



Conferencias magistrales

CM01. Modelo animal de hepatocarcinoma en primates no humanos (*Papio hamadryas*) mediante clonación de oncogenes en vectores lentivirales

Henry Bautista*, D. Chavez*, K. Brasky*, V. Hodora*, R. Landfor*

Introducción. El hepatocarcinoma (HCC) es el cuarto tumor maligno más frecuente y el tercero en mortalidad. Esto último demuestra su mal pronóstico en parte por la ausencia de un modelo animal para estudiar la hepatocarcinogenesis.

Objetivo general. Diseñar un modelo animal de cáncer hepático en babuinos (*Papio hamadryas*) mediante clonación de oncogenes en vectores lentivirales.

Metodología. ARN total se obtuvo de cultivos de hepatocitos primarios de babuinos. Los genes P53 R249S, Hras1 G12V, Cmyc, Snail y AFP fueron amplificados por RT-PCR, mutados y ligados en vectores de expresión lentivirales. Cultivos primarios de hepatocitos de babuino fueron transducidos con combinaciones de oncogenes a un MOI ≥ 300 . Los hepatocitos fueron mantenidos durante 30 días en incubación. $1E+06$ o $1E+07$ células fueron inyectadas en el hígado de ratones SCID y babuinos. Luego de un período de incubación de 1-12 meses los animales fueron sacrificados. Tejido tumoral fue extirpado y células malignas aisladas enzimáticamente. Las células y tejidos fueron fenotipificados por múltiples ensayos.

Resultados. Se observaron tumores con las combinaciones P53/Myc y P53/Myc/Hras1 \pm Snail \pm AFP en el 100% de los ratones entre 4 y 12 semanas post inyección. En babuinos, P53MycHras1/ \pm Snail/ \pm AFP originó tumores en el 50% de los animales. Fenotípicamente, los tumores exhibieron un patrón de carcinoma hepático mal diferenciado con pérdida marcadores epiteliales ALB, ALF, HNF4, CK-8 y CK-18, E-cadherina y ganancia de marcadores mesenquimales Vimentin, MMP9, N-cadherina y Snail1. La aparición de masas tumorales visualizadas por resonancia magnética se correlacionó con la sobreexpresión de AFP en suero. El panel de citoquinas en suero mostró elevación de IL-6. Finalmente, se observó un fenotipo de células cáncer stem-cell con un perfil específico de CD90+/CD24+.

Conclusiones. Nuestro modelo de cáncer hepático es el primero en primates no humanos diseñado por ingeniería genética. Su aplicación en la comprensión de la hepatocarcinogenesis, aportará conocimiento para el diagnóstico y tratamiento oportuno del HCC.

*Departamento de Virología e Inmunología; Instituto de Investigaciones Biomédicas de Texas, San Antonio, Texas, EEUU.

CM02. La epidemiología molecular como apoyo a las acciones de vigilancia y control de la rabia en Colombia

Andrés Páez*, Constanza Nuñez†, Andrés Velasco-Villa‡

Introducción. La rabia es una encefalitis aguda y fatal causada por *Lyssavirus*, prevenible por vacunación y con más de 55.000 muertes humanas anuales. La epidemiología molecular comprende sofisticadas técnicas de laboratorio que contribuyen al entendimiento de las relaciones filogenéticas entre virus, siendo herramienta importante para vigilar la circulación viral e implementar medidas de control.

Objetivo general. Investigar las relaciones filogenéticas entre virus rábicos aislados de humanos y animales en Colombia para entender las dinámicas de transmisión de los virus de la rabia en el tiempo, la geografía y entre las especies animales.

Metodología. Los virus rábicos en muestras de tejido encefálico de animales y humanos fueron aislados y caracterizados por tipificación antigénica y genética. Las relaciones filogenéticas fueron inferidas mediante análisis de distancia de las secuencias del gen de la nucleoproteína.

Resultados y conclusiones. Los estudios de epidemiología molecular de la rabia en Colombia han contribuido al entendimiento de las dinámicas de transmisión entre especies animales y humanos, en la geografía y en el tiempo, constituyéndose en herramienta fundamental en la implementación de acciones de control. Los gatos han sido eficientes transmisores de la rabia de origen silvestre a humanos, y no han tenido importancia como transmisores de la rabia urbana. La rabia en zorros en la región caribe ha sido consecuencia de contactos individuales con perros infectados, mas no de un establecimiento entraespecífico. La vigilancia de la rabia canina en la región caribe no ha sido lo suficientemente sensible para identificar la totalidad de casos. Esta podría ser la situación en otras regiones colombianas. Se evidencia que barreras geográficas han limitado la transmisión de la rabia en Colombia. La tipificación serológica ha presentado inespecificidad lo que puede llevar a inferencias equivocadas por lo cual la secuenciación genómica se hace indispensable en la vigilancia de la transmisión de rabia por laboratorio.

*Grupo de Virología, Dirección de Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá D.C. - Colombia. †Grupo VIREM - Laboratorio de Virología - Universidad del Valle - Cali - Colombia. ‡Rabies Section - National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases - Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta GA, USA.

CM03. Infección de neuronas trigeminales por herpes simplex virus, estudios *in vivo* e *in vitro*

Jaime Castellanos*

Introducción. El Virus Herpes Simplex Tipo 1 (HSV-1) se transmite principalmente por la saliva y se replica en las células epiteliales, para luego diseminarse hacia los Ganglios Trigeminales (GT) usando transporte axonal, en donde establece infección latente, causando recurrencias clínicas frecuentes después de reactivarse y expresar todos sus genes durante episodios de inmunosupresión de los pacientes. Se ha descrito un importante papel de los interferones en el control de la replicación viral, pero se conoce poco sobre el papel del Interferón beta (IFN) durante la infección aguda y el establecimiento de la latencia.

Objetivo general. Presentar la evidencia experimental sobre el papel del IFN-beta durante la infección por HSV-1 en un modelo de cultivo primario de GT de ratón establecido por nuestro grupo.

Metodología. Se obtuvieron GT de ratones adultos para cultivo celular, se ensayaron diferentes estrategias de enriquecimiento neuronal para después ser infectados con HSV-1. Se determinaron proporciones de infección en cultivos tratados y no tratados con IFN-beta, la producción viral por plaqueo, la expresión de genes estimulados por IFN usando qPCR y la activación de la cascada de señalización por Western blot. Se evaluó la cinética de captura, transporte e infección en el GT, después de inoculación en la mucosa bucal de ratones adultos.

Resultados. Se estableció un cultivo de GT enriquecido en neuronas (15%), en el cual se demostró un alto neurotropismo del HSV-1. La infección causa un severo efecto citopático que es impedido por el tratamiento con IFN-beta, el cual induce una reducción significativa en el título viral producido. La infección induce la activación de una respuesta antiviral celular, que a su vez es modulada negativamente por el virus, apareciendo una estrategia de evasión que regula moléculas de apagamiento de la señalización de citoquinas (Socs-3) e inhibiendo la fosforilación de Jak-1 y Stat-1. Después de la inoculación por escarificación de la mucosa oral, el virus se transporta hasta el ganglio, encontrándose DNA y virus infeccioso desde el día 5 p.i., tanto en neuronas como en células de soporte en el GT.

Conclusiones. El modelo estandarizado, permite la disección de los eventos celulares y moleculares asociados a la infección por HSV-1 en el GT y a la respuesta antiviral implementada, además de las estrategias de evasión inmune desarrolladas por el virus. La comprensión de estos fenómenos favorecerán el desarrollo de alternativas terapéuticas para la infección por herpes.

*Grupo Patogénesis Infecciosa, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Colombia.

CM04. Polimorfismo del promotor del gen de TNF-A y su relación con la carga viral en animales infectados con virus de leucemia bovina (BLV)

C. Ceriani*‡, V. Nieto*‡, J. Passucci‡, S. Gutierrez*‡, G. Dolcini*‡, P. Lendez*‡

Introducción. El virus de leucosis bovina provoca una expansión benigna de linfocitos B, o linfocitosis persistente, que puede derivar en el desarrollo de linfosarcoma. Ocasiona enormes pérdidas económicas, por eso la necesidad de controlar su diseminación es imperiosa. Hasta el momento no se han podido desarrollar vacunas. La mayor fuente de contagio es la sangre, lo que facilita la transmisión iatrogénica. Se han hecho numerosos estudios para identificar animales resistentes a la diseminación viral, uno de los hallazgos más promisorios hasta el momento es la asociación de ciertos alelos del gen *BoLA* DRB3.2 con la carga viral de los animales. Sin embargo, esto no alcanzaría a justificar la existencia de animales con baja o alta carga viral (BCV o ACV). Luego de la primo infección, se produce un aumento en numerosas citoquinas, entre ellas el TNF- α . En un primer momento, el TNF- α estaría implicado en la apoptosis de las células infectadas, aunque luego debido a cambios en su expresión y a un desbalance de sus receptores, estimularía la proliferación celular y por ende la linfocitosis persistente y el desarrollo de linfosarcoma. La expresión del TNF- α está asociada a polimorfismos de la región promotora del gen.

Objetivo general. Determinar asociación entre un polimorfismo de la región promotora del gen de TNF- α y la carga proviral.

Metodología. El ADN se purificó a partir de sangre entera. Se utilizó la técnica de PCR para determinar la carga viral, y PCR-RFLP para determinar el polimorfismo del promotor.

Resultados. Se analizaron 144 animales ACV y 130 BCV. Dentro del grupo BCV se encontraron 42 A/A, 74 G/A y 14 G/G. En el grupo ACV se encontraron 40 A/A, 61 G/A y 43 G/G.

Conclusiones. Los animales con genotipo G/G en posición -824 tienen 3.22 veces mayor probabilidad de tener alta carga proviral que los individuos G/A o A/A.

*Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN) CONICET. †Laboratorio de Virología, FCV-UNCPBA, Tandil, Argentina. ‡Área de Bioestadística, FCV-UNCPBA, Tandil, Argentina.

CM05. Dinámica de la infección y transmisión de la influenza porcina en cerdos después del destete

A. Diaz*, C. Corzo*, M. Culhane*, S. Sreevatsan*, M. Torremorell*

Introducción. Los Virus Influenza tipo A (IAV) tienen un genoma segmentado, de cadena sencilla, RNA negativo que codifica 12 proteínas diferentes. Las infecciones por influenza son de distribución mundial y ocurren en diferentes especies animales, incluidos los humanos. Dadas las características propias de su genoma y la diversidad de huéspedes a los que afecta, la epidemiología de influenza es extremadamente compleja. El cerdo parece jugar un papel fundamental en la epidemiología de influenza, pero poco se sabe de la evolución del virus dentro de las poblaciones porcinas. El objetivo de este estudio es caracterizar la dinámica de infección y transmisión de la influenza porcina en cerdos después del destete, y determinar cuales factores pueden contribuir en su prolongada persistencia en las poblaciones endémicamente infectadas.

Metodología. Una cohorte de 132 animales fue seleccionado aleatoriamente de un total de 2.200 cerdos a la llegada a una granja de crecimiento y engorde. Los 132 cerdos, con tres semanas de vida, fueron identificados individualmente, y mantenidos con el resto de los animales. La granja seleccionada para el estudio había sido diagnosticada previamente con IAV, y sólo recibe cerdos de una única granja de cría. Un hisopo nasal fue recolectado de cada uno de los cerdos seleccionados a la llegada, y posteriormente una vez a la semana por 15 semanas. Adicionalmente se colectaron muestras de sangre de cada uno de los cerdos a la llegada, y una vez cada 4 semanas. A cada uno de los hisopos recolectados se les corrió un PCR en tiempo real (qRT-PCR) para la identificación de IAV y cada una de las muestras de sangre se analizó por ELISA para la identificación de anticuerpos específicos contra IAV. La proporción de individuos positivos por PCR y la media del valor del ELISA se comparo entre semanas.

Resultados. Se detectaron animales positivos durante todas las semanas muestreadas (excepto en la semana 10) indicando que los cerdos a la llegada pueden ser una fuente de influenza para otras poblaciones. Se identificaron dos picos de infección, a la segunda y séptima semana después del destete, y se identificaron diferencias significativas en la media de los resultados de ELISA para cada una de las semanas identificadas.

Conclusiones. En general nuestros resultados indican que la infección por IAV en cerdos luego del destete es bastante dinámica, que los cerdos destetos pueden ser una fuente de infección para otras poblaciones y que los anticuerpos maternos podrían jugar un papel importante en la presencia del virus por periodos prolongados en poblaciones porcinas.

*Department of Veterinary Population Medicine, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, St. Paul, MN, USA. †PIC, Hendersonville, TN, USA.

CM06. Detección y tipificación de herpes virus humanos

H. Illán*, D. Cisterna*, C. Lema*, R. Bonaventura*, M. Freire*

Introducción. Los herpes virus afectan principalmente a pacientes inmunocomprometidos produciendo importantes patologías como lesiones en piel, en mucosas y en órganos, encefalitis y otros desordenes en el sistema nervioso. Inicialmente el diagnóstico se realizaba mediante técnicas serológicas como ELISA e Inmunofluorescencia. El método gold estándar es el aislamiento viral en cultivos celulares y su identificación con anticuerpos monoclonales. Posteriormente se han desarrollado métodos moleculares.

Objetivo general. Utilizar una metodología con mayor sensibilidad, desarrollándose una técnica de Nested- PCR de mucha utilidad para determinar a los Herpesvirus en muestras de baja carga viral como es el LCR.

Metodología. Esta técnica es a su vez multiplex detectando Herpes Simplex (HSV), Citomegalovirus (CMV), Varicela Zoster (VZV), Epstein Barr (EBV) y Herpesvirus- 6 (HHV-6) en una sola reacción. La misma amplifica una región del gen de la ADN polimerasa viral. La mayoría de las muestras provienen de pacientes inmunosuprimidos principalmente con sospechas de HSV, VZV y CMV.

Resultados. Actualmente en nuestro servicio se están desarrollando técnicas de Real time PCR, con el fin de reemplazar el método convencional. En el caso de la detección de HSV, esta siendo aplicada al diagnostico actual. La misma es una técnica en su forma Taqman, que amplifica la región de la glicoproteína B y utiliza una sonda marcada con FAM-TAMRA, con muy buena sensibilidad.

Conclusiones. La PCR convencional fue también una importante herramienta para la tipificación de HSV tipo 1 y tipo 2 mediante el RFLP a partir de su producto. A su vez se utilizó para investigar los posibles agentes involucrados en los casos de Síndrome de Guillain Barré. Otra aplicación importante fue la determinación previa al estudio de casos de Resistencia Antiviral para HSV y para CMV en la investigación de mutaciones del Gen UL97 asociadas a Resistencia a Ganciclovir.

*Servicio de Neurovirosis, Virología, INEI, ANLIS- Malbrán, Argentina.

CM07. SUMO - ¿Una nueva forma de lucha contra el virus de la influenza humana?

G. Rosas-Acosta*†, K. Meraz*, J. Chacon*, A. Santos*, J. González*, G. Meléndez*,
D. Ramírez*, K. Prieto*, D. Quintanar*, T. Rodríguez*, S. Pal*

Introducción. El virus de la influenza A es uno de los virus con mayor capacidad patogénica para la especie humana. Las medidas actuales utilizadas para combatir la influenza exhiben grandes deficiencias asociadas a la gran variabilidad viral que le permite al virus cambiar continuamente los mayores determinantes antigénicos virales, y desarrollar resistencia contra cualquier droga antiviral que este dirigida a componentes estructurales virales.

Objetivo general. El objetivo de los estudios que se desarrollan en nuestro laboratorio es la caracterización de las interacciones establecidas entre el virus de la influenza y un sistema de modificación post-translacional de proteínas, conocido como el Sistema de SUMOylación.

Metodología. Nuestros estudios han abarcado una gran gama de aproximaciones experimentales, desde ensayos *in vitro* hasta pruebas en animales, pasando desde luego por numerosos ensayos en cultivo celular, y usando sistemas de genética reversa para desarrollar nuevos mutantes virales que nos permitan esclarecer con precisión los roles proveídos por el sistema de SUMOylación para el virus de la influenza.

Resultados. Nuestros datos demuestran el establecimiento de una interacción muy íntima entre el virus de la influenza A y el sistema de SUMOylación, ya que numerosas proteínas virales son modificadas por este sistema y, en el proceso, las funciones asociadas a ellas son reguladas por esta modificación. Adicionalmente, el virus en sí mismo incrementa la actividad de este sistema celular, pero las células que exhiben el mayor incremento son las que parecen desarrollar resistencia a la infección viral, sugiriendo una posible función protectora. Consistente con estas observaciones, mutantes virales que llevan una proteína viral no modificable, exhiben mayor patogenicidad en un modelo animal.

Conclusiones. Nuestros estudios sugieren que el sistema de SUMOylación parece constituir otro sistema celular con capacidad antiviral. Por lo tanto, es posible que tratamientos capaces de incrementar la actividad de este sistema celular de manera transitoria puedan constituir potenciales tratamientos contra la influenza.

*Department of Biological Sciences, The University of Texas at El Paso, El Paso, TX. 79968 USA; and, †Border Biomedical Research Center, The University of Texas at El Paso, El Paso, TX. 79968 USA.

CM08. Epidemiología molecular de la infección respiratoria aguda grave (IRAG) en unidades centinelas de Bogotá durante el 2012

Liliana Patricia Díaz*, Yeimi González-Giraldo*, Sandra Gómez*, Patricia MPH. Arce†, Hernán Vargas*

Introducción. En Bogotá los resultados de la vigilancia centinela de infección respiratoria presentados por la Secretaría de Salud los virus frecuentemente detectados por IFI son VSR, adenovirus, Influenza y Parainfluenza.

Objetivo general. Genotipar los virus presentes en IRAG en unidades centinelas, describir la estacionalidad y las posibles características clínicas en Bogotá durante el 2012.

Metodología. La muestra se seleccionó de la base de datos del Laboratorio de Salud Pública para el evento y mediante técnica de CLART Pneumovir identificaron 19 virus respiratorios, se estimaron las prevalencias virales por subgrupos de edad, sexo y diagnóstico clínico inicial.

Resultados. Analizadas 316 muestras, fueron positivas 265 (83,8%). El grupo de menores de dos años presentó la mayor presencia de virus con 141 muestras (44,6%). La Neumonía no especificada (Código CIE-10 J18.9) y Bronquiolitis aguda no especificada (Código CIE-10 J21.9) presentaron la mayor positividad de virus con el 23,7% (n= 75) y 22,4% (n= 71). El virus con mayor prevalencia fue Bocavirus con el 38,6% (n= 121), encontrándose como infección única en el 9,8% (31 muestras) y en asocio con otros virus en el 90,2% (n= 90). En una muestra se detectó la coinfección por seis virus. La asociación del VSR tipo A con diagnóstico de bronquiolitis fue evidenciada ($X^2= 27,61$ $p<0,000$) y el VSR tipo B como causante de la neumonía de tipo viral ($X^2= 12,49$ $p< 0.000$). La estacionalidad viral para el Bocavirus mostró un pico a la semana 22 y otro a la semana 42, igual que para el VSR A y Adenovirus. Otros virus no detectados por la técnica de IFI, tales como Rhinovirus y Metapneumovirus presentaron picos en las mismas semanas epidemiológicas.

Conclusiones. Se demostró la presencia de virus respiratorios de notificación obligatoria y de nuevos virus respiratorios emergentes en forma de infecciones únicas y múltiples en muestras tanto positivas como negativas reportadas por IFI dentro de las unidades centinelas establecidas por IRAG en Bogotá.

*Grupo Laboratorio de Salud Pública. Dirección de Salud Pública. Secretaría de Salud de Bogotá. †Grupo de Vigilancia Epidemiológica. Dirección de Salud Pública. Secretaría de Salud de Bogotá.

CM09. La autofagia celular en la maduración del virus del dengue

M. Roberto*, Claude M. Nagamine†, E. Méndez‡, J. Yuan§, K. Kirkegaard*

Introducción. El proceso celular de autofagia desempeña un papel fundamental en la respuesta inmune innata y está generalmente destinado a destruir diversos tipos de patógenos intracelulares. Algunos patógenos como el virus de la poliomielitis, el virus de la hepatitis C y el virus del dengue, no obstante, dependen de dicho proceso, o componentes del mismo, para su replicación. Para este tipo de virus, inhibidores de autofagia pueden ser utilizados terapéuticamente como inhibidores de infección, con la ventaja de que, al tratarse de un proceso celular esencial en el ciclo viral, la selección de variantes resistentes al tratamiento está altamente dificultada.

Objetivo general. Determinar el efecto de la estimulación e inhibición de autofagia en el ciclo viral del virus del dengue *in vivo* e *in vitro*.

Metodología. Se han empleado los compuestos estimuladores de autofagia rapamicina y nicardipina tanto *in vivo* (ratones AG-129) como *in vitro* (células BHK-21) y el compuesto spautin-1 como inhibidor de autofagia *in vitro*. Las infecciones de dengue se llevaron a cabo con las cepas de dengue 16681 en células BHK-21 y PL046 en ratones AG-129.

Resultados. La estimulación de autofagia con rapamicina y nicardipina resultó en un aumento del título viral y la patogenicidad de la infección por dengue. La inhibición de autofagia con spautin-1 resultó en una significativa reducción del título viral, con una mínima reducción en la cantidad de RNA viral. El análisis de las partículas formadas en la ausencia de autofagia reveló partículas termosensibles y no infecciosas en las que el péptido pr se encuentra asociado al virión.

Conclusiones. El proceso de autofagia es importante en varios estadios del ciclo viral del virus del dengue, desempeñando un papel fundamental en el proceso de maduración y posterior adquisición de infectividad del virus. Como consecuencia, la inhibición farmacológica controlada de autofagia podría suponer una nueva estrategia en la lucha contra infecciones causadas por dengue.

*Departamento de Microbiología e Inmunología. †Departamento de Medicina Comparativa, Stanford University School of Medicine, Stanford, Estados Unidos. ‡Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México. §Departamento de Biología Celular, Harvard Medical School, Boston, Estados Unidos.

CM10. Estudios de neuroinvasión y neuropatogenia asociados a una cepa de virus dengue

Myriam Velandia*, Leidy Bastidas*, María Calderón*, Sigrid Camacho*, Jaime Castellanos*

Introducción. El Virus del Dengue (DENV) en algunas ocasiones infecta y altera la fisiología del tejido nervioso. Actualmente no se conocen los mecanismos utilizados por el DENV para ingresar e infectar el tejido nervioso, de igual modo se desconocen algunos aspectos de la neuropatogenia asociada a la infección.

Objetivo general. Establecer un modelo de infección que permita evaluar la neuroinfección y neuropatogenia inducida por DENV.

Metodología. Para responder algunos aspectos de la neuroinvasión y neuropatogenia inducida por una cepa de virus dengue neuroadaptada, se hizo la neuroadaptación *in vivo* e *in vitro* de una cepa de DENV-4. La variante viral neuroadaptada (D4MB-6) obtenida se usó para infectar animales recién nacidos. A los 3 o 6 días postinfección (dpi) los animales fueron procesados para evaluar la infección y alteración del tejido nervioso y órganos extraneurales, el tipo de respuesta y otros aspectos asociados a la neuropatogenia, adicionalmente se evaluó la alteración de la permeabilidad vascular (*in vivo* e *in vitro*).

Resultados. La variante viral D4MB-6, indujo alteraciones neurológicas al ser inoculada por la vía peritoneal o en la almohadilla plantar, de ratones Balb/c de 2 y 7 días. Esta variante infectó neuronas, microglía, oligodendrocitos y linfocitos; causó hemorragias y vasodilatación y daños evidentes en la arquitectura del encéfalo, sin replicarse ni afectar órganos extraneurales. Activó la respuesta inmune local y se detectaron mediadores pro-inflamatorios asociados o no a Interferón. Adicionalmente se encontró que la infección indujo la muerte neuronal asociada a procesos excitotóxicos por glutamato. Finalmente se observó que este virus utilizó el transporte axonal retrogrado y alteró la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica, para permitir el paso de virus y de células inmunes.

Conclusiones. Nuestro modelo nos sugiere que la neuropatogenia asociada al D4MB-6 es multifactorial asociada a la madurez fisiológica de los individuos, a procesos excitotóxicos e inmunológicos.

*Grupo de Virología, División de Investigaciones, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

CM11. Indicaciones de detección y genotipado de HPV en la práctica: triage con Test de Papanicolaou

Laura García*

Introducción. El Virus del Papiloma Humano (HPV) causa Cáncer de Cuello Uterino (CC), se encuentra ampliamente distribuido en la población sexualmente activa. Cada país ha adoptado su propia estrategia para combatir esta enfermedad. En nuestro país se recomienda el Test de Papanicolaou (PAP) anual para la detección de lesiones de cuello. La detección del HPV muchas veces genera incertidumbre por lo que fue necesario determinar el grupo que se beneficia de la técnica.

Objetivo general. Detectar posibles beneficiarios del test de HPV.

Metodología. Se analizaron los resultados de 3.510 pacientes clasificadas en los siguientes grupos: 958 mujeres asintomáticas de Red de Atención Primaria (RAP) a las que se realizó PAP y HPV; 1.864 pacientes sintomáticas de la Unidad de Infecciones Genitales (UDIG), 550 pacientes con lesiones actuales o tratadas de cuello uterino (Policlínica de Tracto Genital Inferior- TGI) y 138 pacientes HIV+. Se realizó la detección y genotipado de HPV mediante el kit comercial Papillocheck (Greiner).

Resultados. La prevalencia de la infección por HPV fue de 13.7%, 20.4%, 33.6% y 59.4% para los grupos RAP, UDIG, TGI y HIV, respectivamente. Los genotipos fueron de alto riesgo en más del 84.3% en todos los grupos. El genotipo 16 fue el más frecuente, seguido del genotipo 56. Las pacientes HIV+ son más propensas a desarrollar infecciones persistentes y lesiones de alto grado (HSIL). La resolución de la infección se produjo en el 60%, 50% y 0% de las pacientes de UDIG, TGI y HIV, respectivamente. Ninguna de las pacientes positivas por el PAP y negativas para HPV o viceversa presentó lesiones precancerosas en el control colposcópico.

Conclusiones. Para pacientes inmunocompetentes es recomendable continuar con el PAP y reservar el Test de HPV para las pacientes con ASCUS o control post-tratamiento de lesiones de cuello. En las pacientes inmunocomprometidas se recomienda descartar primero la infección por HPV, dada la rápida evolución de la noxa.

*Laboratorio de Biología Molecular. Departamento de Patología Clínica. Centro Hospitalario Pereira Rossell. Administración de Servicios de Salud del Estado (ASSE). Montevideo, Uruguay.

CM12. La infección por el VIH-1, regula la expresión/función de los receptores tipo Toll 2 y 4, en células primarias humanas

Silvio Urcuqui-Inchima*, Diana Giraldo*, Juan Carlos Hernández†

Introducción. La respuesta innata a través de los Receptores Tipo Toll (TLR), juega un papel fundamental en la infección por el VIH-1 y en la inducción de una respuesta antiviral. En efecto, el reconocimiento del VIH-1 a través de los TLR, induce la producción de citoquinas proinflamatorias e interferón. Igualmente se ha descrito que la exposición de células infectadas por el VIH-1, en presencia de agonistas específicos de los TLR, afecta la replicación viral.

Objetivo general. Evaluar el efecto de la infección por VIH-1 en la expresión y función de los TLR2 y TLR4 en células primarias humanas.

Metodología. Células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y macrófagos derivados de monocitos (MDM), obtenidas de individuos sanos, fueron estimuladas *in vitro* con el VIH-1 y se evaluó la expresión de TLR2 y TLR4, por citometría de flujo. La producción de citoquinas se determinó por ELISA. Igualmente en CMSP de individuos VIH-1(+) se evaluó la expresión de los TLR y citoquinas proinflamatorias. Finalmente, en neutrófilos obtenidos de individuos sanos se evaluó el efecto del VIH-1 en la expresión y función de diferentes TLR, por RT-PCR y ELISA, respectivamente.

Resultados. El VIH-1 altera la expresión de TLR2 y TLR4 y la producción de citoquinas proinflamatorias, tanto en CMSP como en MDM. Resultados similares fueron observados en CMSP obtenidos de individuos VIH-1(+). En neutrófilos también se observó que el VIH-1 altera la expresión/función de los TLR.

Conclusiones. Nuestros resultados muestran que el VIH-1 regula la producción de citoquinas proinflamatorias, a través de la expresión de los TLR.

*Grupo Inmunovirología, Universidad de Antioquia, †Infettare, Universidad Cooperativa de Colombia, Medellín, Colombia.

CM13. Identificación *in-silico* de genes asociados a la patogénesis de paraparesia espástica tropical/mielopatía asociada al HTLV-1 (HAM/TSP)

*Eliana Ocampo-Toro**, *Fabian Tobar-Tosse**, *Pedro A. Moreno†*

Introducción. La Paraparesia Espástica Tropical / Mielopatía asociada al HTLV-1 (HAM/TSP), es una enfermedad neurodegenerativa de impacto en la población de la costa pacífica colombiana, cuya patogenia está asociada a la infección de linfocitos T CD4+ por parte del retrovirus HTLV-1, cuyo mecanismo de infección y respuesta inmune aún no se conoce con claridad.

Metodología. Dentro del presente trabajo se realizó una exploración de nuevos genes humanos asociados a HAM/TSP, mediante métodos bioinformáticos de análisis de bases de datos de expresión de genes.

Resultados. Fueron identificados genes con similar perfil de expresión a la proteína humana HNRNPA1 asociada a HAM/TSP, dentro de estos, se destacan genes constitutivos de células gliales y relacionados filogenéticamente con HNRNPA1 y la proteína viral Tax.

Conclusiones. En el presente trabajo han sido identificados un conjunto de genes asociados a HAM/TSP con perfiles de expresión similares, con características funcionales y estructurales que los describen como factores determinantes dentro de esta mielopatía.

*Grupo de Investigación de Ciencias Básicas y Clínicas de la Salud. Pontificia Universidad Javeriana Cali. Cali – Colombia. †Grupo de Bioinformática y Biocomputación. Universidad del Valle. Cali – Colombia.

CM14. Principales características epidemiológicas y moleculares del virus de influenza tipo A en poblaciones porcinas

*A. Diaz**, *M. Allerson**, *M. Culhane**, *S. Sreevatsan**, *M. Torremorell**

Los Virus Influenza Tipo A (IAV) son una zoonosis de distribución mundial, responsables de la primera pandemia humana del siglo XXI, cuyo reservorio natural son las aves acuáticas. La influenza porcina es considerada endémica a nivel mundial y los virus de gripe representan un riesgo directo para la salud del cerdo pues es un agente etiológico primario de enfermedad. Asimismo el virus es considerado un riesgo en salud pública dado que los humanos y los cerdos han compartido múltiples IAV a lo largo del tiempo, incluido el virus pandémico. Sin embargo se desconoce cuál es el rol del cerdo en la transmisión de los IAV al hombre.

Los IAV tienen un genoma segmentado extremadamente diverso, RNA negativo, que pueden codificar hasta 12 proteínas diferentes que conforman al virión. En su superficie posee sus dos principales antígenos proteicos, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Existen al menos 16 hemaglutininas y 9 neuraminidasas diferentes que determinan la antigenicidad del virus y su capacidad para infectar a una especie u otra. Las diferencias en dichos antígenos permiten que el virus re-circule en las poblaciones susceptibles lo cual hace que el control y la erradicación sean extremadamente difícil. Dichos cambios antigénicos ocurren por la evolución natural del virus durante su transmisión mediante dos mecanismos: el drift antigénico, y el shift antigénico. En el primero la acumulación de mutaciones puntuales, hace que los antígenos diverjan sobre el tiempo. En el segundo cuando existe una infección con dos o más virus, en un mismo huésped, los viriones pueden intercambiar segmentos genéticos, generando un virus que antigénicamente es muy diferente a sus “progenitores”. Actualmente nuevas técnicas de secuenciación (Next Generation Sequencing, NGS) permiten explorar con mayor cobertura y confianza la variabilidad genética del virus dentro de las diferentes poblaciones o subpoblaciones infectadas, y nuevas técnicas de cartografía antigénica pueden ser utilizadas para comparar sus diferencias antigénicas.

En resumen el cerdo parece jugar un papel fundamental en la epidemiología de los IAV, dado que puede infectarse con virus de múltiples orígenes (aviar, porcino o humano). La transmisión en cerdos ocurre principalmente por contacto directo entre los animales, pero diversas rutas de transmisión indirecta también han sido reportadas. Dentro de los factores reconocidos como modificadores en la transmisión y selección de los IAV en cerdos, se pueden mencionar: la vacunación, el movimiento de animales, y la constante introducción de animales susceptibles en las granjas porcinas (lechones recién nacidos, y hembras de reemplazo). Conocer los mecanismos de transmisión y evolución de los IAV en poblaciones porcinas es fundamental para desarrollar estrategias de prevención, control, e incluso eliminación para reducir su impacto en la salud porcina y minimizar el riesgo en salud pública. Sin embargo la evidencia científica indica que hay una mayor proporción de virus influenza que fluyen de los humanos a los cerdos que de los cerdos a los humanos por lo cual el diseño de estrategias para reducir esta transmisión es igualmente importante.

*Department of Veterinary Population Medicine, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, St. Paul, MN, United States.

CM15. Actualización sobre herpesvirus en bovinos y equinos en Colombia

Julián Ruíz-Sáenz*

El Herpesvirus bovino-1 (BoHV-1) y los Herpesvirus equinos 1 y 4 (EHV-1 & EHV-4), son virus de genoma ADN pertenecientes al orden de los *Herpesvirales*, familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alfaherpesvirinae*. Dichos virus poseen una amplia diversidad de cepas, las cuales son serológicamente indiferenciables. Estos agentes son patógenos altamente prevalentes en diversas regiones del mundo y causan graves pérdidas económicas debidas a un amplio rango de síntomas clínicos que van desde la presentación de enfermedad respiratoria hasta la inducción de abortos en el último tercio de la gestación, muertres embrionarias y en algunos casos enfermedad neurológica asociada a la infección.

En Colombia el BoHV-1 fue reportado por primera vez a comienzos de los años 70, y desde entonces ha sido reportado como uno de los principales limitantes de la industria ganadera nacional. Estudios serológicos en haciendas ubicadas en los departamentos de Antioquia y del Valle del Cauca demostraron un 100% de prevalencia serológica por hato para el BoHV-1 y una prevalencia general por individuos del 75,63%. Desde el punto de vista molecular, la caracterización de aislamientos virales ha mostrado que la mayoría de los aislamientos pertenecen al subtipo BoHV-1.1 y solo una cepa pertenece al subtipo BoHV-1.2a; existiendo diferencias en la virulencia de las cepas aisladas.

Para los Herpesvirus equinos, los estudios serológicos han demostrado prevalencias para el EHV-4 superiores al 90% y para el EHV-1 prevalencias que pueden ir del 1,92% al 33,3% de animales positivos dependiendo de la presencia de factores de riesgo para la presentación de la infección. Estudios moleculares realizados han demostrado circulación de ambos virus tanto en células mononucleares de sangre periférica como en ganglios trigéminos de equinos de plantas de faenado, indicándose la presencia de latencia viral y la presencia de reservorios de la infección en el país.

*Grupo de Investigación en Ciencias Veterinarias Centauro, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

CM16. Enfoques globales en el estudio de la interacción rotavirus-célula

T. López*, D. Silva-Ayala*, L. Casorla*, J. Moreno*, C. Batista†, N. Perrimon‡, S. López*, C. Arias*

Los rotavirus son la principal causa de gastroenteritis severas en niños pequeños a nivel mundial. Actualmente se cuenta con dos vacunas, pero no existen tratamientos dirigidos en contra del virus. Entender de los mecanismos que utiliza el virus para replicarse en sus células huésped puede ser una fuente de información en el diseño de los tratamientos con capacidad de inhibir la replicación viral. Existen varias estrategias que permiten estudiar en forma global las interacciones entre los virus y las células. Uno de estos enfoques se basa en el uso de la tecnología de la interferencia de RNA, con esta técnica es posible reducir la expresión de cualquier proteína celular y estudiar el efecto de esta reducción en la replicación viral. Otro enfoque muy útil es el de la proteómica cuantitativa, en este caso se intenta evaluar los cambios en los niveles de expresión de proteínas celulares inducidos durante la replicación viral. Es posible combinar este enfoque con técnicas que permiten estudiar un subset del proteoma celular, por ejemplo el fosfoproteoma, y de esta manera estudiar los cambios en el patrón de fosforilación de proteínas inducidos por la replicación viral.

Existen varios retos metodológicos en el montaje de estas estrategias. En el caso de la interferencia de RNA el diseño de la metodología necesaria para evaluar de forma eficiente, cuantitativa, rápida y repetitiva la replicación viral es un paso indispensable. Con la finalidad de realizar un tamizaje de siRNAs que cubriera en su totalidad el genoma humano, desarrollamos un ensayo de fluorescencia infrarroja. Este ensayo se basa en el uso de anticuerpos para detectar antígeno viral directamente en la placa de cultivo mediante inmunofluorescencia indirecta. Usando este ensayo evaluamos el efecto de una biblioteca de 21,000 siRNAs, identificamos 516 tratamientos de siRNAs con la capacidad de reducir la expresión del antígeno viral. A partir de estos datos identificamos varias funciones celulares, entre ellas el tráfico vehicular, el sistema Ubiquitina-proteasoma y uniones estrechas.

En el caso del análisis del fosfoproteoma una de las etapas más importantes es precisamente la de poder aislar esta parte del proteoma, En el caso de rotavirus hemos utilizando una combinación de marcaje iTRAQ y purificación de fosfopéptidos para evaluar los cambios en el nivel de fosforilación durante la infección viral a 2 y 6 horas postinfección. Los fosfopéptidos purificados mediante columnas de óxido de Titanio fueron separados mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, los datos fueron colectados y analizados para identificar tanto la secuencia del péptido, el sitio de fosforilación y las marcas iTRAQ. A partir de estos datos pudimos identificar más de 80 sitios de fosforilación que cambian durante la infección. Se identificaron eventos metabólicos como los más representados dentro de este conjunto de datos, sugiriendo un control a nivel del metabolismo celular inducido por el virus durante su replicación. Estos datos permiten tener un panorama amplio de las interacciones entre la célula huésped y rotavirus, generando nuevo conocimiento y ayudando a identificar eventos necesarios para que rotavirus pueda infectar eficientemente.

*Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular. †Laboratorio Universitario de Proteómica, Instituto de Biotecnología-UN-AM. ‡Departamento de Genética, Escuela de Medicina, Universidad de Harvard.

CM17. Epigenomic and topological consequences of lentiviral integration process on target chromatin

F. García*, M. Domínguez*

The human genome is one of the most complex molecular structures ever seen in nature. Its extraordinary information content has revealed a surprising mosaicism between coding and non-coding sequences. This highly regionalized structure introduces complex patterns for understanding the gene structure and repetitive DNA sequence composition providing a new scenario to study biological processes such as Lentivirus cDNA integration into host genome.

Insertion of the retrotranscribed viral cDNA copy into the host cell genome is an essential step in the life cycle of retroviruses and one of their main features. Upon entry and release of the viral RNA into the cytoplasm of the host cell, this is reverse transcribed into a linear double stranded cDNA molecule. The resulting cDNA copy is then integrated into the genome of the host cell in a process catalyzed by the viral Integrase (IN). HIV-1 integration has been extensively studied using a wide array of molecular biology, biochemistry and structural biology approaches. However, it is critical to directly identify the viral distribution inside human genome in order to understand at genomic level the relationship between the composition and topology of chromatin and the target site selection.

The main results that our group of investigation have obtained, lead us to propose as working hypothesis that complex mechanisms of retroviral cDNA integration alters the topological conformation of chromatin and the histone modifications in those areas of chromatin with high frequency of lentivirus provirus.

To test such working hypothesis we had used two systemic approaches: 1). To study the effect of cDNA integration in the several gene expression networks of normal and HIV-1 infected target cells and 2). To analyze complex histone modification patterns and described the epigenomic environment that characterizes HIV-1, MLV and XMRV insertion sites by taking advantage of the detailed genome-wide chromatin maps that are currently available for human CD4+T cells. Using data from BOND (Biomolecular Network Data Bank, <http://bond.unleashedinformatics.com/Action>), BioGRID (Biological General Repository for Interaction Datasets, <http://thebiogrid.org/>), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>), available online, a file with the interaction data of 28 genes located close to integration sites was constructed. A total of 2770 interactions among 28 genes which were located close to HIV-1 proviruses in human macrophages were recorded. The evaluation of the several topological parameters such as clustering coefficient, shortest paths, network heterogeneity, the centralization, average number of neighbors and characteristic path length, showed change in the values of HIV-1 macrophage infected gene network, compared with normal macrophage network. The non- altered network was more condensed, had more number of interactions, was wide open rich in shortest paths and also was composed by one major component and two minor clusters being more heterogeneous and multi-functional. Statistical differences between the topology states of two networks were registered for topological coefficients, closeness centrality and neighborhood connectivity distribution (Kolmogorov-Smirnov test $p < 0.05$). These results indicate that normal network was significantly more central and densely connected in comparison with that of HIV-1 macrophage infected network.

To determine if histone modification enrichments around retroviral integration sites are specific of retrovirus, we computed the Log of the Ratio of Fold Change (LFR score) for 39-histone marks resulting of the analysis of 88517 Lentivirus and Gammaretrovirus integration sites in CD4+T cells. Moreover we determined that H3K23ac, H4K8ac, H4K12ac, H3K27ac, and H4K5ac was the set of five histone marks with the most similar pattern. H3K18ac, a mark mainly located in the region surrounding the TSS, is also present in the set of the most divergent histone marks obtained in our analysis. In the same way, we observed that H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, which are marks elevated in the promoter and transcribed regions of active genes were present in the set of histone modifications with the most similar distribution pattern among the three type of retrovirus analyzed.

Taking together our data validated the hypothesis of the existence of highly complex mechanisms altering the topology and epigenetic status of that regions of chromatin associated with several events of retroviral integrations and enforce the idea that chromatin signatures expose specie-specific retroviral infectious and pathogenic mechanisms.

Acknowledgments. This work was grant in aid with funds of COLCIENCIAS/Universidad del Valle (2010). Project "Integration of Human Lentivirus in Macrophages" project. The Universidad del Valle /Internal Call (2013). Project "Construction of Systemic Model of the Lentiviral Integration Process", and Biology School of Georgia Tech/Univale inter-institutional cooperation convention (2013).

*Molecular Biology and Pathogenesis Laboratory, Department of Physiological Sciences, Biomedical Sciences School, Health Faculty, Universidad del Valle.

CM18. Genetic variability and evolution of pandemic H1N1 influenza A virus in the Latin American region

Juan Cristina*

The first influenza pandemic of this century was declared in April of 2009, with the emergence of a novel H1N1 influenza A virus strain (H1N1pdm). Understanding the evolution of H1N1pdm populations within the South American region is essential for studying global diversification, emergence, resistance and vaccine efficacy. In order to gain insight into these matters, we have performed an extensive phylogenetic analysis of hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) gene sequences of all available and comparable HA and NA sequences obtained from H1N1pdm IAV circulating in the South American region. High evolutionary rates and fast population growths characterize the population dynamics of H1N1pdm strains in this region of the world. A significant contribution of first codon position to the mean evolutionary rate was found for both genes studied, revealing a high contribution of nonsynonymous substitutions to the mean substitution rate. The results of these studies revealed that clade 7 was the dominant 2009 H1N1pdm lineage in South America. Amino acid substitutions P100S, S220T and I338V were found in almost all HAs of South American H1N1pdm strains. All strains isolated in Brazil, bearing substitution Q310H are assigned to clade 6, suggesting a founder effect. Substitutions found in the NA proteins of H1N1pdm strains isolated in South America, with the exception of some strains isolated in Argentina and Brazil bearing HA substitution H275Y, do not appear to be sufficiently close to affect the drug binding pocket for the three NA inhibitor antivirals tested. An analysis of the NA protein of N1 component of the Influenza vaccine strain recommended for Southern hemisphere influenza seasons of 2010 - 2013 and H1N1pdm strains isolated in South America during the same period showed differences in the antigenic properties of the proteins, revealing that antigenic regions relevant for vaccine development may differ among different H1N1pdm populations. All these will be discussed on the light of the course of genetic and antigenic evolution of H1N1pdm IAV populations circulating in the South American region and its contribution to the selection of future and appropriate vaccine strains and anti-viral drugs.

*Laboratorio de Virología Molecular, CIN, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

CM19. Identificación de proteínas celulares involucradas en el ciclo de replicación de astrovirus

A. Murillo*, R. Vera-Estrella†, B.J. Barkla†, E. Méndez, CF. Arias*

Los astrovirus son la segunda causa de gastroenteritis en niños. Poseen un genoma (6.8 kb) de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva con tres marcos abiertos de lectura (ORF 1a -1b y 2), cada uno de los cuales codifica para una poliproteína. Cada vez hay más evidencia de la función que cumplen las proteínas, lípidos y membranas celulares en el ciclo de replicación de los virus (+)RNA. En este trabajo nos propusimos separar y caracterizar las membranas donde astrovirus pudiera estar llevando a cabo la replicación y posiblemente el ensamble de las partículas virales. A partir de células Caco-2 infectadas con astrovirus Yuc 8 separamos las proteínas asociadas a membranas mediante gradientes de flotación en Iodixanol y electroforesis zonal de flujo libre (EZFL). Se separaron tres poblaciones (I, II, III) de membranas en las cuales determinamos la presencia tanto de la proteína estructural VP90, las proteínas no estructurales nsp1 y nsp2 (proteasa y RNA polimerasa, respectivamente), así como del RNA genómico y anti genómico, solamente en la población II (fracciones 40 a 60 de un total de 96). Adicionalmente quisimos identificar las proteínas celulares presentes en estas fracciones, para ello se escogieron fracciones de la población II y de las poblaciones I y III (como control negativo) para ser analizadas por espectrometría de masas (LC-MS/MS). En total se identificaron 814 y 803 proteínas (con alta confianza, mínimo dos péptidos únicos y un porcentaje de identificación del 95%) de las células no infectadas e infectadas, respectivamente. Obtuvimos una superposición del 41,4% (670 proteínas) entre las células no infectadas e infectadas y el análisis por redes (STRING software) mostró un enriquecimiento de redes proteicas diferentes entre ambas condiciones. Partiendo de la hipótesis de que proteínas celulares localizadas en esas fracciones pueden tener alguna función en la replicación de astrovirus, enfocamos el análisis en las proteínas que solamente se encontraron en las células infectadas y en la fracción 48-49 donde se encontró mayor cantidad de proteínas, RNA y partículas virales. En esta fracción, de 17 proteínas, seleccionamos 7 con base a su función en la replicación de otros virus. Al evaluar efecto del silenciamiento de estos 7 genes sobre la replicación de astrovirus encontramos que el silenciamiento de los genes que codifican para las proteínas Lanosterol-14-demetilasa, RNA helicasa DDX23 y el receptor del fosfatidil inositol trifosfato (ITPR-3) disminuyen el rendimiento viral. Actualmente estamos determinando a qué nivel estos genes cumplen una función importante para la replicación de astrovirus. (Apoyo de DGAPA UNAM/IN219910 y Conacyt/79574).

*Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, †Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, México.

CM20. Estudios de la infección por virus de las hepatitis en Colombia

María-Cristina Navas*

Las hepatitis virales representan una importante causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. En Colombia los casos de hepatitis A y hepatitis B son de notificación obligatoria; es así como en el año 2011 se registraron 2.219 casos de hepatitis B y 5.519 casos de hepatitis A en el sistema de salud.

Los genotipos de VHB identificados en estudios realizados por el Grupo de Gastrohepatología en pacientes, donantes y población asintomática de Medellín, Apartadó, Quibdó y Amazonas corresponden a genotipo F, subgenotipos F3, F1b, y F1a, genotipo A y Genotipo D. El genotipo F, subgenotipos F3 y F1b, son los de mayor representación en los diferentes grupos analizados. También se ha demostrado la circulación exclusiva del genotipo III del Virus de la Hepatitis Delta en comunidades indígenas del departamento del Amazonas.

Adicionalmente se ha caracterizado la infección oculta por VHB en donantes de sangre (2,0%, 6/310) y en pacientes con hepatopatías terminales (9,5%, 6/66).

Con respecto a la infección por VHC en pacientes multitransfundidos, se identificaron los genotipos 1b, 1a, 2b y 3a, con predominio del subgenotipo 1b.

Casos de infección por Virus de la Hepatitis E (VHE) fueron demostrados por marcadores serológicos y moleculares en muestras de pacientes, con diagnóstico clínico de hepatitis viral, residentes en Medellín y en otros municipios del departamento de Antioquia. El análisis filogenético de los aislados demostró la circulación del genotipo 3 de VHE, como ha sido descrito en otros países de Sur América.

Por último, los resultados preliminares de un proyecto en ejecución han demostrado la presencia del Virus de la Hepatitis A en el río Magdalena y en las quebradas La Golondrina y El Hato, fuente principal de los acueductos de municipios de Antioquia. Mientras que el VHE ha sido detectado en aguas residuales de tres municipios.

*Grupo de Gastrohepatología, Universidad de Antioquia. Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

CM21. The cytokine response of human macrophages infected with Dengue Virus under antibody enhancing conditions induces endothelial activation and tight junction disruption *in vitro*, and increases vascular permeability *in vivo*

H. Puerta*, F. Medina*, S. Raya†, L. González-Mariscal‡, R. del Ángel*, J. Ludert*

Severe Dengue (SD) is a potentially deadly complication of Dengue Virus (DV) infection, which alters vascular barrier fluid functions and results in plasma leakage and hemorrhagic manifestations. Pre-existing immunity to one of the four DV serotypes can increase disease severity upon subsequent infection with a different serotype, presumably through a mechanism called *Antibody-Dependent Enhancement* (ADE). Despite extensive studies, the molecular bases of how ADE contributes to SD are largely unknown. This work compares alongside the cytokine response of differentiated U937 human monocytic cells infected directly with DV or in the presence of enhancing concentrations of a monoclonal antibody directed to the E protein. The same antibody mutated in the Fc region, thus unable to bind to the Fc receptor, was used as a negative control. In addition, the capacity of conditioned supernatants to disrupt tight junctions (TJs) in MDCK cell cultures and to activate endothelial HUVEC cells was also evaluated. Using a cytometric bead commercial assay, ADE infected cells were found to produce significantly higher levels of the proinflammatory cytokines IL-6, IL-12p70 and TNF- α , as well as PGE2 than cells infected directly with the virus or in the presence of control antibodies. Exposure of MDCK cells monolayers by the apical side to supernatants collected from ADE infected cells, lead to a rapid and marked loss of the trans-epithelial resistance (TER) and to delocalization and degradation of the apical junctional complex structural proteins occludin and E-cadherin. Meanwhile, no effect on TER and only partial disruption in the structure of the TJs was observed with the supernatants collected from cells directly infected or infected in the presence of control antibodies. Depletion of either TNF- α , IL-6, IL-12p70 from the conditioned supernatants collected from the ADE infected cells, fully reverts the disrupting effect of the supernatants. Similarly, supernatants collected from ADE infected cells induced higher activation of endothelial (HUVEC) cell cultures as determined by expression of VCAM-1 and PECAM on the cell surface by FACS assay. Remarkably, mice injected intraperitoneally with the ADE supernatants showed extensive vascular permeability changes, as indicated by an Evans Blue quantification assay, in sera and lungs. These results indicate that the cytokine response of macrophages to ADE infection is not a “storm” but rather a well-modulated response, which nonetheless, shows a great combined capacity to disturb TJs and to activate endothelial cells *in vitro*. As suggested by the result obtained with the mouse model, such a response may be related to the vascular plasma leakage characteristic of SD.

*Department of Infectomics and Molecular Pathogenesis. †Department of Physiology, Center for Research and Advanced Studies (CINVESTAV), México, D.F.

CM22. Estudios de virus emergentes en Colombia: a una década del Primer Simposio Nacional de Virología (SNV) y dos del descubrimiento del primer hantavirus en el continente americano (sin nombre virus, SNV)

Juan D. Rodas*

Hace ya más de 40 años se publicó en el “American Journal of Tropical Medicine and Higiene”, el primer registro de un virus emergente aislado en Colombia, el arenavirus Pichinde. Veinticinco años más tarde (a mediados de la década de los 90’s), las zoonosis emergentes se convertirían en uno de temas más reiterativos de la literatura científica, con la aparición permanente de nuevos agentes algunos de ellos de impacto global sobre la salud pública humana.

A pesar de que los Estados Unidos detectaron desde 1993 la primera infección por Hantavirus en el nuevo mundo, tuvo que pasar más de una década para que se reconociera la circulación de virus similares en Colombia. En el primer estudio realizado por Mattar y colaboradores en el 2004, registra una sorpresiva frecuencia de infección de 13,5% en una muestra de campesinos tomada en los departamentos de Córdoba y Sucre. Dos años más tarde un estudio serológico de pequeños mamíferos de la misma región, permitiría detectar una muy contrastante prevalencia (2,1%, 7/336), en roedores silvestres, la mayoría de ellos de la subfamilia *Sigmodontinae*.

Cinco años más tarde se registró la primera identificación de unos de los posibles reservorios para los Hantavirus en Colombia, al determinar una frecuencia de infección de 14% (15/109) en *Zigodontomys cherriei*. Adicionalmente, en esta oportunidad se amplificaron, por RT-PCR, secuencias virales en los tejidos de los roedores capturados, que mostraron una alta identidad con los hantavirus Calabozo y Maporal, previamente identificados en Panamá y Venezuela respectivamente.

Posteriormente, en Abril del presente año, utilizando dos nuevos antígenos hantavirales (Maciel virus, MACV y Araraucara virus, ARAV), el grupo de Córdoba, encontró 10 y 21 muestras positivas (3,5%-7,3%), de entre 286 sueros humanos, algunos de ellos con títulos tan altos, como 6.400 y 25.600, e incluso 2 de ellos reaccionaron con Ig M, mostrando por primera vez, la posibilidad de infección aguda, aunque aún no se registre ningún caso humano. Desafortunadamente en este estudio no se encontraron ratones seropositivos. También en esta década, Mattar y cols., encontraron títulos bajos de Ig G (40-80) en 5 y 2 *Z. brivicanda* para los arenavirus Pichinde y Guanarito respectivamente.

Al tiempo que se desarrollaron las investigaciones de Hantavirus (mediados de la primera década del siglo XXI), el Virus del Oeste del Nilo (VON), cuya circulación se detectaba por primera vez en el hemisferio occidental a finales del siglo XX (1999), fue igualmente demostrado en la costa atlántica colombiana, donde se encontró reactividad tipo IgG en 10 especímenes de caballos y 2 de burros colectados en los departamentos de Córdoba y Sucre. Mientras tanto, en la región andina, los grupos de investigación de la Universidad de Antioquia en Medellín, desarrollarían una encuesta serológica en un total de 22 sueros equinos colectados en los departamentos de Antioquia y Meta, y encontrarían 5 muestras reactivas para Ig M y 17 para IgG, 4 de ellos confirmados por seroneutralización.

Finalmente, y entre los trabajos colombianos de mayor impacto internacional, vale la pena mencionar el aislamiento de VON a partir de flamings del zoológico de Santa Fé en la ciudad de Medellín, desarrollado por el grupo del Dr. Osorio de la Universidad de Wisconsin y en colaboración con la Universidad de Antioquia. Diez y ocho de 29 muestras fueron positivas por RT-PCR, y dos aislamientos fueron caracterizados *in vivo* y *in vitro*.

Para terminar no podría dejar de mencionar los brotes por agentes virales re-emergentes tales como la Fiebre Amarilla entre el 2004 y 2005 y la reciente aparición del virus de influenza porcina H1N1 en la pandemia del 2009. Lo anterior nos hace pensar que aunque no contamos con la infraestructura necesaria para investigar estos eventos de la mejor manera, si estamos (debido a la alta diversidad del trópico, y a sus particulares condiciones climáticas) padeciendo la aparición casi permanente de nuevas y potenciales amenazas infecciosas, que nos desafían a continuar el trabajo de interactuar y prepararnos para los eventuales casos humanos que podrían aparecer donde se den las condiciones apropiadas para su surgimiento. La creación de grupos de investigación multidisciplinarios y la colaboración internacional favorecida por la globalización, representan caminos hábiles para enfrentar el desafío de las limitaciones técnicas en los países tercer-mundistas. Hoy, el uso de herramientas como el análisis filogenético y los sistemas de información geográfica, nos permiten entender mejor como los factores climáticos y ecológicos, otrora subestimados, y grandemente afectados por el hombre, se han convertido en elementos fundamentales de una nueva visión eco-epidemiología de las enfermedades infecciosas.

*Línea de Zoonosis Emergentes y Re-emergentes. Grupo de Investigación en Ciencias Veterinarias “Centaurio”. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia.

CM23. Análisis de microarreglos de cepas seleccionadas de *Aedes aegypti*, susceptible y refractaria al virus dengue

Paola A. Caicedo*, Carl Lowenberger‡, George Dimopoulos‡, Neal Alexander*, Clara Ocampo*

La selección de dos cepas de *Aedes aegypti* colectados en Cali, con diferente susceptibilidad a la infección por virus dengue, susceptible (Cali-S) y refractaria con barrera de infección del intestino medio (Cali-MIB), sugiere la apoptosis como uno de los mecanismos de respuesta inmune presentes en los mosquitos refractarios para eliminar infección por el virus. Con el fin de identificar si existen otros mecanismos inmunes o metabólicos asociados a la refractoriedad en la cepa Cali-MIB, este proyecto comparó la expresión génica global del intestino medio de Cali-S y Cali-MIB después de la ingestión con azúcar, sangre, y sangre con virus Dengue-2 utilizando microarreglos. Para esto, los mosquitos alimentados con los diferentes retos se diseccionaron a las 30 h post-alimentación, período de mayor expresión, se les extrajo el ARN y se generó ADNc para su posterior análisis con microarreglos y validación por qPCR.

Los resultados preliminares de los microarreglos indican la expresión de 3.761 genes en todas las cepas. Se han identificado 165 genes relacionados con la inmunidad. Los genes expresados diferencialmente entre las dos cepas expuestas al virus DEN-2 incluyen genes de diferentes vías metabólicas: inmunidad, proteólisis, redox, replicación, transporte, y otros de función desconocida. Se seleccionaron 15 genes para evaluar su expresión diferencial en las cepas, durante las primeras etapas de infección (0, 8, 24 y 36 horas). Próximamente se evaluará la función de genes por medio de RNAi, para identificar los efectos de la inhibición de estos genes sobre el fenotipo de los mosquitos.

Este estudio proporcionará una visión global de la expresión génica en los mosquitos susceptibles y refractarios y se compara con otros estudios que han analizado algunas moléculas y vías específicas. Este estudio también validará el uso de nuestras cepas derivadas de campo como un modelo biológico importante para estudiar las relaciones virus-hospedero.

*Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM), Santiago de Cali-Colombia. ‡Department of Biological Sciences, Simon Fraser University, Vancouver-Canada. †Department of Molecular Microbiology and Immunology, Malaria Research Institute, Bloomberg School of Public Health, Johns Hopkins University, Baltimore, U.S.A.

CM24. Deciphering the role of NK cell activation and the antibody response against non structural protein 1 (NS1) in endothelial dysfunction during dengue virus infection

Henry Puerta-Guardo*, Alexandros Hadjilaou*, Ángela M. Green*, Eva Harris*

Dengue is a major public health problem worldwide, with over 100 million cases annually. Infection with any of the four dengue virus serotypes (DENV-1,-2, -3 and -4) may result in a wide spectrum of manifestations, ranging from asymptomatic infection to an acute self-limiting illness (DF), to severe and potentially life-threatening forms, known as dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS). A hallmark of severe disease is abrupt onset of vascular leakage, hypotension, and clinical shock. Accumulating evidence suggests that a complex interplay between host and viral factors contribute to the evolution to severe disease. However, the immunological processes conditioning progression to severe dengue are not fully understood. The non-structural protein 1 (NS1) of DENV is a 50-kDa protein absent from the virion but secreted as a hexamer by DENV-infected cells, and is found at higher levels in patients with DHF/DSS. NS1 has been shown to be strongly immunogenic and antibodies against NS1 are thought to play both a protective as well as a pathogenic role. The mechanism(s) by which antibodies against NS1 and/or the soluble and cell surface-associated NS1 contribute to DENV pathogenesis remains unclear. Natural killer (NK) cells are a subset of non-B, non-T peripheral blood lymphocytes that mediate clearance of “stressed” cells such as virally-infected cells and tumor cells through antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC), regulated degranulation, and the production of chemokines and cytokines that recruit and activate other cells. Endothelial cells are the first barrier to the fluid to the tissues and a primary target of immunological attack, which can lead to vasculopathy and organ dysfunction through vascular leak syndrome. In order to evaluate the role of NK cell activation in the pathogenesis of dengue disease associated with circulation of NS1 and anti-NS1 antibodies, we are exposing cultures of primary human endothelial cells to different concentrations of sNS1 obtained from DENV-infected culture supernatants in the presence or absence of human monoclonal anti-NS1 antibodies or anti-NS1 polyclonal sera and evaluating cell cytotoxicity using an LDH enzymatic assay as an indicator of cell lysis. In addition, we are assessing endothelial activation and alteration of endothelial intercellular junctions by measuring the trans-endothelial electrical resistance (TEER) in endothelial cells grown in transwells systems and visualizing the distribution and localization of tight junction proteins and adhesion molecules markers by immunofluorescence microscopy, respectively. This work provide evidence of how the immune response against the soluble NS1 protein on the surface of endothelial cells participates during the DENV pathogenesis inducing important changes in the endothelium that leads to the vascular leak and severe dengue.

*Division of Infectious Diseases & Vaccinology, School of Public Health, University of California, Berkeley, Berkeley, CA.

CM25. Mecanismos genéticos utilizados por el virus respiratorio sincicial humano para generar diversidad

Juan Arbiza*

Desde 1983 estudiamos la diversidad del virus respiratorio sincicial humano en Uruguay, a través del análisis de la variabilidad genética y antigénica de las glicoproteínas G de cepas que circulan todos los años. A partir de 1988, por medio de varias cooperaciones, hemos podido analizar la variabilidad de virus sincicial respiratorio humano aislados durante algunas epidemias en Brasil, Argentina y más recientemente en Panamá y Cuba.

El VRS fue el agente viral más frecuentemente asociado con las infecciones respiratorias agudas, que se producen anualmente en el otoño, el invierno y principios de primavera, en países de clima templado y con las épocas de lluvia en los países tropicales.

En varias epidemias anuales que se estudiaron, cepas de los grupos A y B circulan juntas durante la epidemia con predominio de uno de ellos. Por lo general, el grupo A predomina, pero en algunas epidemias el grupo B se detecta con más frecuencia.

Para analizar la diversidad antigénica de las cepas, extractos de células infectadas con diferentes virus del grupo A se sometieron a ensayo con un panel de anticuerpos monoclonales anti-G (MAbs).

La variabilidad genética se analizó por secuenciación de la mitad C-terminal del gen de la proteína G. Las secuencias obtenidas se utilizaron para derivar los árboles filogenéticos, incluyendo secuencias previamente publicadas.

El análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoácidas de la proteína G de las cepas estudiadas mostró tres tipos de cambios genéticos: a) sustituciones de nucleótidos que dieron lugar a cambios de aminoácidos; b) sustituciones de nucleótidos que introdujeron cambios en la posición del codón de terminación y c) inserción de nucleótidos que dieron lugar a la incorporación de nuevos aminoácidos en la proteína.

*Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo-Uruguay.

CM26. Studies on viral infections by hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV) and hepatitis delta virus (HDV) in different regions of South America

Mónica Viviana Alvarado-Mora*

Viral hepatitis are among the major pandemics in the world nowadays. There are many causes of hepatitis, including hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV) and hepatitis delta virus (HDV). In this study, several regions of South America were studied. In Colombia, the states of Amazonas and Magdalena were identified as highly endemic areas for HBV. Genotype F3 (75%) was the most prevalent. It was determined that subgenotype F3 is the oldest among all F subgenotypes. In the state of Chocó, subgenotype A1 (52.1%) was the most prevalent. Surprisingly, nine indigenous cases of infection by genotype E (39.1%) were found in this state. For HCV, in Bogotá, subtype 1b (82.8%) was the most frequent. Likewise, it was estimated that this subtype was introduced around 1950 and spread exponentially from 1970 to 1990. HDV has been identified in cases of fulminant hepatitis in the state of Amazonas, all of them classified as genotype 3. It was determined that the HDV/3 spread exponentially from 1950 to 1970 in South America and after this time, this infection stopped to increase, probably due to introduction of vaccination against HBV. The presence of genotype 3 in the indigenous population has been previously reported in the region of Santa Marta, Colombia, and in the indigenous peoples of Venezuela and Bolivia. In Chile, a study was carried out with 21 patients chronically infected with HBV without any prior antiviral treatment. All sequences obtained belonged to subgenotype F1b and clustered into four different groups, suggesting that different strains that are circulating in Chile. In Brazil, the state of Rondônia, we found HCV subtype 1b (50.0%) as the most frequent. This was the first report on HCV genotypes in this state. For HBV, subgenotype A1 (37.0%) was the most frequent. The results of the state of Rondônia are consistent with other studies carried out in Brazil, showing the presence of several HBV genotypes, reflecting the mixed origin of the Brazilian population. Studying the state of Maranhão, we evaluated the frequency of HBV infection and its genotypes and we found 4 genotype A1 sequences that grouped with other sequences reported in Brazil. In another study, we characterized HBV subgenotypes in 68 patients with chronic hepatitis B in Pernambuco and we found subgenotype A1 in 78.7% cases. Finally, in a study of samples from São Paulo, we found a case of HBV genotype C in a native Brazilian patient and this is the first complete genome sequence of HBV/C2 reported in Brazil.

*Departamento de Gastroenterología, Facultad de Medicina, Universidad de São Paulo, São Paulo, Brasil.

CM27. Diagnóstico diferencial de las hepatitis virales: ¿Cómo iniciar el estudio?

Gabriela Muñoz G.*

Los cuadros de hepatitis aguda y crónica pueden ser causados por una variedad de agentes, entre los que se incluyen drogas, anestésicos, tóxicos, radiación, parásitos, bacterias y virus. Dentro de los agentes virales capaces de producir una hepatitis se distinguen los virus primariamente hepatotropos (virus hepatitis A, B, C, D, E) cuyo órgano blanco principal o exclusivo es el hígado, a diferencia de otros virus (EBV, CMV, HSV, etc) que pueden comprometer este órgano como parte de un síndrome o bien en forma exclusiva en casos particulares.

Frente a un cuadro de hepatitis aguda o crónica debemos descartar o confirmar, como primera línea, los virus hepatitis por su frecuencia en estos cuadros. El algoritmo de estudio de estos virus dependerá de la incidencia y endemia de cada uno de ellos en cada país, sin embargo se recomienda la realización de un tamizaje de todos ellos, o los más frecuentes, en una primera aproximación. Debemos recordar que el cuadro clínico producido por estos agentes virales es semejante e indistinguible uno de otro, sin embargo las consecuencias de la infección son diferentes. Por ello es necesario realizar un diagnóstico diferencial lo cuál se realiza a través del estudio de antígenos y/o anticuerpos específicos (marcadores virales). Si bien los inmunoensayos han sido de gran utilidad para el diagnóstico y el seguimiento de una hepatitis viral, el desarrollo de la biología molecular ha representado un avance importante especialmente en el estudio de las hepatitis crónicas, utilizándose para la detección cuali o cuantitativa de DNA o RNA viral.

Existen, por tanto, una variedad de marcadores virales y moleculares para el estudio de las hepatitis, sin embargo la indicación y el uso que hagamos de ellos dependerá de la información que queramos obtener en cada caso en particular, dependiendo del momento de la infección, de las características del paciente y las limitaciones de los ensayos disponibles. Por ello, es de utilidad hacer uso de algoritmos de estudio, los cuales pueden variar de acuerdo a la situación epidemiológica y a la disponibilidad y acceso de los diferentes marcadores.

El diagnóstico diferencial inicial se puede realizar utilizando los marcadores clásicos que permiten detectar una infección aguda por VHA (anti VHA IgM), por VHB (HBsAg + anti core IgM), y por VHD (anti VHD IgM), éste último en zonas endémicas. Para el estudio de VHD también se dispone de anti VHD total (IgG + IgM). Sin embargo, el anti VHD IgM persiste positivo en los casos de cronicidad en una superinfección, por lo que se recomienda es complementar este marcador con el estudio de RNA- VHD. En el caso de VHC y VHE, si bien existen ensayos comerciales que detectan IgM específicas, su sensibilidad es limitada por lo que se recomienda el uso de anticuerpos del tipo IgG, cuya detección es posible en las etapas precoces de la infección. Estos últimos tienen la limitación de estar presentes tanto en casos agudos como crónicos, como se observa con el VHC, o en infecciones pasadas como en VHE. En ambos casos el estudio de RNA viral permite definir la presencia de infección en caso de ser positivos.

Dado que el cuadro clínico de una hepatitis aguda es muchas veces indistinguible de un cuadro crónico, algunos marcadores nos ayudarán a diferenciar el estado de la infección. En el caso de VHB, la presencia de HBsAg por más de 6 meses, en ausencia de IgM core, pero un anti core total positivo nos permite identificar una hepatitis crónica por VHB. Para el VHC, es necesario recordar que el diagnóstico de cronicidad lo dará la detección positiva del RNA viral. Dado que un porcentaje importante de las infecciones agudas por VHB y especialmente VHC son asintomáticas, estas infecciones muchas veces solo se pesquisan en la etapa de cronicidad.

Para el seguimiento de la infección por VHB se dispone de marcadores virales adicionales, como el HBeAg que permiten evaluar el grado de replicación viral durante la infección y representa un indicador pronóstico de cronicidad su persistencia en la etapa aguda de la infección. El anticuerpo correspondiente, anti HBe, aparecerá detectable al hacerse indetectable el antígeno correspondiente e indica una baja replicación viral (seroconversión). Estos dos marcadores serán de gran utilidad para evaluar la respuesta a terapia antiviral junto con el estudio de carga viral de VHB.

Para el VHC, el monitoreo de la infección se realiza mediante la carga viral y el estudio del genotipo VHC, siendo estos ensayos imprescindibles para definir la duración de la terapia antiviral y evaluar la respuesta virológica. Existen actualmente protocolos definidos de seguimiento con carga viral para evaluar una respuesta temprana, precoz, recaída y respuesta viral sostenida, lo cual definirá la continuación o suspensión del tratamiento.

Existen marcadores que permiten detectar la inmunidad frente a una nueva infección por algunos de los virus hepatitis. La presencia de anti HBs permite confirmar la recuperación de una infección por VHB. El uso de anti core total es de gran utilidad para determinar la prevalencia de infección por VHB en estudios epidemiológicos ya que detectará tanto los casos recuperados espontáneamente como aquellos con infección activa.

El uso de anti VHA total permite detectar a los casos de infección reciente o pasada, siendo un buen marcador para definir la necesidad de vacunación.

Los anticuerpos anti VHC permanecen detectables por largos periodos de tiempo post infección, tanto en los pacientes crónicos como aquellos que se recuperan post tratamiento o en forma espontánea, por lo tanto son un buen marcador para estudios de prevalencia de VHC pero no generan protección o inmunidad a nuevas infecciones.

Los anti VHE perduran por un tiempo limitado post primo-infección al igual que los anti VHD en los casos agudos.

*Jefe Unidad Biología Molecular. Hospital Clínico Universidad de Chile, Santiago, Chile.

CM28. Biología molecular de baculovirus autóctonos: aplicaciones y perspectivas

V. Romanowski*, L. Ferrelli*, S. Haase*, R. Salvador†, M. Berretta†, A. Sciocco-Cap†

En Argentina, Uruguay y el sur de Brasil se presentan varios lepidópteros-plaga en cultivos de leguminosas; entre ellos, *Anticarsia gemmatalis*, *Epinotia aporema*, *Rachiplusia nu* y *Spodoptera frugiperda*.

La sustitución de los insecticidas químicos de amplio espectro por agentes de control biológico que no sean tóxicos para especies distintas a la plaga es uno de los objetivos de una agricultura sustentable. En este sentido, los baculovirus son altamente específicos para el huésped e inoocuos para otros organismos. Sin embargo, salvo ciertas excepciones, el uso de baculovirus en el control de plagas se ha enfrentado con una serie de inconvenientes. Aunque su alta especificidad constituye una ventaja desde el punto de vista ecológico, es una posible desventaja desde la óptica comercial. Por otra parte, su velocidad de acción es lenta (sobre todo en zonas templadas) y, si bien se ha demostrado que los insectos causan menor daño una vez infectados, los productores agrícolas no los consideran atractivos al compararlos con los insecticidas químicos de alto poder de volteo.

Ante ello, se han encarado estudios que apuntan a introducir modificaciones en los genomas de baculovirus a fin de ampliar su rango de huéspedes y su virulencia, sin alterar su inocuidad hacia organismos no blanco.

Si bien existe el antecedente de la aplicación exitosa del nucleopolidrovirus AgMNPV para el control de *A. gemmatalis* en Brasil, su velocidad de acción no resulta satisfactoria en climas más templados y para atacar este problema, se desarrolló un sistema de modificación genética por recombinación homóloga.

Por otra parte, se caracterizó a un aislamiento de un nuevo granulovirus específico de *E. aporema* (EpapGV) con un patrón de infección poliorganotrópico y se determinó la secuencia nucleotídica completa de su genoma (DNA circular de 120 kb). La combinación de aislamientos autóctonos con la tecnología de mejoramiento genético de estos baculovirus apunta a disminuir en forma considerable el uso de insecticidas sintéticos de alta toxicidad.

*IBBM (UNLP-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata; La Plata, Argentina. †IMYZA-INTA, Castelar, Provincia de Buenos Aires; Argentina.

CM29. Arenavirus del Continente Americano: biología molecular, diagnóstico, prevención y tratamiento

Víctor Romanowski*

La mayor parte de los arenavirus infecta roedores cuya distribución se restringe a regiones geográficas limitadas y la infección es generalmente persistente y asintomática. El ser humano es un huésped accidental que se contagia al tomar contacto con material contaminado por las excretas de los roedores portadores y en ocasiones puede desarrollar fiebre hemorrágica severa con una alta tasa de mortalidad. Estas zoonosis endémicas son provocadas por los virus Junín (JUNV) en Argentina, Machupo (MACV) y Chapare (CHPV) en Bolivia, Guanarito (GTOV) en Venezuela y Sabiá (SABV) en Brasil. Con excepción de la vacuna para la fiebre hemorrágica argentina (FHA), prácticamente no existe prevención ni tratamiento específico.

Los arenavirus son envueltos y poseen un genoma compuesto por dos moléculas de RNA denominadas L y S. El RNA S contiene la información para la RNA polimerasa L y un proteína de matriz Z, con múltiples funciones. El RNA S codifica para las proteínas N (nucleocápside) y GPC (precursor de las glicoproteínas de envoltura SSP+G1+G2). Las glicoproteínas forman complejos triméricos que, en el caso de los arenavirus patógenos del nuevo mundo, interactúan con el receptor de transferrina 1 (TfR1).

En los primeros días de la infección en humanos la carga viral es generalmente indetectable por los métodos serológicos corrientes; sin embargo, mediante RT-PCR, se dispone de un diagnóstico específico y temprano, esencial para el éxito del tratamiento con plasma inmune, que redujo la mortalidad en casos de FHA de 30% - 15% a menos de 1%. Los inmunoensayos con proteínas de JUNV permiten evaluar la concentración de anticuerpos y se han desarrollado métodos para determinar su potencial neutralizante sin la necesidad de usar virus patógenos de nivel BSL3/4.

Más recientemente, la expresión del gen de GPC ha permitido establecer el rol de cada proteína en los eventos tempranos de la infección, incluidas la interacción de G1 con TfR1 y la capacidad fusogénica de G2. Estas se han convertido en blancos de los ensayos de estrategias terapéuticas específicas.

*IBBM (UNLP-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata; La Plata, Argentina.

CM30. La replicación de rotavirus requiere de un sistema ubiquitina-proteasoma funcional

Tomás López*, Joaquín Moreno*, Daniela Silva-Ayala*, Luis Casorla*, Susana López*, Carlos F. Arias*

Los rotavirus son el principal agente etiológico de diarreas severas en niños pequeños, son virus con un genoma segmentado de RNA de doble cadena cuya replicación se efectúa en estructuras citoplasmáticas llamadas viroplasmias y que requieren de la gemación de partículas hacia el interior de vesículas derivadas del retículo endoplásmico para completar su morfogénesis. En un análisis de interferencia de RNA identificamos blancos relacionados al sistema ubiquitina-proteasoma como relevantes para la replicación viral. Con la finalidad de determinar si este sistema se requiere para la replicación viral, evaluamos el efecto de inhibidores del proteasoma sobre la infectividad y la producción de progenie viral. Encontramos una disminución dependiente de dosis en ambos parámetros, sin embargo en estas condiciones descubrimos que los inhibidores del proteasoma producen una reducción en la síntesis de proteínas lo cual explica la reducción en la producción de antígeno viral. El efecto sobre traducción celular puede evitarse si se incluyen aminoácidos no esenciales en el medio de cultivo, en estas condiciones los inhibidores del proteasoma no afectan la infectividad pero si reducen la producción de progenie viral. Esta reducción en la progenie correlaciona con una disminución en la producción de genoma viral. En estas condiciones existe una reducción en la producción de partículas virales, sin embargo la maduración dentro del retículo endoplásmico no se ve afectada. Los viroplasmias que se forman cuando se inhibe el proteasoma son más abundantes pero de menor tamaño que los controles y la polimerasa viral no se recluta eficientemente a ellos. Estos resultados sugieren que cuando el proteasoma no es funcional la polimerasa viral no puede incorporarse a los viroplasmias por lo que la producción de genoma viral y el ensamblaje de partículas en el viroplasma se ven disminuidas.

*Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología-UNAM.

CM31. Vigilancia ambiental para poliovirus en Colombia

María Mercedes González de S.*

La aplicación de las estrategias diseñadas para la erradicación de la Poliomiélitis mediante vacuna oral anti polio (OPV) permitió la erradicación del polio virus salvaje 2 y una disminución del 99% en la incidencia de la enfermedad a nivel mundial. Ha sido demostrado que los virus derivados de la vacuna revierten a forma virulenta (VPDV) y han causado brotes en diferentes países; esto indica la necesidad de reforzar la vigilancia de la circulación de poliovirus y lograr coberturas útiles de vacunación como requerimiento y complemento al planteamiento de la Organización Mundial de la Salud de suspender la vacunación oral y continuar con la vacuna inactivada ya que la circulación ambiental del poliovirus se constituye en una barrera para lograr la erradicación de la poliomiélitis. En Colombia, no se han logrado coberturas útiles en todos sus municipios. Desde el año 2006, la Universidad del Quindío con la colaboración del Instituto Nacional de Salud ha realizado una vigilancia ambiental con el objetivo de determinar la posible circulación silente de poliovirus salvajes y VPDV en investigaciones realizadas, se colectaron 42 muestras de aguas residuales en municipios con coberturas de inmunización para polio mayor del 80% y 52 muestras de aguas residuales de los municipios con coberturas menores del 80%. Se determinó la presencia de enterovirus y poliovirus. No se detectaron evidencias de circulación de VPDV. Se detectaron enterovirus no polio en el 17,3% de las muestras y circulación de las cepas vacunales Sabin Se identificaron a los serotipos de Coxsackievirus B1, B2, B5 y Echo virus 6 y 30. No obstante, la no circulación VDPV se hace necesario continuar con estudios de respuesta inmune a poliovirus en población infantil colombiana para determinar la vulnerabilidad de estas poblaciones a la infección por poliovirus y con la vigilancia ambiental.

*Grupo de Inmunología Molecular (GYMOL). Universidad del Quindío, Facultad Ciencias de la Salud, Armenia, Colombia.

CM32. Predicting viral threats

Maria Salvato*

Outbreaks of infectious diseases can occur after bioterrorist attack or after innocent accidents. They are far more likely to occur after innocent environmental disruption, transport of commercial goods and travel by diseased human beings, than after deliberate sabotage. A number of organizations like the WHO and the US CDC conduct surveillance in an effort to predict outbreaks. Here we will discuss the criteria for determining the urgency of each biothreat agent, and the methods used to “predict” their potential damage.

*Laboratorio Enfermedades por Arenavirus y Vacunas Preventivas. Instituto de Virología Humana. Universidad de Maryland - School of Medicine Baltimore, Estados Unidos.

CM33. Estudio de los rotavirus: receptores celulares, fármacos que inhiben la infección y uso de los rotavirus como virus oncolíticos

C. Guerrero*, O. Acosta*

En el laboratorio de Biología Molecular de Virus, de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional, nuestro grupo ha propuesto internamente tres moléculas candidatas a receptoras de rotavirus: av β 3, Hsc70, PDI (junto con ERp57), proponiendo un modelo que sugiere la existencia de posibles vías alternativas para la entrada de los rotavirus. Hemos diseñado una aproximación metodológica para estudiar la infección por rotavirus en vellosidades aisladas del intestino delgado. Reportamos que Hsc70, PDI y β 3, se encuentran asociadas, formando un complejo proteico en los microdominios lipídicos “Rafts”, co-inmunoprecipitando junto con partículas rotavirales. Hipotetizamos que rotavirus no requiere transitar un espacio de largo rango para llevar a cabo sus interacciones secuenciales a través de los diversos receptores celulares. Propusimos que la entrada a la célula implica a PDI con su capacidad reductora y la posible generación de grupos tiol en VP7 y VP4 contribuiría al desensamblaje de las TLPs y/o a la capacitación de estas proteínas para su interacción secuencial con los receptores de la superficie celular. PDI intracelular actuaría como oxidante (formando enlaces disulfuro) en el ER para propiciar el estado conformacional adecuado de VP7 para la generación (ensamblaje) de TLPs intracelularmente. Encontramos que al interferir la reacción de oxido-reducción (redox) se bloquea la infección. Para esto, analizamos 140 medicamentos, incluyendo los que no tenían grupos tiol y encontramos 3 grupos de fármacos inhibidores de más del 90% de la infección: AINES, fármacos contra la diabetes y antioxidantes [N-acetilcisteína (NAC) y ácido ascórbico]. Los estudios los realizamos en células cultivadas y en ratones recién nacidos y adultos infectados con el virus. Encontramos que al inhibir la vía NF- κ B, de manera directa o indirecta, se disminuye la infección. La infección de rotavirus aumenta la expresión de Hsc70, PDI, NF-kB, COX, PPAR γ y las especies reactivas de oxígeno, ROS, y al tratar las células infectadas con agonistas de PPAR γ o que interfieran con la vía NFkB, las proteínas regresaron al estado basal propio de una célula no infectada.

Otra línea de investigación ha sido analizar si rotavirus es candidato a virus oncolítico o no. Tuvimos en cuenta que PDI, Hsc70 y av β 3 son marcadores de progresión tumoral. PDI, o las HSPs, incluida Hsc70, no se expresan en la membrana de células del tejido normal (exceptuando el enterocito) y si en neoplasias, esta condición posibilita que el rotavirus pueda ser utilizado en tumores donde estos receptores se expresan, sin afectar el tejido normal. Encontramos que los aislamientos rotavirales obtenidos en nuestro laboratorio infectaron y lisaron las líneas celulares tumorales examinadas (línea celular de leucemia mieloide humana U937, leucemia linfocítica aguda Reh, cáncer de estómago KATO III, cáncer de pulmón A549, cáncer de mama MCF-7 y MDA, leucemia mieloide de ratón Sp2/0-Ag14 y cultivos primarios de leucemias humanas), ingresan utilizando las HSPs (Hsp90, Hsp70, Hsc70, Hsp60 o Hsp40), que expresan PDI y la integrina α v β 3 de membrana citoplasmática, sugiriendo que han adquirido ganancia de función al utilizar proteínas de choque térmico (HSPs). En general los resultados fueron similares para todas las líneas tumorales examinadas, con pequeños cambios. Como control se utilizaron células normales no tumorales. Lo anterior nos permitirá iniciar estudios para desarrollar un modelo animal para analizar la selectividad por el tejido neoplásico sin lesionar al tejido normal (seguridad), la eficacia y la eficiencia como tratamiento, y de ser exitoso, obtendríamos una herramienta alternativa en el tratamiento del cáncer para ser estudiada en humanos.

*Laboratorio de Biología Molecular de Virus, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia.

CM34. The role of platelets in viral hemorrhagic fever

Juan Carlos Zapata*

Viral hemorrhagic fevers (VHF) are acute zoonotic diseases associated with coagulation dysfunctions that can progress to hypovolemic shock and death. The pathogenesis of the VHF is still unclear but they have in common a lack of initial immune responses and thrombocytopenia. Platelets are the second most abundant cells in peripheral blood and play important roles in both coagulation and inflammation. Therefore, platelet destruction or dysfunction induced by viruses will not only affect hemostasis but also will modify the immune response to infection. In this talk I will focus on the four major ways viruses affect platelet development and function, and new evidence of molecular factors that are preferentially induced by the more pathogenic members of the *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Arenaviridae*, *Filoviridae*, and, most recently, *Rhabdoviridae*.

*Laboratorio Enfermedades por Arenavirus y Vacunas Preventivas, Instituto de Virología Humana, Universidad de Maryland - School of Medicine Baltimore, Estados Unidos.