

## **Utilización del simporter de I/Na (hNIS) para la visualización de células troncales mesenquimáticas (hMSCs) e inducidas pluripotencialmente (hiPSCs) en terapia génica y celular combinada**

**Carolina Belmar-López<sup>1</sup>, Gracia Mendoza<sup>1</sup>, Daniel Öberg<sup>2</sup>, Jerome Burnet<sup>2</sup> and Pilar Martín-Duque<sup>1,3</sup>.**

<sup>1</sup>Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza, Spain. <sup>2</sup>Queen Mary University of London/Cancer Research, London, UK. <sup>3</sup>Fundación Araid.

Las células madres mesenquimales humanas son células madre adultas multipotentes que tienen la habilidad de crecer indefinidamente y diferenciarse. Una de sus características es su capacidad para migrar y proliferar en áreas de inflamación y en tumores como parte del proceso de remodelado tisular, lo que las hace ser una buena elección para su uso como vehículos en aplicaciones de terapia génica en distintas patologías como en cáncer. Nosotros mostramos diferencias en la capacidad de migración entre hMSCs de diferentes orígenes y de las hiPSCs (células humanas inducidas pluripotentes) cuando las administramos sistémicamente en un modelo de tumor *in vivo*. Para desarrollar nuestra hipótesis, realizamos una técnica de visualización no invasiva *in vivo* para seguir a las células marcadas con el simporter de I/Na (hNIS) a través de SPECT y el empleo de radioisótopos como el <sup>99m</sup>Tc. Los resultados obtenidos muestran la capacidad de las hMSCs y de las hiPSCs de migrar a las zonas tumorales, existiendo diferencias en la intensidad de la señal y el crecimiento de los tumores entre las diferentes linajes celulares. Nuestros resultados confirman el alto potencial del uso de estas células en nuevas terapias génicas y celulares, pero también la importancia de la elección entre las diferentes tipos de hMSCs.

**Palabras clave:** Migración; simporter de I/Na; células madre humanas mesenquimales; células madre humanas inducidas pluripotentes, cáncer

## **Identificación de nuevas formas recombinantes del VIH-1 mediante análisis de genomas completos**

**Clusa Cuesta, Laura y Thomson, Miguel**

**Departamento de Patogenia Viral, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda, Madrid**

El VIH-1 presenta una gran variabilidad genética, distinguiéndose 4 grupos, 9 subtipos y 49 formas recombinantes circulantes (CRFs), además de múltiples formas recombinantes únicas. En Europa occidental predomina el subtipo B, aunque en Galicia también circula el subtipo G y diversas formas recombinantes BG, incluyendo la CRF14\_BG. En análisis previos de secuencias parciales de virus de subtipo G de Galicia, se observaron cuatro grupos o clústeres filogenéticos. En genomas completos, dos virus del mayor de los clústeres eran recombinantes BG con idéntica estructura en mosaico. Con el fin de determinar si dicho clúster corresponde a una nueva CRF, se analizaron genomas completos de cinco virus adicionales, amplificados mediante RT-PCR a partir de RNA plasmático.

Los análisis filogenéticos revelaron que dos virus presentaban la misma estructura en mosaico que los dos analizados previamente, con un genoma predominantemente de subtipo G y un corto segmento de subtipo B cerca del extremo 3', lo que permite definir una nueva CRF. Los 3 virus restantes muestran estructuras recombinantes únicas, pero están relacionados entre sí y con la nueva CRF, como lo muestran los análisis filogenéticos de genomas completos y segmentos parciales.

Basándose en estos resultados, se propone un modelo de generación de los recombinantes BG identificados mediante recombinaciones sucesivas.

**Palabras clave:** VIH-1, forma recombinante (CRF), CRF14\_BG, Galicia, secuencia completa.

## **Implicación del receptor celular HVEM en la susceptibilidad oligodendrocítica a la infección por HSV-1**

**Crespillo Alguacil, Antonio Jesús y López Guerrero, José Antonio**

**Universidad Autónoma de Madrid - Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO). Cantoblanco, Madrid**

Los oligodendrocitos (OLs) son las células productoras de la mielina en el sistema nervioso central (SNC). La mielina está compuesta por membranas ricas en glicoesfingolípidos y colesterol que protegen a los axones. Se ha investigado la susceptibilidad de una línea celular oligodendrocítica humana (HOG) a Herpes virus

simplex tipo 1 (HSV-1). Los datos obtenidos muestran un aumento de ésta en OLs diferenciados. La RT-PCR de la Timidina Kinasa viral a 4 horas post-infección (hpi) muestra diferencias significativas entre OLs diferenciados e indiferenciados, indicando que son manifestadas ya a tiempos muy cortos. Se han estudiado los receptores celulares WGA, HVEM y Nectina-1, encontrando diferencias en cuanto a la expresión y distribución de HVEM, concentrándose en los “Myelin like sheets” (estructuras semejantes a las vainas de mielina) de OLs diferenciados. Mediante videomicroscopía se observó que la entrada viral sucede a través de filopodios, sugiriéndose que el receptor HVEM podría generar ese incremento de susceptibilidad. Estos resultados permitirían una plausible extrapolación a sistemas más complejos, *in vivo*, que podrían inferir en un posible papel de la infección por herpesvirus en patologías neurodegenerativas que cursan con desmielinización, como la esclerosis múltiple (EM).

**Palabras clave:** HSV-1, HVEM, Nectina-1, Oligodendrocitos humanos (HOG), Esclerosis múltiple.

**Estudio *in vivo* de la función de supresión del silenciamiento del factor HCPro de PVY: interacciones moleculares, localización subcelular y papel de P1 como proteína asistente**

**Doblas Ibáñez, Paula; Cantó Ceballos, Tomás y Vázquez Estévez, Covadonga**

**Departamento de Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid.**

Los potyvirus son virus fitopatógenos responsables de importantes pérdidas económicas en el sector agrario a nivel mundial. El factor HCPro de potyvirus es una proteína multifuncional involucrada en diversas funciones del ciclo de infección, una de las cuales consiste en suprimir el silenciamiento génico mediado por ARN. El presente trabajo pretende profundizar en la caracterización funcional de esta proteína como supresor del silenciamiento, analizando en concreto el HCPro de Potato Virus Y (PVY). Para ello se ha llevado a cabo el estudio *in vivo*, mediante expresión transitoria en planta, de su localización subcelular, su estado de agregación y sus posibles relaciones con otras proteínas virales o celulares. Los resultados muestran un estado al menos parcialmente agregado de HCPro, que se acumula principalmente en inclusiones citoplasmáticas. Dicha distribución subcelular se ve afectada por la

presencia de otros factores virales que suprimen el silenciamiento. Además se ha detectado una posible interacción nuclear entre HCPro y la proteína AGO4. Por otra parte se demuestra que en el caso de PVY la presencia de la proteína viral P1en *cis* durante la maduración post-traducciona l de HCPro es imprescindible para que ésta adquiera la función de supresión y se acumule en tejido vegetal.

**Palabras clave:** HCPro / Silenciamiento génico / Supresor viral / PVY.

## **Estudios moleculares de fagos líticos y atemperados de *Streptococcus pneumoniae***

**Fernández De la Hoz, Jorge y García González, Pedro**

**Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Madrid.**

Varios bacteriófagos de *Streptococcus pneumoniae* han sido objeto de estudio siendo aislado y purificado su ADN con el fin de secuenciarlo y ampliar así el conocimiento de nuevas cepas fágicas de esta bacteria que causa grandes problemas sanitarios en países fundamentalmente en desarrollo donde llega a ser una causa incluso de muerte. Partiendo de estudios previamente realizados en Cp-1 (Ronda et al. 1981) se ha procedido al estudio de Cp-7, una cepa lítica con similitud morfológica a Cp-1, de HB-746, cepa lisogénica (o atemperada) y de la cepa clínica 655 enviada desde el Instituto de Salud Carlos III para confirmar su modo de actuación con las técnicas empleadas en nuestro laboratorio. Los resultados fueron satisfactorios, más aún teniendo en cuenta la dificultad que presenta la enorme sensibilidad de estos fagos al ser tratados, y se logró de forma óptima la extracción y purificación del ADN de las cepas Cp-7 y HB-746 para poder ser secuenciado posteriormente. También se confirmó con los resultados obtenidos que la cepa clínica 655 se trataba de una cepa lisógena.

**Palabras clave:** *Streptococcus pneumoniae*, neumococo, bacteriófagos neumocócicos, bacteriófagos líticos, bacteriófagos atemperados, enzimas líticas.

**Evaluación del impacto en la producción lechera en Galicia de la infección por el virus de la Diarrea Vírica Bovina; Estudio de viabilidad del proyecto**

**González Rodríguez, José Francisco y de la Fuente López, Ricardo**

**Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.**

Se han empleado los registros de análisis de anticuerpos anti-p80 frente al virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) en tanque de leche y encuestas a veterinarios y propietarios para analizar la epidemiología del virus y su impacto sanitario y zootécnico en la producción láctea gallega. La prevalencia media no ha superado el 25%, pero no tiene una clara tendencia a disminuir. Las granjas con baja prevalencia ( $P < 5\%$ ) han seroconvertido a una tasa del 17% anual, muy elevada respecto a países con planes de erradicación en marcha, posiblemente por una falta de conciencia del daño que la infección puede causar, lo que inhibe la adopción de medidas de bioseguridad eficaces.

Las explotaciones afectadas han cambiado su actitud respecto a la bioseguridad y aumentan las medidas preventivas y de control. El mayor factor de riesgo es la compra de animales sin aplicar cuarentena ni revisar su estado respecto a la infección por BVDV y es en este apartado (junto a la vacunación) dónde más cambios se han producido. Llama la atención la falta de control sobre visitantes y el escaso uso que se hace de la prevención vacunal, ya que las vacunas se aplican después de haberse establecido la infección. En conclusión, el universo muestral parece suficiente para medir el impacto del BVDV sobre la producción lechera.

**Estudio preliminar sobre las alteraciones fenotípicas de las células Treg causadas por la infección VIH en pacientes adultos infectados**

**Jaramillo-Ruiz LD, Muñoz-Fernández, M<sup>a</sup>A y Correa-Rocha R\*.**

**Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular. Hospital Universitario Gregorio Marañón. Madrid, España.**

Las células T reguladoras son una subpoblación de los linfocitos T CD4+ de gran importancia en el establecimiento y mantenimiento de la tolerancia y la homeostasis del sistema inmune. Muchos estudios han analizado la frecuencia de las Treg en pacientes infectados por VIH. Sin embargo, los resultados no son concluyentes y

existe una gran controversia sobre el papel que juegan las Treg en el curso de la infección. Recientemente se ha demostrado que el VIH puede infectar las células Treg. Trabajos previos de nuestro grupo demuestran que las Treg son susceptibles de infección por el VIH disminuyendo la expresión del Foxp3 en las células infectadas. Este fenómeno produce una alteración en la capacidad supresora de las células Treg. El objetivo de éste estudio es corroborar dicho comportamiento *in vivo* y determinar el fenotipo de las Treg en pacientes infectados por VIH. Los resultados preliminares indican que efectivamente la frecuencia de células Foxp3+ es inferior en los pacientes infectados por VIH que en los individuos sanos. El estudio sigue en curso para recopilar un número suficiente de muestras que permitan confirmar estos resultados. Este estudio permitirá conocer mejor el papel de las Treg en el curso de la infección por VIH.

**Palabras clave:** Células T reguladoras, VIH, Foxp3 y células Th-17

## **Estudio de genética del virus de la hepatitis c en cultivos celulares**

**Manzanares Ibáñez, Mónica y Sheldon, Julie**

Universidad Autónoma de Madrid - Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO). Cantoblanco, Madrid

El virus de la hepatitis C infecta a unos 170 millones de personas en todo el mundo, dando lugar en muchos de los pacientes afectados a cirrosis y carcinoma hepatocelular. Aunque en los últimos años se ha avanzado mucho en su conocimiento gracias a que se consiguió el desarrollo y la optimización de un sistema de cultivo celular, aún hay etapas de su ciclo de replicación que no se comprenden totalmente, y muchas de las funciones de las proteínas virales aún no están claras. Con el fin de dilucidar el papel que juegan dos de estas proteínas en el desarrollo de carcinoma hepatocelular, en este trabajo se desarrolló un sistema de expresión de los genes de la proteína del core y la proteína no estructural NS5A del virus, de tres genotipos distintos, mediante la clonación de los mismos y su posterior transfección en líneas celulares de hepatoma, obteniéndose buenos niveles de expresión de ambas proteínas, lo que servirá como base para futuras investigaciones.

**Palabras clave:** hepatitis C, core, NS5A, clonación, transfección.

## **Uso de correceptores de VIH-1 en formas genéticas no-B**

**Ortiz Martínez de Carnero, Fernando y Pérez Álvarez, Lucía**

**Departamento de Retrovirus, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid.**

La secuencia de V3 es el principal determinante del uso de correceptores de VIH-1. Las diferencias genéticas existentes entre las secuencias de V3 por formas genéticas de VIH-1 podrían asociarse con un tropismo/uso de correceptores preferencial entre unas formas genéticas y otras. Este proyecto se centra en el estudio del tropismo de diferentes formas genéticas no-B del VIH-1 mediante la secuenciación de V3, su análisis filogenético realizado con los programas RAxML, Genotyping y RIP 3.0 y la predicción del tropismo mediante las reglas simples de V3 y los programas informáticos Geno2pheno y WebPSSM. Se estudian un total de 41 muestras de plasma de pacientes con VIH-1. En el árbol filogenético se identificaron 7 formas genéticas de subtipos B, G, F1, F2, CRF01\_AE, CRF02\_AG, CRF14\_BG. Algunas secuencias resultaron diferentes en V3 y retrotranscriptasa/proteasa, definiéndose como formas recombinantes únicas (URFs). Se demostró un predominio de tropismo R5 en subtipo F y subtipo G, y una presencia de tropismo X4 en todos los CRF14\_BG. Estos resultados sugieren diferencias de tropismo en las formas genéticas, si bien habría que ampliar el número de muestras de cada grupo. Se observan resultados genotípicos discrepantes en la predicción del tropismo X4. El estudio fenotípico podría definir el tropismo en estos casos discrepantes.

**Palabras clave:** Correceptor, VIH, Formas genéticas no-B, Tropismo

## **Estudio epidemiológico y etiológico del brote de varamientos masivos de delfines en 2011**

**Rubio Guerri, Consuelo y Sánchez-Vizcaíno Rodríguez, José Manuel**

**Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.**

Entre marzo y mayo, 45 delfines vararon en las costas de la Comunidad Valenciana y Baleares. Hasta ahora, habían ocurrido dos brotes de varamientos masivos en el mar Mediterráneo, en 1990 y 2007, asociándose a una infección por *Morbillivirus*. El objetivo de este trabajo ha sido el estudio epidemiológico y etiológico del brote de varamientos masivos de 2011 en el Mediterráneo. En 2011, un total de 45 animales vararon en las costas valencianas, la especie que principalmente ha sido afectada es el delfín listado la mayoría de los animales eran jóvenes y vararon en la provincia de Valencia. Para encontrar la causa de este aumento de varamientos, se llevaron a cabo técnicas moleculares convencionales para la detección de varios virus, entre ellos *Morbillivirus*, dando positivos ocho de los trece animales estudiados. El estudio filogenético de las secuencias obtenidas de *Morbillivirus*, reveló 100% de homología a la del 2007. Por otro lado, con tejidos obtenidos del brote se pusieron a punto nuevas técnicas moleculares, a través del rastreo metagenómico para la detección de nuevos virus. En conclusión, se confirma la muerte por *Morbillivirus* de los animales analizados, lo que supondría el tercer brote en la historia en el Mediterráneo; y por otra parte, es la primera vez que se utiliza la metagenómica en cetáceos.

**Palabras clave:** *Morbillivirus*, cetáceos, metagenómica, delfín.

## **Estudio molecular de la región pre-core/HBxAg del VHB**

**Sevillano Mantas, Alejandro Manuel y Avellón Calvo, Ana María**

**Departamento de Virología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda, Madrid**

Cerca de 400 millones de personas en el mundo se han infectado por el VHB; aproximadamente 1 millón de estas han evolucionado desfavorablemente hacia el desarrollo de afectación hepática crónica, cirrosis y, en el peor de los casos, la aparición de hepatocarcinomas (HCC). Muchos estudios anteriores demuestran la asociación entre el HBxAg y el desarrollo de HCC. El desarrollo de un método que permita la caracterización de la región x del VHB, así como el estudio de las regiones de interés en pacientes con diferentes estadios de la infección, contribuiría a la

predicción de una mala evolución clínica, contribuyendo así a la mejora del manejo clínico de pacientes. En el presente estudio, se diseñó un método capaz de amplificar la región de estudio con sensibilidad para los genotipos A-H. El estudio de esta región permitió poner de manifiesto numerosas mutaciones asociadas al mal pronóstico de la infección, así como mutaciones puntuales que no han sido descritas. El análisis de la secuencia de aminoácidos permitió encontrar cambios de aminoácidos en dominios conocidos y asociados al escape de la respuesta inmune, inhibición de la apoptosis y actividad transactivadora.

**Palabras clave:** VHB; HBxAg; proteína X del VHB; región X, gen X.