

RCCV

Revista Complutense de Ciencias Veterinarias

MASTER DE VIROLOGIA

Facultad de Veterinaria

Universidad Complutense de Madrid (UCM)

RESUMENES TRABAJOS FIN DE MASTER

CURSO 2013/14

REVISTA COMPLUTENSE DE CIENCIAS VETERINARIAS

ISSN	1988-2688
AREA	Ciencias de la Salud
MATERIA	Veterinaria
CENTRO	Facultad de Veterinaria
EDITOR	Servicio de Publicaciones de la Universidad Complutense de Madrid
TIPO	Científica
PERIODICIDAD	Semestral
IDIOMA	español, inglés

CONSEJO ASESOR	Director: Luis Revuelta Rueda (Universidad Complutense de Madrid, España) Secretaria de Redacción: María Arias Alvarez (Universidad Complutense de Madrid, España) Consejo Editorial: Adelfa del Carmen García Contreras (Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México) Arturo Anadón Navarro (Universidad Complutense de Madrid, España) Carlos García Artiga (Universidad Complutense de Madrid, España) Carmen Pérez Díaz (Universidad Complutense de Madrid, España) Cristina Ortiz Díez de Tortosa (Universidad Complutense de Madrid, España) Edgar Carlos Quispe Peña (Universidad Nacional de Huancavelica, Perú) Esther Collantes Fernández (Universidad Complutense de Madrid, España) Gonzalo García de Fernando Minguillón (Universidad Complutense de Madrid, España) Luis Ortiz Vera (Universidad Complutense de Madrid, España) Rosario Martín Ortí (Universidad Complutense de Madrid, España) Teresa García López (Universidad Complutense de Madrid, España) Teresa Miras Portugal (Universidad Complutense de Madrid, España).
---------------------------	---

**DIRECCION
POSTAL** Departamento de Fisiología (Fisiología Animal). Facultad de Veterinaria, UCM. Avda. Puerta de Hierro, s/n. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid.

LUGAR Madrid

Su objetivo es promover la difusión de la investigación básica y aplicada, como integración de las principales áreas de conocimiento adscritas en los diversos campos de las Ciencias Veterinarias y de los Alimentos. También aporta contenidos relativos a la Salud Pública, Seguridad Alimentaria y Medio Ambiente.

ESTUDIO DE LA TIROSINA 98 DE LA RECOMBINASA G35P DEL BACTERIÓFAGO SPP1

Alonso de Andrés, Verónica; Ayora Hirsch, Silvia

Centro Nacional de Biotecnología (CNB). Campus de Cantoblanco. 28049 Madrid

La replicación del bacteriófago SPP1 se inicia por replicación tipo theta (θ), y tras una o más rondas de replicación, se produce un cambio dependiente de recombinación a replicación tipo sigma (σ) sintetizándose ADN concatémico que es esencial para el correcto empaquetamiento del ADN en la procápside. SPP1 transcribe un número de genes esenciales implicados en el cambio de replicación y generación del concatémico. Uno de estos genes, localizado en el promotor PE3, codifica la proteína G35P. La proteína G35P es una recombinasa de la familia Red13 capaz de unirse a ADN de cadena sencilla y de cadena doble, además de catalizar la reacción de anillamiento de cadenas entre un ADN de cadena sencilla circular y una cola homóloga 3' de un ADN de cadena doble. Aun no se ha podido obtener la estructura por difracción de rayos X de G35P, por lo que se desconocen los dominios encargados de su actividad. Este trabajo tiene como objetivo localizar residuos de G35P que pudieran estar involucrados en las distintas actividades descritas para la proteína. Mediante mutagénesis dirigida, se ha construido el mutante G35P-Y98A y se ha desarrollado un protocolo de purificación. Ensayos de unión de la proteína G35P-Y98A a ADN muestran que la mutación en el residuo Y98 afecta a la capacidad de unión a ADN de cadena sencilla.

Palabras clave: bacteriófago SPP1, recombinasas de la familia Red, replicación de ADN, recombinación homóloga.

PROPAGACIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADENOVIRUS DE SERPIENTE TIPO 1 (SnAdV-1). PROPIEDADES INFECTIVAS Y ESTRUCTURALES

**Arenas Carreño, Verónica; San Martín Pastrana, M^a Carmen; Condezo Castro,
Gabriela Nérida**

Centro Nacional de Biotecnología (CNB). Campus de Cantoblanco. 28049 Madrid

El primer adenovirus de reptil secuenciado e incluido dentro del género *Atadenovirus* fue el adenovirus de serpiente tipo 1 (SnAdV-1). Aunque son muchos los estudios realizados sobre este adenovirus, aún quedan por dilucidar bastantes aspectos sobre su naturaleza, estructura e infectividad. En el presente trabajo se ha intentado estandarizar unas mejores condiciones para su propagación en células de corazón de iguana de la línea IgH-2 para su posterior purificación, determinando que temperaturas de 37°C permiten acortar el tiempo para obtener

la misma cantidad de virus purificado con respecto a temperaturas inferiores de 28°C. Además este nuevo protocolo ha permitido conseguir un número de partículas infectantes prácticamente constante y de composición proteica apenas variable entre distintas purificaciones.

Palabras clave: Adenovirus, propagación, purificación, optimización

UNA BAJA PROPORCIÓN DE VARIANTES DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C DE ALTO FITNESS ES SUFICIENTE PARA INCREMENTAR EL FITNESS DE TODA LA POBLACIÓN: RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON TELAPREVIR DE POBLACIONES MIXTAS

Blanco Rodríguez, Guillermo; Perales Viejo, Celia

**Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Campus de la Universidad Autónoma.
28049 Madrid**

El virus de la hepatitis C pasado cien veces en cultivo celular (p100) muestra un *fitness* incrementado y una resistencia parcial a numerosos antivirales. El mecanismo de resistencia a los antivirales no está relacionado con la presencia de mutaciones de resistencia en la cuasiespecie sino con mutaciones que incrementan su *fitness* replicativo. Estudios anteriores demuestran que dos poblaciones virales de distinto *fitness* pueden interaccionar engullendo la población de eficacia reducida a la de mayor *fitness*. El objetivo de este trabajo se centra en contestar a esta preguntas: ¿puede el virus p100 ser absorbido por una población mayoritaria de un virus de *fitness* más bajo? ¿el tratamiento con Telaprevir altera esta interferencia? Los datos recogidos en este trabajo sugieren que el p100 arrastra toda la población viral incluso en presencia de Telaprevir, incrementando el *fitness* de la mezcla.

Palabras clave: Hepatitis C, Telaprevir , dinámica de cuasiespecies , resistencia , *fitness*

EL RATÓN HUMANIZADO PARA LA MOLÉCULA CD69 (HUCD69:CD69-/-) COMO MODELO DE INTERVENCIÓN ANTIVIRAL. ACCIÓN TERAPÉUTICA ANTI-VACCINIA

Bueno Cañones, Raquel; Lauzurica Gómez, Pilar

Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. 28220 Madrid

CD69 es un receptor de membrana que se expresa rápidamente tras la activación en todas las poblaciones leucocitarias. Gracias a estudios con ratones deficientes en CD69, se ha descrito el papel de la molécula murina como controlador de la respuesta inmune e inflamatoria. Al no existir ningún modelo para el estudio de CD69 humano *in vivo*, se plantea en este proyecto abordar la caracterización de un modelo transgénico de ratón humanizado que porta 110Kpb conteniendo el gen y las regiones reguladoras de la molécula CD69 (*huCD69:CD69^{-/-}*). Los resultados obtenidos muestran un patrón de expresión de CD69 humana similar al observado en la molécula murina endógena, en todas las poblaciones estudiadas excepto en linfocitos B, donde la expresión de huCD69 es constitutiva. En un estado basal, la homeostasis de poblaciones hematopoyéticas en el modelo humanizado no se vio alterada y tampoco se observaron anomalías frente a la infección con *Vaccinia*. De este modo podemos aceptar el modelo transgénico como válido para el estudio de CD69 humano. Además, ensayos terapéuticos empleando anticuerpos anti-huCD69, en un contexto de infección viral, muestran cambios inducidos por el anticuerpo, que parecen fomentar una reducción del título viral en los experimentos preliminares realizados.

Palabras clave: ratón humanizado, CD69, expresión

REPROGRAMACIÓN DIRECTA DE FIBROBLASTOS HUMANOS A HEPATOCITOS FUNCIONALES MEDIANTE LENTIVIRUS QUE EXPRESAN FACTORES DEFINIDOS

Bustos Tauler, José; Segovia Sanz, José Carlos; García Bravo, María

Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT).

28040 Madrid

La enfermedad hepática es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en el mundo, siendo hasta ahora el trasplante de hígado el tratamiento de elección. Sin embargo, el trasplante hepático tiene limitaciones como el bajo número de donantes, la dificultad de la técnica quirúrgica y el riesgo de rechazo del trasplante. Debido a estas limitaciones, se están evaluando fuentes celulares alternativas para aquellos pacientes que presentan enfermedades metabólicas o genéticas, en las que el injerto de un número limitado de células funcionales pudiera tener un efecto terapéutico. En el presente trabajo se han identificado combinaciones de factores de transcripción hepáticos que, mediante su expresión tras transducción lentiviral y cultivo *in vitro* en un medio específico de hepatocitos, son capaces de reprogramar fibroblastos humanos a células similares a hepatocitos (hepatocitos inducidos, iHep). Estos

iHep presentan silenciamiento de genes específicos de fibroblastos, cambios morfológicos que les asemejan a hepatocitos, expresión de genes hepáticos y adquisición de determinadas funciones características de hepatocitos. Pensamos que los iHep podrían ser una alternativa al tratamiento de la enfermedad hepática y evitarían algunos de los problemas asociados al trasplante de órgano.

Palabras clave: células madre, iHep, hepatocitos, fibroblastos, reprogramación

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y REPLICACIÓN *JN-VITRO* DE COXSACKIEVIRUS 83: IMPLICACIONES EN LA PATOGENICIDAD

Calderón Mayo, Katherine Ivette; Cabrerizo Sanz, María

Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. 28220 Madrid

El serotipo de enterovirus coxsackievirus (CV)-83 se ha asociado con infecciones que abarcan desde síndromes febriles hasta enfermedades más graves, 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-83 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 11-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-83 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-83 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 clave: Coxsackievirus 83, análisis filogenético, RT-PCR, cultivos celulares

PUESTA A PUNTO Y ANÁLISIS DE PERFILES DE CITOQUINAS POR QPCR EN MODELOS EXPERIMENTALES DE INFECCIÓN Y VACUNACIÓN FRENTE A ARBOVIRUS Y CURVAS DE REPLICACIÓN

Carretero Monteagudo, Jaime José; Brun Torres, Alejandro

Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA). Valdeolmos. 28130 Madrid

En este estudio se expone la puesta a punto de una técnica de PCR cuantitativa (qPCR)-SYBR® Green para analizar perfiles de expresión de citoquinas de ratón (IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23R, IFN- γ y TNF- α) obtenidos a partir de esplenocitos estimulados con LPS, ConA y PHA, y oveja (IL-1, IL-4, IL-12, IFN- γ y TNF- α) extraídos de linfocitos de sangre periférica (PBLs) estimulados con LPS y ConA. Para ello, se realizaron amplificaciones de cada fragmento por PCR convencional y se ligaron al plásmido pGEM-T. Estas secuencias ligadas se utilizaron como patrón para la puesta a punto. Una vez establecidas las condiciones, se realizaron cuatro experimentos adicionales para probar la eficacia de la técnica: un ensayo de infección de ratones IFNAR (-/-) con el virus de la lengua azul (BTV), una inmunización de ratones utilizando un vector de vaccinia (MVA) modificado para expresar dos proteínas de BTV, un ensayo de inmunización de ratón con un vector MVA modificado para expresar proteínas del virus de la fiebre del Valle del Rift (RVFV) y desafío con tres péptidos sintéticos derivados de las mismas; y un ensayo de caracterización de la línea celular ovina. Se demostró que la técnica de qPCR era funcional, rápida, sensible y útil para el estudio de la respuesta inmune en una gran cantidad de casos.

Palabras clave: qPCR, citoquinas, ratón, oveja, vacuna.

ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN ANTI-VIH DE DERIVADOS FORBÓLICOS Y DITERPÉNICOS AISLADOS DE *EUPHORBIA SPP.*

De a Torre Tarazona, Humberto Erick, José Alcamí Pertejo, Luis Miguel Bedoya del Olmo

Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. 28220 Madrid

La terapia antirretroviral no es capaz de curar la infección por el VIH-1, debido a que no puede erradicar ni prevenir la formación de los reservorios biológicos del virus. Además, la administración de algunos fármacos ha sido asociada a toxicidad. Por ello, son necesarias nuevas estrategias que incluyan la eliminación de estos reservorios. En este trabajo se han analizado una serie de derivados forbólicos y diterpénicos aislados de *Euphorbia spp.* Se seleccionaron los compuestos más potentes y se estudió sus mecanismos de acción. El compuesto LF3-52-2-1, un 4-deoxiforbol, induce la internalización de los receptores del VIH-1 CD4, CXCR4 y CCR5, además de ser un potente antagonista de la latencia del VIH-1 en el

rango nanomolar. Los compuestos LF3-107-1, diterpeno, y LF3-103-2, diterpenoide premirsinol, también inducen la internalización de receptores, y poseen un mecanismo adicional distinto a la interferencia de la entrada del virus. El 4-deoxiforbol tuvo la capacidad de reactivar la transcripción del VIH-1 en linfocitos humanos, además de activar las regiones LTR y NF- κ B en estas células. Además, bloqueando la vía de activación de PKCs y la vía de Ras-MAPK con inhibidores de PKC θ y de MEK, respectivamente, se puede bloquear la reactivación del VIH-1 que produce el 4-deoxiforbol. Por tanto, esta clase de compuestos podrían ser considerados para el desarrollo de nuevos fármacos frente al VIH y como reactivadores de los reservorios virales.

Palabras clave: VIH, terapia antirretroviral, reservorios biológicos, internalización de receptores, activación de la latencia viral.

AISLAMIENTO EN CULTIVO CELULAR DEL PARECHOVIRUS HUMANO TIPO 3 (HPEV-3) Y CARACTERIZACIÓN GENÓMICA: IMPLICACIONES EN PATOGENICIDAD

Díaz de Cerio Flores, María; Cabrerizo Sanz, María

Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. 28220 Madrid

El parechovirus (HPeV)-3 es el HPeV que se asocia más frecuentemente con patologías neurológicas graves en niños pequeños. Debido a su difícil crecimiento en cultivo celular, el HPeV-3 no se ha podido estudiar en profundidad, por lo que la información sobre su tropismo o capacidad infectiva que puedan condicionar la patogenicidad es todavía escasa. Los objetivos de este estudio fueron: genotipar los HPeV detectados en 13 niños con fiebre, sepsis o meningo-encefalitis; estandarizar un método de cultivo para HPeV-3; y analizar la secuencia de las regiones S'UTR y VP1, implicadas en replicación y traducción, y en inmunidad y unión al receptor, respectivamente. Se confirmó el genotipo HPeV-3 en 12 de los virus detectados, pero sólo tres muestras fueron capaces de crecer en cultivo con las condiciones optimizadas previamente. Los cambios de nucleótidos observados en S'UTR y las estructuras secundarias predichas mostraron diferencias en la estabilidad de algunos dominios con respecto al prototipo. En VP1 también se observaron cambios en los aminoácidos pero no se pudo estudiar si afectaban a la conformación espacial de la proteína y a su funcionalidad. Es necesario realizar más estudios que permitan definir si estos cambios de secuencia se relacionan con una mayor patogenicidad de HPeV-3.

Palabras clave: Parechovirus, HPeV-3, cultivo viral, enfermedades neurológicas, RT-PCR, análisis de secuencia

VARIANTES DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 6 EN HOMBRES QUE PRACTICAN SEXO CON HOMBRES (HSH)

Gallego Rioja, Irene; Ortiz Rivera, Marta; Torres Hortal, Montserrat

Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. 28220 Madrid

El objetivo del presente trabajo fue la caracterización de variantes del virus del papiloma humano (VPH) 6 en muestras anales de hombres que practican sexo con hombres (HSH), mediante análisis filogenético en las regiones E6 y L2, y su distribución en función de las características sociodemográficas y clínicas de los pacientes. El 68,6% de los pacientes estaban infectados por VIH-1, el 54,9% eran españoles y el 37,3% latinoamericanos. La mediana de edad fue de 31,2 años. El 84,3% presentó una citología anal alterada y el 31,4% presentó lesión por condilomas. Las variantes de VPH6 pertenecientes al linaje 8 fueron las mayoritarias (96, 1%), siendo el sublinaje 81 el más frecuente (60,8%), seguido por los sublinajes 83, 82 y 85 (29,4%, 3,9% y 2%, respectivamente). No se observaron diferencias por estatus VIH, resultados citológicos o presencia de condilomas. El sublinaje 81 fue más común en españoles y el sublinaje 83 en latinoamericanos. Se puede concluir que en la población de estudio se han detectado variantes pertenecientes a todos los linajes y sublinajes descritos en VPH6, excepto el sublinaje 84. Los resultados obtenidos están en consonancia con datos recientemente publicados donde los sublinajes 81 y 83 se relacionan con infecciones anogenitales y el sublinaje 83 es más común en África y América.

Palabras clave: VPH6, variantes, HSH

EFFECTO DE LA REPLICACIÓN DEL PRIÓN EN LA ACUMULACIÓN DE DEPÓSITOS DE B-AMILOIDE IN VIVO

García Contreras, Consolación; Torres, Juan María; Ordóñez Gutiérrez, Lara

Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA). Valdeolmos. 28130 Madrid

Las enfermedades priónicas o encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs) son enfermedades neurodegenerativas letales caracterizadas por un cambio conformacional en la proteína priónica celular (PrP^c), resultando una proteína patógena mal plegada (PrP^{sc}). Además de la PrP, otras proteínas mal plegadas pueden producir enfermedades

neurodegenerativas como tau y 13-Amiloide (13A) en la enfermedad de Alzheimer (EA), a-sinucleína en la enfermedad de Párkinson o huntingtina en la enfermedad de Hungtinton. La idea de que algunas enfermedades neurodegenerativas como EA, podrían propagarse en cerebro mediante un mecanismo "*prion-like*" se está consolidando, sugiriendo que estas "enfermedades conformacionales" (PMD) tienen un origen infeccioso. Estudios previos han demostrado que los niveles de expresión de PrPc tienen un efecto sobre la agregación y acumulación de placas insolubles de 13A en cerebro. La finalidad del presente trabajo es analizar la formación y acumulación de 13A en cerebro durante la infección con un prión en ratones transgénicos APP^{swe}/PS 1 dE9, frecuentemente utilizados en el estudio de la EA. Los resultados preliminares mostraron un aumento en la acumulación de 11A en comparación con los ratones controles, inoculados con cerebro sano. Estos resultados sugieren que la replicación del prión tiene un efecto sobre la dinámica de acumulación de 13A.

Palabras clave: Prión, EET, 13-Amiloide, Alzheimer, *prion-like*, PrP.

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DEL SARAMPIÓN EN ESPAÑA. GENOTIPO D4.

**Gómez Vecino, Aurora; Echevarría Mayo, Juan E.; Fernández García, Aurora
Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. 28220 Madrid**

En este estudio se evaluaron los patrones de circulación epidemiológica del genotipo D4 en España (2008-2012). En el contexto del Plan de Eliminación del sarampión auspiciado por la OMS para la Región Europea, es importante caracterizar los genotipos circulantes del virus y trazar las cadenas de transmisión. Se analizaron 1.636 secuencias de genotipo D4 pertenecientes a la región hipervariable N450 que codifica el extremo C-terminal de la nucleoproteína del genoma del virus del sarampión obtenidas de GenBank y MeaNS. Tras alinearlas se realizaron análisis de distancias y árboles filogenéticos por métodos basados en máxima verosimilitud. El soporte de los nodos se consideró significativo para valores de "bootstrap" superiores a 0,80. Se encontraron 41 haplotipos diferentes en España pertenecientes la mayoría a las variables más prevalentes en Europa, además de algunas de nueva descripción. Además se desarrolló una RT-PCR anidada que permite amplificar una región intergénica altamente variable. Se confirma la detección de las mismas variantes circulantes en Europa durante el período de estudio y la identificación de una nueva variante Española: D4-Madrid que causó brotes locales siendo posteriormente detectada en otros

países europeos. La nueva RT-PCR será útil para diferenciar cadenas de transmisión del virus en grandes brotes.

Palabras clave: sarampión, epidemiología, diagnóstico, variantes, RT-PCR

OPTIMIZACIÓN DE UNA VACUNA FRENTE A LA LEISHMANIASIS

Iglesias Caballero, María de la Montaña; Esteban Rodríguez, Mariano; Mejías Pérez, Ernesto; Sánchez Sampredo, Lucas

Centro Nacional de Biotecnología (CNB). Campus de Cantoblanco. 28049 Madrid

La leishmaniasis es un complejo de enfermedades parasitarias causadas por varias especies del género *Leishmania*. Según los datos de la Organización Mundial de la Salud la enfermedad es prevalente en 90 países y considerada una de las diez enfermedades infecciosas más importantes del mundo con 12 millones de infectados. Su tratamiento es largo, caro, muy tóxico y no existe ninguna vacuna aprobada actualmente. Varios candidatos vacunales, entre los que se encuentra el virus Ankara (vaccinia) modificado (MVA) recombinante que expresa el antígeno LACK, han sido probados aportando protección al estimular linfocitos T CD4+ colaboradores específicos para el parásito y linfocitos T coa+ citotóxicas. Con el propósito de aumentar la inmunogenicidad del virus MVA-LACK, esta investigación se centra en el diseño de un nuevo virus MVA capaz de secretar el antígeno LACK. Este cambio tiene el objetivo de incrementar los niveles de respuesta T CD4+ T H1 frente al antígeno LACK, debido a que descubrimientos recientes apuntan a esta población de células como la clave para inducir protección frente a la enfermedad.

Palabras clave: Leishmaniasis; vacuna; virus MVA; antígeno LACK; inmunomodulación.

VEHICULIZACIÓN DE PARTÍCULAS PSEUDOVIRALES POR MEDIO DEL DOMINIO DE UNIÓN A DINEÍNA DE LA PROTEÍNA p54 DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA

Juiz González, Pedro Miguel; Alonso Martí, Covadonga; Galindo, Inmaculada

Instituto Nacional de Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). 28040 Madrid

El Virus de la Peste Porcina Africana (VPPA) es un virus ADN de cadena doble perteneciente a la superfamilia de virus núcleo-citoplasmáticos de gran tamaño. Este virus utiliza el sistema microtubular de la célula infectada, mediante su unión directa al complejo motor microtubular por la proteína viral p54. Insertando el motivo de unión a la dineína de la proteína p54 en la

secuencia de la proteína VP60 del Virus de la Fiebre Hemorrágica del Conejo (RHDV) se produjeron partículas pseudovirales (VLPs) para comprobar su dinámica en la línea celular Vero. Estas VLPs entran en las células y utilizan el sistema microtubular para llegar al espacio perinuclear, entrando efectivamente en el núcleo. Las propiedades de estas VLPs funcionalizadas con el dominio de unión a dineína de p54 las convierten en una posible herramienta terapéutica capaz de alcanzar el compartimento nuclear.

Palabras clave: VPPA, p54, partículas pseudovirales, dineína, sistema microtubular.

EVOLUCIÓN DEL BACTERIOFAGO Q β A DISTINTA TASA DE ERROR

Kubota, Kirina; Lázaro Lázaro, Ester

Instituto Nacional de Tecnología Aeroespacial (INTA). 28850 Torrejón de Ardoz

Actualmente se está investigando un nuevo tratamiento para las enfermedades víricas basado en el aumento de la tasa de error de la replicación mediante el uso de mutágenos. Por ello, resulta esencial entender el comportamiento de las poblaciones virales en presencia de los mutágenos empleados, así como las posibles consecuencias de su retirada antes de finalizar el tratamiento. En esta investigación se han estudiado las propiedades fenotípicas y genotípicas de tres poblaciones del bacteriófago Q β evolucionadas a distinta tasa de error. Los resultados muestran que las poblaciones del fago que han experimentado un aumento transitorio de la tasa de error presentan valores de *fitness* superiores a aquellas evolucionadas a tasa de error estándar o incrementada de forma continua por la presencia de un mutágeno. Éstas, además, presentan mejor capacidad replicativa cuando se exponen a un nuevo ambiente (bacterias de fase estacionaria temprana), pero ningún cambio en su capacidad de adaptación frente a otra presión selectiva (elevación de la temperatura). Se precisan más estudios sobre las consecuencias de los incrementos transitorios de la tasa de error, a fin de minimizar el posible aumento de la capacidad adaptativa viral debida al aumento de la heterogeneidad genética causada por mutágenos.

Palabras clave: cuasiespecies, *fitness*, mutágenos, tasa de error, adaptación.

PAPEL DE DENDRÍMEROS CARBOSILANOS CATIÓNICOS COMO AGENTES TRANSFECTANTES, Y DE DENDRONES Y NANOPARTÍCULAS DE ORO ANIÓNICAS COMO PREVENCIÓN DE LA INFECCIÓN POR EL VIH-1

López López, Ana M^a; Muñoz Fernández, M^a Ángeles; Jiménez Fuentes, José Luis;

Sepúlveda Crespo, Daniel

Hospital Universitario Gregorio Marañón. 28007 Madrid

Con el desarrollo en los últimos años de la Nanomedicina se están estudiando moléculas que podrían revolucionar el concepto de la medicina, abriéndose una nueva vía para prevenir y combatir la infección por el VIH. Esta Memoria se ha dividido en dos secciones. En la Sección 1, basándose en estudios previos donde se determinaba la capacidad transfectante del dendrímero carbosilano catiónico 2G-NN16, se investiga el papel del 2G-NN16 y del dendrímero catiónico de nueva síntesis 2G-03NN24 como posibles transfectantes en linfocitos T CD4 primarios y su posible aplicación en terapia génica frente al VIH-1. Ambos dendrímeros muestran una eficiencia en la transfección de linfocitos T CD4 e inhibición de la replicación viral. En la Sección 2, se estudian cuñas dendríticas y nanopartículas de oro aniónicas que, hipotetizando que se produce la interacción de sus grupos funcionales aniónicos con la proteína gp120 del virus y/o receptor celular CD4 y/o correceptores CCR5 o CXCR4, actúan en las primeras etapas del ciclo del VIH e inhiben la infección viral. Los resultados obtenidos son prometedores e indican que los dendrímeros catiónicos podrían ser posibles candidatos como transfectantes con acción antiviral y los aniónicos como posibles microbicidas frenando la infección por el VIH, aunque hay que desarrollar nuevos experimentos para su confirmación.

Palabras clave: VIH-1, dendrímeros carbosilanos, microbicida, terapia génica, nanotecnología.

CARACTERIZACIÓN DE LA INFECCIÓN DEL MUTANTE DE DELECIÓN PARCIAL VBUN-NSM 4 EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

Martínez Tobar, David; Risco Ortiz, Cristina; Sanz Sánchez, Laura

Centro Nacional de Biotecnología (CNB). Campus de Cantoblanco. 28049 Madrid

Debido a la rápida y eficiente expansión de los vectores artrópodos, las enfermedades causadas por los virus de la familia *Bunyaviridae* están apareciendo en lugares en las que no estaban antes y reemergiendo en las zonas en las que ya habían sido erradicados. Ante la falta de medios de control eficientes que paren este fenómeno, se buscan elementos

farmacológicos que curen estas enfermedades. Para ello hace falta la identificación de dianas moleculares eficientes y para esto es necesario saber cómo los virus manipulan el equilibrio interno de la célula a su favor, y con que lo hacen. Mediante el uso de un mutante de delección parcial de la proteína viral NSm se han podido estudiar las posibles funciones de esta proteína durante el proceso infeccioso producido por el virus Bunyamwera, el prototipo de la familia *Bunyaviridae*.

Palabras clave: Vector, *Bunyaviridae*, mutante, NSm, Bunyamwera.

ESTUDIO VIROLÓGICO DE CÉLULAS LATENTE Y PERSISTENTEMENTE INFECTADAS POR VIH

Mota Biosca, Anna; Olivares Zarco, Isabel

Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. 28220 Madrid

El objetivo de este trabajo es estudiar distintas moléculas que interaccionen con células persistentemente infectadas por VIH, tanto si es para intentar activar la producción de virus como para conseguir una disminución de la producción viral. En este estudio hemos probado diferentes supuestos activadores de la latencia, como la prostratina y el vorinostat y otras de las cuales no sabíamos que efectos podrían tener, como es un inhibidor del ATR (ataxia telangectasia y Rad3-related). Con los activadores de latencia no hemos conseguido ningún efecto significativo sobre las células persistentemente infectadas, aunque este efecto si lo podemos ver en células latentemente infectadas. Con el inhibidor de ATR, hemos podido observar que tiene cierto efecto antiviral (disminuye la producción de virus aproximadamente un 50-60%) en células persistentemente infectadas; sin embargo, en infecciones agudas tiene el efecto contrario, un aumento en la producción de virus.

Palabras clave: VIH, persistencia, latencia, antiviral, inhibidor de ATR.

ESTUDIO DE LA SECUENCIA COMPLETA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS E (VHE) EN PACIENTES INMUNODEPRIMIDOS

Muñoz Chimeno, Milagros; Avellón Calvo, Ana

Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. 28220 Madrid

La infección por VHE en pacientes inmunodeprimidos suele cronificar o presentar un curso fulminante. El ARN_{mc}(+) incluye: ORF1 (no estructural), ORF2 (cápside) y ORF3. Los objetivos de este trabajo han sido: (i) diseñar métodos de PCR anidada para la amplificación y

secuenciación del genoma completo de VHE; (ii) analizar la variación en las diferentes proteínas del virus en secuencias de referencia y en dos casos de pacientes inmunodeprimidos con hepatitis aguda (C1 y C2). Se observó gran variación en la ORF1 a excepción del dominio Y con función desconocida, que presenta un alto grado de conservación. La ORF2 presentó una mayor variación en el dominio expuesto al exterior. En la ORF3, las dos regiones ricas en prolinafueron las que mostraron mayor variación. En C1 y C2 se observaron diferencias significativas: C1 presentó mayor afectación en proteínas clave como RdRp y helicasa y en el dominio relacionado con la respuesta inmune innata de ORF3; la C2 presentó variaciones en proteasa, en dominio X (procesos inflamatorios), así como mutación del motivo de ORF3 relacionado con la salida del virus de la célula. Concluimos por tanto, que la herramienta diseñada, permite estudiar los hallazgos a nivel molecular, que pueden tener su importancia de acuerdo al grado de conocimiento funcional del genoma. La utilidad de este tipo de análisis cobrará sentido en el futuro, una vez puedan acumularse datos en distintos tipos de infección.

Palabras clave: Virus de la hepatitis E, genoma completo, análisis genómico, inmunodeprimido

**ESTUDIO DE FACTORES QUE INDUCEN NECROSIS SISTÉMICA EN
NICOTIANA BENTHAMIANA DURANTE LA INFECCIÓN CON EL AISLADO PPV-
SWCM, PERTENECIENTE A LA FAMILIA DE *POTYVIRIDAE***

Olivas Gallegos, Ana; Martínez-Turiño, Sandra; García Álvarez, Juan Antonio

Centro Nacional de Biotecnología (CNB). Campus de Cantoblanco. 28049 Madrid

Estudios previos con el virus de la viruela del ciruelo (*Plum pox virus*, PPV) agente causal de la enfermedad de la Sharka, mostraron que un aislado viral (PPV-SwCM), pero no otro (PPV-R), era capaz de inducir necrosis sistémica (NS) en *Nicotiana benthamiana* pero no en *Nicotiana clevelandii*. Dicho fenotipo pudo asociarse principalmente con las regiones a partir de las cuales se expresaban las proteínas P3 y 6K1. En este trabajo hemos estudiado el posible efecto diferencial de la expresión individual de las proteínas P3 y P3-6K1 de PPV-SwCM en los dos huéspedes herbáceos, comparándolo con el aislado PPV-R. Por otra parte, hemos estudiado la influencia de la temperatura y el ácido salicílico en el desarrollo de la NS inducida por PPV-SwCM en *N. benthamiana*. Nuestros resultados muestran que el fenotipo de NS se manifiesta sólo en el contexto de la infección viral por PPV. Además, parece involucrar alguna ruta de señalización mediada por ácido salicílico e inducirse a temperaturas

inferiores a 30°C. Son necesarios otros estudios para conocer cuáles son las bases moleculares que controlan este proceso y la relación que existe entre el fenotipo de NS y la respuesta inmune del huésped.

Palabras clave: virus de plantas, *Plum pox virus* (PPV), necrosis sistémica, *Potyvirus*, virus ssRNA(+) .

ESTUDIOS FUNCIONALES DE LA AMIDASA 73 DEL PROFAGO INTEGRADO EN EL GENOMA DE *Streptococcus ictaluri*

Peigneux Navarro, Ana; García González, Pedro

Centro de Investigaciones Biológicas (CIB). 28040 Madrid

La creciente aparición de bacterias multirresistentes a los antibióticos ha puesto de manifiesto la necesidad de otras alternativas terapéuticas. Una de las posibles opciones es la conocida como "terapia fágica", que incluye tanto fagos completos como sus productos génicos. Uno de estos productos, las endolisinas, se han utilizado exógenamente como agentes antimicrobianos, resultando ser muy eficaces, ya que hidrolizan de forma selectiva y rápidamente la pared de sus bacterias diana. Por esta razón se decidió clonar, expresar, purificar y analizar la actividad bactericida frente a diferentes patógenos de una nueva endolisina, procedente de un profago integrado en el genoma de *Streptococcus ictaluri*, denominada amidasa 73, que contiene un dominio catalítico similar a la familia amidasa 2, un dominio de unión a sustrato con dos repeticiones CW_7, que proporciona un amplio espectro de acción, y una carga neta de +0,7, un factor importante a la hora de su aplicación exógena. Los resultados mostraron que esta nueva endolisina tiene un potente efecto bactericida frente a varias bacterias, produciendo una disminución de dos o tres unidades logarítmicas en el número de células viables de los cultivos bacterianos de *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus iniae* y *Enterococcus faecalis*.

Palabras clave: resistencias a antibióticos, endolisinas, enzibióticos, terapia fágica.

GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO CANDIDATO VACUNAL PARA VIH/SIDA QUE EXPRESA ANTÍGENOS DE VIH-1 Y CARECE DEL GEN INMUNOMODULADOR A40R DE VACCINIA

Pérez Ramírez, Patricia; Esteban Rodríguez, Mariano; García-Arriaza, Juan Francisco

Centro Nacional de Biotecnología (CNB). Campus de Cantoblanco. 28049 Madrid

El desarrollo de una vacuna segura y eficaz frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es una de las metas primordiales para el control y la prevención del síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA), una enfermedad pandémica que causa millones de muertos cada año. En este proyecto hemos generado y caracterizado un nuevo candidato vacunal frente al VIH/SIDA basado en el vector poxviral virus modificado de Ankara (MVA), que expresa los antígenos Env, Gag, Pol y Nef del subtipo B de VIH-1 (MVA-B), y que tiene delecionado el gen inmunomodulador poxviral *A40R* con el fin de mejorar la inmunogenicidad de dicha vacuna. El recombinante MVA-B ilA40R generado tiene correctamente delecionado el gen *A40R*, es estable y expresa los antígenos del VIH-1 GPN y gp120 de forma similar al virus parental MVA-B. Además, la deleción del gen *A40R* del MVA-B no afecta a la replicación del virus. Finalmente, MVA-B ilA40R disminuye en macrófagos humanos la expresión del varios genes relacionados con la respuesta inmune innata, en comparación con MVA-B.

Palabras clave: Poxvirus, VIH/SIDA, vacunas, vectores recombinantes, *A40R*.

ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS DEL VIRUS DE LA PESTE DE PEQUEÑOS RUMIANTES (PPRV) INVOLUCRADAS EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA A INTERFERÓN TIPO 1

Rangel Tapia, Giselle Angeline; Sevilla, Noemí; Martín, Verónica

Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA). Valdeolmos. 28130 Madrid

El virus de la Peste de los Pequeños Rumiantes (PPRV) es un *Morbillivirus*, que comparte género con el virus del Sarampión (MeV) en humanos y el virus de la Peste bovina (RPV). La Peste de los Pequeños Rumiantes (PPR) es una enfermedad que afecta a animales domésticos: caprinos, ovinos, camellos, y algunos animales silvestres. El gen *P* de los virus de la familia *Paramyxoviridae* codifican la proteína P y tres proteínas no estructurales (C, V y W), que se ha descrito que tienen actividad antagonica a interferón (IFN) tipo 1, pero sólo han sido probadas C, P y V en algunos *Morbillivirus*. En PPRV sólo se ha estudiado el efecto de V del aislado Turquía/2000, no habiéndose analizado la actividad de C, P y W al respecto. En este proyecto hemos demostrado que el aislado virulento de Costa de Marfil (ICV'89) de PPRV inhibe la acción de IFN tipo 1, a través del promotor de activación de los elementos de respuesta a IFN 1 (ISRE), mediante las proteínas P, V y W. Experimentos *in vitro* demostraron que la actividad interferente de V-ICV es más eficiente. W-ICV demostró tener un efecto sobre esta ruta de señalización, mientras que para P-ICV el efecto fue más débil y

C-ICV no pudo bloquear la estimulación de ISRE. Es la primera W de PPRV clonada y en la cual se le ha comprobado esta función.

Palabras claves: PPRV, proteínas no estructurales, bloqueo de señalización IFN

ESTUDIO DE ADENOVIRUS, GRIPE Y CORONAVIRUS EN MURCIÉLAGOS IBÉRICOS

Rodríguez Núñez-Milara, Isabel; Casas Flecha, Inmaculada

Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. 28220 Madrid

Dado que los murciélagos (orden *Chiroptera*), incluso sanos, son reservorios y hospedadores de diferentes virus, se ha monitorizado diferentes géneros de estos mamíferos propios de la fauna de la Península Ibérica: *Nyctalus*, *Pipistrellus*, *Eptesicus*, *Hypsugo* y *Tadarida*. Para ello, se ha analizado un total de 203 muestras biológicas, 110 exudados faríngeos y 93 heces, para la detección específica de Adenovirus, virus de la gripe y Coronavirus. Los métodos utilizados en la detección y caracterización de Adenovirus y virus de la gripe forman parte de la cartera de servicios del Laboratorio de Virus Respiratorios y Gripe del CNM (Centro Nacional de Microbiología). Para la detección de Coronavirus se ha estandarizado una técnica de RT-PCR en tiempo real (rtRT-PCR) genérica para la familia *Coronaviridae*, que incluye al Coronavirus SARS y al Coronavirus MERS. Tras el análisis mediante PCR y rtRT-PCR se han detectado cinco Adenovirus en dos especies, *Nyctalus lasiopterus* y *Pipistrellus kuhlii*, que se caracterizaron mediante el análisis de un fragmento del hexón viral. Todas las muestras fueron negativas para Coronavirus y virus de la gripe. Este estudio mejora el conocimiento sobre la epidemiología de los Adenovirus, de los virus gripales y de los Coronavirus en murciélagos de la Península Ibérica.

Palabras clave: Adenovirus, Gripe, Coronavirus, Murciélagos ibéricos, PCR y RT-PCR