

RCCV

Revista Complutense de Ciencias Veterinarias

ISSN 1988-2688

RCCV, Vol. 10 (2)

<http://dx.doi.org/10.5209/RCCV.54611>

MASTER DE VIROLOGIA

Facultad de Veterinaria

Universidad Complutense de Madrid (UCM)

RESUMENES TRABAJOS FIN DE MASTER

CURSO 2015/16

REVISTA COMPLUTENSE DE CIENCIAS VETERINARIAS

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

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

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

LUGAR Madrid

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

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS PROTEÍNAS ORF16 Y ORF17 DEL BACTERIOFAGO 80 α

Acosta Bogado, Sonia Gabriela; Ayora Hirsch, Silvia

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

Las islas de patogenicidad son regiones del genoma bacteriano que confieren virulencia y son capaces de ser transferidas horizontalmente con ayuda de bacteriófagos a los que parasitan. El bacteriófago 80 α es un fago atemperado de *S. aureus* que puede actuar como un ayudante para la movilización de varias islas de patogenicidad. Este fago codifica en su genoma una proteína que actúa como inductora de islas de patogenicidad (Orf16), que pertenece a la familia de recombinasas Sak3, y una proteína SSB (Orf17), que se encuentra corriente abajo del gen *orf16*. Este trabajo tenía como objetivo el desarrollo de protocolos de purificación y el comienzo del estudio bioquímico de las proteínas Orf16 y Orf17 del bacteriófago 80 α con el fin de entender cómo esta proteína está involucrada en la transferencia horizontal de islas de patogenicidad.

Se llevó a cabo la sobreexpresión, la purificación y finalmente la caracterización bioquímica parcial de las proteínas Orf16 y Orf17. Los resultados indicaron que la proteína Orf16 del fago 80 α se une al ADN de cadena sencilla (oligo de 100 nt) de forma cooperativa con una Kapp de 200nM mientras que la proteína Orf17 por su parte se une al ADN de cadena sencilla de forma no cooperativa y con una Kapp de 1,55nM y además no parece haber interacción entre ambas proteínas con el ADN de cadena sencilla.

Palabras claves: isla de patogenicidad, bacteriófago 80 α , proteína Orf16, proteína Orf17, caracterización bioquímica

EFFECTO DEL AMBIENTE EN LAS RELACIONES GENOTIPO-FENOTIPO EN EL BACTERIOFAGO Q β

Acosta-Cumplido, Esther; Lázaro Lázaro, Ester

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

Las altas tasas de error de los virus RNA, su rapidez de replicación y sus elevados tamaños poblacionales conducen a la generación de poblaciones muy diversas que se adaptan rápidamente a los cambios ambientales. El objetivo de este Trabajo Fin de Máster es el estudio del fitness y la capacidad adaptativa de 11 clones del bacteriófago Q β que han experimentado reducciones poblacionales sucesivas que han conducido a la fijación de distintas mutaciones en su secuencia consenso. El fitness se determinó a su temperatura óptima de replicación a 37°C y a dos temperaturas subóptimas (30°C y 43°C). Para estudiar la capacidad de adaptación, los virus fueron propagados a 43°C durante 15 pases seriados. Al final del proceso se determinó la secuencia consenso de las poblaciones obtenidas. Los resultados muestran que la mayoría de los clones analizados tienen *fitness* similares al virus de tipo salvaje cuando éste se determina a 37°C y a 30°C. Sin embargo, a 43°C algunos de los clones muestran descensos de *fitness*, mostrando la influencia del ambiente en el efecto de las mutaciones. También se han encontrado diferencias en la capacidad adaptativa de los distintos clones dependiendo del contexto genómico.

Palabras claves: Fitness; bacteriófago Q β ; virus RNA; adaptación, tasa de error

COMPARATIVE ANALYSIS OF DNA DAMAGE BYPASS BY Φ 29 AND RELATED B-FAMILY DNA POLYMERASES

Aparicio Maldonado, Cristian; Redrejo Rodríguez, Modesto; Salas Falgueras, Margarita

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

Las polimerasas replicativas no pueden replicar el DNA dañado. Sin embargo, existen DNA polimerasas que pueden llevar a cabo síntesis a través de daño (TLS) para replicar bases dañadas. Aquí, estudiamos si la capacidad de TLS está presente en DNA polimerasas de la familia B, como la bien conocida del fago Φ 29 (Φ 29DNAP), la del fago Bam35 (B35DNAP) o BacpDNAP, descubierta recientemente en elementos genéticos móviles bacterianos. Analizamos *in vitro* como estas polimerasas llevan a cabo la TLS de diferentes daños bajo distintas condiciones. Observamos un efecto diferente del cofactor sobre la TLS para cada polimerasa. Φ 29DNAP realizó TLS preferentemente en presencia de manganeso, pero BacpDNAP, contrariamente, la realizó con magnesio. Sin embargo, la TLS de B35DNAP no dependió del cofactor. También estudiamos *in vivo* el crecimiento del fago Φ 29 expuesto a agentes genotóxicos, como hidroperóxido de tert-butilo (*t*-BuOOH) o metanosulfonato de metilo (MMS), a concentraciones que solo redujeron levemente la supervivencia del hospedador. Observamos que, en comparación con la incidencia en el hospedador, *t*-BuOOH redujo siete veces la producción de fago, mientras MMS la redujo a la mitad. Esto sugiere que la maquinaria de replicación del fago toleró mejor los daños alquilantes del MMS en el DNA que los oxidativos del *t*-BuOOH.

Palabras clave: Replicación de bacteriófagos; DNA polimerasas de la familia B; Síntesis de DNA a través de daño; Daño del DNA; Cofactor metálico.

GENERACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DEL VIRUS DEL EBOLA ZAIRE EN EL SISTEMA DE EXPRESIÓN DE BACULOVIRUS PARA EL DESARROLLO DE NUEVAS HERRAMIENTAS DIAGNÓSTICAS

Barriales San Miguel, Diego; Marín López, Alejandro; Brun Torres, Alejandro; Ortego Alonso, Fco. Javier

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

El virus del Ebola Zaire es la especie más virulenta del género *Ebolavirus* causando fiebre hemorrágica en humanos y primates no humanos. Es responsable de la mayoría de brotes ocurridos en el continente africano y posee un ratio de mortalidad que oscila entre el 30 y el 90%. Estudios recientes han mostrado que los cerdos pueden infectarse actuando como hospedador natural, pudiendo transmitirlo a otros cerdos y primates no humanos por contacto o aerosol. La ausencia de tratamientos y estrategias vacunales efectivas hace necesario el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos multiespecie basados en la detección de anticuerpos. En este trabajo se han expresado las proteínas recombinantes: glicoproteína (GP), nucleoproteína (NP), proteína de matriz VP40 y los dominios *mucin-like* (MLD) y de unión al receptor (RBD) de la proteína GP del virus Ebola Zaire empleando como sistema de expresión baculovirus recombinantes. La expresión de las proteínas recombinantes se analizó mediante ensayos de western blot e inmunofluorescencia empleando anticuerpos monoclonales y policlonales específicos de GP, NP y VP40. Estas proteínas han servido para desarrollar sistemas de diagnóstico basados en ensayos de ELISA que detectan eficientemente anticuerpos específicos de las proteínas NP y VP40 en sueros de ratones inmunizados.

Palabras clave: Virus Ebola Zaire, proteína recombinante, baculovirus, herramienta diagnóstica.

PROYECTO DE CREACIÓN DE UN BIOBANCO DE SUERO Y PLASMA PROCEDENTE DE PACIENTES CON ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN ARGENTINA

Cabassi, María Victoria; Muñoz Fernández, M^a Ángeles

Hospital Universitario Gregorio Marañón. 28007 Madrid

Los biobancos son unidades funcionales sin fines de lucro en donde se almacena material biológico e información asociada. Dentro de un biobanco, las muestras se organizan en base a criterios de calidad, orden y destino, constituyendo una importante plataforma de apoyo a la investigación. En Argentina, el funcionamiento de los biobancos es heterogéneo y existe la necesidad de normalizar los procesos referidos a su organización y actividad.

El objetivo principal de este trabajo es establecer los lineamientos para la creación de un biobanco de suero y plasma procedente de pacientes con enfermedades infecciosas, fundamentalmente de etiología viral, dentro de un hospital pediátrico de la provincia de Buenos Aires. En estos lineamientos se involucrarán procesos regulados por normas de calidad y bioseguridad y enmarcados dentro de la normativa vigente a nivel nacional e internacional.

Se definieron tanto la estructura jerárquica como la sistemática de donación y cesión de muestras, la metodología de procesamiento y almacenamiento, el modo de registro de datos y los procesos de gestión de calidad.

Se espera que, además de lograrse la implementación del proyecto, este documento sirva como modelo para la creación de nuevos biobancos a nivel nacional y que contribuya a la mejora en el funcionamiento de los ya existentes.

Palabras clave: biobanco, investigación clínica, pediatría, almacenamiento de material biológico.

REGIÓN HIPERVARIABLE RICA EN POLIPROLINA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS E, DESCRIPCIÓN DE UNA REGIÓN INTRÍNSECAMENTE DESORDENADA

Cenalmor Molina, Alejandro; Avellón Calvo, Ana M^a

Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. 28220 Madrid

El virus de la hepatitis E (VHE) causa de brotes y casos esporádicos de hepatitis en humanos. Su aparición está asociada al consumo de agua contaminada (genotipos 1 y 2) o carne de animales infectados (genotipos 3 y 4). Por tanto, los genotipos 3 y 4 se consideran zoonóticos. La región hipervariable (HVR) de VHE (localizada en ORF1, proteínas no estructurales) se ha descrito como intrínsecamente desordenada y sin función asignada, postulándose la posible relación con la inespecificidad de especie del virus. El objetivo principal de este trabajo se centra en describir la HVR. Para ello, se llevó a cabo la amplificación y secuenciación de la HVR completa de VHE en muestras de pacientes infectados por genotipo 3 (n=21) y su posterior caracterización en comparación con las secuencias de la misma región existentes en las bases de datos. Es la primera vez que se caracteriza la región HVR de muestras de pacientes en España. La HVR, no es una región tan desordenada como esperábamos, sino que posee motivos conservados. Nuestros resultados indican una diferencia en las HVR a nivel molecular entre los genotipos no zoonóticos y los genotipos zoonóticos. La longitud de la región HVR no depende del subtipo dentro del genotipo 3.

Palabras clave: Virus de la Hepatitis E, región hipervariable, región poliprolina, *Hepeviridae*, zoonótico

ANÁLISIS DE DATOS DE METAGENÓMICA EN VIRUS DE LA ANTÁRTIDA Y EL ÁRTICO

Fernández Linares, Carlos; Alcamí Pertejo, Antonio

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

Los virus son las entidades biológicas más abundantes de la tierra, siendo importantes reguladores de las comunidades microbianas. Sin embargo, el conocimiento que tenemos sobre ellos aún es escaso, especialmente sobre sus mecanismos de adaptación y evolución. En este trabajo se ha estudiado la variabilidad genética de los virus presentes en dos lagos de agua dulce de zonas polares, Limnopolar y Nordammen, por tratarse de zonas aisladas con muy baja influencia humana y con un bajo aporte zoogénico. Para ello se ha puesto el foco en la búsqueda de genomas virales con comportamiento de cuasiespecies a través de herramientas bioinformáticas. En este estudio se han ensamblado las lecturas generadas por secuenciación masiva procedentes de ambos lagos y se describen las diferencias taxonómicas halladas entre ellos, la identificación de virus con genoma circulares y el análisis de la variabilidad genética a través de diversos parámetros. Finalmente, se han buscado correlaciones entre la variabilidad genética y las diferentes familias virales presentes en cada lago, encontrando una pequeña correlación inversa, aunque estadísticamente significativa, entre el tamaño del genoma de los virus detectados y la variabilidad genética a través del índice de Shannon.

Palabras clave: Lagos polares, Metagenómica, Virus ssDNA, Cuasiespecies, Bioinformática

NUEVOS MÉTODOS MOLECULARES APLICADOS AL ESTUDIO DE LA EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA PAROTIDITIS

Gavilán García, Ana María; Fernández García, Aurora; Echevarría Mayo, Juan E.

Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. 28220 Madrid

La vigilancia epidemiológica es un aspecto primordial e indispensable para controlar la enfermedad producida por el virus de la parotiditis. Actualmente, la herramienta utilizada para el genotipado, secuenciación del gen SH, no permite discernir cadenas de transmisión y patrones de circulación, ya que circula exclusivamente un genotipo. A fin de solventar este problema, se desarrolló en este trabajo una RT-PCR convencional capaz de amplificar una región variable, entre los genes M y F. Se amplificaron 46 muestras pertenecientes a la quinta (2005-2009) y sexta (2011-2015) onda epidemiológica producidas en nuestro país pertenecientes al haplotipo del gen SH MuVs/Almería.ESP/17.05[G]. Tras purificarlas y secuenciarlas, se completaron con los resultados de dos RT-PCR, de otras dos regiones variables, desarrolladas previamente en la unidad, y se realizó el correspondiente análisis filogenético con las regiones hipervariables individuales y concatenadas. Se discute cómo se ha dado un reemplazo de cepas entre las ondas que no mostraban SH y cómo las regiones NVP y MF tienen una mayor capacidad de discriminación, mientras que la región PM parece prescindible. Las regiones NVP y MF, parecen ser la herramienta adecuada para desentrañar los patrones de circulación del virus cuando la secuencia SH resulta insuficiente.

Palabras clave: virus de la parotiditis, regiones hipervariables, PCR y análisis filogenético.

FUNCIONALIDAD DE MUTANTES DE GP16 EN EL PROCESO DE EMPAQUETAMIENTO DE ϕ 29

González Pascual, Raquel; Bocanegra, Rebeca; López Carrascosa, José

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

Los bacteriófagos son virus que infectan a bacterias. Estos virus son muy ubicuos y sus características dependen de la bacteria a la que infectan y al ambiente donde viva ésta. El bacteriófago ϕ 29 pertenece al género *Caudovirales* y a la familia *Podoviridae*, tiene un genoma de doble cadena de ADN. La proteína gp16 de este virus forma parte del motor de empaquetamiento y su función es introducir el ADN al interior de la precabeza en presencia de ATP. En este trabajo se purificaron varios mutantes de esta proteína para analizar su interacción con las precabezas de ϕ 29, su actividad ATPasa y su capacidad de empaquetamiento *in vitro* del ADN de ϕ 29. La comparación de la actividad de estos mutantes con la de la proteína silvestre nos puede dar las claves para entender las bases moleculares de estas funciones. Nuestros resultados mostraron que únicamente son capaces de empaquetar ADN las precabezas que están unidas a los mutantes Q10A y N158A. Esto puede ser debido a que estas mutaciones no se encuentran en dominios estrictamente esenciales para la actividad de la proteína, mientras que el resto de los mutantes mapean dominios clave en la función empaquetadora de ADN.

Palabras clave: gp16, ATPasa, empaquetamiento, mutante.

SÍNDROME RESPIRATORIO AGUDO Y GRAVE, SARS-COV: BASES MOLECULARES DE LA PATOGENICIDAD

Honrubia Belenguer, Jose Manuel; Enjuanes Sánchez, Luis; Sola Gurpegui, Isabel

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

El agente etiológico causante del síndrome respiratorio agudo y grave (SARS), conocido como SARS-CoV, emergió en 2002 y afectó a más de 8.000 personas con una tasa de mortalidad del 10%. La presencia de virus tipo-SARS en murciélagos abre la puerta a una posible reemergencia del virus, por lo que el estudio y desarrollo de candidatos a vacuna y terapias antivirales es de gran interés. Las vioporinas son proteínas con actividad canal iónico que están presentes en algunos virus y participan en los procesos de producción y maduración de partículas virales, así como en patogénesis. Por eso, las vioporinas son proteínas a tener en cuenta a la hora de desarrollar herramientas contra la infección viral. El SARS-CoV codifica tres vioporinas: 3a, E y 8a. La implicación de la actividad canal iónico de la proteína 3a en la producción *in vitro* del virus, así como en patogénesis son el objetivo principal de este trabajo. Se ha concluido que la actividad canal iónico de la proteína 3a no es esencial para la producción de virus en cultivos celulares, mientras que no se puede concluir que la actividad canal iónico de la proteína 3a del SARS-CoV sea determinante en la patogénesis viral.

Palabras clave: SARS-CoV, proteína 3a, actividad canal iónico, producción de virus, Virulencia

STABILITY OF ADENOVIRUS CAPSIDS IN THE PRESENCE OF DIVALENT CATIONS

Jiménez Gómez, Alba; Condezo Castro, Gabriela N., San Martín Pastrana, Carmen

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

Los Adenovirus son virus sin membrana cuya cápsida icosaédrica presenta una arquitectura compleja. Un problema común en los estudios estructurales de Adenovirus basados en criomicroscopía electrónica es la pérdida de pentones. El objetivo de este trabajo es, imitando las condiciones de trabajo a las que se ven sometidas las muestras para la adquisición de datos en criomicroscopía electrónica, encontrar un protocolo que minimice la alteración estructural de las partículas virales para facilitar los estudios de criomicroscopía electrónica. Para ello se estudió el efecto de diferentes tampones, y en particular de la presencia de cationes divalentes, sobre la estabilidad de Adenovirus tipo 5. Las muestras se analizaron mediante ensayos de infectividad y microscopía electrónica convencional. Los resultados indicaron que los cationes divalentes ejercen un ligero efecto positivo sobre la estabilidad estructural de la partícula viral. Este estudio sugiere que sería conveniente emplear el buffer HBS+Mg ya que parece preservar mejor la integridad de la partícula viral y, por tanto, podría mejorar los resultados de los posteriores estudios de criomicroscopía electrónica.

Palabras clave: Estructura de Adenovirus, estabilidad estructural, cationes divalentes, criomicroscopía electrónica, microscopía electrónica convencional.

GENERATION OF MVA-BASED VACCINE CANDIDATES EXPRESSING GP AND GP-VP40 FROM ZAIRE AND SUDAN EBOLAVIRUS STRAINS

Lázaro Frías, Adrián; García Arriaza, Juan Francisco; Esteban Rodríguez, Mariano

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

El virus del Ébola (EBOV) es uno de los patógenos más peligrosos del mundo, y causa una enfermedad grave en seres humanos y primates que se caracteriza por fiebres hemorrágicas y una alta tasa de mortalidad. El reciente brote de 2014 en África occidental ha puesto de manifiesto la necesidad de tratamientos o vacunas eficaces para la enfermedad del virus del Ébola. En este estudio, hemos generado y caracterizado varios candidatos vacunales contra las cepas Zaire y Sudán de Ébola basados en el vector poxviral altamente atenuado virus vaccinia ankara modificado (MVA) que expresa la proteína GP o GP junto con la proteína VP40. MVA-GP Zaire y MVA-GP Sudán estimularon fuertes respuestas inmunes innatas en macrófagos humanos, con la producción de interferón beta (IFN- β). Después de la inmunización de ratones BALB/c con un protocolo homólogo (MVA-GP Zaire / MVA-GP Zaire) o heterólogo (DNA-GP Zaire / MVA-GP Zaire) se indujeron altos títulos de anticuerpos IgG, IgG1, IgG2 e IgG3 contra GP Zaire. Por otra parte, también se indujeron anticuerpos con reactividad cruzada contra GP Sudán. Estos resultados apoyan la consideración de estos recombinantes basados en MVA como posibles candidatos vacunales contra el virus del Ébola.

Palabras clave: Ébola, MVA, vacunas, GP, VP40.

CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A DNA P1 Y P2 DEL BACTERIOFAGO Bam35

Lechuga Mateo, Ana; Redrejo Rodríguez, Modesto; Salas Falgueras, Margarita

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

El bacteriófago Bam35 es un virus de la familia *Tectiviridae* que infecta a *Bacillus thuringiensis* cuyo sistema de replicación iniciado por proteína terminal no está completamente elucidado. Aunque recientemente se han caracterizado tanto la polimerasa como la proteína terminal, no se conocen las proteínas de unión a cadena sencilla y doble de DNA. En este trabajo se analiza el papel de las proteínas virales p1 y p2 como las proteínas de unión a cadena doble (DBP) y sencilla (SSB) de DNA, respectivamente. Para comprobar esta hipótesis, se obtuvieron ambas proteínas recombinantes expresadas en *E.coli* y se purificaron por cromatografía de afinidad. Una vez obtenidas, se llevó a cabo la caracterización bioquímica y funcional de estas proteínas mediante diferentes experimentos *in vitro*. En experimentos de retraso en gel se observó que p2 se une a DNA, en concreto, se une con mayor afinidad a cadena sencilla que a cadena doble. También se comprobó que p1 se une a DNA de cadena doble y no reconoce específicamente el origen izquierdo de replicación. Finalmente, en ensayos de iniciación, se han obtenido resultados preliminares que sugieren que p2 podría mejorar la eficiencia en la iniciación de la replicación de DNA.

Palabras clave: Bam35, proteínas de unión a DNA de cadena sencilla (SSB), proteínas de unión a DNA de cadena doble (DBP), replicación de DNA, proteína terminal (TP)

VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO. VIROLOGÍA, EPIDEMIOLOGÍA, ENFERMEDADES ASOCIADAS Y VACUNAS

Martín Leal, Laura; Gómez-Lucía Duato, M^a Esperanza

Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense. 28040 Madrid

La infección por el Virus del Papiloma Humano es la enfermedad de transmisión sexual más extendida mundialmente. Más aún, ciertos tipos de este virus son potentes agentes carcinogénicos, hasta el punto de que el cáncer de cérvix derivado de la infección por VPH es el segundo trastorno neoplásico más común. En el presente Trabajo de Fin de Máster se realiza una revisión bibliográfica del conocimiento actual sobre la virología del virus, incluyendo sus características morfológicas y genómicas, así como su ciclo viral y la reacción inmunitaria que desencadena. También se analizan los estudios epidemiológicos vigentes sobre la distribución de la enfermedad, con especial atención a la distribución geográfica y por edad. Asimismo, se repasan algunas de las lesiones más comunes derivadas de la infección, tanto las benignas como las potencialmente carcinogénicas. Finalmente, se revisa exhaustivamente las tres vacunas contra VPH disponibles, Cervarix, Gardasil y Gardasil-9, analizando sus principios activos, composición, los distintos estudios que avalan su eficacia, efectos adversos reportados y prescripciones de vacunación recomendadas.

Palabras Clave: VPH, Virología, Epidemiología, Vacuna, Revisión.

ESTUDIO DE LA RESPUESTA NEUTRALIZANTE DURANTE EL INICIO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 EN PAREJAS DE HOMBRES QUE TIENEN SEXO CON HOMBRES

Martín Martín, Alba; Casado Herrero, Concepción

Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. 28220 Madrid

Las respuestas de anticuerpos neutralizantes (NABs) en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), han sido objeto de estudio durante los últimos años, con el propósito de estudiar los factores virológicos o genéticos del huésped implicados en tales respuestas. Con el objetivo de estudiar estos factores se analizaron muestras de plasma de cuatro parejas de hombres que tienen sexo con hombres (HSH) con infección reciente y simultánea por VIH-1 en los dos miembros de la pareja. En resumen, aunque se han comenzado a detectar diferencias en las respuestas de NABs en algunas de las parejas no se han podido asociar a factores virológicos o genéticos del huésped. Esto es debido, probablemente, a que el tiempo transcurrido entre la primoinfección y las muestras estudiadas fue insuficiente. Los resultados sugieren la necesidad de continuar el estudio con nuevas muestras obtenidas con posterioridad a las analizadas.

Palabras clave: *env*, HSH, infección reciente, NABs, VIH-1.

EVALUACIÓN DE UNA NUEVA TÉCNICA MOLECULAR PARA EL DIAGNÓSTICO DE LOS VIRUS INFLUENZA Y SINCICIAL RESPIRATORIO

Mateos Haro, Miriam; Bouza Santiago, Emilio; Muñoz García, Patricia; Kestler, Martha

Hospital Universitario Gregorio Marañón. 28007 Madrid

Las técnicas moleculares rápidas son métodos que producen resultados en 75 minutos o menos y tienen alta sensibilidad y especificidad, reproducibilidad y son fáciles de usar. En este estudio hemos analizado el impacto clínico y de laboratorio, del procesamiento de muestras con un algoritmo que consiste en usar como primer paso una técnica molecular rápida. Del 15 de diciembre al 15 de febrero recogimos y procesamos con este algoritmo las muestras respiratorias recibidas en el laboratorio. Observamos la prevalencia de influenza y VRS, comparamos las dos técnicas moleculares y después comparamos los pacientes con VRS e influenza con un grupo control aleatorizado. También comparamos las dos poblaciones positivas para ambos virus. Durante el estudio, recibimos 1200 muestras con sospecha de infección respiratoria: 114 fueron positivas para gripe, 95 para VRS y 6 fueron co-infecciones. Al comparar los pacientes con influenza y VRS, observamos diferencias significativas en: edad, prescripción antibiótica y antiviral, hospitalizaciones y fallecimientos. Este algoritmo mejoró la prescripción de antivirales y redujo la de antibióticos, hospitalizaciones, admisiones en la UCI y fallecimientos. Hemos demostrado que la importancia del VRS en adultos es similar a la de influenza.

Palabras clave: Influenza, VRS, diagnóstico, técnicas moleculares.

LA PROTEÍNA P1 DEL VIRUS DE LA SHARKA COMO FACTOR DE LA INTERACCIÓN PLANTA-VIRUS

Ordoñez Cencerrado, Carlos David; Garcia Álvarez, Juan Antonio

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

La proteasa P1 del virus de la Sharka está relacionada con la supresión del silenciamiento y, en estudios recientes, se ha comprobado que P1 podría tener funciones adicionales relacionadas con la replicación viral y/o la respuesta defensiva del hospedador. El virus mutante PPV(P1Pro) que carece del dominio N-terminal represor de P1, parece replicarse inicialmente con más eficiencia pero posteriormente induce síntomas más graves que los del virus silvestre, acumulándose en niveles menores. Se pretendió comprobar distintos aspectos funcionales de estas proteínas: a) si P1Pro induce directamente una respuesta defensiva; b) si P1, por el contrario, la inhibe; c) si la actividad sin restricciones de P1Pro estimula la replicación y ese aumento induce una respuesta defensiva. Se estudió la dinámica de infección en un mutante con un procesamiento independiente de P1. También la acumulación viral e inducción de PRs en virus recombinantes que expresaban P1Pro de manera ectópica; PPV, y PVX, este último para estudiar P1Pro en un contexto independiente del auto procesamiento. Se analizó la evolución de PPV(P1Pro) mediante pases seriados. Aunque no se puede descartar que P1 participe en la replicación regulando se auto corte, sí se comprobó que P1Pro por si misma estimula las proteínas de respuesta defensiva del hospedador, tanto en plantas silvestres como en plantas transgénicas deficientes en ácido salicílico.

Palabras clave: Proteína P1, Proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs), *Nicotiana*, *Plum pox virus* y *Potato virus X*.

ESTUDIO DE LAS POBLACIONES PERIFERICAS MONONUCLEARES DE OVEJAS INFECTADAS CON PPRV

Peláez Laderas, Adrián; Sevilla Hidalgo, Noemí; Rojas Carrasco, José

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

La Peste de los pequeños rumiantes (PPR) produce grandes pérdidas en la ganadería, afectando gravemente a los rumiantes. Esta enfermedad es causada por el virus de la peste de los pequeños rumiantes (PPRV), perteneciente a la familia *Paramyxoviridae* del género *Morbillivirus*. La respuesta inmune frente a PPRV no está bien caracterizada, hecho necesario para diseñar vacunas alternativas. En este proyecto contribuimos al conocimiento de la respuesta inmune frente a la infección por PPRV en ovejas mediante la caracterización de poblaciones leucocitarias a distintos tiempos post-infección y la fluctuación de las mismas con el tiempo, comparado con animales vacunados. Para ello, se extrajeron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de ovejas desafiadas y/o vacunadas a diferentes tiempos post-infección o post-vacunación, y mediante técnicas de citometría de flujo se evaluaron las distintas poblaciones leucocitarias y los grados de activación de las mismas. Se observó la disminución de las células T CD4⁺ y el incremento de la población de células NK a día 5 post-infección. Asimismo, se cuantificó la producción de IL-8 e IFN- γ a día 13 y 17 post-infección en suero, sin cambios significativos en las poblaciones vacunadas y sin vacunar. Estos datos confirman que la inmunosupresión inducida por PPRV es transitoria.

Palabras clave: PPRV, vacunas, leucopenia, IFN- γ , linfocitos T $\gamma\delta$.

ESTUDIO COMPARATIVO DE DIFERENTES TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES FRENTE AL VIRUS DEL SÍNDROME REPRODUCTOR Y RESPIRATORIO PORCINO

Plaza Soriano, Ángeles; Martínez Lobo, Francisco Javier; Prieto Suárez, Cinta

Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid

Para la determinación de la presencia de anticuerpos neutralizantes (AN) frente al VSRRP en sueros de cerdo se han desarrollado diferentes técnicas de seroneutralización (SN) que son utilizadas por los diferentes grupos de investigación que trabajan en esta enfermedad. Sin embargo, no existen datos acerca de la correlación entre los resultados obtenidos con las distintas técnicas. Por tanto, los objetivos de este trabajo han sido optimizar cada uno de los ensayos de SN frente al VSRRP disponibles en la bibliografía y determinar la correlación existente entre el título de AN obtenidos con las distintas técnicas comparadas. Los resultados del estudio indican que todas las técnicas empleadas muestran una especificidad del 100% y una sensibilidad comparable, aunque los títulos de AN tienden a ser mayores cuando se emplea una técnica de neutralización consistente en la determinación de una reducción del 90 % de los focos de infección mediante IFI. Aunque las características de especificidad, amplitud y potencia de los sueros utilizados en el estudio no parecen tener un impacto significativo en los resultados obtenidos, las propiedades de las cepas utilizadas en los ensayos podrían tenerlo, ya que la correlación de los resultados obtenidos con distintas técnicas parece ser dependiente de cepa.

Palabras clave: VSRRP, ensayos de seroneutralización, especificidad y sensibilidad

¿ESTÁ EL VIH-1 DEL SUBTIPO B EVOLUCIONANDO HACIA UNA FORMA MENOS VIRULENTO?

Santana Santana, Texenery; Pernas Escario, María

Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. 28220 Madrid

OBJETIVOS: Analizar, mediante el análisis de las envolturas, si ha habido un cambio de la virulencia del VIH-1 del subtipo B en España desde el inicio de la epidemia en 1981 hasta la actualidad.

PRINCIPALES RESULTADOS: Los resultados de este trabajo muestran que los pseudovirus generados con envolturas del VIH-1 de las variantes actuales presentaban una mayor capacidad replicativa y un mayor título viral que las variantes antiguas. Por otra parte, se ha observado que la envoltura del VIH-1 subtipo B ha evolucionado, variando en longitud, acortándose 15 nucleótidos de media. No existen cambios significativos en el número de sitios de N-glicosilación.

CONCLUSIONES: Los resultados de este trabajo han permitido demostrar, aunque con un número limitado de muestras, el aumento significativo de la aptitud viral del VIH-1 de las variantes actuales respecto a las antiguas, lo cual se podría reflejar en una evolucionando a una forma con mayor virulencia.

Palabras clave: aptitud viral, virulencia VIH-1; análisis envoltura; progresión VIH.

INFLUENCIA DEL AMBIENTE EXTRACELULAR EN LA ADAPTACIÓN DEL BACTERIOFAGO Q β A PRESIONES SELECTIVAS INTRACELULARES

Román Moreno, Ismael; Lázaro Lázaro, Ester

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

En este trabajo hemos utilizado un virus que posee un genoma de RNA, el bacteriófago Q β , para estudiar como la interacción entre las presiones selectivas intra y extracelulares influye en su capacidad de replicación y adaptación. Se han establecido diferentes líneas evolutivas en las que este virus ha sido propagado mediante pases seriados realizados a la temperatura óptima (37°C) o a temperaturas subóptimas (30°C y 43°C), alternando con choques térmicos (exposición a 60°C) entre los distintos pases. En algunos casos las poblaciones también han sido sometidas a mutagénesis artificial para estudiar la influencia del aumento de la tasa de error en la adaptación a los choques térmicos extracelulares. Los resultados mostraron que cuando el bacteriófago Q β es sometido a choques térmicos seguidos de replicación a 43°C no es posible la adaptación simultánea a ambas condiciones, siendo necesario que una de las dos presiones selectivas aumente gradualmente. Independientemente de la temperatura de replicación, en todos los casos se seleccionó la mutación A1956G (Lys204Glu en la proteína A1 del virus). Respecto a la tasa de error, hemos comprobado que pequeños aumentos son compatibles con la adaptación a los choques térmicos, mientras que aumentos mayores impiden que esta tenga lugar.

Palabras clave: bacteriófago Q β , presión selectiva, choque térmico, adaptación, mutación.

COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LA INHIBICIÓN DEL VIH DE DOS FAMILIAS DE DENDRÍMEROS CARBOSILANO POLIANIÓNICOS PARA SU USO COMO MICROBICIDA

Valderas Pancorbo, Sonia; Muñoz Fernández, M^a Ángeles

Hospital Universitario Gregorio Marañón. 28007 Madrid

Actualmente no existe una vacuna eficaz contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), por lo que se están investigando nuevas estrategias preventivas basadas en microbicidas vaginales y la nanotecnología. Debido al fracaso de los microbicidas en ensayos clínicos y al insuficiente efecto de los antirretrovirales, en esta memoria se propone comparar dos familias de dendrímeros carbosilano polianiónicos con núcleo polifenólico. Se realizó un cribado de seis nanocompuestos de primera, segunda y tercera generación, y grupos sulfonato o carboxilato en la periferia para identificar su actividad anti-HIV-1. Tras un ensayo de toxicidad e inhibición en células TZM.bl, se seleccionaron cuatro compuestos con los valores más bajos de EC50 y los índices terapéuticos más altos: BDJS010, BDJS011, BDJS012 y BDJS006. Estos dendrímeros inhibieron la infección por el VIH-1 en las primeras etapas del ciclo viral bloqueando la interacción gp120/CD4, inactivando las partículas virales. Estos resultados sugieren a estos dendrímeros para su desarrollo como microbicidas vaginales para prevenir la transmisión del VIH-1. Sin embargo, se necesitan más ensayos *in vitro* e *in vivo* en un modelo de ratonas humanizadas BLT (médula ósea-hígado-timo) para la evaluación preclínica de estos compuestos y trasladar los resultados a ensayos clínicos.

Palabras clave: dendrímero carbosilano polianiónico, microbicida, prevención, transmisión sexual, VIH-1

DESARROLLO DE HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN VIRUS-CÉLULA EN EL MODELO DE VPPA

Viedma González, Sergio; Alonso Martí, Covadonga; Galindo Barreales, Inmaculada

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

El virus de la peste porcina es un virus grande de ADN bicatenario que provoca una enfermedad altamente contagiosa y mortal en el cerdo doméstico. En el presente trabajo se han desarrollado herramientas útiles para el estudio de la interacción del VPPA con la célula infectada. Concretamente, se ha generado un virus recombinante fluorescente B30-GFP y se ha realizado la expresión y purificación de la proteína viral p12 en el sistema de baculovirus para la posterior obtención de antisueros. Además se ha profundizado en el estudio de la factoría viral. Utilizando el virus recombinante se pudo observar expresión de GFP desde estadios tempranos de la infección y por tanto pudo utilizarse para la visualización de los virus en su tráfico a través de la vía endocítica. Estos hallazgos han contribuido a reforzar la hipótesis de que la proteína viral p30 se expresa tempranamente en el interior de los endosomas. Por otro lado se pudo demostrar el reclutamiento de los endosomas multivesiculares y colesterol en la formación de los sitios de replicación ó factoría viral, distribuidos en un proceso dependiente de microtúbulos. Estos componentes celulares participan en la formación de la factoría dando soporte a la replicación viral. Además se evidenció como el retículo endoplásmico se dispone alrededor de las factorías donde se identificaron los sitios de replicación viral activa.

Palabras clave: VPPA, B30-GFP, proteína p12, proteína p30, endosomas.

EXOSOMAS COMO BIOMARCADORES EN PACIENTES INFECTADOS POR EL VIH-1 BAJO TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL EN DOS ESCENARIOS: ESCASA REPOBLACIÓN DE LINFOCITOS T CD4+ Y NEOPLASIAS NO ASOCIADAS A SIDA

Vázquez García, Esther; Vallejo Tiller, Alejandro

Hospital Universitario Ramón y Cajal. 28034 Madrid

El objetivo del estudio de la expresión de los miRNAs transportados por exosomas es hallar biomarcadores para pronosticar la capacidad repobladora de linfocitos T CD4+ de los pacientes VIH positivos que inician el tratamiento antirretroviral, y también para pronosticar el desarrollo de neoplasias no asociadas a SIDA, como el linfoma de Hodgkin y el cáncer de pulmón. Los resultados de las qRT-PCRs de los pacientes seleccionados muestran que la expresión de ocho de los 17 miRNAs seleccionados es significativamente distinta en no repobladores. Los pacientes No Repobladores sobreexpresan los miRNA 192, 320^a y 409 y tienen reprimidos los miRNA 24, 106a, 144, 181a y 221 con respecto a los Repobladores. En el caso del linfoma de Hodgkin cuatro de los 18 miRNAs analizados se expresan distintamente al comparar los controles con el momento del diagnóstico, y en cáncer de pulmón tres de 10. En el linfoma de Hodgkin ocurre represión con respecto a los controles en los miRNAs 16, 20a, 106a y 223. En cáncer de pulmón hay sobreexpresión de los miRNAs 145, 146a y 214. Los miRNAs con expresión distinta podrían llegar a ejercer de biomarcadores de pronóstico, y alguno de diagnóstico, de las situaciones estudiadas.

Palabras clave: Exosomas, miRNA, biomarcador, no repobladores, neoplasia.