

Máster en Virología Universidad Complutense de Madrid: Resumen de los Trabajos Fin de Máster. Curso 2017-18

El Máster en Virología, que se imparte en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) ha reunido en el curso 2017-18, en su séptima edición, a 26 alumnos. Es el único Master en España especializado en esta Ciencia, y en él intervienen profesores e investigadores de reconocido prestigio y diversas instituciones.

Los alumnos han realizado brillantes Trabajos Fin de Máster (TFM), que se han defendido en las convocatorias de Junio y Septiembre. Los Tribunales han estado integrados por expertos en Virología, tanto Profesores como investigadores de distintos centros públicos, y las calificaciones otorgadas oscilaron entre 5,0 y 9,5 puntos.

Un año más, los estudiantes del máster han demostrado madurez investigadora en esta apasionante ciencia. Sus trabajos podrían ser publicables en revistas indexadas tras la difusión de los resúmenes en la Revista Complutense de Ciencias Veterinarias, como se viene realizando desde los inicios del Máster en el curso 2010-11.

Los temas han sido diversos, correspondiendo 13 a la temática de virus humanos, 11 a virus animales, y 2 a virus de plantas. Los trabajos que han tratado sobre virus humanos han incluido estudios sobre el virus de la Inmunodeficiencia (VIH) y el Herpes simplex (VHS) (5 en total), virus Influenza A (3), virus Hepatitis C (HCV) (2), virus entéricos (Rotavirus/Adenovirus y Norovirus) (1), Vaccinia (VACV) (1) y Ebolavirus (EBOV) (1). Los TFM sobre virus animales han estado centrados en: Flavivirus y el virus de la Fiebre del Nilo Occidental (WNV) (2), el virus de la Peste porcina africana (ASFV) (1), el virus de la Lengua azul (BTV) (1), el virus de la Enfermedad de Gumboro o Bursitis infecciosa aviar (1), el virus de la Fiebre del Valle del Rift (RVFV) (1), Astrovirus aviares (1), el virus de la Diarrea vírica bovina (BVDV) (1), el virus del Síndrome respiratorio y reproductor porcino (PRRS-1) (1), el virus de la Coriomeningitis linfocitaria del ratón (LCMV) (1) y un trabajo sobre inmunopotenciadores para vacunación en acuicultura (1). Finalmente, dos de los TFM han versado sobre virus de plantas (TuMV y Begomovirus).

Las temáticas de los trabajos han incluido caracterización de virus e infecciones, estudios de dianas moleculares, obtención de mutantes, obtención de clones infecciosos, expresión de antígenos recombinantes, producción de nanopartículas, prevalencia y diversidad de virus, nuevas metodologías y herramientas para predicción y diagnóstico de enfermedades, desarrollo de candidatos vacunales y vacunas recombinantes, inmunopotenciadores de vacunas, y efectos, eficacia y combinación de terapias antivirales.

Obtención y caracterización de una variante de virus de la fiebre del valle del Rift resistente a la seroneutralización¹

Bernad Roche, María; Borrego Rivero, Belén; Brun Torres, Alejandro

La fiebre del valle del Rift (RVFV) es una zoonosis viral transmitida por artrópodos causada por un *Phlebovirus*. Se caracteriza por provocar altas tasas de aborto en rumiantes y es responsable de graves pérdidas económicas en ganadería, además de suponer un problema de Salud Pública. Las glicoproteínas de superficie Gn y Gc son las principales dianas vacunales puesto que están implicadas en el reconocimiento por anticuerpos neutralizantes. En este trabajo, se sometió al virus a condiciones de presión inmune para observar si se producía algún cambio frente a la seroneutralización y si dicho cambio podía asociarse a mutaciones en el segmento M, que codifica para las glicoproteínas. Tras 10 pases en cultivo celular en presencia de suero anti-RVFV, se obtuvieron variantes que presentaban resistencia parcial a la seroneutralización y cambios en su antigenicidad. También se observaron sustituciones en regiones próximas a epítopos asociados al reconocimiento por anticuerpos neutralizantes. Estos resultados sugieren que si la población viral es sometida a presión inmune, pueden aparecer variantes resistentes a la seroneutralización. Es necesario llevar a cabo estudios adicionales para poder determinar si los cambios en el genotipo se pueden asociar al fenotipo de resistencia observado y para seguir caracterizando estas nuevas variantes virales.

Palabras clave: glicoproteínas, resistencia, RVFV, seroneutralización.

¹ Centro de Investigación en Sanidad Animal – Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (CISA-INIA). Valdeolmos. 28130 Madrid.

Expresión de antígenos recombinantes de Flavivirus: aplicaciones para diagnóstico²

Blázquez Pérez, Sandra; Martín Acebes, Miguel Ángel

El virus del Nilo Occidental (WNV) perteneciente al género *Flavivirus* es un patógeno RNA presente en España que infecta aves, caballos y humanos para el cual no existe diagnóstico ni tratamiento específico. España reúne las condiciones idóneas para favorecer la circulación del WNV como la presencia de su principal vector y reservorios para el virus. Tradicionalmente WNV se divide en dos linajes mayoritarios, habiéndose detectado recientemente la circulación de WNV de linaje 2 en España. Con el objetivo de obtener antígenos para mejorar las técnicas de diagnóstico en el futuro, se han generado plásmidos recombinantes capaces de expresar las proteínas estructurales de WNV de linaje 2. La expresión de la proteína E de WNV se detectó en el retículo endoplásmico de las células eucariotas transfectadas con los vectores construidos con un punto máximo de expresión 24 h post-transfección. El análisis mediante *Western-blot* de la proteína E mostró que había sufrido un procesamiento post-transduccional correcto. Estos plásmidos podrían constituir un primer paso en la mejora de las herramientas de prevención y control de virus de linaje 2.

Palabras clave: Virus del Nilo Occidental, *Flavivirus*, proteínas recombinantes, proteínas estructurales, fiebre del Nilo Occidental, transfección.

Ciclo de amplificación de la PCR como predictor de mala evolución de la gripe³

Carmona Vivar, Francisco; Muñoz García, Patricia; Bouza Santiago, Emilio

Introducción: la gripe causa epidemias anuales con una alta morbilidad y mortalidad. Los factores de riesgo de evolución desfavorable son principalmente clínicos. La relación entre la carga viral (CV) y la evolución no ha sido descrita. **Objetivos:** estudiar la relación entre los ciclos de amplificación (Ct) de PCR para gripe A (marcador subrogado de CV) y la evolución.

Métodos: estudio retrospectivo en el que se seleccionaron muestras positivas para gripe A (realizadas con el sistema GeneXpert®) obtenidas a partir del Servicio de Urgencias del HGUGM durante la temporada 2016-2017. Análisis de los Ct y relación con las variables evolutivas: ingreso, ingreso superior a siete días, complicaciones intrahospitalarias, mortalidad y vacunación.

Resultados: se observó una diferencia significativa entre los Ct de los pacientes que ingresaron más de siete días vs los que tuvieron una estancia hospitalaria menor (Ct 23,44 vs 26,20; p=0,036). Se apreció una tendencia no significativa a un menor Ct en los pacientes que fallecieron vs los que sobrevivieron (Ct 19,94 vs 25,23; p=0,055). No se observaron diferencias en el resto de variables analizadas.

Conclusión: en este estudio hemos demostrado que un menor Ct se asocia con una estancia hospitalaria más prolongada y con una tendencia hacia mayor mortalidad.

Palabras clave: *Influenza A*, RT-PCR, ciclo de amplificación, evolución, carga viral.

Construcción y caracterización de clones infecciosos de PRRSV-1⁴

Castillo Pérez, ; Prieto Suárez, Cinta; Martínez Lobo, Francisco Javier

El virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino es un virus de la familia *Arteriviridae* con una elevada variabilidad. La construcción de clones infecciosos a partir de cepas del virus con distintas características biológicas constituye una herramienta muy útil para la identificación de factores de virulencia y determinantes antigénicos. Los objetivos del presente trabajo son: la construcción de un clon infeccioso a partir de una cepa del PRRSV previamente caracterizada en función de sus propiedades antigénicas y la caracterización de otro clon infeccioso de características antigénicas opuestas para, en el futuro, intercambiar distintas proteínas de ambas cepas e identificar aquellas relevantes para el desarrollo de anticuerpos neutralizantes. Para construir el clon de EU-11, se amplificó el genoma completo en varios fragmentos y los amplicones obtenidos se clonaron en plásmidos. De cada plásmido, se seleccionaron al menos 4 clones para determinar la secuencia consenso. Los distintos fragmentos se ensamblaron mediante la técnica de Gibson-Assembly y se colocaron en un vector con el promotor CMV. Con el plásmido obtenido se transfetaron células susceptibles a la infección y se obtuvo progenie vírica viable. Para caracterizar el clon de Sp-3, se hizo una curva de crecimiento comparando el clon infeccioso y la cepa parental.

Palabras clave: PRRSV, clon infeccioso, genética reversa, virus quiméricos.

² Departamento de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). 28040 Madrid.

³ Hospital General Universitario Gregorio Marañón. 28007 Madrid.

⁴ Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid.

Dianas moleculares en estadios tempranos de la infección por el virus de la peste porcina africana⁵

Clemente Candela, Javier; Alonso Martí, Covadonga; Galindo Barreales, Inmaculada

La expansión de la Peste Porcina Africana (PPA) por Europa y China y la ausencia de una vacuna eficaz, han puesto de manifiesto la necesidad de identificar dianas moleculares para el virus que permitan el diseño de vacunas eficaces para el control de la enfermedad. La validación de estas dianas moleculares es realizada mediante fármacos antivirales, los cuales también pueden presentar aplicación en determinadas circunstancias epidemiológicas. La entrada del virus de la peste porcina africana (VPPA) se produce por la vía endosomal y ha sido relacionada con el flujo de colesterol intracelular, donde se encuentran implicados transportadores endo/lisosomales de colesterol. Hay una serie de compuestos que inhiben esta función y producen retención intracelular de colesterol, como son ciertas drogas catiónicas anfífilas. En este trabajo se ha comprobado la actividad antiviral frente al VPPA de una librería de compuestos análogos a estas drogas, siendo una serie de ellas activas en estadios tempranos y otras activas en fases posteriores de la infección. Estos resultados, pueden ser utilizados en un futuro como herramienta en la caracterización de estas dianas de la membrana endosomal y para el desarrollo racional de vacunas eficaces y seguras y fármacos antivirales específicos.

Palabras clave: VPPA, antivirales, entrada viral, colesterol.

Estudio comparativo de la inmuno-estimulación con diversas flagelinas en células de peces⁶

Crespo Yuste, Estefanía; Gómez Casado, Eduardo

La vacunación es el método más adecuado para controlar enfermedades infecciosas que amenazan a la industria de la acuicultura a nivel mundial. Desafortunadamente, las vacunas tradicionales basadas en antígenos recombinantes o patógenos inactivados aportan un nivel de protección que no persiste en el tiempo, requiriendo nuevas dosis. Por lo tanto, el uso de adyuvantes o inmunopotenciadores a menudo es necesario para aumentar la eficacia de la vacuna. La flagelina se ha usado anteriormente como adyuvante contra muchos patógenos, por ello en este trabajo se va a llevar a cabo un estudio comparativo de inmuno-estimulación utilizando principalmente dos flagelinas pertenecientes a *Marinobacter algicola* (F y Fred) y la flagelina de *Vibrio vulnificus*.

Palabras clave: flagelina, adyuvante, respuesta inmune, *Marinobacter algicola*, *Vibrio vulnificus*.

Prevalencia y diversidad de astrovirus en aves neotropicales⁷

Fernández Correa, Izaskun; Benítez Rico, Laura; Doménech Gómez, Ana; Gómez-Lucía Duato, Esperanza

El desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación masiva ha facilitado la detección de numerosos virus nuevos, en especial de muestras procedentes de zonas remotas. El ecosistema natural de la Reserva de Nouragues es una región neotropical de la Guayana Francesa que alberga una gran diversidad de aves silvestres que pueden actuar como reservorio de virus desconocidos, algunos con potencial zoonótico, por lo que tiene un gran interés conocer más profundamente la diversidad viral de estas poblaciones. El análisis metagenómico de muestras cloacales de aves neotropicales realizado en este trabajo mostró un porcentaje destacable (5,2%) de secuencias correspondientes a astrovirus. Se obtuvieron al menos tres genomas completos altamente divergentes que constituyen un nuevo clado dentro de la especie *Avastrovirus 2* y que podrían constituir una nueva especie. El análisis de la organización genómica muestra que estos virus comparten algunas características comunes con astrovirus de mamíferos (*Maastrovirus*). El estudio de las muestras cloacales individuales por RT-PCR con cebadores genéricos de astrovirus mostró una prevalencia $\geq 5,4\%$, un porcentaje muy superior al descrito en el orden Passeriformes. Por primera vez, se han descrito astrovirus en las familias de aves Cardinalidae, Conopophagidae, Furnariidae, Thamnophilidae, Turdidae y Tyrannidae.

Palabras clave: Metagenómica; astrovirus; aves neotropicales; diversidad; prevalencia

⁵ Instituto Nacional de Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). 28040 Madrid.

⁶ Departamento de Biotecnología. Instituto Nacional de Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). 28040 Madrid.

⁷ Departamento de Microbiología III (Facultad de Ciencias Biológicas) y Departamento de Sanidad Animal (Facultad de Veterinaria). Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid.

Efectos epigenéticos como consecuencia del tratamiento con antivirales de acción directa frente al Virus de la Hepatitis C⁸

García Crespo, Carlos; Sánchez, Aurora; Perales Viejo, Celia

El carcinoma hepatocelular (HCC) es la mayor causa de trasplante de hígado y uno de los cánceres más comunes a nivel global, siendo en gran proporción producido por la infección crónica por el virus de la hepatitis C (HCV). El tratamiento del HCV ha experimentado un gran avance con los antivirales de acción directa (DAAs) consiguiendo tasas de curación superiores al 95%. Sin embargo, se ha descrito una recurrencia de HCC asociado a HCV en aproximadamente un 25% de pacientes que han conseguido una cura virológica tras el tratamiento con DAAs. En este trabajo se ha estudiado el efecto que tiene el HCV sobre diferentes cambios epigenéticos asociados con cáncer, y si el tratamiento con DAAs revierte estos efectos. Los resultados muestran que el tratamiento con DAAs revierte la fosforilación de serina 10 en la histona H3 inducida por HCV a través la actividad quinasa de Aurora quinasa B (AURKB). Además, se ha demostrado que el *fitness* vírico tiene un mayor efecto sobre la regulación de estas marcas epigenéticas.

Palabras clave: HCV, HCC, AURKB, *fitness*, DAAs.

Caracterización de la replicación de virus de la Gripe de distinta patogenicidad en células cardíacas⁹

Gomollón Guevara, Verónica Alexandra; Falcón Escalona, Ana

El virus pandémico de la gripe A(H1N1) pdm09 se ha asociado a casos severos de disfunciones cardíacas. En concreto, se logró aislar de un paciente fallecido una cepa patógena (F) que presentaba como factor responsable de su patogenicidad una mutación en la subunidad PA de la polimerasa viral (D529N). El virus recombinante patógeno portador de esta mutación (PA mut) presenta una menor producción de genomas virales defectivos (DVGs) que se correlaciona con una menor respuesta antiviral de células pulmonares infectadas, comparado con un virus atenuado (PB2 mut). Además, estos dos virus presentan una diferente cinética de replicación en células cardíacas.

El objetivo de este trabajo es evaluar la posible contribución de la inducción de respuesta antiviral y la actividad replicativa de la polimerasa de los virus mutantes PA mut y PB2 mut de diferente patogenicidad a las diferencias en la cinética de replicación observadas en células cardíacas de ratón infectadas con estos dos virus.

Se ha demostrado la ausencia de respuesta antiviral relevante en células cardíacas frente a controles positivos de inducción, si bien, se ha visto una leve acumulación de la proteína ISG56 en infecciones por los virus pandémicos recombinantes control (CAL) o los virus mutantes PB2 mut y PA mut. La caracterización de la actividad replicativa de la polimerasa viral no ha sido concluyente debido a limitaciones técnicas en la línea celular cardíaca utilizada.

Palabras clave: virus influenza A(H1N1) pdm09, respuesta inmune antiviral, células cardíacas, genomas virales defectivos (DVGs), virus recombinantes.

Evaluación de dos métodos inmunocromatográficos comerciales para la detección de rotavirus/adenovirus y norovirus. Epidemiología molecular de las infecciones gastrointestinales causadas por virus¹⁰

González Serrano, Lydia; Cabrerizo Sanz, María

Introducción. Las infecciones virales se consideran la causa más común de gastroenteritis aguda (GEA), especialmente en niños. Los métodos de análisis inmunológico se recomiendan para el diagnóstico virológico debido a su simplicidad y bajo costo. **Objetivos.** Evaluar dos técnicas comerciales inmunocromatográficas (IC) (Materlab) para la detección rápida de rotavirus/adenovirus y norovirus, en comparación con los resultados obtenidos utilizando métodos de PCR. También se realizaron estudios epidemiológicos.

Métodos. Se estudiaron 100 heces recogidas de pacientes con GEA (84% niños) ingresados en el Hospital Puerta de Hierro (Madrid) entre febrero y julio de 2018, utilizando técnicas de IC y de PCR, secuenciación y análisis filogenético. **Resultados y Conclusiones.** Las pruebas de IC mostraron valores altos de sensibilidad y especificidad (>97%) concluyendo que es una técnica útil para un diagnóstico rápido. Rotavirus-A G9 y G12 fueron los virus más frecuentemente

⁸ Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC-UAM). Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM). Cantoblanco. 28049 Madrid.

⁹ Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). Campus de Cantoblanco. 28049 Madrid.

¹⁰ Centro Nacional de Microbiología (CNM), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Majadahonda. 28220 Madrid.

detectados (16%), seguidos por enterovirus (7%), norovirus GII y GI (4%), adenovirus 41 (4%) y astrovirus (1%). En 4 niños vacunados se detectó rotavirus. La vigilancia del rotavirus es necesaria para controlar la aparición de nuevas cepas o variantes. Se identificó un agente patológico en solo el 31% de los pacientes, por lo que otros virus como sapovirus o parechovirus podrían estar implicados.

Palabras clave: norovirus, rotavirus, adenovirus, inmunocromatografía, PCR.

Caracterización genética y antigénica de los virus de la gripe circulantes en España. Temporada 2017-18¹¹

Gutiérrez García, María; Pozo, Francisco

El virus de la gripe pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* y se distinguen tres géneros: A, B y C, siendo la gripe A y B las causantes de epidemias. La combinación de los distintos tipos de hemaglutinina y neuraminidasa, permite diferenciar dos subtipos de gripe A circulante en humanos: A/H1N1 y A/H3N2. Dentro de la gripe B, hay dos linajes: B/Victoria y B/Yamagata. Las epidemias anuales se deben a la gran capacidad de cambio que presenta el virus (deriva antigénica). Debido a ello, se establece el Sistema de vigilancia de Gripe formado por la red centinela y la red no centinela. Este sistema permite realizar un seguimiento de los virus circulantes en cada temporada. En España, en la temporada 2017-18, se ha producido el predominio de la gripe B perteneciente al linaje B/Yamagata, aunque también han circulado linajes B/Victoria, A/H1N1 y A/H3N2. Además, ha circulado un nuevo virus B/Victoria que tiene una delección en la porción HA1 de la hemaglutinina. A causa de que, en esta temporada, han co-circulado dos los linajes de gripe B (B/Yamagata y B/Victoria), se ha diseñado una RT-PCR en tiempo real que permite distinguir ambos linajes y detectar aquellos virus B/Victoria que presentan la delección.

Palabras claves: gripe, RT-PCR en tiempo real, vigilancia, A/H3N2, A/H1N1, B/Victoria, B/Yamagata.

Funcionalización de nanopartículas virales (VNPs) derivadas de un virus de plantas con fines de protección vegetal¹²

Kellnerová, Sára; Ponz Ascaso, Fernando

Objetivo: Desarrollo de nano-biomoléculas seguras y biodegradables capaces de mejorar la resistencia de las plantas, mediante la producción de *virus-like particles* (VLPs), derivadas del *Virus del mosaico del nabo*, funcionalizadas con péptidos con carácter antimicrobiano o estimulantes del desencadenamiento de la respuesta inmunitaria de las plantas. La producción de las partículas se obtiene mediante expresión transitoria en plantas a partir de las cuales se purifican. Resultados: Se demostró que era posible la funcionalización de las VLPs con determinados péptidos mediante fusión genética a la proteína de la cápsida viral. Adicionalmente, se puso a punto un sistema semi-*in vivo* para analizar su actividad. Conclusiones: Es posible producir VLPs funcionalizadas con péptidos mediante expresión transitoria en plantas. Estas nano-biomoléculas podrían resultar útiles como compuestos alternativos a los productos que han venido generándose mediante síntesis química, cuyo uso se está restringiendo, para proteger los cultivos y productos agrícolas frente al ataque de los patógenos. Se trata de una nueva y prometedora estrategia sostenible, eficaz y eco-respetuosa.

Palabras clave: partículas similares a virus (VLPs), péptidos antimicrobianos (AMPs), péptidos elicitores de inmunidad (ITPs), biocontrol, nanopartículas.

Desarrollo de técnicas de diagnóstico directo e indirecto y aplicación en la búsqueda del virus de la Coriomeningitis Linfocitaria¹³

Labiod Becerro, Nuria; Vázquez González, Ana; Sánchez-Seco, M.^a Paz

El virus de la Coriomeningitis linfocitaria, es una zoonosis de distribución mundial transmitida principalmente por el ratón común *Mus musculus* que actúa como reservorio y vector en el ciclo biológico del virus. En España está descrito el establecimiento de un ciclo urbano-selvático en algunas zonas geográficas, con la detección del virus y anticuerpos

¹¹ Unidad de Virus Respiratorios, Centro Nacional de Microbiología (ISCIII). Majadahonda. 28220 Madrid.

¹² Centro de Biotecnología y Genómica de plantas (CBGP). Parque Científico y Tecnológico, UPM, Campus de Montegancedo, Ctra M-40, km 38, 28223 Pozuelo de Alarcón (Madrid).

¹³ Laboratorio de Arbovirus, Servicio de Virología, Centro Nacional de Microbiología (CNM), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Majadahonda. 28220 Madrid.

en roedores y humanos, y casos de afectación neurológica aguda en humanos. Debido a la gravedad del cuadro clínico de la enfermedad y el potencial teratogénico descrito, se hace necesaria la investigación de este virus en nuestro país y la puesta a punto de nuevas herramientas diagnósticas. En el presente trabajo se ha desarrollado una RT-PCR en tiempo real la cual ha mostrado una alta sensibilidad y especificidad, siendo capaz de detectar todas las cepas del virus con una sensibilidad límite de 5,6 copias/reacción. Además, se ha llevado a cabo un estudio de seroprevalencia realizado en muestras de suero de población de riesgo mediante la preparación de portas de IFI. Ambas metodologías serán incorporadas a la cartera de servicios del Laboratorio Nacional de Referencia para zoonosis víricas del CNM.

Palabras clave: Coriomeningitis linfocitaria, seroprevalencia, RT-PCR en tiempo real, meningitis, IFI.

Mutagénesis letal del virus de la hepatitis C¹⁴

Lacueva Arnedo, Manuel; Domingo Solans, Esteban; Perales Viejo, Celia

En este proyecto se pretende investigar una posible actividad mutagénica del sofosbuvir (SOF) frente al virus de la hepatitis C (VHC), complementaria a su acción inhibitoria de la polimerasa NS5B. Para ello se han realizado pases seriados de un VHC P200 de alto *fitness* en presencia y ausencia de SOF y se ha estudiado la complejidad del espectro de mutantes mediante clonaje molecular y secuenciación Sanger. Por otra parte, se ha analizado el efecto que producen los antivirales Favipiravir (FVP) y SOF sobre la estructura de la polimerasa NS5B del VHC en virus de diferente *fitness*. Para ello, se ha analizado mediante procedimientos bioinformáticos la variación en energía libre ($\Delta\Delta G$) producida por las mutaciones no sinónimas respecto a la secuencia de referencia del virus P0. Los resultados indican un impacto del *fitness* en la estabilidad de la estructura proteica de la polimerasa NS5B. También muestran la tendencia del FVP a aumentar la inestabilidad proteica, mientras las poblaciones pasadas con SOF predicen un aumento de la estabilidad. Esta observación inesperada ha llevado a dos hipótesis alternativas discutidas a la luz del conocimiento actual de la dinámica viral.

Palabras clave: Sofosbuvir, Favipiravir, fitness, inestabilidad, NS5B.

Estudio preliminar de la entrada del virus de la diarrea bovina¹⁵

Martínez, Ane; Abrescia, Nicola GA

El virus de la diarrea bovina (BVBV), junto con el resto de *Pestivirus*, ocasiona grandes pérdidas económicas en el sector ganadero a nivel mundial. La entrada del virus a la célula requiere tres pasos; (i) la unión a su receptor (CD46 bovino) y, posteriormente, al co-receptor (desconocido), (ii) permitiendo la internalización del virus a la célula, y (iii) la fusión de la envuelta vírica y endosomal para la liberación del genoma al citoplasma. En este trabajo se estudia la estructura de CD46 bovino y la posible unión al virus mediante la producción de proteo-liposomas y su visualización por criomicroscopía electrónica (crio-EM) y criotomografía electrónica (crio-ET). Los resultados exhiben el potencial del sistema utilizado para el estudio de la entrada del virus, apoyando la unión del virus al receptor CD46 bovino, aunque también la necesidad de optimizar el sistema.

Palabras clave: Virus de la diarrea bovina, receptor CD46 bovino, liposomas, criotomografía electrónica.

In vivo evaluation of the multi-epitopic protein TMEP-B as novel HIV vaccine candidate¹⁶

Mediavilla Medel, Pilar; Perdiguero de la Torre, Beatriz; Gómez Rodríguez, Carmen Elena; Esteban Rodríguez, Mariano

Una vacuna contra el VIH/SIDA capaz de inducir protección inmunitaria continúa siendo el principal objetivo en el campo del VIH. Se ha estudiado clínicamente la vacuna MVA-B, la cual exhibe un buen perfil de inmunogenicidad en ensayos clínicos profilácticos y terapéuticos de fase I pero no pudo evitar prevenir el aumento viral después de eliminar los antirretrovirales. Con el objetivo de aumentar la inmunogenicidad de MVA-B y evitar la inmunodominancia de la envuelta, se diseñó un inmunógeno multi epitópico basado en epitopos de células T, y se insertó en dos vectores (ADN y MVA), para ser combinado con la vacuna MVA-B. En este trabajo, se describe la caracterización *in vitro* de MVA TMEP y el perfil inmunógeno producido en ratones por TMEP-B cuando se administran los prime/boost de forma homóloga o heteróloga. MVA TMEP expresa correctamente el antígeno TMEP-B y presenta la misma capacidad replicativa que el parental en células CEF. El régimen heterólogo DNA TMEP/MVA-B induce magnitudes más altas

¹⁴ Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Cantoblanco, 28049 Madrid.

¹⁵ Laboratorio de Virología Estructural. Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias (CIC bioGUNE). Parque Científico Tecnológico de Bizkaia building 801A, 48160 Derio, Vizcaya.

¹⁶ Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). Campus de Cantoblanco. 28049 Madrid.

de células CD8, CD4 y Tfh, y con un reconocimiento más amplio de epítomos que DNA TMEP/MVA TMEP o los regímenes homólogos (MVA/MVA), apoyando esa combinación con esos vectores para enfocar una vacuna terapéutica.
Palabras clave: Vacuna, MVA, respuesta inmune, VIH tipo 1, linfocito T.

Evaluación de la eficacia de la terapia dual frente a la triterapia en pacientes infectados por VIH¹⁷

Molano Uribe, M^a Carmen; Vallejo Tiller, Alejandro

Sobre pacientes diagnosticados VIH +, se evalúan los efectos del cambio de tratamiento de un triple antirretroviral, a un tratamiento dual con tan solo dos antirretrovirales, midiendo la concentración de IL-6, CD14, CD163, IP-10, Proteína C reactiva y Dímeros D, para comparar dichas concentraciones en cada grupo experimental y comprobar si hay o no diferencias significativas en las concentraciones de dichas moléculas que puedan explicarse con el cambio de tratamiento de los pacientes. Con un modelo experimental de cohortes, se asignaron tres grupos experimentales (Basal, 6 Meses y 12 Meses) y se lleva a cabo el cambio a tratamiento dual en el momento basal del experimento. Además se han elegido 10 pacientes que tienen muestra tanto en el momento basal como en el momento final del estudio y se han realizado PCR de sus muestras buscando miRNAs en exosomas que participan en diferentes procesos cancerígenos o inflamatorios, para poder hallar si existe diferencia significativa paciente por paciente. Los análisis estadísticos detectaron diferencias significativas entre los grupos, para la concentración de CD14 e IP-10 que, junto con los resultados de las PCR permiten concluir que el cambio de triterapia a biterapia podría ser beneficioso.

Palabras clave: eficacia, VIH, tratamiento, biterapia, citoquinas.

Caracterización biológica de las variantes del VIH-1 que inician la infección en pacientes HSH¹⁸

Rico Zamorano, Juan; Casado Herrero, Concepción

El objetivo de este trabajo es caracterizar biológicamente las variantes del VIH-1 que inician la infección en pacientes HSH. Para ello, se analizaron biológicamente los virus aislados obtenidos de siete pacientes con infección reciente por VIH-1. Los resultados de este estudio reflejan una gran variabilidad en el tamaño del reservorio que generan los virus, así como en la capacidad infectiva y replicativa de los virus analizados. Según los resultados obtenidos, la carga proviral está directamente relacionada con el nivel de linfocitos T CD8+ del paciente y con la capacidad infectiva y replicativa de los virus. En general, cuanto mayor es el reservorio detectado en los pacientes, más eficaces son los virus. Por otro lado, los resultados del análisis de las cuasiespecies virales indican que las poblaciones virales que inician la infección son homogéneas y presentan una baja diversidad. Así mismo, se ha comprobado que desde el principio de la infección existe una alta proporción de genomas defectivos en el reservorio originados, principalmente, por deleciones e hipermutación.

Palabras clave: infección primaria por VIH-1, reservorio viral, capacidad replicativa, capacidad infectiva, cuasiespecies.

Dendrimeros aniónicos carbosilanos en combinación con dapivirina como microbicidas frente a la infección por el VIH-1 y VHS-2¹⁹

Rodríguez Izquierdo, Ignacio; Muñoz Fernández, M^a Ángeles

Para evaluar la actividad sinérgica de la dapivirina (DPV) con los dendrimeros aniónicos carbosilanos G1-S2, G2-S16 y G3-S16, como candidatos para el desarrollo de un microbicida capaz de prevenir las infecciones tanto por el VIH-1 como por el VHS-2, se evaluó la biocompatibilidad, actividad anti-VIH-1, anti-VHS-2 y la inhibición del crecimiento bacteriano de las diferentes combinaciones. Los compuestos mostraron buena biocompatibilidad en las líneas celulares estudiadas y las combinaciones obtuvieron >95% de inhibición frente al VIH-1 con perfiles sinérgicos o aditivos frente al aislado viral R5-VIH-1. La combinación DPV/Dendrimeros no interfiere con el potencial inhibitorio de los dendrimeros frente al VHS-2, alcanzando los mismos niveles de inhibición >95% alcanzados por los dendrimeros de manera individual, a pesar de que la DPV no mostró efecto frente al VHS-2. La DPV y los dendrimeros analizados no modifican

¹⁷ Grupo de enfermedades infecciosas y SIDA. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Ctra. Colmenar Viejo, km. 9, 100, 28034 Madrid.

¹⁸ Servicio de Virología Molecular. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. 28220 Madrid.

¹⁹ Laboratorio de Inmunobiología Molecular, Sección Inmunología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón. 28007 Madrid.

el crecimiento bacteriano *in vitro*, evitando así la alteración de las cepas presentes en la microbiota vaginal. Este estudio representa el primer estudio sobre las combinaciones DPV/Dendrímero para desarrollar un microbicida seguro.

Palabras clave: Dapivirina, dendrímeros, VIH-1, VHS-2, microbicida.

Estudio de factor pro-viral en la infección con el virus vacunal²⁰

Romero Estremera, Yolimar; Lorenzo Hermida, María

Vaccinia es el virus modelo de la familia *Poxviridae*. Este y el virus de la viruela tienen inmunidad cruzada, lo que permitió utilizar el virus *vaccinia* como vacuna contra la viruela y erradicar con éxito la enfermedad. En trabajos previos en el laboratorio de poxvirus se realizaron cribados generalistas donde se obtuvo una lista de genes candidatos a ser factores pro-virales de la infección. En este trabajo se ha seleccionado uno de ellos, gen de beta 2 microglobulina (B2M), para su validación y profundización en el papel que desempeña la proteína en la infección. Se elaboraron líneas celulares modificadas con el método CRISPR/Cas9 para anular la expresión del gen de B2M. Se observó el desarrollo de la infección viral detectando la expresión de la proteína marcador fluorescente (BFP) o la actividad enzimática de SEAP mediante el uso de virus *vaccinia* recombinantes. Como resultado, se comprobó que la proteína B2M juega un papel importante en las etapas iniciales de la infección del virus *vaccinia* ya que la ausencia de esta proteína en las células modificadas, disminuye significativamente la infectividad del virus y la expresión de los marcadores, medidos a las pocas horas de infección, previamente a la replicación del DNA viral.

Palabras clave: Virus *vaccinia*, entrada, proteína B2M, BFP, SEAP, CRISPR/Cas9.

Characterization and preclinical evaluation of MVA-gp145/gpn as a novel vaccine candidate against HIV/AIDS²¹

Saiz Martínez, Lidia; Perdiguero de la Torre, Beatriz; Gómez Rodríguez, Carmen Elena

El desarrollo de una vacuna efectiva para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que sea capaz de estimular respuestas tanto humorales como celulares específicas sigue siendo uno de los mayores retos de la comunidad científica. En el presente estudio, determinamos las características virológicas e inmunológicas de un nuevo candidato vacunal basado en MVA, denominado MVA-gp145/GPN, en cultivos celulares y ratones. El virus recombinante expresa de manera simultánea la proteína transmembrana trimérica gp145 de la cepa viral ZM96 subtipo C y la poliproteína Gag(ZM96)-Pol-Nef(CN54), la cual es procesada para formar partículas que se asemejan al virus (VLPs). Observamos que el virus MVA-gp145/GPN expresa los dos antígenos del VIH-1 en la forma correcta, es altamente estable y muestra la misma cinética de crecimiento que el virus parental MVA-WT. El análisis de la respuesta inmune inducida en ratones BALB/c mediante una inmunización homóloga *prime/boost* con MVA-gp145/GPN reveló que este virus recombinante inducía una respuesta T CD4 específica frente a Env y Gag de elevada magnitud y polifuncionalidad. Además, desencadenaba la generación de linfocitos T foliculares y B de los centros germinales VIH-específicos, los cuales se correlacionaron con una robusta respuesta humoral. En conjunto, estos resultados apoyan la consideración del vector MVA-gp145/GPN como posible candidato vacunal contra el VIH-1.

Palabras clave: VIH-1, Inmunogenicidad, ratones, MVA, vacuna.

Caracterización molecular de una nueva especie de begomovirus monopartito aislado de *Ipomoea* sp. en Sudán²²

Salinas Moscoso, José Noel; Fiallo Olivé, Elvira

En el marco de una línea de investigación cuyo objetivo es caracterizar las infecciones virales causadas por begomovirus que afectan a plantas silvestres, en este trabajo se analizaron plantas asintomáticas de *Ipomoea* sp. colectadas en Sudán mediante la amplificación por círculo rodante (RCA) y posterior clonación y secuenciación del virus con genoma de ADN de cadena simple detectado en algunas de las plantas. La caracterización molecular y filogenética del genoma de dicho virus confirmó que se trataba de un begomovirus monopartito (género *Begomovirus*, familia *Geminiviridae*) con una organización genómica típica de los begomovirus del Viejo Mundo. Su genoma está constituido por ADN circular de cadena simple y codifica para seis proteínas, dos en la cadena viral y cuatro en la complementaria. El

²⁰ Departamento de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). 28040 Madrid.

²¹ Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). Campus de Cantoblanco. 28049 Madrid.

²² Laboratorio de Virología del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSMUMA-CSIC) en Algarrobo-Costa, Algarrobo, 29750 Málaga.

análisis de la secuencia genómica completa permitió determinar que constituye una nueva especie dentro del género *Begomovirus*. Este hallazgo confirma la gran diversidad de especies dentro de este género de virus y pone de manifiesto el papel que las plantas silvestres pueden tener como reservorios virales.

Palabras clave: begomovirus, clonación, *Ipomoea*, plantas silvestres, taxonomía viral

Estudio de la formación de VLPs mediante la co-expresión de proteínas estructurales de EBOV utilizando MVAs recombinantes²³

Sánchez Marqués, Raquel; Brun Torres, Alejandro; Moreno Fernández, Sandra

Zaire Ebolavirus (ZEBOV) es la especie más virulenta del género Ebolavirus (EBOV) con una mortalidad de entre un 30-90%, causando fiebres hemorrágicas víricas en humanos y primates no humanos (NHPs). Esta especie es la causante de la mayoría de los brotes de la enfermedad del virus del Ébola. En recientes estudios se ha demostrado que los murciélagos frugívoros son el reservorio natural del virus, y que los cerdos son hospedadores naturales de Ebolavirus pudiendo transmitirlo a los humanos y NHPs. Desde el último gran brote, la alta mortalidad del virus junto con la ausencia de tratamientos y vacunas efectivas han evidenciado la necesidad de desarrollar métodos de diagnóstico rápidos y eficaces. En este estudio se han expresado la nucleoproteína (NP), glicoproteína (GP) y proteína de matriz VP40 (VP40) de ZEBOV empleando como sistema de expresión el vector MVA para evaluar la formación de estructuras supramoleculares que puedan servir como fuente de antígeno para el desarrollo de un sistema de diagnóstico. La expresión y generación de estas estructuras han sido analizadas mediante Western Blot, ensayos de inmunofluorescencia y microscopía electrónica.

Palabras clave: Ebolavirus, proteínas NP, GP y VP40, VLP, método de diagnóstico, MVA.

Estudio de los factores involucrados en la inducción de la apoptosis en células de pollo tras la infección por el virus de la bursitis infecciosa (IBDV)²⁴

Santini Santiago, Aileen; Rodriguez Aguirre, Dolores

El virus de la bursitis infecciosa (IBDV) causa una enfermedad inmunosupresora aguda (IBD), que afecta a los pollos domésticos, y que produce una rápida pérdida de los linfocitos B y la atrofia de la bolsa de Fabricio. Diversas evidencias indican que una respuesta inmune exacerbada, junto con una pérdida masiva de linfocitos B debido a apoptosis, son los principales factores que contribuyen a la gravedad de la enfermedad. Aquí hemos estudiado el papel del IFN tipo I en la activación de la apoptosis en células de pollo infectadas con IBDV. Mientras que el pretratamiento con IFN confiere protección contra la infección por IBDV, la adición de IFN a células previamente infectadas conduce a la muerte celular por apoptosis. El bloqueo de la expresión de PKR, la inhibición de la vía de señalización de IFN o del proceso de transcripción/replicación viral conducen a una reducción de la apoptosis en células DF-1, lo que indica que estos son factores críticos en la respuesta apoptótica. Se obtuvieron resultados similares en células primarias CEF, aunque el efecto apoptótico fue menor en estas células, lo que podría estar relacionado con una menor tasa de replicación de IBDV. Nuestros resultados indican que el material genómico del IBDV es el factor viral que contribuye a la inducción de la apoptosis.

Palabras clave: Apoptosis, IBDV, IFN, ISGs, pollo.

Estudio de la capacidad de la proteína NS2 del virus de la lengua azul en inducir una respuesta inmune protectora²⁵

Utrilla Trigo, Sergio; Ortego Alonso, Francisco Javier; Marín López, Alejandro; Calvo- Pinilla, Eva

El virus de la lengua azul (BTV) causa una enfermedad hemorrágica en rumiantes que se transmite por la picadura de los mosquitos del género culicoides. La lengua azul es una enfermedad prevalente del ganado que causa graves pér-

²³ Centro de Investigación en Sanidad Animal – Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (CISA-INIA). Valdeolmos. 28130 Madrid.

²⁴ Departamento de Biología Molecular y Celular. Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). Campus de Cantoblanco. 28049 Madrid.

²⁵ Centro de Investigación en Sanidad Animal – Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (CISA-INIA). Valdeolmos. 28130 Madrid.

didadas económicas en la industria ganadera de los países afectados. La vacunación es una medida crítica para controlar la propagación del virus. El desarrollo de vacunas frente a BTV se ha centrado en antígenos que inducen una fuerte respuesta de anticuerpos neutralizantes. Debido a su variabilidad antigénica, estas vacunas suelen ser de serotipo restringido. Recientemente, el laboratorio ha demostrado que una sola proteína no estructural altamente conservada, la proteína NS1, expresada en el vector vacunal virus vaccinia Ankara modificado (MVA) puede proporcionar protección multiserotipo en ratones IFNAR (- / -) 129 frente a BTV. En este trabajo, hemos estudiado la posible respuesta inmune protectora inducida por la proteína no estructural NS2 de BTV expresada en el vector viral MVA. Se generaron MVA recombinantes que expresan la proteína NS2 de BTV-4 o las formas truncadas NS2-Nt y NS2-Ct. Además, para analizar la respuesta inmune humoral y celular inducida por los MVA recombinantes, se expresaron las proteínas NS2-Nt o NS2-Ct en el sistema de baculovirus, se purificaron y se usaron para desarrollar un sistema de detección basado en la técnica de ELISA. La inmunización con dos dosis de NS2 o NS2-Nt administradas a través del vector viral rMVA indujo una respuesta inmune humoral y celular específica de NS2, pero no lo suficientemente potente como para proteger a los ratones IFNAR (- / -) infectados con una dosis letal de BTV-4. Aunque los resultados de este trabajo muestran que la respuesta inmune celular inducida por rMVA-NS2 no protege a los animales inmunizados frente a BTV-4, esta respuesta celular podría servir para mejorar la eficacia de la vacuna experimental rMVA-NS1 desarrollada previamente en el laboratorio. Por esta razón, se ha generado un rMVA dual que incluye la proteína NS1, que ya había mostrado buenos resultados en protección y la proteína NS2. El rMVA dual que expresa las proteínas NS1 y NS2 podría ser una vacuna marcadora prometedora frente a múltiples serotipos de BTV.

Palabras clave: Virus de la lengua azul, NS1, NS2, vacuna recombinante, ratones IFNAR (- / -), virus modificado de Vaccinia Ankara.

Evaluación de nuevas herramientas de diagnóstico serológico de infecciones por virus del Nilo Occidental en caballos²⁶

Zavala Gómez. Ricardo; Jiménez Clavero, Miguel Ángel; Llorente de Gracia, Francisco

El virus del Nilo Occidental (WNV) pertenece al género flavivirus y es transmitido a las aves y a otros animales, principalmente mediante mosquitos ornitofílicos. Este virus puede afectar a humanos y caballos causando infección asintomática y, en algunos casos, problemas neurológicos. La detección de IgM es usada para la determinación de infección vírica reciente, pero la persistencia de los anticuerpos de IgM en ocasiones puede ser más larga de lo esperado y puede conducir a confusión en el diagnóstico. Para aliviar este problema, la avidez de los anticuerpos de IgG puede ser una opción en el diagnóstico, diferenciando de una forma más eficiente entre infección reciente y antigua. En este estudio, se llevó a cabo la evaluación de un kit comercial de diagnóstico basado en la detección de la avidez de IgG para su uso en el diagnóstico de infección reciente de WNV en caballos.

Palabras clave: Virus del Nilo Occidental, avidez, diagnóstico serológico, ELISA, infección reciente.

²⁶ Centro de Investigación en Sanidad Animal – Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (CISA-INIA). Valdeolmos. 28130 Madrid.