

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

MÁSTER EN VIROLOGÍA CURSO 2013-2014



**TRABAJO FIN DE MÁSTER PARA OPTAR AL TÍTULO DE
MÁSTER EN VIROLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y REPLICACIÓN *IN-VITRO*
DE COXSACKIEVIRUS B3: IMPLICACIONES EN LA
PATOGENICIDAD**

KATHERINE IVETTE CALDERÓN MAYO

**CENTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA DEL INSTITUTO DE SALUD
CARLOS III. MAJADAHONDA. MADRID**

BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DOCTORA

MARÍA CABRERIZO SANZ

Trabajo Fin de Máster para optar al Título de:

Máster en Virología, curso 2013 – 2014

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y REPLICACIÓN *IN-VITRO*
DE COXSACKIEVIRUS B3: IMPLICACIONES EN LA
PATOGENICIDAD**

**Realizado en el Laboratorio de Enterovirus del Centro Nacional
de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda.**

Madrid

Katherine Ivette Calderón Mayo

Fdo.

Dra. María Cabrerizo Sanz

Fdo.

Madrid, Septiembre del 2014

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y REPLICACIÓN *IN-VITRO* DE COXSACKIEVIRUS B3: IMPLICACIONES EN LA PATOGENICIDAD

Alumna : Katherine Ivette Calderón Mayo

Tutor Académico: María Cabrerizo Sanz

Resumen:

El serotipo de enterovirus coxsackievirus (CV)-B3 se ha asociado con infecciones que abarcan desde síndromes febriles hasta enfermedades más severas, neurológicas o sistémicas, particularmente cuando afectan a neonatos o a individuos inmunodeprimidos. Los objetivos de este estudio fueron analizar mediante amplificación y secuenciación las regiones 5'NCR, VP1 y 3Dpol de 4 cepas de CV-B3 aisladas en pacientes con diferentes cuadros clínicos, y determinar sus cinéticas de replicación en diferentes líneas celulares. Los cambios de nucleótidos observados en los dominios II-V que forman el IRES dentro de la región 5'NCR con respecto a la cepa prototipo Nancy, podrían influir en la capacidad de replicación y el tropismo de los CV-B3 estudiados, aunque las estructuras secundarias predichas (MFOLD) no pudieron confirmar estos resultados. Los análisis filogenéticos en VP1 y 3Dpol sirvieron para estudiar la variabilidad y evolución genética de los CV-B3 a lo largo del tiempo. Asimismo, los cambios de aminoácidos observados en VP1 parece que modifican ligeramente las estructuras conformacionales de dicha proteína comparándolas con la prototipo, pero probablemente no afectan a su funcionalidad. Por último, no se pudo concluir que hubiera una asociación entre la capacidad de infección mostrada en las líneas celulares estudiadas y las diferentes patologías causadas.

Palabras claves: *Coxsackievirus B3, análisis filogenético, RT-PCR, cultivos celulares y curvas de replicación.*

Abstract:

Coxsackievirus B3 is an enterovirus serotype associated with a wide range of pathologies, from febrile syndrome to severe neurological or systemic diseases, particularly when the infection affects newborns or immunocompromised patients. The objectives of this study were to analyze the 5'NCR, VP1 and 3Dpol regions in 4 CV-B3 strains isolated from patients with different clinical syndromes by amplification and sequencing, and to investigate the replication kinetics of CV-B3 in different cell lines. Nucleotide changes observed in IRES domains II-V within 5'NCR in comparison to the CV-B3 prototype strain Nancy, might be related with changes in the replication capacity and cellular tropism of the CV-B3 strains studied, but this hypothesis could not be confirmed by the predicted secondary structures of the studied domains (MFOLD). Phylogenetic analyses in VP1 and 3Dpol regions were used to study the genetic variability and the molecular evolution of CV-B3 through the years. Furthermore, amino acid mutations in VP1 resulted in changes in the 3D protein structures comparing with the prototype strain one, but probably, the changes do not modify the functionality of the VP1 protein. Finally, the infectivity capacity of the CV-B3 strains in different cell lines is unrelated to clinical manifestations showed by the infected patients.

Keywords: *Coxsackievirus B3, phylogenetic analyses, RT-PCR, cell cultures and replication kinetics.*

Agradecimientos:

Mis sinceros agradecimientos a las autoridades del Instituto de Salud Carlos III de Majadahonda, por permitirme realizar el trabajo de fin de máster en el Centro Nacional de Microbiología.

A la Dra. Gloria Tallero Tasso, por su generosidad al facilitarme la oportunidad de desarrollar este trabajo en el Laboratorio de Enterovirus y brindarme su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad.

A la Dra. María Cabrerizo Sanz, por aceptarme para llevar a cabo este trabajo, bajo su dirección y amplia experiencia en enterovirus, quien a pesar de sus múltiples labores, compromisos internacionales y familiares, siempre tuvo tiempo y aliento optimista para orientarme en este trabajo.

Al personal técnico: Purificación, Almudena, Hortensia e Isidoro, que fueron amigos incondicionales y me apoyaron durante mi estancia en el laboratorio, invirtiendo en mi persona tiempo, conocimientos, paciencia y buen humor.

A mi familia a mi tía Nancy Lourdes Mayo Simón por apoyarme incondicionalmente durante la realización del máster y de este trabajo.

A mis padres Juan y Ana, que me apoyaron en todo momento animándome a seguir adelante, con su amor, a mis hermanas Karla y Ana Camila que fueron personas que me alentaron en todo momento.

A Aldo Rojas Neyra, que a pesar de la distancia me apoyo en todo momento para seguir mis metas y sueños.

A mis amigos, Giselle, Erick, Guille, Felipe y Leyla; quienes siempre estuvieron dispuestos a apoyarme, escucharme y aconsejarme, quiero darles las gracias por demostrar tanto aprecio que al final sirvieron de mucho en mi estancia en este país.

Y a María, mi compañera y amiga del laboratorio, por los momentos compartidos, su amistad y estima personal.

ÍNDICE

	Pág.
I. CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. FAMILIA PICORNAVIRIDAE	1
1.2. GÉNERO <i>ENTEROVIRUS</i>	1
1.3. ESTRUCTURA VIRICA Y CICLO REPLICATIVO	1
1.4. MODO DE TRANSMISIÓN, PATOGENIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS	3
1.5. EPIDEMIOLOGÍA	3
1.6. COXSACKIEVIRUS B3	4
1.7. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO	5
II. CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	7
2.1. JUSTIFICACIÓN	7
2.2. OBJETIVO GENERAL	7
2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
III. CAPÍTULO 3. PACIENTES Y MÉTODOS	9
3.1. PACIENTES Y MUESTRAS	9
3.2. MÉTODOS	9
3.2.1. Aislamiento de CV-B3 en cultivo celular	9
3.2.2. Amplificación de las regiones 5'NCR, VP1, 3Dpol	10
3.2.3. Análisis de la secuencia de aa y/o nt de las regiones 5'NCR, VP1 y 3Dpol	11
3.2.4. Análisis filogenéticos	12
3.2.5. Ensayos <i>in vitro</i> de la cinética de replicación del CV-B3	12
IV. CAPÍTULO 4. RESULTADOS	14
4.1. Análisis filogenético de la región 3'VP1	14

4.2. Obtención de los aislados de CV-B3	14
4.3. Análisis de la 5'NCR	16
4.4. Análisis de la VP1 completa (VP1c)	22
4.5. Análisis filogenético de la región 3Dpol	27
4.6. Determinación <i>in vitro</i> de la cinética de replicación de las diferentes cepas de CV-B3 analizadas en 4 líneas celulares	29
V. CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN	31
VI. CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES	34
CHAPTER 6. CONCLUSIONS	35
VII. CAPÍTULO 7. RECOMENDACIONES	36
VIII. CAPÍTULO 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
IX. CAPÍTULO 9. VALORACIÓN PERSONAL	42

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. FAMILIA PICORNAVIRIDAE

La familia *Picornaviridae* (pico: pequeño, virus: viridae) es una amplia y muy variada familia de virus ARN de cadena sencilla y de polaridad positiva. Actualmente engloba a 46 especies agrupadas en 26 géneros que incluyen más de 300 sero/genotipos distintos de virus. Los géneros que infectan a humanos son: *Enterovirus*, que incluyen los enterovirus humanos (EV) y los rinovirus, *Hepatovirus*, *Parechovirus*, *Cardiovirus*, *Cosavirus* y *Kobuvirus* (Knowles et al., 2012).

1.2. GÉNERO ENTEROVIRUS

Dentro de la familia *Picornaviridae*, los virus del género *Enterovirus* son los que más se asocian con enfermedades humanas. Actualmente se conocen más de 90 serotipos de EV capaces de infectar al hombre. La actual clasificación taxonómica basada en la organización del genoma, similitud de secuencias y propiedades biológicas, agrupa a los EV en 4 de las 12 especies que incluye el género *Enterovirus*: la especie A (EV-A) (17 serotipos), EV-B (56 serotipos), EV-C (16 serotipos, incluidos los poliovirus 1, 2 y 3) y EV-D (3 serotipos). Una de las características principales de los EV, al igual que otros picornavirus, es la de presentar una alta frecuencia de recombinación entre los EV circulantes, siendo normalmente intra-especie (Palacios et al., 2010).

1.3. ESTRUCTURA VÍRICA Y CICLO REPLICATIVO

La partícula viral de pequeño tamaño, 30 nm de diámetro aproximadamente, es esférica, sin envoltura lipídica y con cápside de simetría icosaédrica constituida por 60 subunidades que consisten en 4 proteínas estructurales (VP1 a VP4) (Tuthill et al., 2010). El genoma de los EV está compuesto por ARN de cadena sencilla de polaridad positiva, es decir que puede actuar directamente como ARN mensajero en la célula que infecta, cuya longitud es de 7209-8450 nucleótidos (nts) y dividida en tres regiones: la región 5' región no traducida (NCR), un marco de lectura abierta (ORF) y la 3'NCR (Palacios et al., 2010).

El genoma de EV presenta una proteína de 22 aminoácidos (aa) (3B VPg) unida covalentemente en su extremo 5' (Palacios y Oberste, 2005). La región 5'NCR (600-1200 nts) contiene una serie de importantes elementos de replicación y control de la traducción, incluyendo un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) que está directamente implicado en la iniciación de la traducción de proteínas (Tuthill et al., 2010).

La ORF codifica una única poliproteína de aproximadamente 2200 aa que es procesada para producir las cuatro proteínas de la cápside (VP4, VP2, VP3 y VP1, respectivamente), las proteasas 2A_{pro} y 3C_{pro}, las proteínas 2B y 2C, la 3B VPg precursor y la ARN polimerasa-ARN dependiente (3D_{pol}) (Palacios y Oberste, 2005; Tuthill et al., 2010).

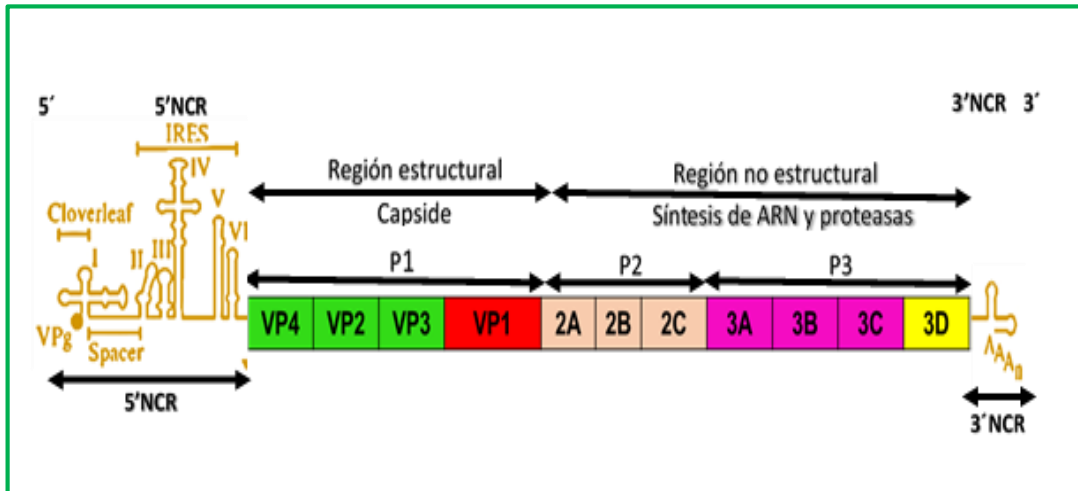


Fig. 1.1. Esquema del genoma completo de los Enterovirus. Elaborado por el propio autor.

VP1 es una de las proteínas de la cápside que se encuentra en la superficie externa del virión formada por ocho láminas β antiparalelas y 7 bucles denominados BC, CD, DE, EF, FG, GH, y HI. Esta región contiene importantes epítomos antigénicos frente a los anticuerpos neutralizantes y en ella se encuentra el sitio de unión al receptor (Tuthill et al., 2010). Por último, se ha comprobado que la secuencia de nucleótidos de la región c-terminal de VP1 determina el serotipo viral (Palacios et al., 2010).

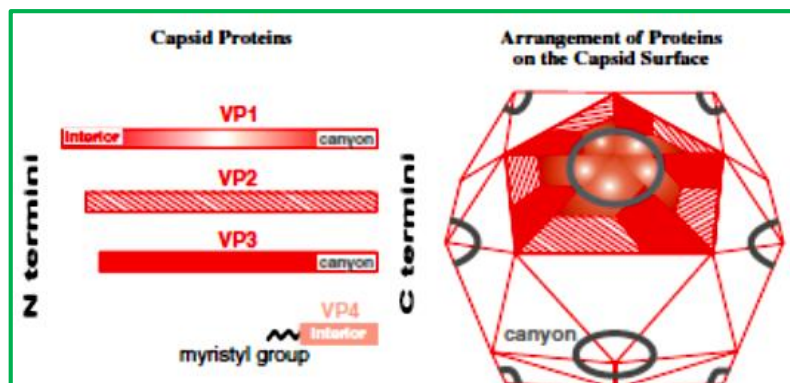


Fig. 1.2. La cápside de los enterovirus. La superficie exterior de la cápside se compone de las proteínas VP1, VP2 y VP3. Adaptado de Carter y Saunders, 2007.

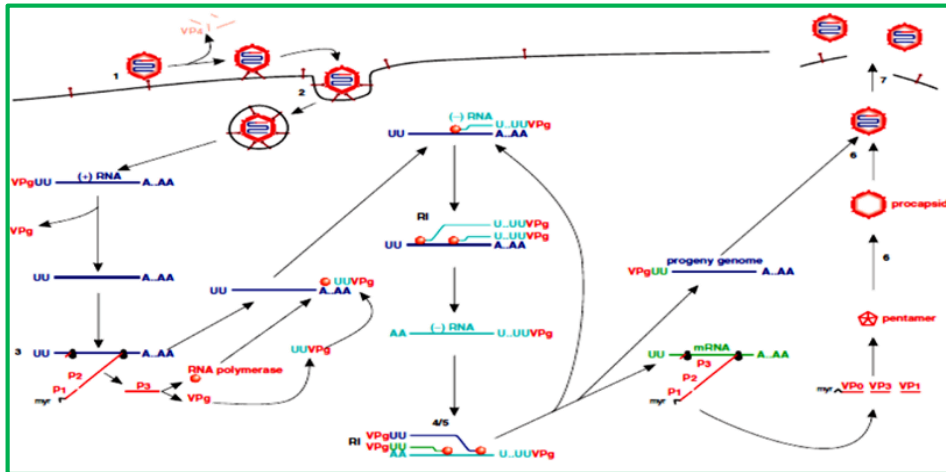


Fig. 1.3. Ciclo replicativo de los EV, el virus se une a la superficie de célula huésped a través de su receptor y entra por endocitosis. La acidificación del endosoma genera cambios conformacionales en el virión, la fusión de la membrana viral con la célula y el desensamblaje de la partícula viral. El ARN es liberado en el citoplasma y es traducido en una sola poliproteína que es procesada por las proteasas virales para dar lugar a las distintas proteínas virales. El ensamblaje de las proteínas estructurales y el ARN sintetizado por la RNA polimerasa se realiza en la superficie de retículo endoplásmico. El resultado es una partícula no infecciosa la cual es transportada al aparato de Golgi, donde es procesada para dar lugar a una partícula madura e infecciosa. Los virus maduros son liberados por exocitosis. Adaptado de Carter y Saunders, 2007.

1.4. MODO DE TRANSMISIÓN, PATOGENIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los EV se transmiten principalmente por vía fecal-oral y aerosoles respiratorios. Inicialmente replican en el tracto respiratorio superior y después pasan al intestino delgado, siendo excretados a través de las heces. En algunos casos los virus pueden replicar en el tejido linfóide submucoso y en el sistema retículo endotelial, y a partir de esta viremia secundaria diseminarse a otros órganos y producir la sintomatología clínica. Así y según el tejido celular que infecten, los EV pueden producir desde un síndrome febril o cuadros respiratorios leves, hasta infecciones del sistema nervioso central (SNC) como meningitis o encefalitis, poliomielitis o parálisis flácida aguda (PFA) causada por los poliovirus (PV), exantema y la enfermedad mano-boca-pie o conjuntivitis hemorrágica aguda. Algunos serotipos de EV se asocian también con enfermedades más graves como la diabetes, miocarditis crónica o sepsis neonatal (Rhoades et al., 2011).

1.5. EPIDEMIOLOGÍA

Los EV están distribuidos en todo el mundo predominando en países templados, aunque pueden circular durante todo el año, presentan estacionalidad bianual, con

mayor prevalencia en primavera-verano y generalmente otro pico en otoño, mientras que en las zonas tropicales las infecciones se producen con alta incidencia en todo el año (Ochiai et al., 2006; Trallero et al., 2010). Muchos serotipos pueden ser endémicos, con poco o sólo gradual cambio en la prevalencia de un año para otro, en contraste con otros serotipos que pueden introducirse periódicamente, causando brotes epidémicos (Palacios et al., 2010).

La mayoría de las infecciones por EV se dan en edad pediátrica y son asintomáticas, pero y como ya se ha comentado, en el caso de que lleguen a infectar otros órganos diferentes al tracto-intestinal, estos virus son capaces de producir una amplia variedad de síndromes clínicos.

En general y con algunas excepciones, no hay asociación entre serotipo y patología; un mismo serotipo puede causar diferentes síndromes en pacientes distintos y varios serotipos pueden causar la misma sintomatología clínica. Los EV, sobre todo los de la especie B (EV-B) son los principales causantes de meningitis aséptica en países desarrollados (Trallero et al., 2010; Khetsuriani et al., 2007).

En el caso de la poliomielitis, en la actualidad hay cuatro regiones declaradas por la OMS "Libre de Polio": la región de las Américas, Pacífico Occidental, Europa y Asia Suroriental. El Poliovirus salvaje (PVS) tipo 2 ya no circula desde 1999, y la poliomielitis permanece endémica solamente en 2 áreas afectando a tres países: Afganistán, Pakistán y Nigeria (CNE, 2014).

Otro de los serotipos relevante desde el punto de vista clínico y con importantes implicaciones para la salud pública es el EV-71. Este EV, de la especie A, produce la enfermedad mano-boca-pie en niños, generalmente de curso benigno, pero desde los años 70's, en los países asiáticos se están produciendo grandes brotes de esta enfermedad, con una alta incidencia de casos con complicaciones neurológicas y pulmonares, llegando a incluso a ser fatales (How et al., 2010; Solomon et al., 2010).

1.6. COXSACKIEVIRUS B3 (CV-B3)

Los coxsackievirus B (CV-B1 a 6), dentro de la especie B, son unos de los serotipos que con mayor frecuencia se asocian a formas más graves de la infección, particularmente cuando afectan a neonatos y lactantes o a individuos inmunodeprimidos (Kemball et al., 2009).

En concreto el CV-B3, es uno de los que más comúnmente se encuentra implicado en la mayoría de las miocarditis que son de origen viral (Vargas, 2013). También se ha asociado comúnmente con miopericarditis, meningitis aséptica, enfermedad sistémica

neonatal, meningoencefalitis, herpangina y otras enfermedades exantemáticas (Khetsuriani et al., 2007).

En algunas infecciones causadas por CV-B3, la respuesta inmune no es suficiente, y el virus puede persistir en el miocardio. La proteasa 2A tiene capacidad para romper la distrofina, una proteína citoesquelética (Beiras et al., 2003), produciendo una miocarditis crónica que conduce a miocardiopatía dilatada idiopática (Monserat et al., 2002). El receptor de CV-B3 es CAR (coxsackievirus-adenovirus receptor) y parece que su expresión es más alta en las primeras etapas de la vida y que luego disminuye en el curso de la vida adulta, lo que podría explicar la susceptibilidad en la edad pediátrica (Limonta et al., 2011), llegando a presentar una clínica perfil similar a la septicemia con hipotensión, síndrome febril, leucopenia o leucocitosis, neutropenia, trombocitopenia y difundido coagulación intravascular (Jasso, 2011).

Con respecto al patrón de circulación CV-B3, este serotipo es detectado todos los años en todo el mundo. Los estudios de vigilancia publicados describen prevalencias de entre 1 y el 4.6%, según los años y los países (Khetsuriani et al., 2007; Roht et al., 2007; Antona et al., 2007; Bingjun et al., 2008; CDC, 2010). Datos del CDC sobre vigilancia de EV en Estados Unidos durante el periodo 1970-2005, indicaron que el 5.4% de los casos fatales por infección enteroviral se asociaban a CV-B3 (Khetsuniani et al., 2007). En España, el serotipo CV-B3 fue identificado en el 1.3% de los EV detectados durante los años 1998-2007, con un 7% de ellos asociados a infecciones respiratorias (Trallero et al., 2010), mientras que en el periodo 2008-2013, los CV-B3 supusieron el 2.8% de los EV tipados. Las infecciones por CV-B3 en este periodo de estudio se asociaron a afectación neurológica neonatal en un 65% de los casos, y se describieron 5 casos de miocarditis o pericarditis (12.5%), resultando fatales en neonato y en un paciente adulto inmunodeprimido (5%) (Datos no publicados del Laboratorio de Enterovirus, CNM, ISCIII).

1.7. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El tradicional método estándar por detección y serotipado de infecciones de EV es el de aislamiento de los virus en cultivo celular y posterior ensayo de sero-neutralización en microplaca con antisueros específicos, lo cual requiere bastante tiempo y la especialización del personal técnico. En las últimas décadas se han desarrollado nuevas técnicas moleculares que permiten la detección de los EV mediante la amplificación del genoma utilizando RT-PCR (retro-transcripción seguida de la reacción en cadena de la polimerasa) que complementan y en algunos casos, sustituyen, los métodos de cultivo viral, sobre todo para la detección de los virus directamente en muestra clínica o para

poder identificar aquellos genotipos de EV no cultivables. Las técnicas moleculares han aportado mayor rapidez y sensibilidad a diagnóstico virológico de las infecciones causadas por EV (Chiang et al., 2012).

CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICACIÓN

Como ya se ha comentado, la infección por CV-B3 puede derivar en una amplia variedad de patologías, que van desde un síndrome febril a enfermedades más graves o incluso fatales tales como miocarditis, hepatitis, meningitis aséptica o meningoencefalitis y la DCM (Chu et al., 2010). La aparición coincidente de estas enfermedades con la infección severa de CV-B3, sugiere fuertemente una relación causal entre la infección viral y la enfermedad (Khetsuariani et al., 2007), que dependen tanto de los mecanismos de defensa del propio hospedador como de factores del virus (tropismo, patogenicidad y grado de virulencia).

Para determinar si existe una relación entre las características virológicas de CV-B3 y los diferentes síndromes clínicos asociados, es importante analizar algunas regiones del genoma, como la 5'NCR, que contiene una extensa estructura secundaria (6 dominios), donde los cambios de nucleótidos específicos pueden determinar una mayor o menor virulencia y distinta capacidad de replicación (Dunn et al., 2000). De igual forma las mutaciones puntuales en la proteína VP1, sobre todo en el bucle DE, pueden jugar un papel importante en el tropismo y en el escape a la respuesta inmunológica (Chu et al., 2010). El análisis filogenético en las regiones VP1 y 3Dpol proporciona datos sobre variabilidad genética de las cepas circulantes y la evolución molecular de los genotipos a través del tiempo (Leitch et al., 2009). Por último, los ensayos *in vitro* de las cinéticas de replicación de las cepas de CV-B3 en diferentes líneas celulares permiten asociar su capacidad infectiva con la patogenicidad.

2.2. OBJETIVO GENERAL

Comparar las cepas de CV-B3 aisladas de 4 pacientes con diferente sintomatología clínica, estudiando cinéticas de replicación en diferentes líneas celulares y la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de algunos genes implicados en infectividad, tropismo celular y recombinación, que pudieran explicar la diferente patogenicidad mostrada.

2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Amplificación de 3 regiones del genoma viral (5'NCR, VP1 y 3Dpol) mediante RT-PCR específicas.

2.2.2. Analizar las secuencias de aminoácidos (aa) y/o nucleótidos (nts) obtenidas para identificar las mutaciones o variantes que puedan estar relacionadas con

distinta infectividad y tropismo. Predicción de la estructura secundaria de ARN en la región del IRES y la estructura 3D de la proteína VP1.

2.2.3. Estudiar *in vitro* la cinética de replicación de las diferentes cepas analizadas en varias líneas celulares (neuronales, gastrointestinales, pulmonares y epiteliales), detectando y cuantificando el ARN viral mediante RT-PCR a tiempo real.

CAPÍTULO 3. PACIENTES Y MÉTODOS

3.1. PACIENTES Y MUESTRAS

En este estudio se incluyeron 4 pacientes menores de 1 año de edad que formaban parte de un proyecto de investigación (PI12-00903). Los 4 presentaron diferentes manifestaciones clínicas. Las muestras recogidas (1 líquido cefalorraquídeo-LCR, 1 heces y 2 exudados faríngeos-EF) se habían testaron para EV mediante RT-PCR comercial (Xpert EV, Cepheid, CA, USA) en el hospital dónde los pacientes habían sido ingresados, resultando todas ellas EV-positivo. Fueron enviadas al CNM para realizar el genotipado del EV mediante una RT-PCR específica para las especies EV-A, B y C en la región 3'VP1 del genoma viral (Cabrerizo et al., 2008), secuenciación del producto de PCR obtenido y análisis de la secuencia mediante el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). En las 4 se confirmó la presencia de CV-B3 (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Características clínicas, epidemiológicas y virológicas de los 4 pacientes incluidos en el estudio.

Nº ID CNM	Pacientes	Fecha de síntomas	Edad	Sexo	Tipo de muestra	Diagnóstico	X-pert EV	RT-PCR-VP1-EV-B	Secuenciación
201317200	P-1	13-abr-13	6m	H	EF	Bronquitis, irritabilidad	P	P	CV-B3
201321590	P-2	25-may-13	11d	M	LCR	Síndrome febril, pleocitosis	P	P	CV-B3
201328093	P-3	19-jul-13	6d	M	EF	Síndrome febril	P	P	CV-B3
201331263	P-4	12-jul-13	2m	M	HECES	Fiebre, exantema, neutropenia	P	P	CV-B3

CV-B3, Coxsackievirus B3; RT-PCR-VP1-B, transcripción reversa de la region cadena polimerasa de la VP1 para los EV especie B; EF, exudado faríngeo; LCR, líquido cefalorraquídeo; P, positivo.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Aislamiento de CV-B3 en cultivo celular

Con el objetivo de obtener suficiente cantidad de virus viable para la realización de los experimentos expuestos, las 4 muestras CV-B3 positivas seleccionadas fueron inoculadas en diferentes líneas celulares: carcinoma de pulmón humano (A-549), rhabdomyosarcoma humano (RD) y carcinoma de epitelial humano-laríngeo (Hep-2) que permiten el crecimiento de este serotipo de EV.

Las líneas celulares se mantienen mediante pases semanales, tripsinizando y utilizando el Minimum Essential Medium Eagle (EMEM) como medio de

crecimiento suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFB), glutamina al 2%, gentamicina 0.5% y una mezcla antibiótica con penicilina y estreptomina 1%, manteniéndose en estufa a 37°C.

Se prepararon tubos (Cell star) de cada línea celular en 2 mL de medio EMEM con 10% de SFB incubadas a 37°C en estufa hasta la formación de monocapa. De cada muestra se inoculó 200µL en cada uno de los tubos de cultivo celular. Para ello, se retiró el medio de crecimiento de los tubos y se cambió por 2 mL del medio EMEM al 2% de SFB, se añadieron los 200µL de inóculo y los tubos se incubaron a 37°C, en gradillas que mantenían una inclinación de 15°, para mantener cubierta toda la monocapa con el medio.

Los tubos inoculados eran visualizados diariamente para la detección del efecto citopático (ECP) característico, hasta conseguir una destrucción del 100% de la monocapa. Los sobrenadantes recogidos fueron guardados a -20°C. Se realizaron varios subpases, con el fin de obtener suficiente stock de virus (Westerhuis et al., 2012).

Una vez detectado el ECP, se confirmó la presencia de CV-B3 en el sobrenadante de los cultivos mediante técnicas de biología molecular. El ARN viral fue extraído utilizando el kit comercial QIAamp Viral RNA (Qiagen, Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. La caracterización del EV se realizó siguiendo la misma metodología descrita en el apartado 3.1.

3.2.2. Amplificación de las regiones 5'NCR, VP1 y 3Dpol

Se amplificó un fragmento de 503 pb en la región 5'NCR mediante una RT-PCR ya descrita (Casas et al., 1997), utilizando 5µL de ARN extraído y los oligonucleótidos EV1+s y EV1-as (Tabla 3.2).

La región VP1 completa (852 pb) se obtuvo amplificando 2 fragmentos solapantes. El fragmento 3'VP1 de 408 pb, se obtuvo mediante la RT- nested PCR ya descrita (Cabrerizo et al., 2008). Para el fragmento 5'VP1 de 327 pb, se diseñaron oligonucleótidos específicos, en este caso las condiciones de la reacción de RT-PCR fueron las mismas que se utilizaron para amplificar la región 3'VP1 (Tabla 3.2).

Por último, parte de la región 3D que codifica para la polimerasa viral se amplificó siguiendo el método previamente descrito por Leitch et al., (2009) (Tabla 3.2).

La purificación de los productos de PCR obtenidos se llevó a cabo para mejorar los resultados de la reacción de secuenciación ya que se consigue

eliminar restos de iniciadores, nucleótidos, enzimas y sales. Para ello se utilizó el método comercial QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La secuenciación de los amplicones generados fue realizada en un secuenciador automático (3730XL DNA Analyzer). Para ello se utilizaron los mismos oligonucleótidos con los cuales se llevó a cabo la amplificación de las distintas regiones: para la 5'NCR se usaron los oligos EV1+s y EV1-as, para la región de la 3'VP1 se utilizaron los oligos B+s y B-as, la región de la 5'VP1 se secuenció con los oligos B+1s y CB-1as, y por último la región 3Dpol se secuenció con los oligos 3Dpol+1s y 3Dpol-1as.

Tabla 3.2. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las regiones correspondientes a: 5'NCR, 3'VP1, 5'VP1 y 3Dpol.

Nombre	Primer	Secuencias (5'→3')	Posición en el genoma	Tamaño amplificado*
5'NCR	EV1+s	CGGTACCTTTGTRCGCCTGTTTTA	63 - 86	503 pb
	EV1-as	CGACTACTTTGGGTGTCCTGTTTC	540 - 564	
5'VP1	CB+1s	GCNATGGCNACYGGNAARTT	2106 - 2125	327 pb
	CB-1as	CAACATGGGAACCCCTTACGC	3083 - 3104	
3'VP1	B+s	ATGTAYRTNCCNCCNGNGG	2874 - 2893	408 pb
	B-as	GARGGNCCNGNNTNGTNGA	3522 - 3541	
3Dpol	3Dpol+1s	GGYGGYACHCCCACNAARAGRATGCT	5742 - 5767	549 pb
	3Dpol-1as	CCAATGGTRACHTAYGTVAARGAYGA	6366 - 6387	

*Posición en el genoma de la cepa de prototipo CV-B3 Nancy.

3.2.3. Análisis de la secuencia de aa y/o nt de las regiones 5'NCR, VP1 y 3Dpol

Las secuencias nucleotídicas obtenidas de las 3 regiones amplificadas se editaron con el programa de Chromas Lite 2.1.1. y se compararon con la secuencia de la cepa de prototipo CV-B3 Nancy (GB M16572) para estimar el número de sustituciones. El fragmento amplificado de la región 5'NCR contiene los dominios II-V del IRES. Utilizando la plataforma MFOLD (RNA Folding Form v 2.3 energies) se predijeron las estructuras de ARN secundarias correspondientes a cada uno de los dominios del IRES para la cepa prototipo y las 4 cepas de CV-B3 estudiadas. En el caso del gen VP1 también se obtuvo la secuencia de aa derivada para cada una de los CV-B3 y se predijeron las estructuras 3D mediante modelado por homología utilizando la plataforma ModWeb (<https://modbase.compbio.ucsf.edu/modweb/>), y visualizándolas con el programa RasMol v. 2.7.2.1.

3.2.4. Análisis filogenéticos

Se realizaron análisis filogenéticos en las regiones VP1 (3'VP1 y VP1 completa) y 3Dpol con las 4 cepas estudiadas y un total de 280 secuencias disponibles en GenBank de cepas de CV-B3 procedentes de diferentes países y las cepas prototipo de los EV especie B (41 en VP1 completa, 81 en la región 3'VP1 y 104 en 3Dpol). Los alineamientos se realizaron con el programa ClustalW y para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizó el programa MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013): método Neirgbor-Joining (N-J), modelo para distancias con el Method Maximum Likelihooh (MCL) (Tamura et al., 2004) y 1000 pseudorepeticiones (bootstrap method).

3.2.5. Ensayos *in vitro* de la cinética de replicación del CV-B3

Para el estudio de la cinética de replicación de las 4 cepas de CV-B3 estudiadas, se emplearon las siguientes líneas celulares: adenocarcinoma de colon humano (Caco-2), carcinoma de pulmón humano (A-549), neuroblastoma humano (SH-SY-5Y) y carcinoma epitelial humano-laringe (Hep-2). Las 4 líneas se crecieron y mantuvieron como se describió en el apartado 3.2.1.

El título del virus de cada uno de las cepas fue determinado por el método estándar de la dosis media infectiva en cultivo celular al 50% (CCID₅₀) y calculada por la fórmula de Kärber (Manual polio Anual, 4th edition, 2004).

Se prepararon monocapas de cada línea celular en placas de 24 pocillos con 1 mL de medio EMEM con 10% de SFB como medio de crecimiento e incubadas en la estufa a 37°C por 24 h antes de la inoculación. Sin embargo las células Caco-2 fueron suplementada con SFB al 20% (Westerhuis et al., 2013) y la monocapa se hizo 3 días antes, debido a que su proceso de formación es muy lento (Harrath et al., 2004).

En el día 0 las líneas celulares fueron infectadas con CV-B3 (4 cepas) a una concentración de 10 CCID₅₀/100µL en un volumen de 200µL del virus aislado. Previamente el medio de crecimiento fue retirado en todos los pocillos de la placa, para ser reemplazado con 1 mL de medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) al 2% de SFB, a excepción de los 4 pocillos a infectar, ya que el virus se inoculó sobre la monocapa y se incubó 2 h a 37°C con atmósfera de CO₂ al 5% para mejorar la adsorción del virus a la membrana celular. Posteriormente, se añadió 1 mL de medio DMEM al 2% de SFB a los pocillos infectados y finalmente la placa se metió al incubador por 10 días a 37°C con atmósfera de CO₂ al 5% (Westerhuis et al., 2012).

En los días 1, 3, 5 y 7 post-inoculación (p.i.) se hizo seguimiento del ECP de la monocapa retirando 50µL de sobrenadante, del cual fue extraído el ARN viral usando el kit comercial QIAamp Viral RNA (Qiagen, Hilden, Germany), eluyendo en menor volumen de buffer (30µL).

El ARN extraído se detectó mediante una RT-PCR a tiempo real diseñada en la región 5'NCR, utilizando una sonda taqman específica para EV, en el equipo Applied Biosystems 7000 Real-Time PCR System (Cabrerizo et al., 2014).

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1. Análisis filogenético de la región 3'VP1

Se compararon 81 secuencias, de las 4 cepas CV-B3 aisladas en este estudio y de 17 cepas que circularon en España durante el periodo 2004-2010, junto con las de los prototipos de EV-B obtenidas del GenBank, basadas en 408 nts de la 3'VP1. La Figura 4.1 muestra el árbol filogenético obtenido. En él se observó que todas las secuencias españolas de CV-B3 (incluidas las 4 del presente estudio) se agruparon junto con la cepa prototipo CV-B3 Nancy en un sólo grupo monofilético (clúster) con un bootstrap de 98%.

4.2. Obtención de los aislados de CV-B3

Con el objeto de obtener suficiente virus viable de las 4 muestras estudiadas para realización de los experimentos expuestos, éstas se inocularon en diferentes líneas celulares (A-549, RD y Hep-2) hasta observar un ECP del 100%. La concentración de los virus se determinó por titulación en microplaca y cálculo de CCID₅₀/100µL. El CV-B3 del paciente creció mejor en la línea celular Hep-2 con un título viral de 10⁶ CCID₅₀/100µL; los CV-B3 de los pacientes 2 y 3 se aislaron mejor en la línea celular RD con 10⁴ y 10⁶ CCID₅₀/100µL, respectivamente y el CV-B3 del paciente 4 se aisló mejor en A-549 con 10⁵ CCID₅₀/100µL.

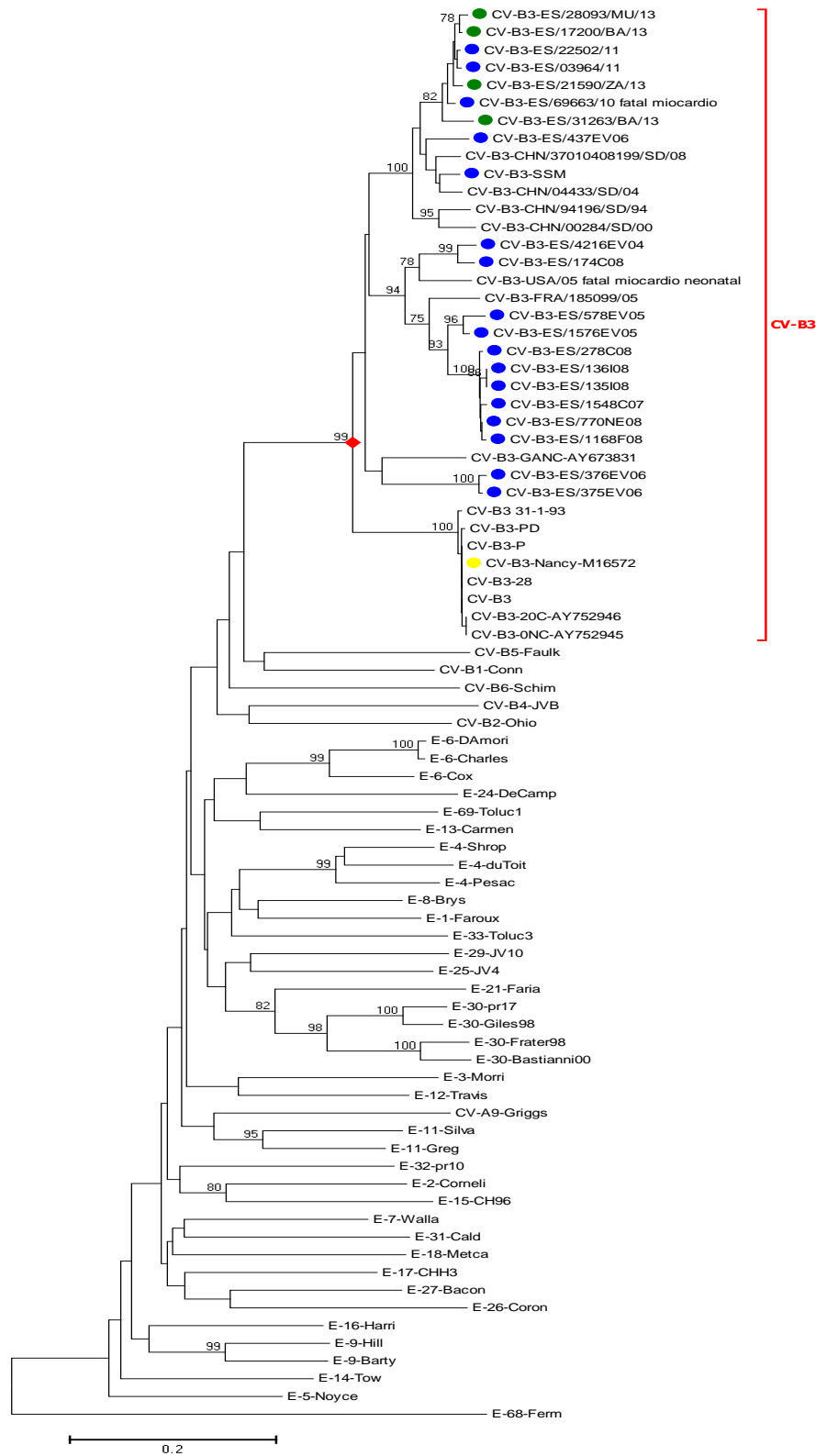


Fig. 4.1. Árbol filogenético con 81 secuencias de CV-B3 y EV-B en la región 3'VP1 basado en 408 nt. El EV-68 de la especie D se utilizó para rotar el árbol. MEGA 6.06 fue el programa usado para la construcción de los árboles filogenéticos con el método Neirgbor-Joining y el modelo de distancias Method Maximum Likelihooh (MCL) y 1000 pseudorepeticiones (bootstrap method) Solo se indican los valores de bootstrap $\geq 75\%$. Las 4 cepas de este estudio están indicadas por (●); otras cepas de España (●) y la cepa prototipo (●).

4.3. Análisis de la 5'NCR

Para el análisis de 5'NCR, se amplificó parte de esta región, visualizando los productos de PCR obtenidos de los 4 aislados mediante electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos tenían un tamaño de banda de 503 bp (Fig. 4.2). Posteriormente se realizó la purificación y secuenciación de estas bandas. Por último, se analizaron las secuencias de nts para identificar las mutaciones y predecir la estructura secundaria del ARN en la región del IRES.

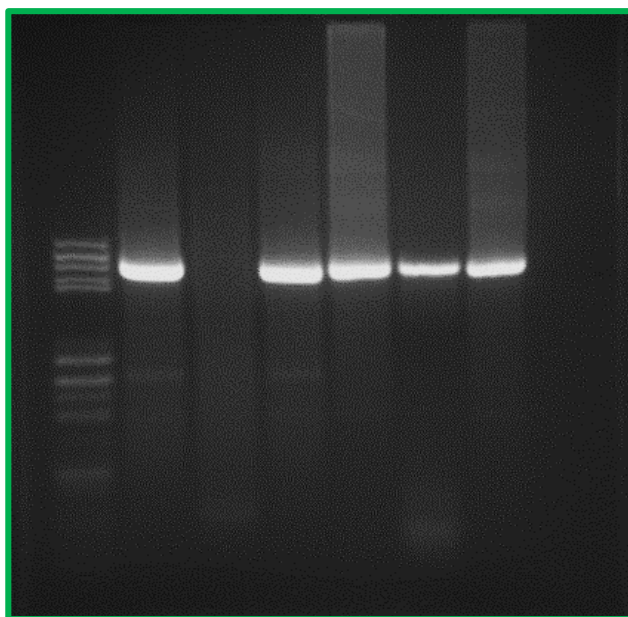


Fig. 4.2. Amplificación de 5'NCR basado en 503 nt. Control positivo E-9, control negativo, y los 4 aislados de este estudio.

El fragmento de 5'NCR amplificado contiene los dominios II-V del IRES. Estos dominios (D) se ubicaron en las posiciones: D-II (nt 99-183 nt), D-III (nt 184-242), D-IV (nt 237-454) y D-V (nt 448-566) con referencia a la cepa prototipo CV-B3 Nancy. Al realizar el alineamiento de esta región de las 4 cepas de CV-B3 estudiadas se observaron varios cambios de nts sobre todo en el D-II.

También se detectó una inserción de una G en la posición 126 en las 4 secuencias con respecto a la cepa prototipo CV-B3 Nancy (Fig. 4.3). Con respecto a la posición 234 (D-III) que había sido descrita como determinante para el fenotipo de cardiovirulencia (Bradrick et al., 2001), las cepas mostraron contener un T en esa posición.

presentaron en este dominio bastantes cambios de nts e incluso la inserción de una G en la posición 126. En el D-III, también se observaron cambios de nts que conducen a que la estructura secundaria en los CV-B3 de los 4 pacientes tenga 1 bucle más y, sin embargo, sea teóricamente algo más estable que la de CV-B3 Nancy (ΔG de -16 Kcal/mol y de -13 Kcal/mol, respectivamente) (Fig. 4.5). En el D-IV, los CV-B3 de los 4 pacientes presentaron una ΔG de -96.6 Kcal/mol con cambios de nts en comparación con el prototipo que presentó una ΔG de -91.1 Kcal/mol. En el D-IV se puede observar claramente que la estructura secundaria del prototipo presenta 1 bucle más al principio del dominio que no presentan los virus de los pacientes, estabilizando el D-IV en estos últimos CV-B3 (Fig. 4.6). Por último en el D-V, los 4 pacientes P1, P2, P3 y P4 presentaron cambios de nts en sus virus prediciendo estructuras con ΔG de -37 Kcal/mol, teóricamente menos estables que la estructura secundaria del prototipo (ΔG de -41 Kcal/mol) (Fig. 4.7)

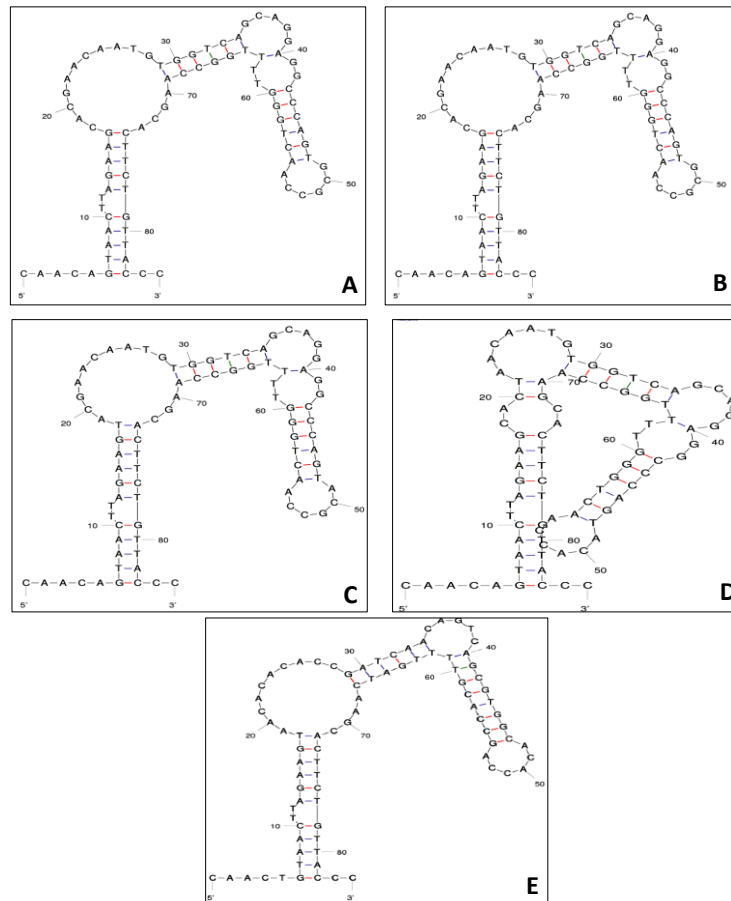


Fig. 4.4. Estructuras secundarias del dominio II del IRES de la región 5'NCR. Estructuras determinadas por ARN MFOLD de las secuencias de los aislados de los pacientes y cepa prototipo CVB-3 Nancy. **A.** Paciente 1: ΔG (-23 Kcal/mol), **B.** Paciente 2: ΔG (-23 Kcal/mol), **C.** Paciente 3: ΔG (-24 Kcal/mol), **D.** Paciente 4: ΔG (-23 Kcal/mol) y **E.** cepa prototipo de CV-B3 Nancy: ΔG (-23 Kcal/mol).

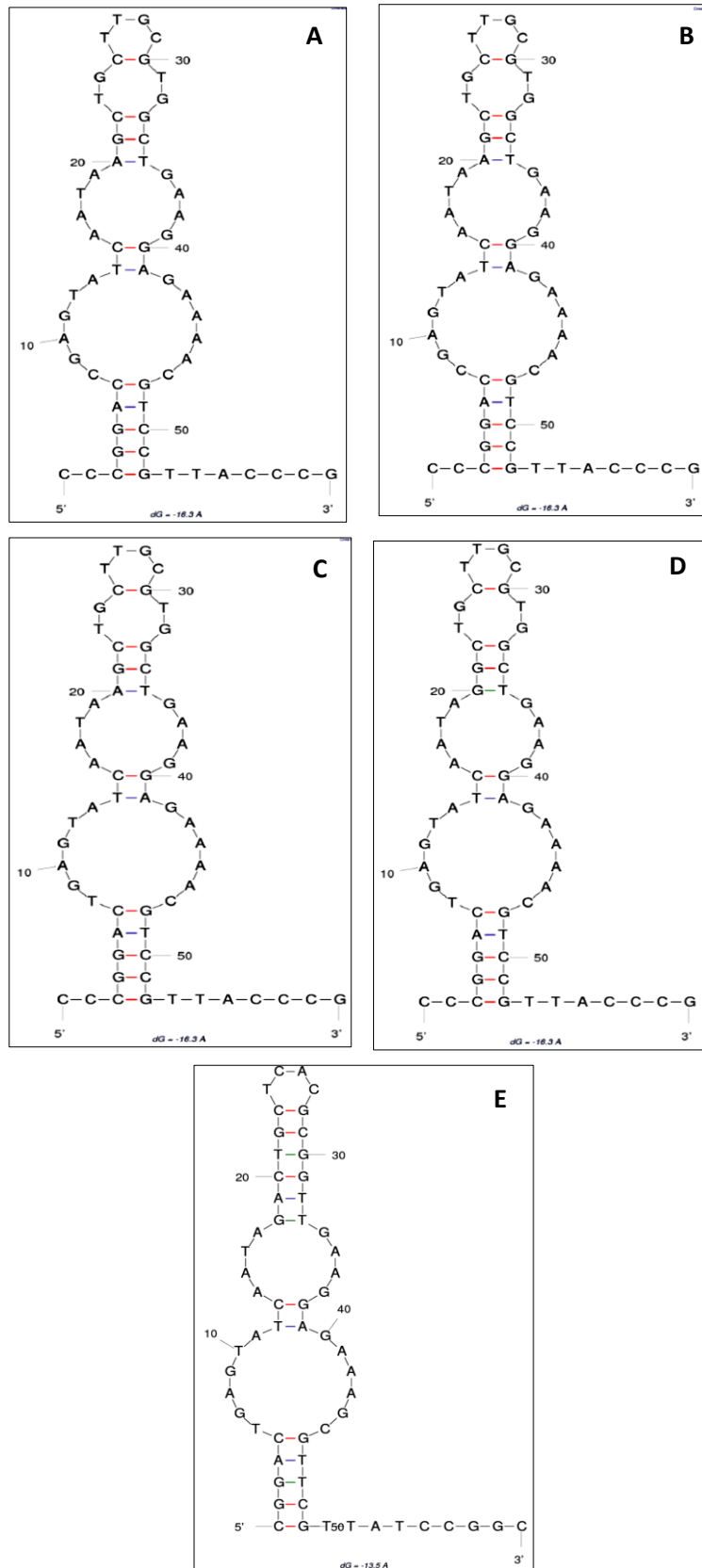


Fig. 4.5. Estructuras secundarias del dominio III del IRES de la región 5'NCR. Estructuras determinadas por ARN MFOLD de las secuencias de los aislados de los pacientes y cepa prototipo CVB-3 Nancy. A. Paciente 1: ΔG (-16 Kcal/mol), B. Paciente 2: ΔG (-16 Kcal/mol), C. Paciente 3: ΔG (-16 Kcal/mol), D. Paciente 4: ΔG (-16 Kcal/mol) y E. cepa prototipo de CV-B3 Nancy: ΔG (-13 Kcal/mol).

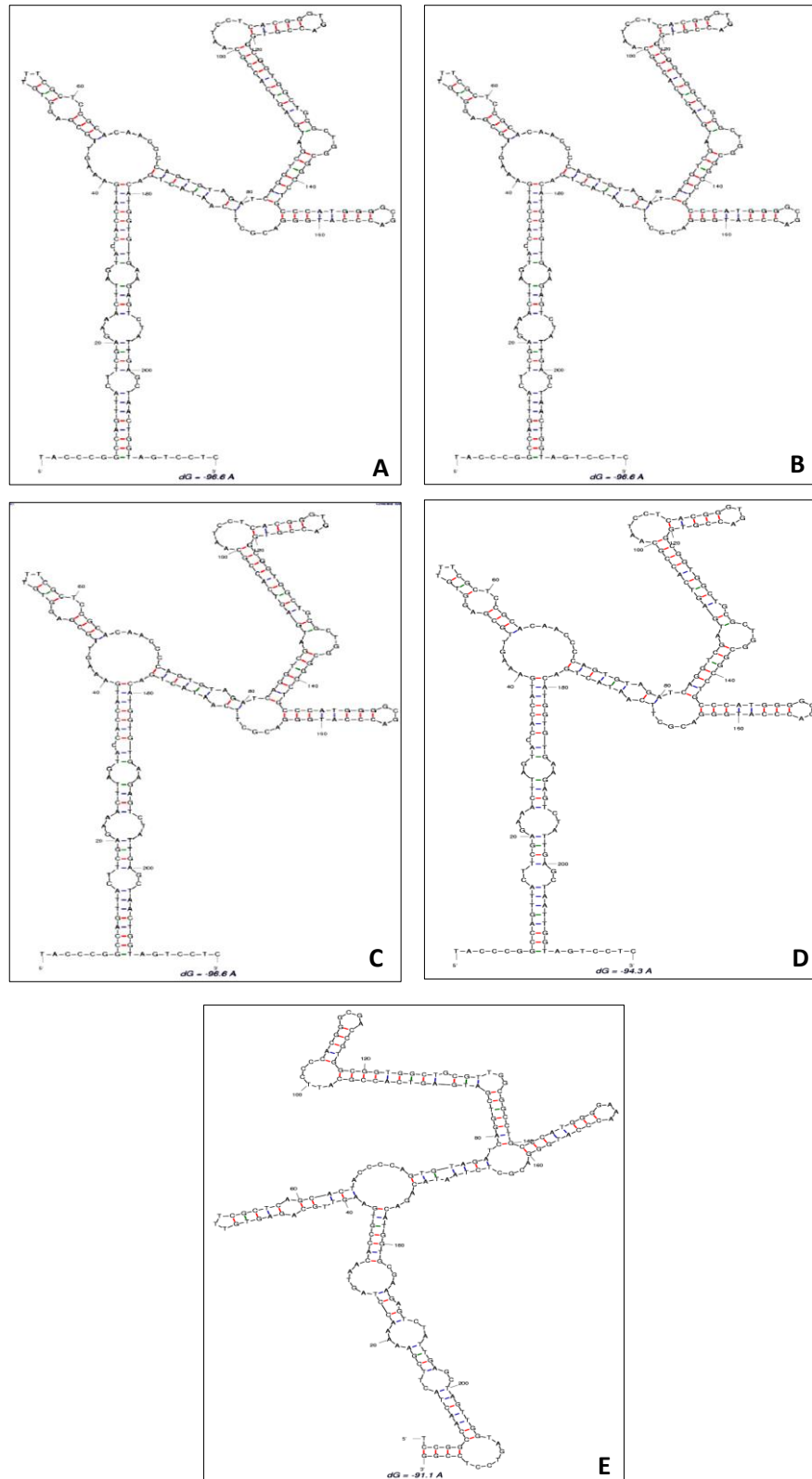


Fig. 4.6. Estructuras secundarias del Dominio IV del IRES de la región 5'NCR. Estructuras determinadas por ARN MFOLD de las secuencias de los aislados de los pacientes y cepa prototipo CVB-3 Nancy. A. Paciente 1: ΔG (-96.6 Kcal/mol), B. Paciente 2: ΔG (-96 Kcal/mol), C. Paciente 3: ΔG (-96.6 Kcal/mol), D. Paciente 4: ΔG (-94.3 Kcal/mol) y E. cepa prototipo de CVB3 Nancy: ΔG (-91.1 Kcal/mol).

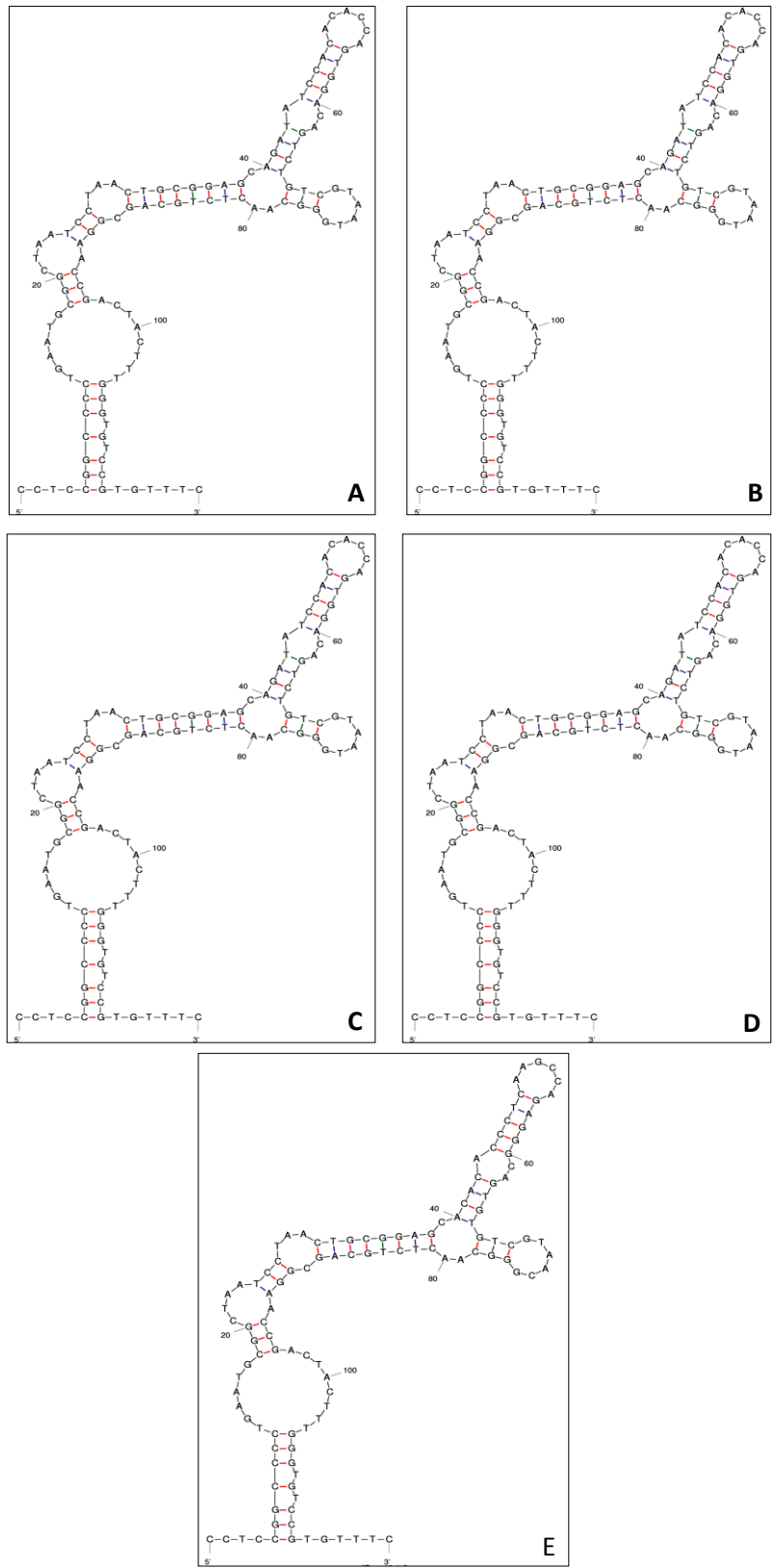


Fig. 4.7. Estructuras secundarias del Dominio V del IRES de la región 5'NCR. Estructuras determinadas por ARN MFOLD de las secuencias de los aislados de los pacientes y cepa prototipo CVB-3 Nancy. A. Paciente 1: ΔG (-37 Kcal/mol), B. Paciente 2: ΔG (-37 Kcal/mol), C. Paciente 3: ΔG (-37 Kcal/mol), D. Paciente 4: ΔG (-37 Kcal/mol) y E. Cepa prototipo de CV-B3

4.4. Análisis de la VP1 completa (VP1c)

Para el análisis de la VP1c se amplificaron 2 fragmentos solapantes: 3'VP1 y 5'VP1 de los 4 aislados, cuyos productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa, observándose bandas con tamaños de 408 y 327 pb, respectivamente (Fig. 4.8). Estos fragmentos fueron purificados, secuenciados, alineados y analizados en MEGA 6.06, dando lugar a una sola secuencia VP1c.

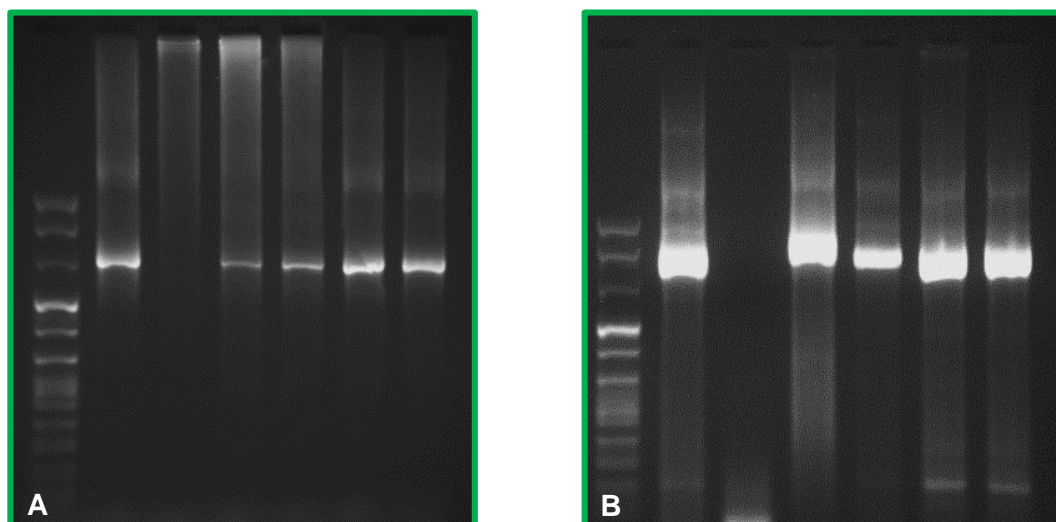


Fig. 4.8. Amplificación de 2 fragmentos de la región VP1: A. 3'VP1 y B. 5'VP1. Control positivo E-9, control negativo, y los 4 aislados de este estudio.

Para el análisis filogenético en la región VP1c (852 pb) se utilizaron 41 secuencias del serotipo CV-B3, incluidas las 4 del presente estudio (2013), otras secuencias aisladas en nuestro país durante 2010 y cepas disponibles en GenBank. El árbol filogenético obtenido clasifica las cepas de CV-B3 en cinco genotipos, GI-GV, clasificación basada en la propuesta por Chu et al., (2010). En los GI y GII se agrupan cepas relativamente antiguas, incluyendo la primera cepa aislada de CV-B3 (1949) en América y considerada como cepa de referencia (Nancy). El GIII lo forman cepas de Estados Unidos y Europa (Alemania, Francia, Reino Unido y España) del 1979-2008. En el GIV se agrupó sólo dos cepas de la India (2009), y en el GV principalmente se agrupan cepas del continente asiático Taiwán y China (1994-2012). Las 4 cepas de España de este estudio (2013) también forman parte de este grupo monofilogenético, formando además, un sub-clúster con un bootstrap 80%, estimándose una distancia entre ellas que variaba entre 0.013-0.030 (Fig. 4.9).

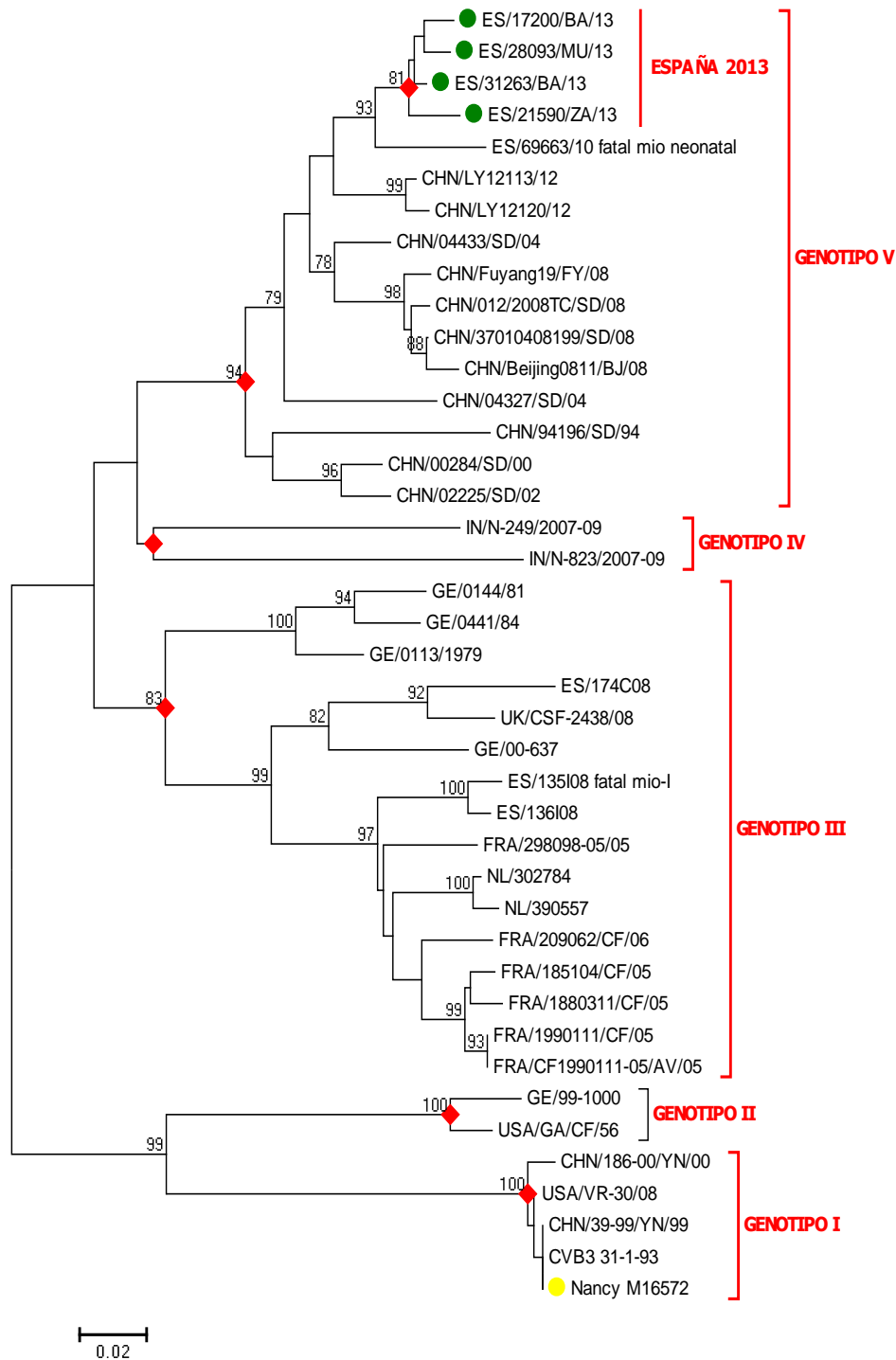


Fig. 4.9. Árbol filogenético obtenido con 41 secuencias de CV-B3 en la región VP1c basado en 852 nt. Los genotipos I-V están indicados. El programa MEGA 6.06 se usó para la construcción de los árboles con el método Neirgbor-Joining y el modelo de distancias Method Maximum Likelihooh (MCL) y 1000 pseudorepeticiones (bootstrap method). Solo se indican los valores de bootstrap $\geq 75\%$. Las cepas españolas de 2013 están indicadas por (●) y cepa prototipo (●).

Asimismo, se obtuvo la secuencia de aa de la proteína VP1 de las 4 cepas de CV-B3 estudiados, se analizaron comparando con secuencias obtenidas del GenBank reportadas como cepas virulentas y no virulentas. En concreto, se identificaron cambios de aa dentro del bucle BC, CD y DE. Se encontraron 3 sustituciones de aa dentro del bucle BC: S⁸⁰→L, A⁸⁴→S, K⁸⁵→R, en el bucle CD se encontró 3 sustituciones: L⁹²→V, P⁹⁴→T, P⁹⁴→A y en el bucle DE se encontró 1 sustitución: I¹³⁶→V (Tabla 4.1). Estos cambios de residuos en algunos casos pueden influir en la conformación espacial de la proteína VP1. Por ejemplo, en los cambios S⁸²→L y A⁸⁴→S (bucle BC), un aminoácido polar pasa a ser hidrófobo, lo cual si podría hacer que la posición de este residuo en la estructura 3D de la proteína varíe. Otros como K⁸⁵→R (bucle BC) seguramente no producen una distorsión en la estructura ya que ambos son aminoácidos básicos con una cadena lateral similar. Mediante técnicas de modelado por homología (ModWeb) y visualización de las estructuras 3D con RasMol v. 2.7.2.1, se observó que tanto la estructura de la proteína VP1 completa como la de solamente los bucles 80-138 para las 4 cepas de CV-B3 cambiaban ligeramente con respecto a las estructuras predichas para el prototipo Nancy (Fig. 4.10 y 4.11).

Tabla 4.1. Alineamiento de aa, indicando aquellos sustituidos en los bucles de la región VP1 de CV-B3 y PV.

Cepas de CV-B3	Aminoácidos sustituidos (bucles de la VP1)*		
	bucle - BC (80-87 aa)	bucle - CD (92-106 aa)	bucle - DE (124-138 aa)
PV-1 Mahoney ¹	F F A R G A C V	V D N P A S T T N K D K L F A	F F T Y S R F D M E L T F V V
CV-B3 Nancy ²	E N S G A K R Y	L T P R Q A A Q L R R K L E F	Q Q P S T T Q N Q D A Q I L T
Paciente 1	E N S G S R R Y	V T T R Q A A Q L R R K L E F	Q Q P S T T Q N Q D A Q V L T
Paciente 2	E N L G S K R Y	V T A R Q A A Q L R R K L E F	Q Q P S T T Q N Q D A Q I L T
Paciente 3	E N S G S K R Y	V T T R Q A A Q L R R K L E F	Q Q P S T T Q N Q D A Q V L T
Paciente 4	E N S G S K R Y	V T T R Q A A Q L R R K L E F	Q Q P S T T Q N Q D A Q I L T

¹ Cepa prototipo de Poliovirus Humano tipo 1 Mahoney, ² Cepa prototipo CV-B3 Nancy y

*Posición de aa en la región VP1 en la cepa prototipo CV-B3 Nancy.

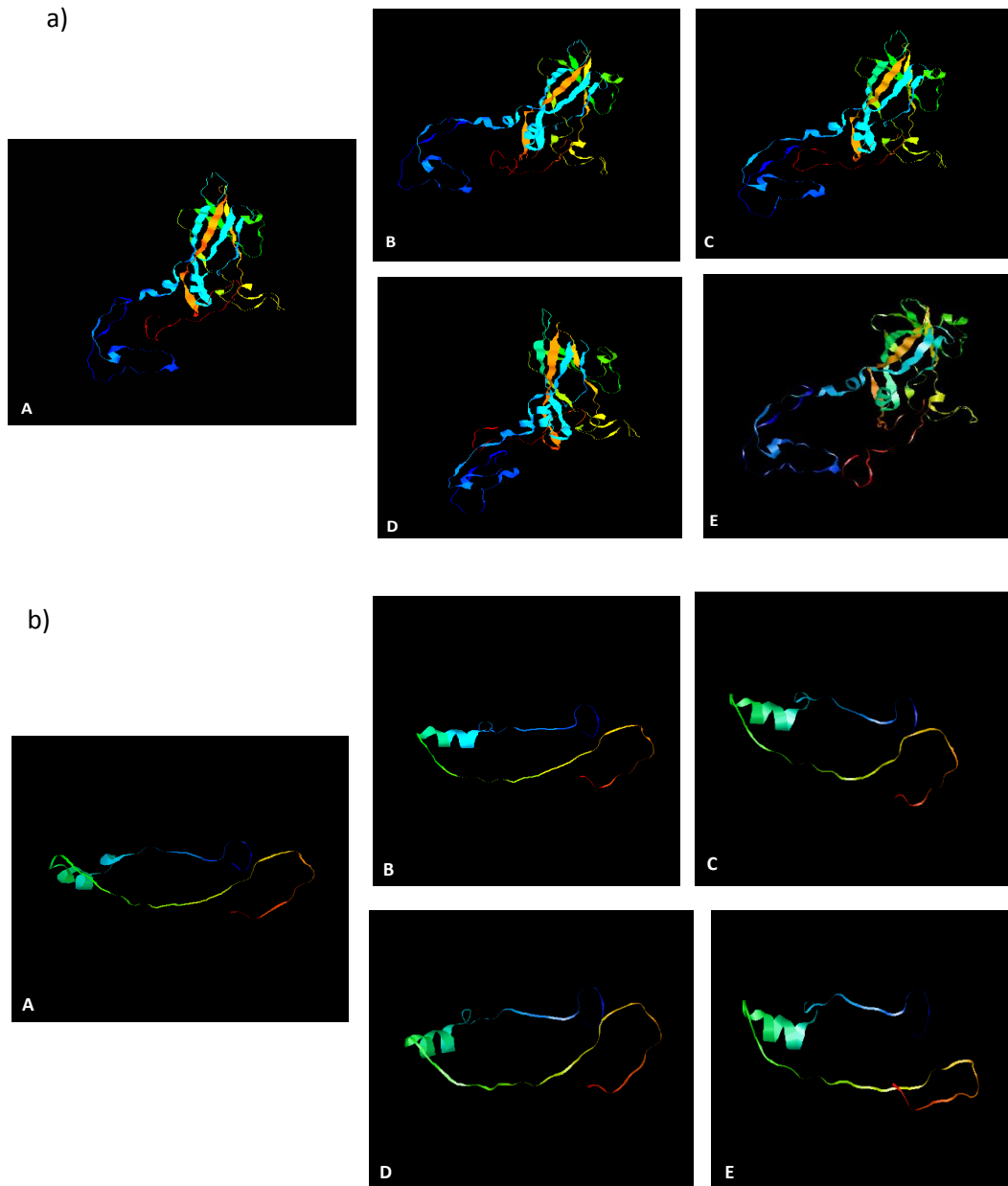


Fig. 4.10. Estructuras 3D de la proteína VP1 completa (a) y los bucles BC, CD y DE (aa88-138) (b) de las 4 cepas aisladas (P1-P4) y la cepa prototipo. Obtenidas por modelaje (ModWeb) y visualizadas por RasMol v. 2.7.1. A: Cepa prototipo CV-B3 Nancy, B: Paciente 1, C: Paciente 2, D: Paciente 3 y D: Paciente 4.

4.5. Análisis filogenético de la región 3Dpol

Se amplificó la región 3Dpol de los 4 aislados, observándose mediante electroforesis en gel de agarosa bandas de un tamaño de 549 pb (Fig. 4.12), que se purificaron y se secuenciaron para realizar un análisis filogenético que nos permitiera determinar si se había producido recombinación en esta región de las cepas CV-B3 estudiadas con otros EV de la misma especie B.

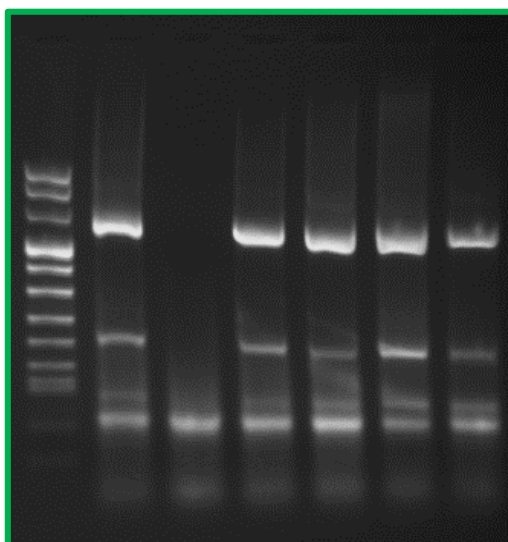


Fig. 4.12. Amplificación de la región 3Dpol 549 nt. Control positivo E-9, control negativo, y los 4 aislados de este estudio.

El árbol filogenético obtenido (con 104 secuencias entre cepas españolas de CV-B3 y otros EV-B) muestra que las cepas CV-B3 se intercalan con otras secuencias de diferentes serotipos de EV-B (Fig. 4.13). Esto indica la existencia de recombinación, ya que los distintos tipos no forman grupos monofiléticos como ocurre en la región VP1, donde la secuencia correlaciona perfectamente con el serotipo. Considerando únicamente las cepas de CV-B3, se puede considerar la existencia de 3 formas recombinantes (FR), A-C. La FR-A lo conforman el CV-B3 Nancy junto con otras secuencias más antiguas; la FR-B agrupa las 4 cepas aisladas en este estudio junto con otras 2 cepas circulantes de España del año 2010 (bootstrap 90%) y el FR-C lo conforman 2 cepas de CV-B3 aisladas de Francia. Sin embargo, otras cepas españolas se agrupan en otros clústers con serotipos distintos, como E-9, E-11 y E-30, lo que indica que existe una alta recombinación entre las secuencias.

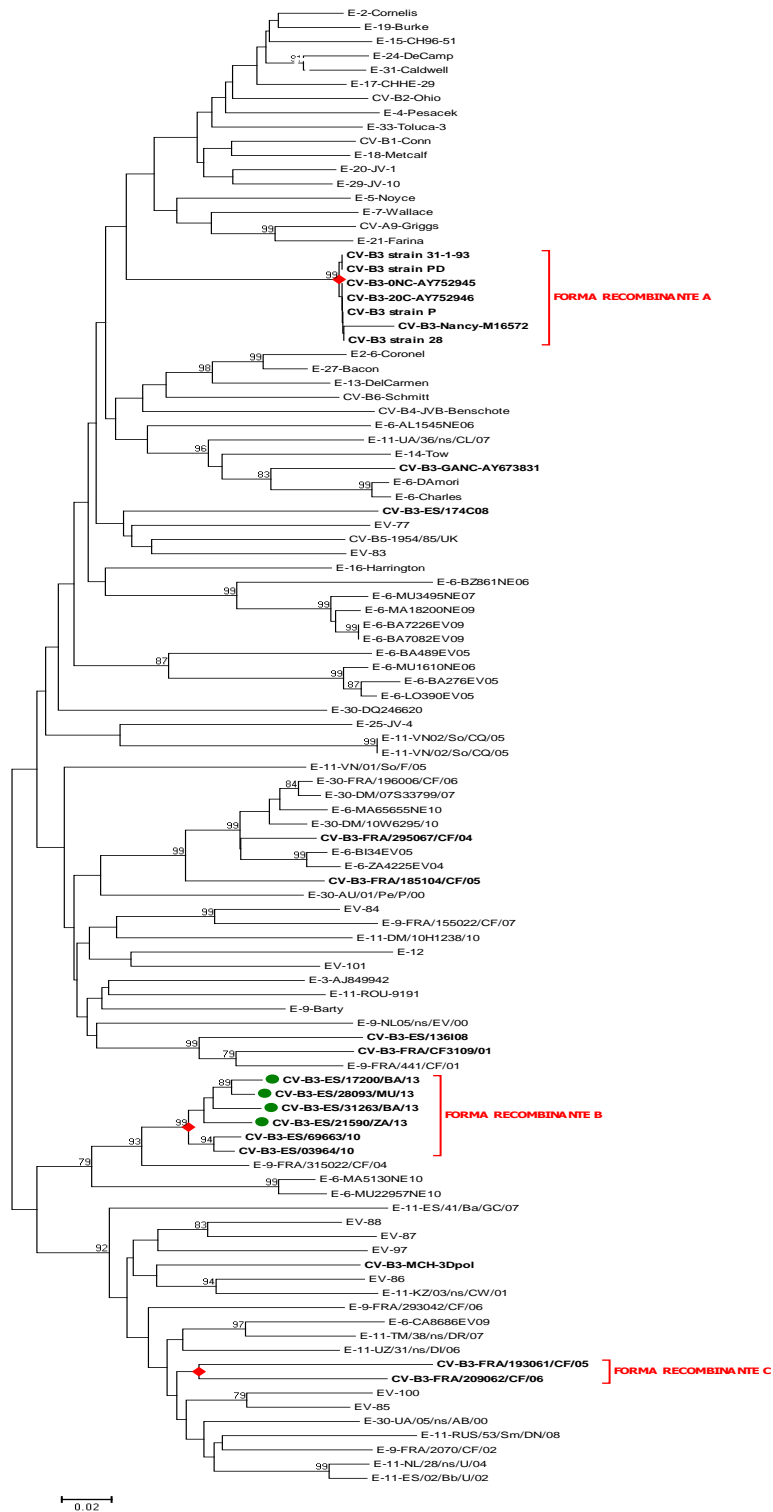


Fig. 4.13. Árbol filogenético obtenido con 104 secuencias de CV-B3 y EV en la región 3Dpol basado en 549 nt. Se indican las 3 formas recombinantes FR (A, B y C). Se usó el programa MEGA 6.06 para la construcción de los árboles con el método Neirgbor-Joining y el modelo de distancias Method Maximum Likelihood (ML) y 1000 pseudorepeticiones (bootstrap method). Solo se indican los valores de bootstrap $\geq 75\%$. Las cepas analizadas en este estudio están indicadas por ● y cepa prototipo ○.

4.6. Determinación *in vitro* de la cinética de replicación de las diferentes cepas de CV-B3 analizadas en 4 líneas celulares.

Las curvas de replicación de las 4 cepas de CV-B3 aisladas se ensayaron en 4 líneas celulares, Caco-2, A-549, Hep-2 y SH-SY-5Y, infectándolas con una concentración inicial de virus de 10 CCID₅₀/μL y cuantificando el virus en el sobrenadante de los cultivos los días 1, 3, 5 y 7 p.i. mediante RT-PCR a tiempo real, al mismo tiempo que se observaba el ECP. Los resultados se muestran en las gráficas de la Fig. 4.14.

La concentración de virus detectado (CCID₅₀/μL) se calculó con la curva patrón de concentración-ct (ciclo umbral, en el cual se detecta amplificación mediante la PCR a tiempo real) según Cabrerizo et al., (2014).

Todos los aislados procedentes de los pacientes 1 al 4 (P1-P4), fueron capaces de replicar en todas las líneas celulares, mostrando una rápida destrucción en la monocapa de las células, siendo la Hep-2 la más rápida en mostrar un ECP del 100% en el día 3 p.i., seguida de las Caco-2 (día 5 p.i.), A-549 y SH-SY-5Y (día 7 p.i.). El mayor nivel de replicación se observó para el aislado del P2 (10^5 - $10^{7.5}$ CCID₅₀/μL) en 3 de las 4 líneas los días 3-5 pi., mientras el CV-B3 que mostró una carga viral más baja fue el P3 con 10^4 CCID₅₀/μL, en las células neuronales y Hep-2.

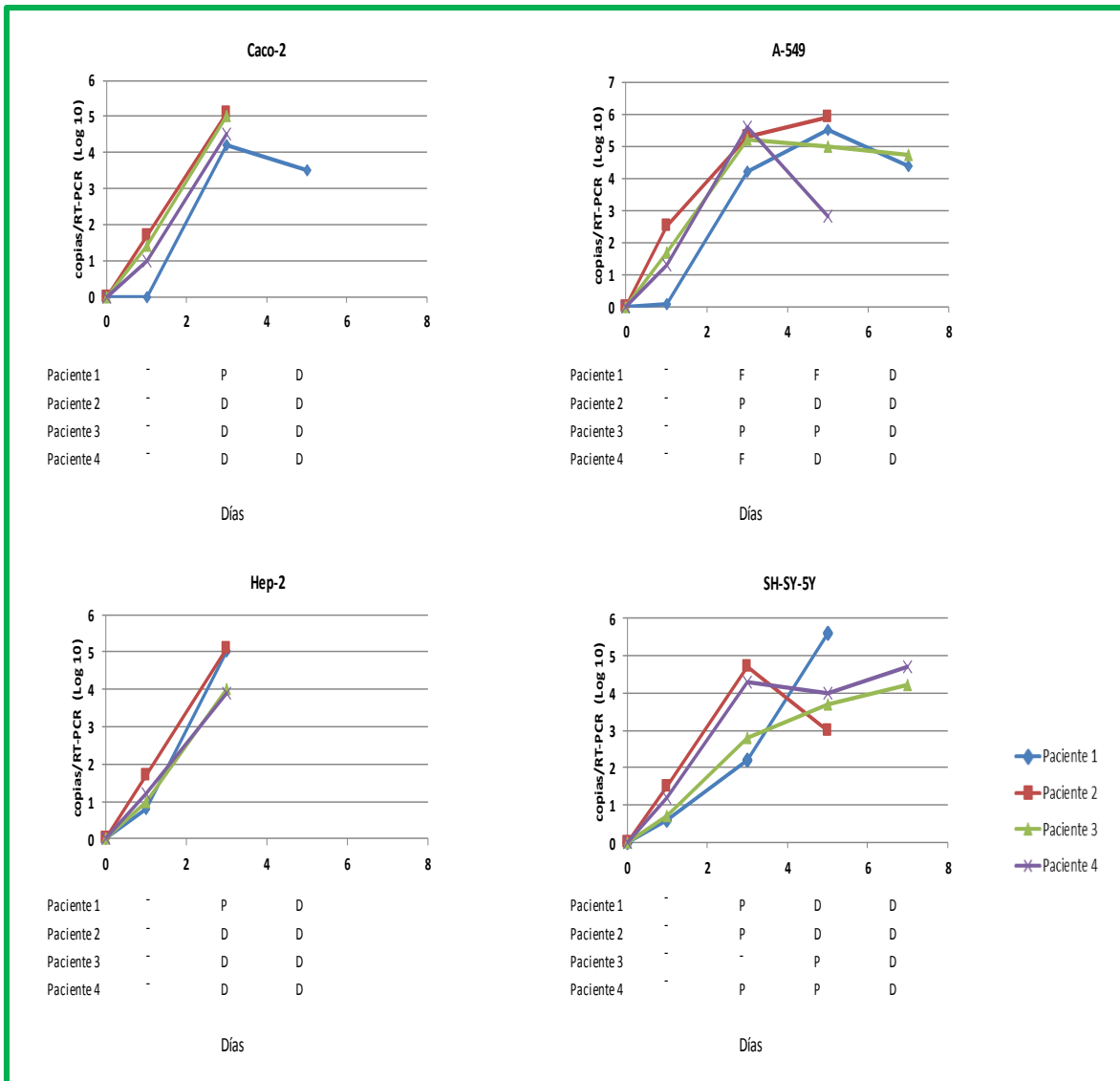


Fig. 4.14. Curvas de replicación de las cepas CV-B3 aisladas de pacientes (P1, 2, 3 y 4), donde el número de cepa corresponde con los números de pacientes (Ver Tabla 3.1). Líneas celulares: Caco-2, A-549, Hep-2 y SH-SY-5Y. (-): no se observa ECP; (P): 50% de ECP; (F): 30% de ECP y (D): 100x100 de ECP. La concentración del virus detectado fue calculada con una curva estándar (Cabrerizo et al., 2014).

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

En este estudio se presentan los resultados obtenidos del análisis de la secuencia de 4 cepas de CV-B3 en 3 regiones (5'NCR, VP1 y 3Dpol) implicadas en replicación y tropismo celular, con el objetivo de intentar relacionar la variabilidad genética con la diferente patogenicidad presentada por dichas cepas en diferentes pacientes (síndrome febril neonatal, exantema y síndrome respiratorio). Así mismo, se analizaron las cinéticas de replicación de cada uno de CV-B3 aislados en diferentes líneas celulares.

El análisis en 5'NCR mostró que los aislados de CV-B3 presentaban numerosos cambios de nucleótidos con respecto a la cepa prototipo Nancy. El fragmento amplificado contenía 4 de los 6 dominios con estructura secundaria (dominios II al V) que forman el IRES, cuya función principal es facilitar la iniciación de la traducción (Dunn et al., 2000). Pero también se ha demostrado que esta región tiene un papel importante en replicación y tropismo celular y en virulencia, al menos en algunos serotipos de EV (Gromeier et al., 1996; Bradrick et al., 2001). Con las secuencias obtenidas en las 4 cepas estudiadas, se obtuvieron las estructuras secundarias de ARN teóricas (mediante MFOLD) de cada uno de los dominios incluidos en el fragmento. A pesar de una diversidad de secuencia significativa en el dominio-II, las estructuras obtenidas fueron similares entre sí y con la cepa prototipo (Fig. 4.4). Bailey y Tappich (2007) determinaron que la virulencia en CV-B3 depende de la estructura del dominio II. Asimismo Bhattacharyya et al., (2008) concluyeron que las sustituciones y mutaciones en el dominio II pueden reducir la actividad específica del IRES. En nuestras cepas, las mutaciones encontradas en este dominio no parece que confieran virulencia a los CV-B3 ya que el cuadro clínico presentado por los pacientes no fue en ningún caso severo (Tabla 3.1). En este sentido, Tu et al., 1995 determinaron que el nucleótido 234 (dentro del dominio III) juega un papel en la determinación del fenotipo de cardiovirulencia. Construyeron cepas quiméricas a partir de secuencias de genomas del CV-B3 no cardiovirulentos, reemplazando el genoma por secuencias homólogas cardiovirulentas y obteniendo la expresión fenotípica de cardiovirulencia en el nucleótido 234 (C en CV-B3/0-no virulento y T en CV-B3/20-cardiovirulento). La aparición de inflamación y necrosis masiva en cardiomiocitos de ratones con la T₂₃₄ en 5' NCR confirmó su hipótesis. Sin embargo, en un trabajo posterior, Dunn et al., (2000) estudiaron los determinantes genómicos de cardiovirulencia del CV-B3 en la 5' NCR de diferentes aislados clínicos, concluyendo que el cambio sencillo de C→T₂₃₄ que confiere el fenotipo de cardiovirulencia en el CV-B3/0 no correlaciona con los fenotipos de cardiovirulencia

de múltiples cepas secuenciadas hasta la fecha de CV-B3, en las que la posición 234 era siempre T independientemente del fenotipo de virulencia. En este sentido, las 4 cepas de CV-B3 aquí estudiadas contienen una T en la posición 234 (Figura 4.3) y ninguna produjo una cardiopatía en los pacientes infectados (Tabla 3.1).

Con respecto a las estructuras secundarias de los dominios III y IV del IRES que se predijeron en las cepas estudiadas, la presencia de 1 bucle más y de 1 bucle menos (Fig. 4.5 y 4.6), respectivamente, confirieron mayor estabilidad teórica a estos dos dominios en comparación con la cepa prototipo (presentaban menor ΔG que la cepa prototipo). En el CV-B3 no se ha descrito que estos dos dominios interfieran con alguna función del IRES, sin embargo Bhattacharyya et al., (2008) sugieren que en los poliovirus y rhinovirus los cambios de nucleótidos dentro del dominio III y IV afectan drásticamente a la función del IRES en replicación. Por último, en el dominio V, nuestros aislados no presentaron estructuras secundarias más estables que la estructura del prototipo (Fig. 4.7).

El presente estudio también analizó la secuencia de la región VP1, que codifica para una de las proteínas que forma la cápside. El árbol filogenético basado en 852 pb, mostró que las diferentes cepas de CV-B3 se agrupaban en 5 genotipos (GI-GV), tal y como había propuesto Chu et al., (2010). Los genotipos GI-II están formados por cepas relativamente antiguas, incluida la cepa prototipo de 1949. Otras cepas que circularon en Estados Unidos, Alemania y China durante los años 1956-1999 constituyen los GI y II. El GIII abarca secuencias europeas (Francia, Holanda, Gran Bretaña, España) que circularon entre 2000 y 2008. El GIV se agrupó sólo con dos cepas de la India (2009) y por último, en el GV, con cepas de China del 2000-2012, es donde se agruparon las 4 cepas españolas del 2013, junto a otra detectada anteriormente, en 2010. Más aún, los 4 aislados de 2013 formaron un subclúster específico definido por un alto bootstrap (>80%) y con una divergencia estimada entre ellas muy baja (distancias 0.01-0.03) (Fig. 4.9). Como ocurre en otros serotipos de EV, la aparición de pequeños cambios en la secuencia de VP1 de CV-B3 es un fenómeno frecuente que permite a los virus escapar de la respuesta inmune, siendo responsables de la divergencia y la evolución molecular de estos virus a lo largo del tiempo.

A nivel de secuencia de aa de VP1, la mayoría de sustituciones se observaron en la región N-terminal, bucle-BC, bucle-CD y bucle-DE (Tabla 4.1), las cuales de una u otra manera podrían interferir con la infectividad y el escape a la respuesta inmunológica ya que estas regiones juegan un papel importante en la estabilidad de la partícula viral y en tropismo celular, y es donde se encuentra el mayor sitio de neutralización antigénica (Chu et al., 2010). Sin embargo, algunos de los cambios detectados con respecto a la cepa prototipo Nancy, como por ejemplo arginina por lisina en el aminoácido 85 (bucle

BC) seguramente no producen una distorsión en la estructura terciaria de la proteína VP1 ya que ambos son aminoácidos básicos con una cadena lateral similar. Sin embargo, el cambio de leucina a serina en el aminoácido 82 (bucle BC), donde un residuo polar pasa a ser hidrófobo, si podría influir en la conformación de la proteína. De hecho, al predecir mediante modelado por homología la estructura 3D de VP1, se observan ligeros cambios conformacionales, aunque probablemente no influyan en la funcionalidad de la proteína (Fig. 4.10 y 4.11). Esta hipótesis requiere de estudios más profundos a nivel de estructura proteica que la confirmen.

Parte de la región 3D que codifica para la polimerasa viral, también se analizó filogenéticamente. En el árbol construido, se observa como las secuencias de CV-B3 aparecen intercaladas entre otras cepas de distintos serotipos de EV de especie B. Es decir, en esta región cada serotipo no forma grupo monofilético como ocurre en VP1. Esto implica que se han producido fenómenos de recombinación, una propiedad muy característica de los EV (Lukashev et al., 2003).

Además, se observa que las 4 cepas de CV-B3 españolas aisladas en 2013 constituyen una única forma recombinantes (FR) ya que se agrupan juntas en un clúster con un 99% de bootstrap, junto con otras 2 cepas que circularon en España en 2010, y con una homología en la secuencia de aminoácidos en esta región mayor del 96%. Por otro lado, se observó que otras cepas españolas de CV-B3 que circularon anteriormente se terminan agrupando en otros clústers con serotipos distintos tales como E9, E11 y E30, lo que indica que éstas y otros virus sufrieron una recombinación diferente (Fig. 4.13).

Para terminar, en este trabajo se estudiaron *in vitro* las cinéticas de crecimiento de las 4 cepas de CV-B3 en distintas líneas celulares, epiteliales, gastrointestinales, pulmonares y neuronales, midiendo la presencia de ARN viral en el sobrenadante de cultivo mediante PCR. Los resultados mostraron que todas las cepas eran capaces de infectar y crecer en las 4 líneas celulares. Aunque algunas cepas de CV-B3 presentaban mejores cinéticas de replicación que otras según la línea celular, no se pudo concluir que existiera algún tipo de relación entre la capacidad de infectar tipos específicos de células y las manifestaciones clínicas causadas por cada cepa de CV-B3 en cada paciente incluido en este estudio (Tabla 3.1). Esto concuerda con los datos aportados por Westerhuis et al., (2012), quienes describieron ensayos similares pero con distintos tipos de parechovirus humanos, discutiendo que las líneas celulares utilizadas son líneas tumorales establecidas, con características específicas y que no tienen por qué representar exactamente un cultivo primario donde la expresión del receptor y la entrada a la célula puede diferir.

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este trabajo hemos llegado a las siguientes conclusiones:

- El análisis de la secuencia en la región 5'NCR de CV-B3 indicó que determinados cambios de nucleótidos con respecto a la cepa prototipo Nancy, pueden teóricamente estabilizar la estructura secundaria del ARN de los dominios que forman el IRES, afectando a su funcionalidad. Sin embargo, no parece que estos cambios estén asociados a una mayor patogenicidad de las cepas.
- Las 4 cepas de CV-B3 presentaron en la posición 234 una T, demostrándose que esta posición no determina exclusivamente el fenotipo de cardiovirulencia y que posiblemente existen otras posiciones específicas adicionales asociadas a virulencia.
- El análisis de la secuencia en la región VP1 permitió estudiar la variabilidad genética y la evolución molecular presentada por las cepas CV-B3 estudiadas. Asimismo, los cambios de aminoácidos detectados con respecto a la cepa prototipo Nancy reflejan cambios en la conformación 3D de la proteína, aunque probablemente la funcionalidad de la misma no se vería afectada.
- El análisis de la secuencia 3Dpol indicó la presencia de fenómenos de recombinación en esta región, observándose que las cepas de CV-B3 estudiadas forman una única forma recombinante.
- Por último, no se pudo determinar si existe algún tipo de relación entre la capacidad de infección de las distintas cepas CV-B3 estudiadas en diferentes tipos de células (neuronales, epiteliales o de pulmón) y las manifestaciones clínicas que los virus causaron los pacientes (fiebre neonatal, exantema o bronquitis).

CHAPTER 6. CONCLUSIONS

With the results obtained in this work have come to the following conclusions:

- The sequence analysis in the 5'NCR region of CV-B3 indicated that certain nucleotide changes compared to the prototype strain Nancy theoretically may stabilize the RNA secondary structure of the domain forming the IRES, affecting their functionality. However, it seems that these changes are associated with increased pathogenicity of strains.
- The 4 strains of CV-B3 at position 234 showed a T, showing that this position is not determined exclusively cardiovascular phenotype and possibly there are additional specific positions associated with virulence.
- The Analysis of sequence in the VP1 region allowed to study the genetic variability and molecular evolution by the CV-B3 strains studied. Also, the amino acid changes identified regarding prototype strain Nancy 3D reflect changes in protein conformation, although probably the same functionality would not be affected.
- The sequence analysis of 3Dpol indicates the presence of recombination events in this region, showing that the strains studied CV-B3 form a single recombinant form.
- Finally, we could not determine whether there is any relationship between the infectivity of different CV-B3 strains studied in different types (neuronal, or lung epithelial) cells and clinical manifestations that viruses caused patients (neonatal fever, rash or bronchitis).

CAPÍTULO 7. RECOMENDACIONES

- Ampliar los estudios filogenéticos de CV-B3 en distintas regiones del genoma viral con un número mayor de aislados clínicos de distintas sintomatologías clínicas, para estudiar la variabilidad genética y evolución molecular de este serotipo a lo largo de los años.
- Realizar más ensayos de cinéticas de replicación de los CV-B3 en otras líneas celulares y en cultivos primarios para estudiar si realmente existe una relación entre la capacidad infectiva de las cepas y las diferencias en patogenicidad mostradas por este serotipo.
- Ampliar los estudios de análisis de secuencia de nucleótidos en 5'NCR y de predicción de estructuras secundarias para mejorar nuestro conocimiento sobre la función de esta región y el dominio IRES en el serotipo CV-B3.
- Complementar los estudios de secuencia de aminoácidos VP1 con el análisis en el resto de las proteínas de la envuelta, obteniendo las estructuras 3D más probables y realizando posteriores experimentos *in vitro* para confirmar si los cambios observados correlacionan con un cambio en la funcionalidad de dichas proteínas.

CAPÍTULO 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antona, D., Lévêque, N., Chomel, J. J., Dubrou, S., Lévy-Bruhl, D., and B. Lina. 2007. Surveillance of enteroviruses in France, 2000-2004. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 26. p: 403-412.
- Bailey, J. M., and W. E. Tappich. 2007. Structure of the 5' nontranslated region of the Coxsackievirus B3 genome: chemical modification and comparative sequence analysis. *Journal of virology*, Vol. 81, No 2. p: 650-608.
- Barrios, J. A., Sarmiento, L., Valdés O., Mas, P., y R. Palomera. 2003. Aplicación de la secuenciación nucleotídica de VP1 a la identificación de Enterovirus humanos. *REV CUBANA MED TROP*; 55(3):133-7.
- Beiras, A. C., Monserrat, L., y M. Hermida. 2003. Miocardiopatía dilatada familiar: situación actual y beneficios clínicos de la investigación básica. *Rev Esp Cardiol*; 56 (Supl 1): 7-12.
- Bingjun, T., Yoshida, H., Yan, W., Lin, L., Tsuji, T., Shimizu, H., and T. Miyamura. 2008. Molecular typing and Epidemiology of non-polio enteroviruses isolated from Yunnan Province, the people's Republic of China. *Journal of Medical Virology*, 80. p: 670-679.
- Bradrick, S., Lieben, E., Carden, B. M., and J. R. Romero. 2001. A predicted secondary structural domain within the internal ribosome entry site of Echovirus 12 mediates a cell-type-specific block to viral replication. *Journal of Virology*, Vol. 75. No. 14. p: 6472-6481.
- Bhattacharyya, S., Verma, B., Pandey, G., and S. Das. 2008. The structure and function of cis-acting element located upstream of the IRES that influences Coxsackievirus B3 RNA translation. *Virology* 377. 345-354.
- Casas, I., Tenorio, A., Echevarría, J. M., Klapper, P. E., and G. Cleator. 1997. M. Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. *Journal of Virological Methods*; 66. p: 39-50.
- Cabrerizo, M., Echevarría, J. E., González, I., De Miguel, T., and G. Trallero. 2008. Molecular epidemiological study of HEV-B enteroviruses involved in the increase in meningitis cases occurred in Spain during 2006. *Journal of Medical Virology*; 80. p: 1018-24.

- Cabrerizo, M., Calvo, C., Rabella, N., Muñoz-Almagro, C., Del Amo, E., Pérez-Ruiz, M., Sanbonmatsu-Gámez, S., Moreno-Docón, A., Otero, A., and G. Trallero. 2014. Design and validation of a real-time RT-PCR for the simultaneous detection of enteroviruses and parechoviruses in clinical samples. *Journal of Virological Methods*, Vol. 208. p: 125-128.
- Carter, J. B, and V. A. Saunders, 2007: *Principles and applications virology*, John Wiley & Sons, Ltd, Road, Londres, Reino Unido.
- Centro Nacional de Epidemiología. Plan Nacional de Erradicación de la Poliomielitis. Vigilancia de la Parálisis Flácida Aguda, año 2013. Madrid 2014. www.isciii.es/ISCIII/es/.../fd...vigilancias.../InformePFA_2013. Consultado: 31/07/2014.
- CDC. 2010. Morbidity and mortality weekly report. Vol. 59. No. 48. P: 1574-1606. Centers for Disease Control and Prevention.
- Chiang et al., 2012. Comparing Molecular methods for early detection and serotyping of enteroviruses in throat swabs of pediatric patients. *PLoS ONE* 7(10). p: 1-6.
- Dunn, J., Chapman, N. M., Tracy, S., and J. R. Romero. 2000. Genomic determinants of cardiovirulence in Coxsackievirus B3 clinical isolates: localization to the 5' nontranslated region. *Journal Virology*, Vol. 74, No 10. p: 4787-4794.
- Chu, P.-Y., Ke, G.-M., Chen, Y.-S., Lu, P.-L., Chen, H.-L., Lee, M.-S., Chen, B.-C., Huang, T.-S., Li, Y.-C., Chou, L.-C., Wang, S.-Y., and K.-H. Lin. 2010. Molecular epidemiology of Coxsackievirus B3. *Infection, Genetics and Evolution* 10. p: 777-784.
- Gromeier, M., Alexander, L., and E. Wimmer. 1996. Internal ribosome entry site substitution eliminates neurovirulence in intergeneric poliovirus recombinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93. p: 2370-2375.
- Harrath et al., 2004. Coxsackievirus B3 Replication and Persistence in Intestinal Cells From Mice Infected Orally and in the Human Caco-2 Cell Line. *Journal of Medical Virology* 74: 283-290.
- How Ooi, M., Chang Wong, S., Lewthwaite, P., Cardosa, M, J., and T. Solomon. 2010. Clinical features, diagnosis, and management of enteroviurs 71. *Lancet Neurol*, 10. p: 1097-1105.

- Jasso, L., 2011. Congenital infections of low frequency in newborns: some relevant aspects. *Bol Med Hosp Infant Mex*; 68(1):6-18.
- Kemball et al., 2009. Coxsackievirus B3 Inhibits Antigen Presentation *In Vivo*, Exerting a Profound and Selective Effect on the MHC Class I Pathway. *PLoS Pathog* 5(10): 1-17.
- Khetsuriani, N., LaMonte-Fowlkes, A., Oberste, S., and M. A. Pallansch. 2007. Enterovirus surveillance-United States, 1970-2005. *Health Topics A - Z. CDC Home*. p: 1-33. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5508a1.htm>. Consultado: 6/08/2014.
- Khetsuriani, N., Kutateladze, T., Zangaladze, E., Shutkova, T., Peñaranda, S., Nix, W. A., Pallansch, M. A., and M. S. Oberste. 2010. High degree of genetic diversity of non-polio Enteroviruses identified in Georgia by environmental and clinical surveillance, 2002-2005. *Journal of Medical Microbiology*, 59. p: 1340-1347.
- Knowles et al., 2012. *Picornaviridae*. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. San Diego: Elsevier. p: 855-880. www.picornaviridae.com. Consultado: 25/06/2014.
- Leitch, E.C., Bendig, J., Cabrerizo, M., Cardoso, J., Hyypiä, T., Ivanova, E., Kelly, A., Kroes, A. C. M., Lukashev, A., MacAdam, A., McMinn, P., Roivanen, M., Trallero, G., Evans, D. J., and Simmonds. 2009. Transmission networks and population turnover of Echovirus 30. *Journal of Virology*, Vol. 83, No.5. p: 2019-2118.
- Limonta, D., Batista, J.F., Riaño, M.A., y A. Abdo. 2011. Miocarditis viral en el adulto. *Revista Cubana de Medicina*: 50(1) 70-82.
- Lukashev, A. N., Lashkevich, V. A., and J. Ilonen. 2003. Recombination in circulating enteroviruses. *Journal of Virology*, 77. p: 10423-10431.
- Monserrat, L., Hermida, M., Bouzas, B., Mosquera, I., Mahon, N., Peteiro, J., Álvarez, N., Penas- Lado, M., Crespo, M., y A, Castro-Beiras. 2002. Familial Dilated Cardiomyopathy in Patients Transplanted for Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Rev Esp Cardiol*. 55(7): 725-32.

- Ochiai, H., Campbell, S. A., Archer, G. E., Chewing, T. A., Dragunsky, E., and A. Ivanov. 2006. Enteroviruses surveillance-United States, 2002-2004. *Clin Cancer Res*, 12. p: 1349-1354
- Palacios, G and MS. Oberste. 2005. Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. Review. *Journal of NeuroVirology*, 11: 424-433.
- Palacios et al., 2010. Human Enterovirus. Cohen, Powderly, Opal: *Infectious Diseases*. Third Edition. Elsevier. Vol. 2. p: 1528-1538.
- Rhoades et al., 2011. Enterovirus infections of the central nervous system Review. *Virology*. 411(2): 288-305.
- Roth, B., Enders, M., Arents, A., Pfitzner, A., and E. Terletskaia-Ladwig. 2007. Epidemiologic aspects and laboratory features of enteroviruses infections in Western Germany, 2000-2005. *Journal of Medical Virology*, 79. p: 956-962.
- Solomon, T., Lewthwaite, P., Perera, D., Cardoso, M, J., McMinn, P., and M. How Ooi. 2010. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect Dis*, 10. p: 778-790.
- Tamura K., Nei M., and Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*30: 2725-2729.
- Trallero et al., 2000. Enteroviruses in Spain: virological and epidemiological studies over 10 years (1988-97). *Epidemiol. Infect.* 124: 497-596.
- Trallero et al., 2010. Enteroviruses in Spain over the decade 1998-2007: Virological and epidemiological studies. *Journal of Clinical Virology*. 47: 170-176.
- Tu, Z., Chapman, N. M., Hufnagel, G., Tracy, S., Romero, J. R., Barry, W. H., Zhao, L., Gurrey, K., and B. Shapiro. 1995. The cardiovirulent phenotype of Coxsackievirus B3 is determined at a single site in the genomic 5' nontranslated region. *Journal of virology*, Vol. 69, No 8. p: 4607-4618.

- Tuthill et al., 2010. Picornaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 343: 43-89.
- Vargas, M. 2013. Miocarditis virales como causa de muerte súbita, aproximación al diagnóstico molecular en patología forense. *Medicina Legal de Costa Rica- Edición Virtual.* Vol. 30(2). ISSN 1409-0015
- Westerhuis et al., 2012. Specific cell tropism and neutralization of human Parechovirus types 1 and 3: implications for pathogenesis and therapy development. *Journal of General Virology.* 93: 2363-2370.
- Westerhuis et al., 2013. Growth characteristics of human Parechovirus 1 to 6 on different cells lines and cross- neutralization of human parechovirus antibodies: a comparison of the cytopathic effect and real time PCR. *Virology Journal.* 10:146.
- WHO, 2004. Polio laboratory manual. IVB. Geneva, Switzerland. 4th edition: 1-157.

CAPÍTULO 9. VALORACION PERSONAL

- El máster de Virología ha incorporado en mi carrera, conocimientos detallados de los virus su patogenia en las diversas enfermedades.
- Mi estancia en el Laboratorio de Enterovirus del Centro Nacional de Microbiología del Instituto Salud Carlos III, ha contribuido en mí, conocer y manejar las técnicas de biología molecular, cultivos que se usan en el campo de la virología, sobre todo en el diagnóstico molecular de los Enterovirus.
- Las clases y pláticas recibidas durante el máster, me ha servido para conocer a profesionales e investigadores en el campo de la virología.
- Este máster me estimula a que continúe con los estudios de Doctorado e investigación en el campo de la inmunología, virología y genética.