

BIOTECNOLOGÍA

ACTIVIDAD MITOCONDRIAL EN CELULAS DE LA CORONA RADIADA DE OOCITOS CANINOS. Tarazona A1, Mira T1, Olivera-Angel M1. 1Grupo de Fisiología y Biotecnología de la Reproducción, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. amtazoot@agronica.udea.edu.co

Las tasas de maduración in vitro de oocitos caninos son bajas. El objetivo de este estudio fué determinar si la actividad mitocondrial de las células de la granulosa es un factor inhibidor de la maduración. Los ovarios se colectaron directamente de hembras castradas y se transportaron en solución salina (0,9 %) a 35 °C; en el laboratorio se lavaron en alcohol y solución salina, se retiraron todos los tejidos de revestimiento; la corteza del ovario se seccionó en cortes horizontales y verticales y se lavó con PBS (10% SFB). Los oocitos con citoplasma oscuro homogéneo y mínimo dos capas de células de granulosa se cultivaron en M-199 suplementado con LH, FSH, 17-β estradiol y piruvato durante 48 horas a 39 °C en atmósfera de 5% CO₂ en aire y máxima humedad; posteriormente se lavaron en PBS (10 % SFB). Se cualificó la fluorescencia con un set de filtros (absorción/emisión máxima ~395/590nm). La actividad mitocondrial se cualificó en base al potencial de membrana interna mitocondrial incubando los oocitos con JC-1 0,75 μm durante 25 minutos. El núcleo se evaluó con tinción de Hoechst. Las células de granulosa mostraron alta actividad mitocondrial con formación de agregados, siendo mayor en las de la corona radiada, posiblemente para ayudar a la maduración del oocito (remodelación de citoesqueleto y acumulación de moléculas para soportar el desarrollo temprano, continuación de la meiosis); no se observó expulsión del primer cuerpo polar, el núcleo del oocito permaneció en metafase. Los resultados sugieren que los problemas en maduración de oocitos caninos no se deben a fallas en la actividad metabólica de las células de granulosa.

ACTIVIDAD MITOCONDRIAL EN BLASTOCISTOS BOVINOS CULTIVADOS IN VITRO . Tarazona A1, Olivera-Angel M1. 1Grupo de Fisiología y Biotecnología de la Reproducción, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. amtazoot@agronica.udea.edu.co

El metabolismo oxidativo de la mitocondria refleja las necesidades energéticas celulares, y puede ser cualificado, de acuerdo al potencial de membrana interno de ésta. La dinámica de la actividad y distribución mitocondriales cambia durante los diferentes estadios del desarrollo preimplantatorio. El objetivo del presente proyecto fue describir la distribución y actividad mitocondrial en estadios de blastocito y blastocito eclosionado. Embriones producidos in-vitro en estadios de blástula y blástula eclosionada, fueron incubados en 0,75 μm de JC-1, durante 25 minutos a 39°C, 5 % CO₂ y máxima humedad; posteriormente se lavaron en PBS (10 % SFB). Se cualificó la fluorescencia con un set de filtros (absorción/emisión máxima ~395/590nm). El número de núcleos se evaluó con Hoechst. En las células del trofoectodermo del blastocisto expandido, las mitocondrias formaron agregados compactos cerca del núcleo; a diferencia de las células del blastocisto eclosionado donde mostraron agregados dispersos por el citoplasma. En ambos casos, se observó mayor actividad en las células de la masa interna, donde la fluorescencia fue homogénea y no se distinguieron agregados diferenciados. Aparentemente las células de la masa interna requieren mayor producción de energía que las células trofoblásticas, por lo que muestran un mayor metabolismo oxidativo. El cambio en la distribución mitocondrial en el trofoblasto eclosionado, podría deberse a los requerimientos para la elongación y reconocimiento maternoembrional. Las células de la masa interna mantuvieron actividad aun después de la eclosión, sugiriendo un requerimiento grande en el metabolismo oxidativo durante los estadios preimplantatorios de los embriones bovinos.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE CAMPO DEL VIRUS DE RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA (RIB) AISLADAS EN COLOMBIA. Piedrahita D, Ramírez G, Vera V. Grupo de Microbiología y Epidemiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. diegopiedrahita9@hotmail.com, instituto_genetica@yahoo.com

La Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (RIB), es una enfermedad infecciosa, altamente contagiosa de distribución mundial y origen viral causada por el Herpesvirus Bovino 1 (HV-1); produce alteraciones en el sistema respiratorio y reproductivo, cursando con rinotraqueítis, conjuntivitis, vulvovaginitis, enteritis, mastitis, abortos, encefalitis, infecciones generalizadas y principalmente fallas reproductivas, convirtiéndose en una enfermedad con un gran impacto económico para los sistemas de producción ganadera. Se han desarrollado varias investigaciones por parte de instituciones como el ICA, CIAT, Universidad de Antioquia y Universidad Nacional de Colombia, efectuándose algunos aislamientos al igual que detectándose alta reactividad serológica (13%-42%). Este trabajo tiene como objetivo comparar mediante técnicas de biología molecular aislamientos de campo realizados en Colombia del Herpes virus Bovino 1 BHV-1, frente a cepas de referencia y la cepa vacunal. Se caracterizarán tres aislamientos virales del BHV-1, los dos primeros aislados en Colombia a principio y finales de la década de los noventa y un tercero en el 2001; para tal fin se utilizará análisis con enzimas de restricción (REA) y se compararán los resultados con las cepas de referencia Iowa, Colorado. Se implementará un PCR para el reconocimiento del genoma viral al amplificar una región del genoma de la g D y la g E del BHV-1. Las regiones amplificadas del genoma viral serán analizadas por RFLPs y secuenciación buscando establecer patrones de comparación y diferenciación entre ellas y en relación con las cepas de referencia y la vacunal. El estudio se llevará a cabo en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia y la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

ADECUACIÓN DE UNA PRUEBA DE PCR PARA EL DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DE LEUCOSIS AVIAR (ALVL) CON ÉNFASIS EN EL SUBGRUPO J (ALV-J). Calderon M, Rodríguez L, Vera V. J, Ramírez G, Villamil L. C. Línea de Microbiología y Epidemiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. dgcamire@yahoo.co.uk

El virus de Leucosis Aviar ocasiona una enfermedad crónica persistente causante de grandes pérdidas económicas en explotaciones avícolas ya que afecta no solo abuelas y reproductoras, sino que también ocasiona alteraciones en el desarrollo en pollo de engorde. La leucosis mieloide y linfoide son causadas por un Retrovirus - Oncovirus del género de Leucosis Aviar (ALV), que agrupa enfermedades

caracterizadas por la presencia de neoplasias. Los virus del grupo ALV que afectan a las aves están agrupados en los subgrupos A, B, C, D, E y J. La presencia de virus del subgrupo J, responsable de la leucosis mieloide, fue determinada en el país en 1997 por la prueba de ELISA, sin realizarse aislamiento viral. Dada la necesidad de disponer de métodos diagnósticos sensibles y específicos, en el presente trabajo se adecuó y desarrolló una prueba de Transcripción Reserva-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), usando dos juegos de Primers diseñados para la detección específica de ALV A-D y ALV-J por separado, éstos juegos de Primers utilizados amplifican una región bien conservada del gen que codifica para la glicoproteína de superficie gp85. Con la prueba de RT-PCR se examinaron brotes locales de campo donde se obtuvo como resultado para ALV A-D 39 sueros positivos y 8 sueros negativos, al evaluar ALV J se encontraron 14 sueros positivos y 33 sueros negativos, de los cuales 12 de las muestras que fueron positivas a ALV J también fueron positivas para ALV A-D. Gracias a la alta sensibilidad del PCR éste se constituye en la prueba ideal para la detección de la infección por ALV y ofrece perspectivas importantes para el diagnóstico a través del empleo de metodologías moleculares las cuales permitirán llevar a cabo un control de calidad adecuado no solo de los insumos producidos en el país sino también de los que ingresan a éste.

DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DEL LEUCOSIS AVIAR (ALV) POR MEDIO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) Y ELISA.. *Rodríguez L, Calderón M, Vera V. J., Ramírez G, Villamil L. C. Línea de Microbiología y Epidemiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. dgcramire@yahoo.co.uk*

La Leucosis aviar es causada por un virus de tipo RNA, perteneciente a la familia Retroviridae. Estos virus, a la vez que inducen neoplasias benignas y malignas, son igualmente agentes inmunosupresores que potencializan otros agentes infecciosos y causan enfermedades crónicas persistentes, es por eso que desde su aparición los trabajos sobre leucosis aviar se han dirigido a la obtención de pruebas diagnósticas sensibles y específicas. Dentro de las pruebas utilizadas para diagnóstico se encuentra la prueba de ELISA de tipo directo para detección de antígeno dirigida a antígenos virales grupo específicos codificados por el gen Gag, particularmente la proteína de envoltura p27 y de tipo indirecto para la detección de anticuerpos; la PCR, usada para amplificar secuencias específicas de la glicoproteína de superficie gp85 o de porciones que codifican para los genes gag y pol; el aislamiento viral y la prueba de COFAL son otras alternativas en el diagnóstico de la ALV. En el presente trabajo, se comparan los resultados de la prueba de RT-PCR en el diagnóstico de 47 sueros obtenidos de brotes de campo presentados en el país en 1998, clínicamente compatibles con ALV con los resultados previamente obtenidos por ELISA directa que correspondían a 33 muestras positivas y 14 negativas. Para ALV A-D se obtuvieron por PCR 39 muestras positivas y 8 negativas; luego se estableció la sensibilidad y especificada de RT-PCR en relación con ELISA, encontrándose que la conformidad estimada es aceptable y se hace evidente que son necesarias más pruebas para realizar una mejor evaluación; por otro lado con relación al estimativo económico del RT-PCR, aunque es una prueba costosa, es una alternativa diagnóstica ideal en aves de alto costo, como son abuelas y reproductoras, ofreciendo un método diagnóstico eficaz, que permitirá planes de control y erradicación más eficientes y eficaces.