis mediada por receptores (EMR), entre otros. Dentro de estas vías podemos nombrar la EMR dependiente de clatrina, EMR dependiente de



caveolina, macropinocitosis y vías menos caracterizadas llamadas vías independientes de clatrina y de caveolina.

3) *Síntesis del genoma y proteínas virales.* La estrategia de replicación de un virus depende de la naturaleza de su material genético. En general, para los virus con genoma ADN monocatenario, en el núcleo de la célula se sintetiza una cadena de ADN complementario. Para los virus ADN de doble cadena la replicación puede ser nuclear o citoplasmática, al igual que la síntesis del ARNm. Los virus con genoma ARN, a excepción de los retrovirus, realizan su ciclo de multiplicación en el citoplasma. El genoma ARN viral puede actuar como mensajero por sí mismo cuando este es de simple cadena y de polaridad positiva (ARN+). Cuando el ARN es de polaridad negativa (ARN-) debe de ser copiado en un ARNm de sentido positivo complementario antes de que las proteínas puedan ser sintetizadas. Las proteínas no estructurales son las primeras que se traducen y por ello se conocen como proteínas tempranas, estas son las responsables de dirigir la traducción de las proteínas tardías (estructurales).

4) *Ensamblaje de los componentes de la progenie viral.* Es el proceso por el cual los distintos componentes, genoma y proteínas virales se unen para formar las nucleocápsides.

5) *Liberación de los viriones maduros de la célula.* En general, los virus desnudos se liberan por ruptura de la membrana plasmática de la célula infectada (lisis celular). Los virus envueltos salen por un proceso denominado gemación o brotación, en algún punto de la membrana plasmática y a partir de la cual adquieren su envoltura.

Uno de los principales procesos en la entrada de un virus a la célula es el reconocimiento y posterior unión del virión a su o sus receptor/es ubicados en la superficie celular. En los alfavirus, dada la amplia variedad de hospedadores que infecta, aves, mamíferos, mosquitos y peces, se han planteado una gran cantidad de posibles receptores, como el receptor mayor de laminina, lectinas, el heparán sulfato, entre otros (Gardner et al., 2011; Wang et al., 1992). Para que se lleve a cabo la unión con el receptor y luego la endocitosis son necesarias las glicoproteínas E1 y E2 del virus. La E2 es importante en la interacción con el receptor, mientras que la E1 interviene en la fusión de membranas entre el endosoma y la membrana viral (Brown and Hernandez, 2012).

Una vez que el ARN es liberado dentro del citoplasma comienza el proceso de traducción por los ribosomas de la célula huésped. El mismo codifica, primeramente, las proteínas no estructurales o reguladoras, las nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4, formando el complejo inicial de replicación (Leung et al., 2011). Una vez que alcanzan una concentración alta en el citoplasma, se empiezan a traducir las proteínas estructurales. Al igual que como sucede en las proteínas reguladoras, las proteínas estructurales se traducen primeramente en una poliproteína, con las siguientes subunidades: PC, E3, precursor de E2 (pE2), 6k, y E1. Una porción de la E3 sirve como señal para que la poliproteína se dirija hacia el retículo endoplasmático. Allí se produce el clivaje de las proteínas que son redirigidas hacia el Golgi. Una vez que el complejo heterodímero alcanza el trans-Golgi, las proteínas E1 y la E2 quedan unidas para asociarse a la cápside y conducir el proceso de gemación. En el proceso de liberación de la célula, los viriones adquieren la bicapa lipídica derivada de la membrana plasmática de la célula hospedadora (Maija K.Pietilä, 2017).

Estudios previos de nuestro laboratorio, donde se estudiaron las etapas tempranas del ciclo de replicación demostraron, por primera vez, que PIXV y RNV ingresan a la célula hospedadora principalmente a través de endocitosis dependiente de clatrina. Luego, ambos virus requieren el transporte a los endosomas tempranos y tardíos, donde el entorno ácido de estos compartimentos da como resultado la liberación de ARN del PIXV o del RNV en el citoplasma (Ghietto et al., 2022)

### **Curva de crecimiento viral**

Los virus poseen una dinámica de crecimiento *in vitro* denominada curva de crecimiento viral, que dependerá de una variedad de factores, entre ellos: (a) la necesidad de una carga viral inicial, (b) las limitaciones del virus para crecer en una determinada línea de cultivo celular, (c) los requerimientos del medio de cultivo y (d) el tiempo de replicación. Además, el mejor método para la detección del virus dependerá de su biología, por ejemplo, si brota o lisa la célula infectada y si es liberado o permanece fuertemente asociado a las células.

La curva de crecimiento viral, considerando un virus que produce un efecto citopático en un cultivo de línea de células adherentes (ECP), es decir, cambios morfológicos y de

viabilidad celular visibles a microscopía óptica, presenta diferentes etapas (Flint et al., 2000). En las primeras horas luego de la infección, los títulos virales disminuyen abruptamente, para luego de un tiempo dependiendo del virus, comenzar a crecer progresivamente. Esta caída en la curva de crecimiento es llamada **fase de eclipse**, la cual es el resultado de la unión del virus a la superficie celular, seguido de la penetración efectiva de la membrana plasmática. Una vez que el virus logra liberar su material genético, la infectividad se pierde por estas pocas horas y se recupera sólo después de producirse nueva progenie viral. La infección progresa hacia una fase de crecimiento rápido, llamada **fase exponencial** o logarítmica, donde la producción y la liberación de nuevos virus al medio de cultivo es máxima. Finalmente, la curva es seguida por una meseta, llamada **fase estacionaria**, donde se alcanza el máximo rendimiento de producción de viriones, todas las células han sido infectadas y comienzan a morir. *El intervalo de tiempo desde el comienzo de la infección hasta alcanzar la fase estacionaria, representa el tiempo requerido para desarrollar un solo ciclo de crecimiento viral.* El rendimiento (producción de partículas virales), la duración de cada fase del ciclo y el efecto que causa en la morfología celular, dependerá principalmente de cada especie viral en particular y de las células utilizadas (Condit, 2013).

*Conocer el ciclo de replicación de los virus es crucial para entender el tropismo y la patogénesis viral.* Estos conocimientos podrían ser aplicados al diseño y construcción de vectores virales para ser utilizados en investigación y terapias génicas. Por lo que este trabajo tuvo un enfoque descriptivo y fue concebido de forma tal que nos permitiera, en base a los resultados obtenidos, plantear nuevas hipótesis sobre la biología de la interacción célula-virus. Si bien hemos caracterizado previamente la curva de crecimiento del PIXV (Gil et al., 2017), consideramos sumamente necesario la implementación de diferentes metodologías de detección y cuantificación viral, complementarias al clásico pero muy valioso ensayo de placa. Por otra parte, el ciclo de replicación del RNV y sus fases aún no han sido caracterizados, por lo que consideramos que estos conocimientos nos brindan información básica y fundamental sobre los otros miembros del complejo de VEE, los cuales constituyen virus emergentes de importancia médica y veterinaria. Teniendo en cuenta resultados previos de nuestro laboratorio, donde se analizaron los títulos virales extracelulares a diferentes tiempos luego de la infección con el PIXV y utilizando como

técnica el ensayo de placa, se observó que el ciclo de replicación presenta una duración de 24 horas, por lo que esperamos resultados similares en cuanto a la duración completa del ciclo del RNV, como así también a sus fases. Por otra parte, esperamos también que la descripción del curso temporal de la infección con el PIXV y con el RNV realizado con diferentes técnicas, tales como titulación por ensayo de placa, RT-qPCR e inmunofluorescencia, arrojen resultados complementarios entre ambos miembros del VEE.

## **OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS**

En este trabajo de tesina nos propusimos caracterizar el ciclo replicativo del PIXV y del RNV en cultivo de células Vero, describiendo la curva de crecimiento mediante diferentes técnicas de cuantificación viral.

### **Objetivos específicos:**

1. Adaptar un inóculo del RNV a cultivos de células Vero.
2. Titular el inóculo del RNV a partir de muestras de sobrenadante de los cultivos de células Vero y del PIXV a partir sobrenadantes de cultivos almacenados ya adaptados.
3. Diseñar y optimizar un ensayo de PCR en tiempo real (qPCR) para la cuantificación del genoma del RNV y del PIXV en las muestras de sobrenadantes y lisados celulares.
4. Describir la curva de crecimiento viral del RNV y PIXV mediante qPCR, ensayo de placa e inmunofluorescencia.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Cultivos celulares.** Células Vero clon 76 (ATCC® CRL-1587™), línea celular generada a partir de células epiteliales renales de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), pasajes 40 a 60, cultivadas en medio de cultivo Dulbecco (DMEM) suplementado con antibióticos y 10% de suero fetal bovino (SFB).

**Virus.** En este trabajo se utilizó el PIXV, cepa BE Ar 35645, aislado de mosquito *Anopheles nimbus* por Shopper y col. en Belem, Brasil (Shoper et al., 1964) y RNV, cepa AG80-663 aislado de *Culex delpontei* en 1980 (Mitchell et al., 1985).

**Anticuerpos y colorantes.** Para visualizar las proteínas virales, las células fueron incubadas con un anticuerpo primario IgG policlonal anti-PIXV-RNV generado en ratones en nuestro laboratorio diluido 1/2000 en albumina sérica bovina (BSA, 1% en PBS). Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón Alexa Fluor 488 (Invitrogen, concentración: 2 mg/ml. Cat: A11001) diluido 1/1200 en solución 1% BSA/PBS. Los colorantes fluorescentes fueron Phalloidina/Rodamina (1/1600) en BSA al 1% para visualizar actina y Hoesch (1/1000) en PBS 1X para el núcleo.

**Protocolo de Adaptación.** Monocapas celulares al 80% de confluencia cultivadas en botellas de 5 ml fueron lavadas tres veces con PBS previo a ser infectadas con 200 µl de inóculo de RNV e incubadas en estufa gaseada a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. A las 24 horas postinfección (hpi), las células infectadas fueron sometidas tres veces a ciclos de congelación / descongelación (-20°C / temperatura ambiente), a fin de obtener tanto partículas virales infectivas del sobrenadante del cultivo, como las intracelulares. Luego del último descongelamiento se centrifugaron a 500 xg (para descartar los residuos celulares) y los sobrenadantes constituyeron el inóculo para el siguiente pasaje celular. Se realizaron un total de 10 pasajes ciegos para la adaptación. El sobrenadante y el lisado de la monocapa del último pasaje, sometidos a los ciclos de congelación y descongelación, fue centrifugado, alicuotado y conservado a -70 °C para su posterior cuantificación.

**Protocolo de infección.** Monocapas de células Vero fueron infectadas con un índice de multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 de manera sincronizada a 4 °C y en agitación suave por 1 hora, para que las partículas virales se adhieran al receptor celular e ingresen al mismo tiempo. Luego, fueron lavadas 3 veces con PBS frío, suplementadas con DMEM 37°C al 10% de SFB e incubadas a 37 °C durante 30 minutos permitiendo la internalización de los viriones. Posteriormente, fueron lavadas con PBS, para eliminar las partículas virales no internalizadas e incubadas a diferentes tiempos postinfección según el diseño experimental.

**Curso temporal de la infección del PIXV y del RNV en células Vero.** Por resultados previos de nuestro laboratorio, se estableció que el MOI a utilizar fuera de 0,1 (Gil et al., 2017), ya que este garantiza la integridad de la monocapa celular en función de la conservación del inóculo

La curva de crecimiento del PIXV y RNV se realizó en células Vero cultivadas en placas de 24 pocillos al 80% de confluencia que fueron infectadas con un MOI 0,1 siguiendo el protocolo de infección. Los sobrenadantes y las monocapas se recolectaron a diferentes tiempos postinfección: 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 horas. Los sobrenadantes fueron alicuotados en tubos eppendorf con volúmenes de 250  $\mu$ l y 140  $\mu$ l para la titulación por placa y extracción de ácidos nucleicos, respectivamente. Las monocapas fueron lisadas con Buffer de lisis provista por el Kit (ver protocolo de extracción de ARN) y almacenadas a -20 °C. Por otro lado, monocapas de células Vero fueron cultivadas e infectadas con MOI 0,1 y luego de 2, 4, 6, 8, 12 y 24 hpi fueron fijadas, procesadas para inmunofluorescencia y observadas en el microscopio.

**Extracción de ARN y protocolo de RT-qPCR.** Las extracciones del genoma viral se realizaron mediante columnas comerciales utilizando el kit de Qiagen “QiAamp Viral RNA Mini Kit (Cat: 52906), siguiendo el protocolo del fabricante, a partir de 140  $\mu$ l de sobrenadante de cultivo o 560  $\mu$ l de lisado celular. El extracto fue almacenado a -20 °C para ser utilizado como templado en los ensayos de RT-qPCR. Se diseñaron primers para la detección de los virus en estudio. La alineación de las secuencias con los primers se realizó mediante la plataforma Clustal Omega y la obtención del porcentaje de Guanina/Citosina(G/C) y la temperatura de Melting (Tm) por la plataforma Primer-Blast. El kit comercial usado fue el i Taq Universal SYBR Green One-step Kit (BIO-RAD, Cat: 172-5151), que incluye un control positivo constituido por un oligonucleótido sintetizado que corresponde a un fragmento de la proteína Nsp1 del genoma de PIXV (nro de acceso: NC038673). Este control se utilizó como calibrador para los ensayos de cuantificación. Su concentración inicial fue de  $5,6 \times 10^{11}$  ARN/ul, y se realizaron diluciones factor 10 para la curva de calibración. La amplificación y cuantificación del genoma viral se realizó en un equipo termociclador en tiempo real Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System.

**Electroforesis en gel de agarosa.** Con el fin de verificar la especificidad de la PCR en tiempo real desarrollada, los productos de la RT-qPCR obtenidos durante la optimización fueron sometidos a una corrida electroforética en gel de agarosa. Los productos de PCR fueron sembrados con buffer de carga en gel de agarosa al 2 % en buffer TBE (0,45 M Tris, 0,45 M ácido bórico, 0,1 M EDTA, pH 8,8). La separación de los fragmentos se observó luego de 45 minutos de corrida electroforética a 100 V, en un transiluminador de luz UV.

**Titulación por Ensayo de Placa.** Se cultivaron monocapas con 80% de confluencia de células Vero en placas de 24 pocillos, infectadas con 100 ul de diluciones seriadas en base 10 (desde  $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-6}$ ), a partir del sobrenadante de los cultivos. Luego se incubó 1 hora a 37 °C con agitaciones periódicas cada 15 minutos para permitir la adsorción y penetración de los viriones en las células. Posteriormente, con el fin de impedir la libre difusión de las partículas virales entre las células, se agregó en cada pocillo 1 ml de solución de medio de cultivo con agarosa (DMEM 2X con 8% de SFB y agarosa fundida al 1% en agua en una relación 1:1 con una temperatura aproximada de 40 °C). Una vez solidificada la solución de agarosa/DMEM las placas se incubaron en estufa gaseada a 37 °C. Luego de 48 hpi, y de corroborar previamente ECP, se fijaron con formol al 10% por 2 horas a temperatura ambiente. Luego de desechar la cobertura del gel de agarosa y cubrir la monocapa de células con cristal violeta al 1% en agua durante 5 minutos, se procedió al recuento de las placas de lisis formadas. El título viral se expresó por el número de unidad formadora de placa por unidad de volumen del inóculo (UFP/ml) cuyo valor es el determinante del título infeccioso.

**Inmunofluorescencia indirecta.** Monocapas de células Vero fueron fijadas con 4 % de paraformaldehído-120 mM de sacarosa en PBS, durante 20 minutos a 37 °C. Posteriormente fueron permeabilizadas durante 5 minutos con 0.2 % Tritón-X100 en PBS y bloqueadas con BSA (5 % en PBS) durante una hora a temperatura ambiente. Luego fueron incubadas con el anticuerpo primario a 4 °C toda la noche, se lavaron 3 veces por 5 minutos con PBS e incubaron por una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario y Phalloidina-rodamina. Fueron lavadas 3 veces con PBS y se incubaron durante 5 minutos con Hoesch, para, finalmente, montarlas utilizando Fluorsave (Calbiochem). Las preparaciones se analizaron utilizando microscopía de epifluorescencia, empleando un

microscopio Olympus modelo IX8, con cámara digital monocromática modelo FVII. Las imágenes fueron obtenidas mediante el software Cell M y analizadas con el software Fiji-ImageJ y Adobe Photoshop CC 2015.

**Análisis estadístico.** Cada ensayo se realizó por triplicado y los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el software GraphPad PRISM versión 9.0.2, expresando la media y desvío estándar. El nivel de significancia utilizado fue  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Diseño y optimización de un ensayo de RT-PCR en tiempo real (qPCR)

En primer lugar, se seleccionaron secuencias genéticas de genomas completos en el GenBank pertenecientes a diferentes especies del complejo VEE (Tabla 2). Las secuencias se alinearon utilizando la plataforma Clustal Omega, con el fin de encontrar segmentos conservados dentro de la proteína nsP1 para diseñar *primers* que amplificaran las secuencias estudiadas en este trabajo. Para la selección de los *primers*, se tuvieron en cuenta diferentes criterios, entre ellos, similitud entre las bases nucleotídicas de las secuencias, temperatura de *melting* entre 50 y 70 °C con una diferencia no mayor a 5 °C entre ambos *primers* y que el producto sea cercano o menor a 100 pares de bases (pb).

**Tabla 2.** Secuencias analizadas de especies del complejo VEE que se encuentran disponibles en GenBank.

Número de acceso en GenBank	Especie/ cepa
<b>NC038673.1</b>	Virus Pixuna cepa Pixuna BeAr 35645
<b>AF075256.1</b>	Virus Pixuna cepa Pixuna BeAr 35645
<b>U34999.1</b>	Virus encefalitis equina venezolana/ 68U201 (subtipo IE)
<b>L01442.2</b>	Virus encefalitis equina venezolana/Cepa de la isla Monos, Trinidad
<b>KP282671.1</b>	Virus encefalitis equina venezolana cepa VEEV/H. sapiens/ VEN/ INH- 9813/ 1995/ IC
<b>KR260736.1</b>	Virus encefalitis equina venezolana Cepa COAN 5506
<b>NC_038674.1</b>	Virus Rio Negro cepa AG80-663

En la Figura 2 se observa que en el alineamiento de las secuencias de referencia correspondiente al fragmento de nsP1, no se encuentran las mismas bases nucleotídicas, por



lo que la secuencia del *primer reverse* se diseñó con bases degeneradas (Tabla 3), donde se asignó la letra R en la posición 882 el cual corresponde según la IUPAC, tanto para la base guanina como adenina.



**Figura 2.** Secuencias de referencias correspondiente al fragmento de nsP1 de PIXV, RNV y VEEV. En rojo se observa los *primers forward* y *reverse* y en amarillo la secuencia del amplicón (107 pb).

**Tabla 3.** Secuencias de los oligonucleótidos sintetizados. La secuencia del amplicón corresponde a PIXV N° de acceso Gen Bank NC038673.1. Tm: Temperatura de melting. pb: pares de bases

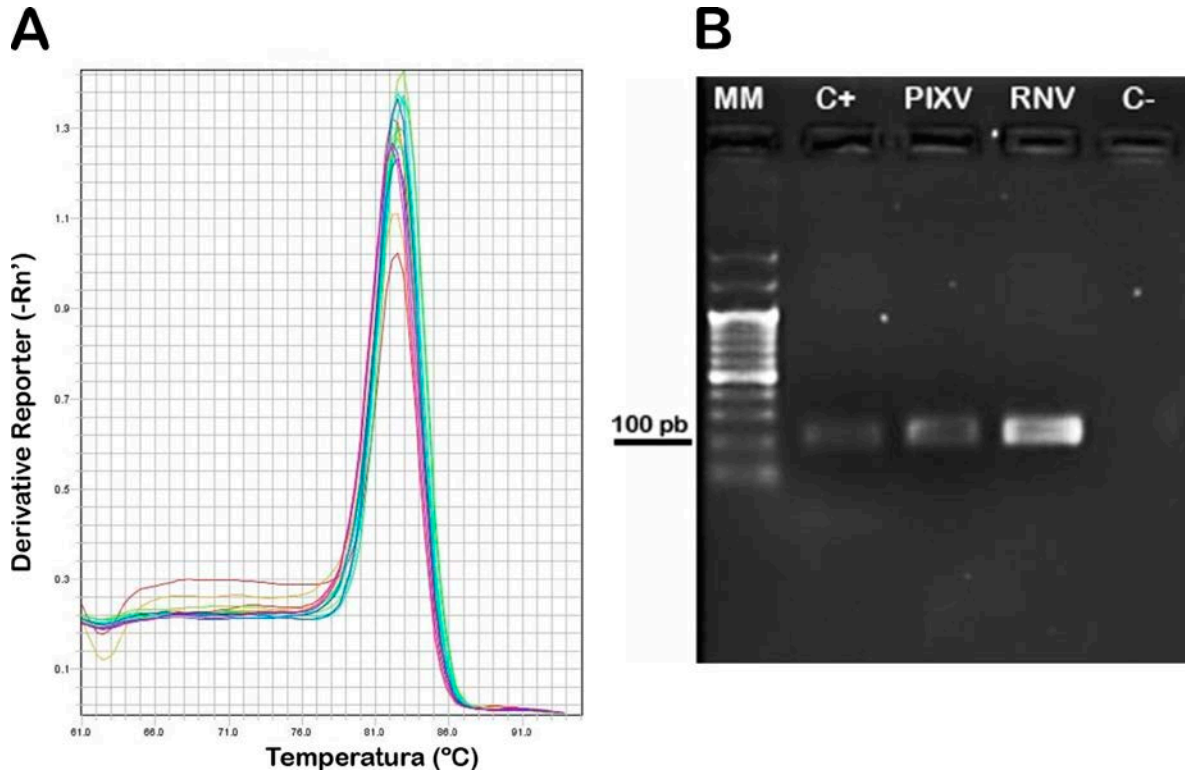
	Secuencia	Tamaño (pb)	Tm (°C)	% GC
<b>Primer Forward</b>	877' ATAGTTAGTTGCGACGGGTACGT '900	23	62,9	48
<b>Primer Reverse</b>	984' CACAAGAATCCCTCGCGRTGCAT '961	23	64,7	52
<b>Amplicón</b>	877' ATAGTTAGTTGCGACGGGTACGTTGTCA AAAGGATAGCTATAAGTCCAGGCCTGTACG GGAAACCTTCGGGCTACGCCGCAACGATGC ATCGCGAGGGATTCTTGTG'984	107		52

Una vez diseñados los *primers*, se procedió a optimizar la RT-qPCR con las condiciones de ciclado descritas en la Tabla 4. Para ello, se utilizó un control negativo (agua miliQ), un inóculo de PIXV y de RNV y diluciones seriadas en base 10 del oligonucleótido sintetizado ( $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3$ ) para determinar la cuantificación absoluta a través de la curva estándar.

**Tabla 4.** Condiciones de ciclado para la RT-qPCR

<b>Etapa</b>	
Transcriptasa reversa	50 °C, 10 min
Desnaturalización	95 °C, 15 seg
<i>Annealing/Extension + Plate read</i>	60 °C, 1 min
Número de ciclos	40 x

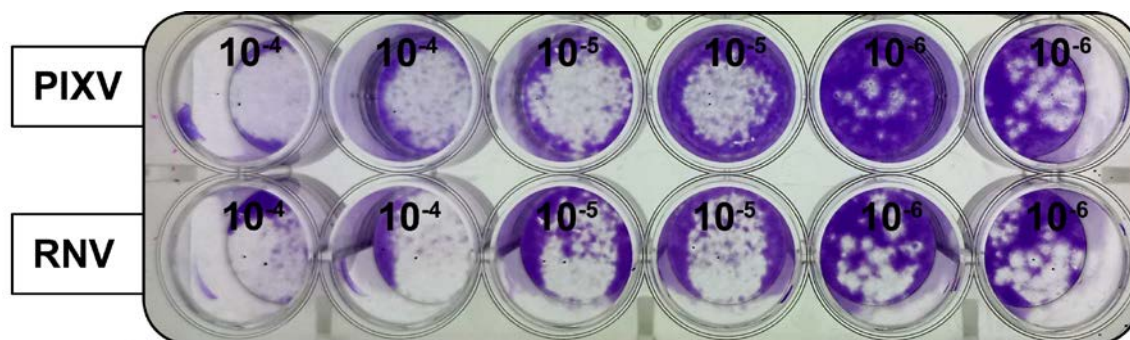
Se corrobora la amplificación del segmento específico (107 pb) mediante la curva de *melting* (Figura 3A) y por corrida electroforética en gel de agarosa (Figura 3B), donde no se observaron fragmentos de amplificación inespecífica.



**Figura 3.** **A)** Curva de melting del ensayo de RT-qPCR, donde se incluyen las diluciones seriadas del oligonucleótido y los inóculos virales **B)** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la RT-qPCR. MM: Marcador de peso molecular, C+: Control positivo oligonucleótido sintético ( $10^6$ ), inóculo PIXV, inóculo RNV, C-: Control negativo.

### Adaptación del RNV y titulación de los inóculos del PIXV y del RNV

En primer lugar, se adaptó el inóculo de RNV mediante pasajes ciegos (ver protocolo de adaptación) en células Vero. En segundo lugar, se cuantificaron por medio de la titulación por ensayo de placas (Figura 4) y RT-qPCR, tanto el inóculo de PIXV (adaptado y almacenado previamente) como el del RNV (Tabla 5). Para la titulación por ensayo de placas se realizaron dilución factor 10 desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$  correspondiente al sobrenadante del último pasaje de adaptación. En tanto, para la qPCR se tomaron 140  $\mu$ l de los inóculos por duplicado, se realizó el protocolo de extracción de ARN y se cuantificaron posteriormente.



**Figura 4.** Titulación por ensayo placa del inóculo del PIXV y RNV adaptado al cultivo de células Vero. Monocapas de células Vero infectadas con diluciones seriadas en base 10 con inóculo stock de PIXV y RNV. Se puede observar las UFP como una mancha blanca (células lisadas) y el resto de las células de la monocapas teñidas con cristal violeta.

**Tabla 5.** Títulos del inóculo de PIXV y RNV por ensayo de placa y RT-qPCR

Virus	UFP/ml	Copias de ARN/ $\mu$ l
PIXV	$2,6 \times 10^8$	$4,1 \times 10^7$
RNV	$2,5 \times 10^8$	$6 \times 10^7$

### Optimización del protocolo de infección

Para describir la curva de crecimiento de ambos virus en cultivos de células Vero, en primer lugar, se optimizó el protocolo de infección que tuvo como objetivo inactivar o eliminar las partículas virales del sobrenadante del cultivo que no fueron internalizadas.

Para ello se cultivaron células Vero, que fueron infectadas con PIXV MOI 0,1 de forma sincronizada. Se retiró el inóculo viral y se lavó tres veces con PBS 4 °C. Posteriormente, se incubó 30 minutos con MEM a 37 °C en estufa gaseada para internalizar las partículas virales. Luego se ensayaron tres metodologías diferentes: Se incubó con *a*) Buffer Citrato (Ácido cítrico 40 mM, 10 mM KCl, 135 mM NaCl, pH=3,0) durante un minuto, *b*) Tripsina-Versene (0,05 % (p/v) tripsina y 0,02 % EDTA) durante un minuto, y por último *c*) 7 lavados con PBS 37 °C. Tanto en *a*) y en *b*) posterior a la metodología, se lavó 3 veces con PBS para restablecer el pH o quitar el excedente de Tripsina, respectivamente. Finalmente, se agregó MEM SFB 10 % y se procedió a recolectar los sobrenadantes a los 30 minutos y 24 horas postinternalización, para ser cuantificados por

ensayos de placa. En la Tabla 6 se pueden observar que los lavados con Tripsina Versene no lograron la eliminación de las partículas virales remanentes del inóculo. Las monocapas tratadas con Buffer Citrato, si bien no manifiestan remanentes de partículas infectivas, presentaron cambios morfológicos (redondeamiento celular y desprendimiento de la monocapa), relacionados con un efecto citotóxico (imágenes no mostradas). Por lo que, se decidió continuar con el protocolo de lavados con PBS x 7, ya que se priorizó mantener la morfología celular en función a las partículas virales infectivas cuantificadas.

**Tabla 6.** Optimización del protocolo de infección con diferentes metodologías. Los sobrenadantes fueron cuantificados por ensayo de placa UFP/ml a los 30 minutos y 24 horas postinternalización.

<b>Tratamientos</b>	<b>30 minutos</b>	<b>24 horas</b>
	<b>(UFP/ml)</b>	
<b>Buffer citrato</b>	0	$2,1 \times 10^7$
<b>Tripsina versene</b>	17	$4,6 \times 10^8$
<b>Lavados con PBS (x7)</b>	5	$8 \times 10^7$

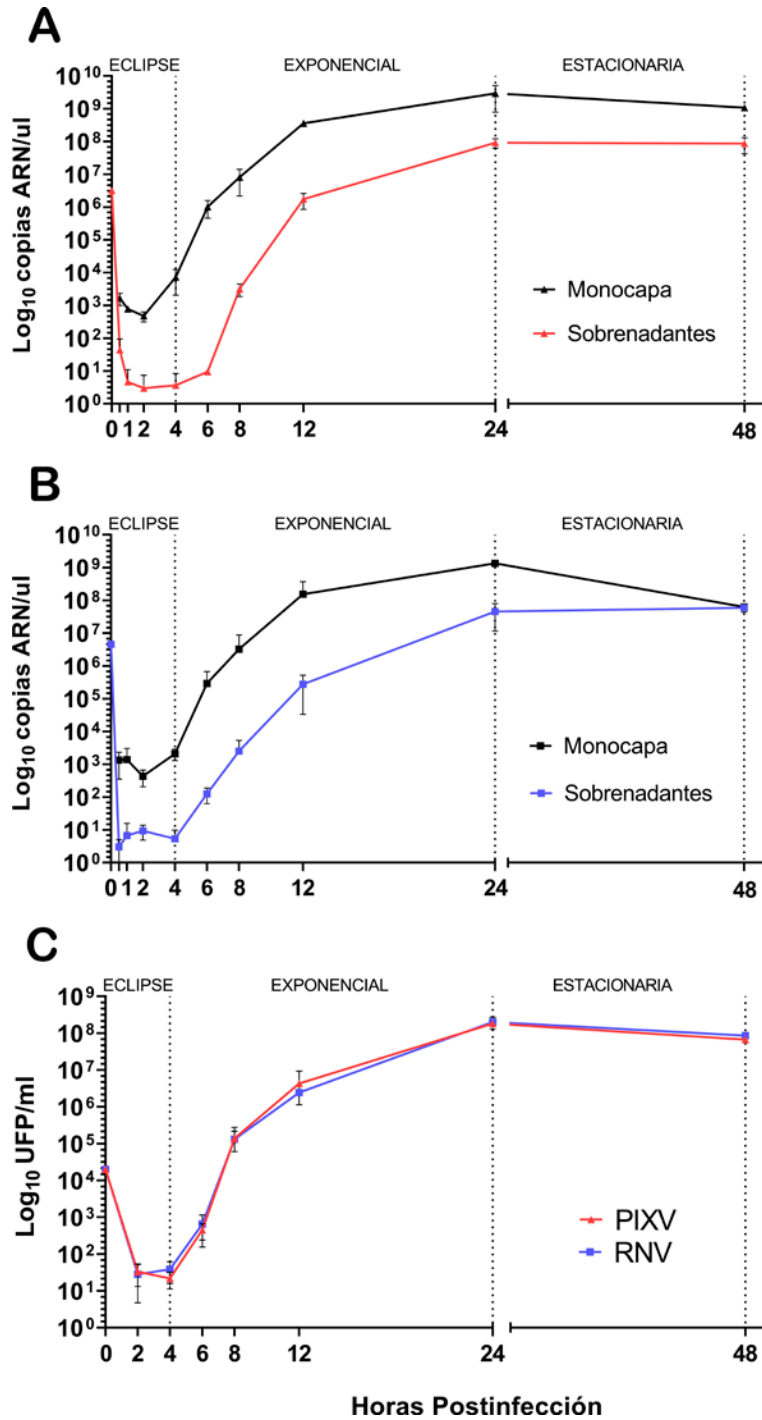
### **Curva de crecimiento viral del PIXV y RNV**

Para caracterizar el curso temporal de la infección, se cultivaron células Vero y se infectaron siguiendo el protocolo que se describió anteriormente. Como se mencionó en materiales y métodos, los sobrenadantes de cultivo y monocapas celulares fueron recolectados a diferentes tiempos postinfección. A partir del análisis del curso temporal de la infección, se observó una similitud entre las curvas de crecimiento, donde el intervalo de tiempo desde la infección hasta el comienzo de la fase estacionaria, tanto para el PIXV como para el RNV, es de 24 horas, representando el tiempo requerido para completar la curva de crecimiento viral.

Durante las primeras 2 hpi la cantidad de copias ARN/ul observadas es el mínimo valor obtenido; obteniéndose en promedio 475 copias ARN/ul en los lisados de las monocapas y 3 copias ARN/ul en los sobrenadantes de los cultivos infectados con PIXV,

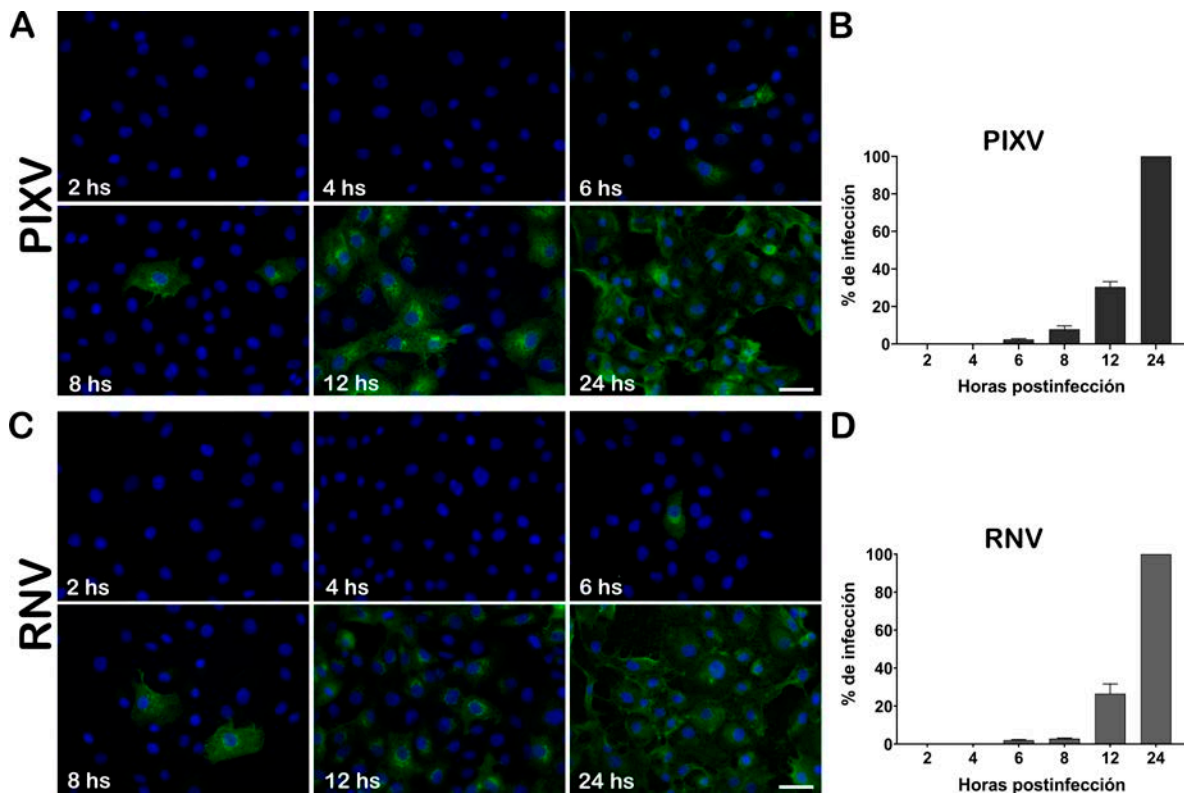
mientras que para RNV, resulta en promedio 439 copias ARN/ul en las monocapas y 9 copias ARN/ul en los sobrenadantes. A partir de las 2 hpi, los títulos de ARN viral intracelular (monocapas) aumentan progresivamente, no así en los sobrenadantes, indicando la síntesis de *novo* del genoma viral (Figura 5 A y B). Los viriones infectivos, cuantificados por ensayo de placa en el medio extracelular en las primeras 4 hpi (Figura 5 C), disminuyeron al menos tres títulos (28 UFP/ml PIXV y 33 UFP/ml RNV) con respecto a sus respectivos inóculos ( $2 \times 10^4$  UFP/ml). Este periodo, donde los títulos virales disminuyen o desaparecen, corresponde a **la fase de eclipse**.

A continuación, se observa un incremento exponencial en el número de copias de ARN/ $\mu$ l y en las UFP/ml para ambos virus desde las 4 hasta a las 24 hpi, tanto de virus intracelular como extracelular, con un máximo de  $1,2 \times 10^8$  copias de ARN/ $\mu$ l y  $2,1 \times 10^8$  UFP/ml para PIXV y  $7,7 \times 10^7$  copias de ARN/ $\mu$ l y  $2,6 \times 10^8$  UFP/ml para RNV, en el medio sobrenadante (virus extracelular). El periodo comprende un total de 20 horas de duración y corresponde a la **fase de crecimiento exponencial o logarítmico**. A partir de las 24 hpi y hasta las 48 hpi no se observó ni un incremento ni una disminución en la cantidad de copias de ARN o UFP en ambos virus. Este es el último periodo de la curva de crecimiento y se denomina **fase estacionaria** (Figura 5 A, B y C). Cabe destacar que se observó hasta tres veces más el número de copias de ARN en las monocapas (ARN viral intracelular) que en los sobrenadantes (ARN viral extracelular) en todas las fases para ambos virus, indicando que a lo largo de todas las etapas se mantiene la tasa de replicación.



**Figura 5.** Curva de crecimiento viral obtenida por RT-qPCR (copias de ARN/μl), en lisado de monocapas y de sobrenadantes de cultivos celulares infectados con **A)** PIXV y **B)** RNV. **C)** Curva de crecimiento viral de PIXV y de RNV obtenida por ensayo de placa (UFP/ml) en el sobrenadante de cultivo (virus infectivo extracelular). Se muestran el inóculo a las 0 horas y las diferentes fases del ciclo: **eclipse** (0-4 hpi), **exponencial** (4-24 hpi) y **estacionaria** (24-48 hpi).

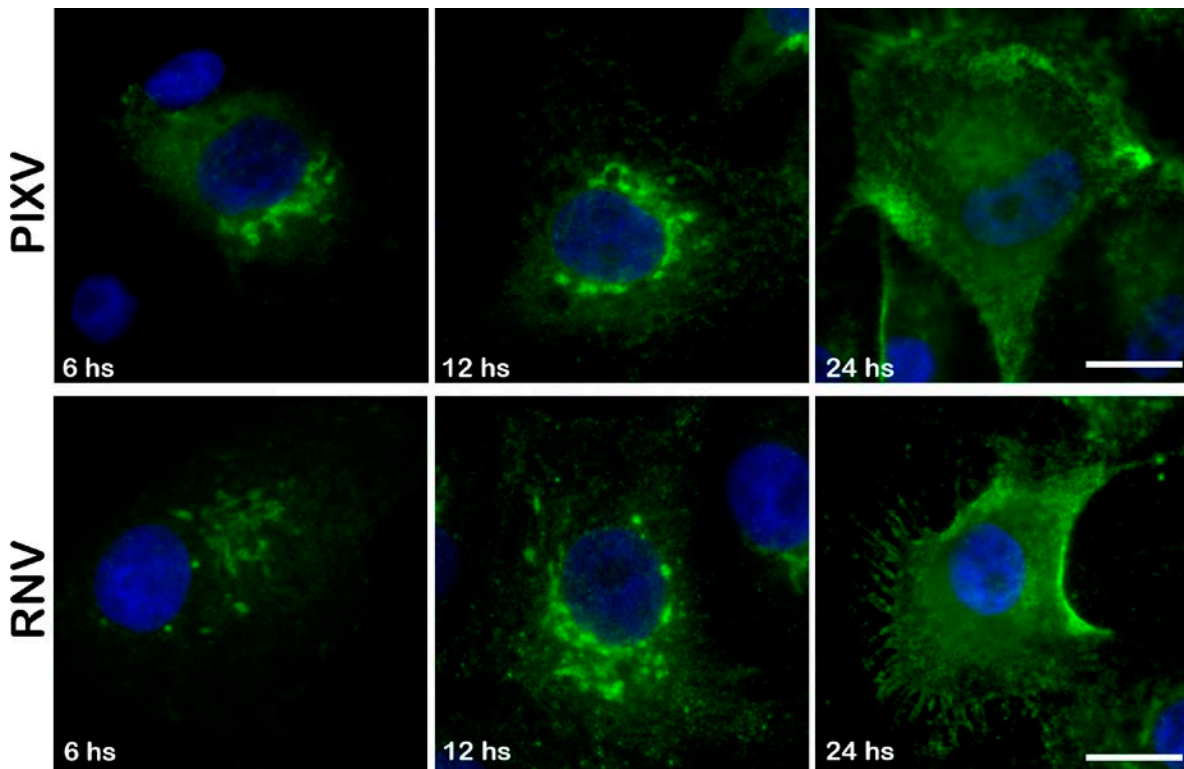
Adicionalmente, se visualizaron las proteínas virales mediante inmunofluorescencia a diferentes tiempos postinfección (Figura 6 A y C) y se calculó el porcentaje de infección en las monocapas celulares con el fin de observar la progresión de la infección viral (Figura 6 B y D). En las primeras hpi (2 y 4 hpi), no se observó fluorescencia correspondiente a las proteínas virales ya que en esta etapa del ciclo viral se están empezando a sintetizar las mismas y la técnica de IFI no es lo suficientemente sensible para mostrarlas en tiempos tempranos. Entre las **6 y 8 hpi** comienzan a visualizarse las primeras células infectadas, con un porcentaje de infección menor al 10 % para ambos virus. A las **12 hpi** el porcentaje escala hasta un 30 % y a las **24 hpi** el 100% de las células están infectadas.



**Figura 6. A y C.** Curso temporal de la infección para PIXV y RNV. Imágenes de microscopía de células Vero infectadas y fijadas a 2, 4, 6, 8, 12 y 24 hpi. En las imágenes se observa la presencia de proteínas virales en verde (Anti-PIXV-RNV) y los núcleos en azul (Hoesch). Barra 20  $\mu$ m. **B y D.** Porcentaje de células infectadas a diferentes tiempos postinfección correspondiente a las imágenes de microscopía de epifluorescencia.

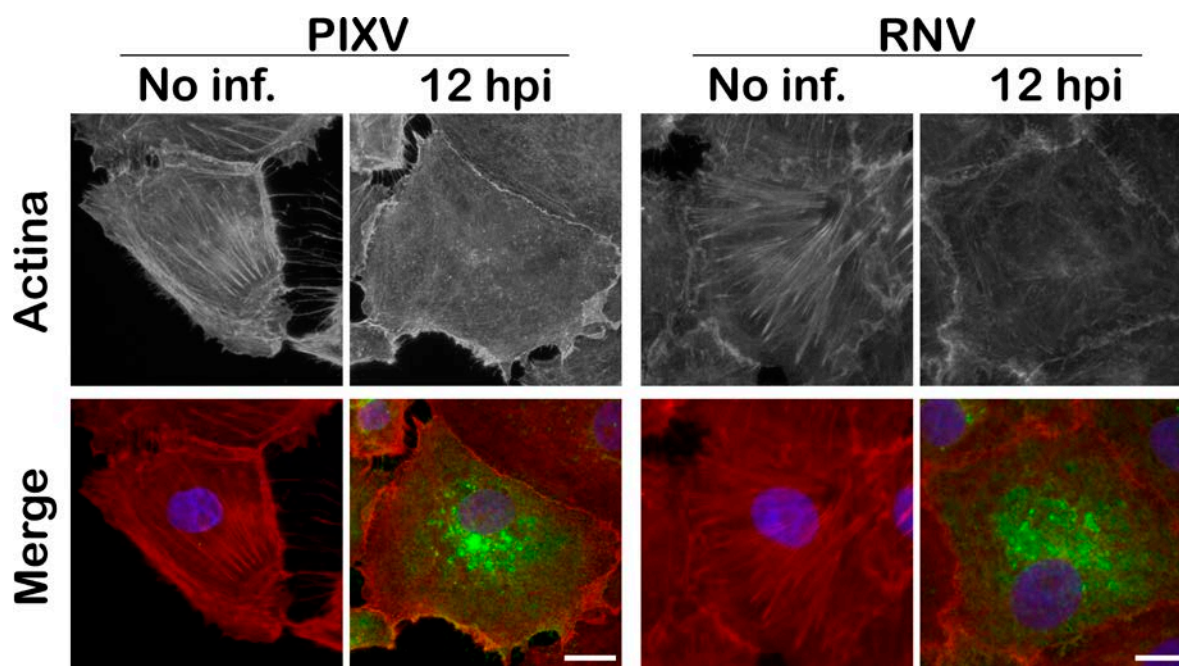


Con el fin de observar con detenimiento la progresión citoplasmática de las proteínas virales, monocapas de células Vero fueron infectadas con PIXV o con RNV, fijadas a diferentes tiempos postinfección y procesadas para inmunofluorescencia. Como puede observarse en la Figura 7, a partir de las 6 hpi comienzan a visualizarse las proteínas virales en la región perinuclear, sitio en el cual éstas son sintetizadas y procesadas. Luego, a las 12 hpi, aumenta de forma considerable la inmunomarcación en la región perinuclear y las proteínas virales comienzan a distribuirse en gran parte del citoplasma, para finalmente, a las 24 hpi invadirlo por completo. Además, en esta última etapa de la progresión intracelular, se observa un marcado ECP.



**Figura 7.** Progresión de la infección intracelular de PIXV y RNV. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de células Vero infectadas y fijadas a las 6, 12 y 24 hpi. Se observa la presencia de proteínas virales en verde (Anti-PIXV-RNV) y los núcleos en azul (Hoesch). Barra 20  $\mu$ m.

De la misma manera, monocapas de células Vero fueron infectadas con ambos virus, fijadas a las 12 hpi y procesadas para inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo anti-PIXV-RNV y colorante Phalloidina/rodamina para visualizar actina. En la Figura 8 se observa que en las células infectadas las fibras de estrés desaparecen y los filamentos de actina se reorganizan formando un cinturón en la región subcortical en relación a las células no infectadas.



**Figura 8.** Cambios en el citoesqueleto de actina durante la infección del PIXV y RNV. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de células Vero no infectadas e infectadas y fijadas a las 12 hpi. **Merge:** PIXV o RNV en verde (Anti-PIXV-RNV), actina en rojo (Phalloidina/rodamina) y los núcleos en azul (Hoesch). Barra 20  $\mu$ m.

## DISCUSIÓN

En esta tesina se caracterizó la curva de crecimiento viral de dos alfavirus del Nuevo Mundo, el PIXV y, por primera vez, la del RNV, en células Vero. Además, se desarrolló y protocolizó la detección y cuantificación del genoma viral mediante RT-qPCR genérica para estos dos virus miembros del complejo VEE.

Los resultados obtenidos en este trabajo describen, ya sea mediante titulación por ensayo de placa o RT-qPCR, las diferentes fases del curso temporal de la infección. Observamos que la *fase eclipse* para ambos virus comprende desde el momento de la infección hasta las 4 hpi. Esta fase está definida como el tiempo que transcurre entre la infección y la aparición de las primeras partículas infectivas, las moléculas precursoras de la progenie viral se encuentran en etapa de síntesis o dispersas en el interior de la célula. Luego le sigue una *fase exponencial*, alcanzando el máximo rendimiento viral a las 24 hpi. En esta fase, se observa un aumento de las partículas virales al medio extracelular, obteniéndose títulos virales infectivos de alrededor de  $2,1 \times 10^8$  UFP/ml para PIXV y  $2,6 \times 10^8$  UFP/ml para RNV. Por último, el ciclo finaliza con una *fase estacionaria*, donde los títulos en UFP/ml y copias de ARN/ $\mu$ l se mantienen constantes o decaen levemente. El alto número de copias de ARN/ $\mu$ l de la monocapa para ambos virus nos indican que los mismos ingresan exitosamente durante los primeros 30 minutos. Cabe resaltar que, entre las 4 y 6 hpi el aumento en el número de copias de ARN/ $\mu$ l en las monocapas es de dos logaritmos, mientras que en los sobrenadantes es de solo uno para ambos virus. Esto estaría indicando que entre esas hpi se mantienen constantes las tasas de replicación dentro de las células. Mediante la técnica de inmunofluorescencia se identificó el progresivo aumento de las proteínas virales en el citoplasma, lo que refleja el curso temporal de la infección intracelular. Es posible observar que a partir de las 6 hpi las proteínas virales tanto del PIXV como del RNV se acumulan en la zona perinuclear, donde son sintetizadas y procesadas para luego ser transportadas a sus lugares de ensamblaje. A las 12 hpi, las proteínas se distribuyen en casi todo el citoplasma de la célula. Además, el análisis de las imágenes obtenidas mostró que la infección de la célula hospedadora con PIXV y RNV afecta drásticamente la morfología celular, observando un marcado ECP. Esto se corresponde con una reorganización del citoesqueleto de actina, donde en células no infectadas se observan claramente las fibras de estrés, mientras que a las 12 hpi estas fibras desaparecen y se observa un cinturón de actina en la región subcortical. Esto concuerda con lo observado en trabajos previos de nuestro laboratorio (Gil et al., 2017).

Los resultados obtenidos son absolutamente consistentes con la curva de crecimiento del PIXV realizada previamente en nuestro laboratorio, tanto en fibroblastos de embrión de ratón (Maldonado and Paglini, 1988), como en células Vero (Gil et al., 2017), mediante la

valoración del ECP, titulación por placas e inmunofluorescencia. Además, se complementa con resultados obtenidos para otros virus del mismo género que poseen cinéticas de crecimiento muy similares como el VEEV, el virus de la Encefalitis Equina del Este, y para otros virus pertenecientes a otras familias, como el virus influenza (Leung et al., 2011; Lundberg et al., 2017; Rubin et al., 1955). A diferencia de las curvas descritas en este trabajo, otros Alphavirus, como el virus Mayaro, alcanzan la fase estacionaria a las 48 hpi en fibroblastos dérmicos humanos (Sugasti-Salazar et al., 2021). En cambio, miembros de otros géneros, como el virus de Zika, en cultivos de células Vero E6, lo hace a los 7 días postinfección, donde se obtienen títulos máximos de  $5 \times 10^7$  UFP/ml (Freppel et al., 2018). Si bien, un trabajo reciente con el virus Chikungunya (Alfavirus del Viejo Mundo), demostró un aumento considerable en los títulos virales por RT-qPCR desde las 12 a las 24 hpi en las líneas celulares HEK-293T, Huh-7 y MRC-5 (Archila et al., 2022), aún es escasa la información de los ciclos de replicación en cultivo de los alfavirus del Nuevo Mundo, evidenciando la necesidad de profundizar en el estudio del ciclo de infección viral en diferentes líneas celulares para los diferentes miembros del género. La curva de crecimiento de RNV, aún no había sido caracterizada, por lo que esta tesina es el primer reporte que describe el curso temporal de la infección utilizando diferentes técnicas, como cultivo celular y biología molecular. Esto, junto con la implementación de una RT-qPCR en tiempo real para cuantificar la carga viral, nos permitirá estudiar la dinámica de entrada y replicación, lo que posibilitará desarrollar diferentes estrategias para estudios posteriores de estos sistemas virales.

Además, frente a la problemática de circulación de más de un subtipo enzoótico en nuestro país, que generan infecciones febriles en humanos sin un diagnóstico etiológico y la actual expansión del territorio habitable por los vectores, consideramos que nuestro trabajo añade una técnica de detección rápida y efectiva de la región Nsp1 de los miembros del complejo VEE, que podría ser considerada para la detección y diagnóstico de estos virus ya que en muchos casos se los confunde con virus de otros géneros, como el virus del Dengue.

En conclusión, los resultados obtenidos en esta tesina demuestran que el intervalo de tiempo desde la infección hasta comienzo de la fase estacionaria para el PIXV y para el RNV es de 24 horas, representando el tiempo requerido para completar la curva de

crecimiento viral, mientras que el mayor rendimiento del virus, alcanzado en la fase estacionaria, representa la máxima cantidad de virus producidos por la monocapa celular. Este es el primer paso en el conocimiento de la biología celular de la infección con el PIXV y con el RNV en cultivos de células Vero, necesarios para poder desarrollar estrategias de prevención y tratamientos de enfermedades causadas por los alfavirus del Nuevo Mundo que presentan una creciente reemergencia a nivel mundial.

## BIBLIOGRAFÍA

- Acheson, N.H., 2007. *Fundamentals of Molecular Virology*. Hoboken, NJ: Wiley.
- Archila, E.D., Lopez, L.S., Castellanos, J.E., Calvo, E.P., 2022. Molecular and biological characterization of an Asian-American isolate of Chikungunya virus. *PLoS One* 17, e0266450.
- Brown, D.T., Hernandez, R., 2012. Infection of cells by alphaviruses. *Adv.Exp.Med.Biol* 726, 181-199.
- Buckley, S.M., 1964. Applicability of the Hela (Gey) Strain of Human Malignant Epithelial Cells to the Propagation of Arboviruses. *Proc Soc Exp Biol Med* 116, 354-358.
- Camilo Guzmán-Terán, A.C.R., Alfonso Rodríguez-Morales and Salim Mattar, 2020. Venezuelan equine encephalitis virus: the problem is not over for tropical America. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*
- CDC, 2020. Centers for Disease Control and Prevention, Diseases DoV-B. Vector-Borne threats and what we do about them. <https://www.cdc.gov/ncezid/dvbd/what-how/detect-prevent.html>.
- Condit, R.C., 2013. Principles of Virology, in: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields virology*, 6th ed. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, Philadelphia, PA, p. 21.
- Contigiani, M.S., de Basualdo, M., Camara, A., Ramirez, A., Diaz, G., Gonzalez, D., Medeot, S., Osuna, D., 1993. [Presence of antibodies against Venezuelan equine encephalitis virus subtype VI in patients with acute febrile illness]. *Rev Argent Microbiol* 25, 212-220.
- Flint, S.J., Enquist, L.W., Krug, R.M., Racaniello, V.R., Skalka, A.M., 2000. Virus cultivation, Detection and Genetics, *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control*. American Society for Microbiology, Washington, D. C., pp. 25-56.
- Forrester, N.L., Wertheim, J.O., Dugan, V.G., Auguste, A.J., Lin, D., Adams, A.P., Chen, R., Gorchakov, R., Leal, G., Estrada-Franco, J.G., Pandya, J., Halpin, R.A., Hari, K., Jain, R., Stockwell, T.B., Das, S.R., Wentworth, D.E., Smith, M.D., Kosakovsky Pond, S.L., Weaver, S.C., 2017. Evolution and spread of Venezuelan equine

- encephalitis complex alphavirus in the Americas. *PLoS neglected tropical diseases* 11, e0005693.
- Freppel, W., Mazeaud, C., Chatel-Chaix, L., 2018. Production, Titration and Imaging of Zika Virus in Mammalian Cells. *Bio Protoc* 8, e3115.
- Gardner, C.L., Ebel, G.D., Ryman, K.D., Klimstra, W.B., 2011. Heparan sulfate binding by natural eastern equine encephalitis viruses promotes neurovirulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16026-16031.
- Ghietto, L.M., Gil, P.I., Olmos Quinteros, P., Gomez, E., Piris, F.M., Kunda, P., Contigiani, M., Paglini, M.G., 2022. Members of Venezuelan Equine Encephalitis complex entry into host cells by clathrin-mediated endocytosis in a pH-dependent manner. *Sci Rep* 12, 14556.
- Gil, P.I., Albrieu, L.G., Mlewski, E., Monetti, M., Fozatti, L., Cuffini, C., Fernandez Romero, J., Kunda, P., Paglini, G., 2017. Pixuna virus modifies host cell cytoskeleton to secure infection. *Manuscrito en Revisión. Scientific Reports*.
- Go, Y.Y., Balasuriya, U.B., Lee, C.K., 2014. Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clin Exp Vaccine Res* 3, 58-77.
- Griffin, D.E., 2013. Alphaviruses, in: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), 6th ed. *Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, Philadelphia, PA*, p. 651.
- Kononchik, J.P., Jr., Hernandez, R., Brown, D.T., 2011. An alternative pathway for alphavirus entry. *Virology* 438, 304.
- Leung, J.Y., Ng, M.M., Chu, J.J., 2011. Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells. *Adv Virol* 2011, 249640.
- Lundberg, L., Carey, B., Kehn-Hall, K., 2017. Venezuelan Equine Encephalitis Virus Capsid—The Clever Caper. *Viruses*.
- Maija K.Pietilä, K., TeroAhola, 2017. Alphavirus polymerase and RNA replication. *Virus Research* 234, 14.
- Maldonado, C.A., Paglini, S., 1988. The use of protein-A gold complex to study partial aspects of Pixuna virus morphogenesis. *Com.Biol.* 7, 113-122.
- Mitchell, C.J., Monath, T.P., Sabattini, M.S., Cropp, C.B., Daffner, J.F., Calisher, C.H., Jakob, W.L., Christensen, H.A., 1985. Arbovirus investigations in Argentina, 1977-

1980. II. Arthropod collections and virus isolations from Argentine mosquitoes. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 34, 945-955.
- Paglini, G., Pereyra Edel, C., Paglini, S., 2006. Cellular receptor for Pixuna virus in chicken embryonic fibroblasts. *Med Microbiol Immunol* 195, 85-92.
- Pisano, M.B., Dantur, M.J., Re, V.E., Diaz, L.A., Farias, A., Sanchez Seco, M.P., Tenorio, A., Almiron, W.R., Contigiani, M.S., 2010a. Cocirculation of Rio Negro Virus (RNV) and Pixuna Virus (PIXV) in Tucuman province, Argentina. *Trop.Med.Int.Health* 15, 865-868.
- Pisano, M.B., Re, V.E., Diaz, L.A., Farias, A., Stein, M., Sanchez-Seco, M.P., Tenorio, A., Almiron, W.R., Contigiani, M.S., 2010b. Enzootic activity of pixuna and Rio Negro viruses (Venezuelan equine encephalitis complex) in a neotropical region of Argentina. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10, 199-201.
- Pisano, M.B., Spinsanti, L.I., Diaz, L.A., Farias, A.A., Almiron, W.R., Re, V.E., Contigiani, M.S., 2012. First detection of Rio Negro virus (Venezuelan equine encephalitis complex subtype VI) in Cordoba, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107, 125-128.
- Pisano, M.B., Torres, C., Re, V.E., Farias, A.A., Sanchez Seco, M.P., Tenorio, A., Campos, R., Contigiani, M.S., 2014. Genetic and evolutionary characterization of Venezuelan equine encephalitis virus isolates from Argentina. *Infect Genet Evol* 26, 72-79.
- Rubin, H., Baluda, M., Hotchin, J.E., 1955. The maturation of Western equine encephalomyelitis virus and its release from chick embryo cells in suspension. *J Exp Med* 101, 205-212.
- Shoper, R.E., Causey, O.R., de Aandrade, A.H., 1964. The venezuelan equine encephalomyelitis complex of group a arthropod-borne viruses, including mucambo and pixuna from the amazon region of brazil. *Am.J Trop.Med.Hyg.* 13, 723-727.
- Sugasti-Salazar, M., Llamas-González, Y.Y., Campos, D., González-Santamaría, J., 2021. Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Impairs Mayaro Virus Replication in Human Dermal Fibroblasts and HeLa Cells. *Viruses*.
- Wang, K.S., Kuhn, R.J., Strauss, E.G., Ou, S., Strauss, J.H., 1992. High-affinity laminin receptor is a receptor for Sindbis virus in mammalian cells. *J.Virol.* 66, 4992-5001.



- Weaver, S.C., Winegar, R., Manger, I.D., Forrester, N.L., 2012. Alphaviruses: population genetics and determinants of emergence. *Antiviral Res.* 94, 242-257.
- Wei Zhang, S.M., Sergei V. Pletnev, Timothy S. Baker, Richard J. Kuhn, and Michael G. Rossmann, 2002. Placement of the Structural Proteins in Sindbis Virus. *Journal of Virology*.
- Young, P.R., 2020. *Arboviruses: A Family on the Move, Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies*, p. 10.
- Zhang, R., Hryc, C.F., Cong, Y., Liu, X., Jakana, J., Gorchakov, R., Baker, M.L., Weaver, S.C., Chiu, W., 2011. 4.4 A cryo-EM structure of an enveloped alphavirus Venezuelan equine encephalitis virus. *EMBO J.* 30, 3854-3863.