

MEMORIAS II SIMPOSIO NACIONAL DE VIROLOGÍA

Septiembre 7 - 9 de 2006
Bogotá - Colombia

Red Colombiana de Virología
Instituto de Virología, Universidad El Bosque.
www.virusnetcolombia.org.co

1. Conferencias Magistrales
2. Trabajos Originales
 - Dengue y Fiebres Hemorrágicas
 - VIH y SIDA
 - Virus RNA
 - Hepatitis Virales
 - Virología Veterinaria
 - Virus DNA
 - Virología Vegetal
3. Presentaciones en Póster

Contacto:
JAIME E. CASTELLANOS
Instituto de Virología Universidad El Bosque
Transversal 9A Bis No. 132-55
Edificio de Rectoría - Laboratorio 205
Tel: (57-1) 633 13 68 Exts. 209/272
Fax: (57-1) 648 90 66
castellanosjaime@unbosque.edu.co

ÍNDICE DE AUTORES

Acevedo LY, T32.
 Acosta O, T30, T34, T39
 Agudelo P, T1
 Alvarado M, T35.
 Álvarez CM, T52, T53, T54, P1.
 Álvarez CP, T55
 Álvarez J, T10
 Álvarez LG, T17
 Alvear D, T18
 Alzate JF, T6
 Amorochio HB, T21
 Angel J, T40.
 Arboleda JJ, T62
 Arboleda M, T1
 Arias JF, T14
 Arias YR, T44.
 Aristizábal FA, T44, T48.
 Ariza K, T58
 Barrera A, P5.
 Barrera J, T57, T56
 Barreto M, T2
 Basto N, T2, T14
 Bello F, T4
 Bello SE, T38.
 Berrocal LC, T6
 Billon y Tigne D, T38.
 Bonelo A, T3, T14
 Bravo LE, T52, T54
 Bravo MM, M2, T45, T47, T50, T51
 Burbano ME, T2
 Caicedo E, T25.
 Calderón MN, T30.
 Cantillo C, T16
 Cantillo C, T58
 Cardona D, T32.
 Carrero S, T1
 Carrillo F, T44.
 Cartagena G, T1
 Castañeda NY, T4
 Castaño JC, M1, T9, T33.
 Castaño ME, T27.
 Castelblanco A, T59
 Castellanos JE, T4, T11, T13, T15, T18, T36, T49.
 Castillo F, T31.
 Castro D, T8
 Ceballos AS, T5
 Céspedes MA, T45.
 Chaves-Bedoya G, P2.
 Chougnet C, T29.
 Cómbita AL, M2, T45, T50
 Correa G, T52, T54, P1, P3.
 Cortés FM, P3, P6.
 Cuartas A, T6
 Delgado G, M2, T45.
 Domingo C, M6, T7, T12
 Donado J, T54
 Duarte D, M2.
 Echeverry LF, T32.

Edwards E, T58
 Estrada JA, T52, T53
 Ferrero A, T59
 Flórez AM, T46.
 Forero JE, T24, T32, T55
 Franco MA, T40.
 Gallego-Gómez JC, M3, T5, T6, T7, T12, T19, T20, P5
 García R, T26.
 García-Carrancá A, T51
 Garzón M, M12, T8
 Genin C, P4.
 Giraldo AM, M1, T9
 Giraldo MA, T33.
 Gómez AM, T7, T19, T20
 Gómez A, T56
 Goz Y, T57, T60, T61
 Góngora A, T60
 Gonzáles M, T51.
 González de Schroeder M, M1, T9, T33.
 González M, T10, T26, T58
 Granados-González V, P4.
 Greenberg HB, T40.
 Gualtero DF, T34.
 Guerrero CA, M4 T30, T31, T34, T39
 Guevara J, T25.
 Gutiérrez AI, P2.
 Gutiérrez MF, M5, T35, T43
 Guzmán F, T34.
 Haenni AL, M11.
 Hainaut P, T54
 Henao LF, T53, T54
 Hernández-Verdun D, T27.
 Herrera DC, T46.
 Hewson R, M9.
 Houghton-Triviño N, T11, T36.
 Hoyos A, T29.
 Hoyos S, T52, P1.
 Huertas A, M2, T47, T50, T51.
 Hurtado C, T46.
 Isaza DM, T17
 Izquierdo C, T37.
 Jaramillo S, T52, T54
 Jiménez GM, T49.
 Komar N, T58
 Kumar A, T27.
 Landay A, T28.
 Lareo L, T43.
 Libreros GA, T3, T14
 López K, T63
 López R, T54
 López-Gil J, T48.
 López-Herrera A, T32, T55, T57, T60, T61
 Manrique FG, T38.
 Mantilla G, M8.
 Martín L, T47, T50

Martínez-Gutiérrez M, T36, P5.
 Martínez-Uzeta C, T49.
 Matanzo A, T7
 Matiz A, T35, T43.
 Mattar S, T10, T16, T58
 Meijer-Chris JLM, T50
 Méndez F, T2, T3, T14
 Méndez JA, M6, T7, T12
 Mills J, T16
 Milner M, M11,
 Mira C, T52, T53
 Molano M, M2, T47, T50, T51
 Montaña D, T11
 Montoya CJ, T28, T29
 Moreno ME, T29.
 Moreno-Acosta P, T47, T50, T51
 Muñoz J, T3
 Muñoz N, T47, T50
 Murillo A, T39.
 Murillo R, T50.
 Narváez CF, T40.
 Navas A, T3
 Navas MC, M7, T52, T53, T54, P1, P3, P6
 Neissa JI, T13
 Ocazonez RE, T21 T22 T23
 Osorio G, T52, T54
 Osorio S, M8.
 Ospina JM, T38.
 Ospina M, T17
 Ossa J, T57
 Padilla L, M1.
 Padmanabha H, M8, T16
 Páez A, T26.
 Panqueba C, M12.
 Pardo E, T14
 Parra B, T2, T3, T14, T25.
 Patiño CP, P4.
 Pelaez D, T36.
 Peña J, T10, T16, T58
 Piedrahita LD, P4.
 Pinter A, P4.
 Ponce C, T58
 Posso H, T50
 Prada-Arismendy J, T15
 Prieto F, T26.
 Puerta H, T16, T58
 Quintero DC, T19, P5.
 Ramírez G, T56
 Ramírez R, T17
 Recio-Pinto E, T36.
 Rengifo G, T14
 Restrepo BN, T1, T17
 Restrepo JC, T52, T54, P1, P3
 Rey G, M6, T7, T12, T26.
 Riffard S, P4.
 Rincón V, T15, T18
 Ríos A, P6.
 Rivera RF, T63

Rodas JD, M9, T62
 Rodríguez JA, M10, T8
 Rodríguez LL, T62
 Rodríguez LS, T34.
 Rubio AM, T59
 Rubio I, P6.
 Rugeles C, T29.
 Rugeles MT, T28, T29, T32.
 Ruiz J, T57, T60, T61
 Sadowy E, M11.
 Salazar A, T6
 Salazar CL, T17
 Salazar-Bravo J, T16
 Saldaña C, T41, T42, T59
 Salgado D, M12, T8
 Salvato M, M9.
 Sanabria LP, T9, T33
 Sánchez de Gómez M, T51.
 Santa C, T54
 Santella R, T54
 Sarmiento LR, T33.
 Sastre DA, T31.
 Silva L, P2.
 Solano O, T18
 St. Laurent G, T27.
 Suárez I, P1.
 Taborda NA, T55
 Téllez Y, T46.
 Tenorio A, M6, T12
 Torres LF, T32.
 Trujillo A, P5.
 Trujillo AI, T19
 Trujillo C, T62
 Ulloa JC, T35, T43
 Urcuqui-Inchima S, M11, T24, T27, T57, T60, P4
 Uribe D, T54
 Usme JA, M6, T6, T7, T12, T20
 Úsuga X, T28.
 Vaca JC, T63
 Valdés S, P2
 Van den Brule A, T50.
 Varón C, T31.
 Vega R, T8
 Velilla PA, T29.
 Vera V, T56
 Villegas A, T53
 Wong S, T10
 Yebrael-Gómez S, T21, T22, T23
 Yepes JO, T53
 Zapata C, T4
 Zuluaga FN, T57

CONFERENCIAS MAGISTRALES

M1. ESTADO ACTUAL DEL DENGUE EN EL QUINDÍO, COLOMBIA

JOHN C. CASTAÑO, MERCEDES GONZÁLEZ DE SCHROEDER,
ALEJANDRA M. GIRALDO, LEONARDO PADILLA
Grupo de Inmunología Molecular (GYMOL), Universidad del Quindío,
Armenia, Colombia.

RESUMEN

El dengue es una enfermedad febril aguda de origen viral, que se caracteriza por fiebre, dolores musculares y articulares, cefalea, dolor retro-orbital, linfadenopatías y exantema que puede evolucionar a una forma hemorrágica complicada; este se transmite por el mosquito *Aedes aegypti*, el cual presenta una localización tanto intra como peridomiciliaria, con un predominio urbano, relacionado con altas densidades de población tanto de mosquitos como de seres humanos. En los últimos años la incidencia del dengue ha aumentado en todo el mundo y particularmente en Colombia el dengue clásico ha mostrado un comportamiento endemo-epidémico desde 1978. Los cambios climáticos producidos por el denominado fenómeno del Niño y la expansión urbana, facilitaron el inicio de la primera epidemia de dengue en el departamento del Quindío. El caso índice apareció en Armenia el 30 de junio de 1997 y desde entonces se han registrado brotes epidémicos en los años 1998, 2001 y 2002 con casos en sus formas clásica y hemorrágica. En el año 2002 en la ciudad de Armenia fueron clasificados como dengue hemorrágico, cuatro casos (0,1%) que cumplieron los criterios establecidos por el Ministerio de Salud y de éstos fallecieron dos personas. A pesar de las medidas de vigilancia epidemiológica y de control de vectores establecidas por las autoridades sanitarias de la ciudad de Armenia y el departamento del Quindío, llama la atención el establecimiento de un estado de endemicidad de esta enfermedad en la región, por lo que se está trabajando en la caracterización molecular e inmunológica de los serotipos responsables del dengue clásico y hemorrágico en el departamento del Quindío. Como resultados parciales se ha logrado la clonación de la proteína NS1, la determinación de la respuesta de citoquinas: interferón gama, IL10. Determinación de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la prueba de ELISA anti NS1. Estudios de Morfogénesis mediante la obtención de un virus dengue recombinante: posibles implicaciones patogénicas y terapéuticas.

Palabras clave: dengue, ELISA, clonación, proteína NS1.

M2. FACTORES DEL AGENTE Y DEL HOSPEDERO EN LA RELACIÓN VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y CÁNCER CERVICAL

ALBA L. CÓMBITA, MÓNICA MOLANO, GIOVANNI DELGADO, DIEGO DUARTE,
ANTONIO HUERTAS, MARÍA MERCEDES BRAVO
Grupo de Investigación en Biología del Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología.
Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Es ampliamente aceptado que los VPH son causa necesaria del cáncer cervical y se han identificado múltiples factores asociados a la infección. Actualmente existe gran interés en identificar que factores, en el virus o en su hospedero, favorecen que un subgrupo de infecciones por VPH no sean eliminadas, y persistan por tiempos prolongados, ya que son estas infecciones las que tiene alta probabilidad de adquirir carácter oncogénico mientras que las infecciones transitorias no tienen un papel importante en el desarrollo de enfermedad clínica. En nuestro grupo hemos estudiado de las variantes moleculares de VPH16 y la respuesta inmune humoral y celular hacia diferentes proteínas virales. Hemos observado una alta prevalencia de variantes no europeas en las pacientes con cáncer y lesiones de alto grado. Este hecho puede explicar en parte la alta incidencia de este cáncer en nuestro país. Actualmente está en curso el análisis de estas variantes y su relación con la infección persistente en una cohorte de mujeres de Bogotá. Dado que se ha propuesto que el sistema inmune juega un papel clave en el control de las infecciones por VPH, en esta misma cohorte examinamos la respuesta inmune humoral hacia las cápsides virales. El análisis de la línea de base muestra una prevalencia del 19% de anticuerpos hacia VPH, está en curso el análisis de los pacientes a los dos años, para evaluar la asociación entre la presencia de estos anticuerpos y la persistencia o eliminación de la infección. La respuesta inmune mediada por células contra las oncoproteínas virales juega un papel importante en la eliminación viral y la regresión de lesiones, analizamos las frecuencias de LT ayudadores específicos de E7 en mujeres con cáncer antes y después

de la radioterapia. Encontramos repuestas de LT ayudadores contra esta proteína en cerca de la mitad de las pacientes analizadas. Después del tratamiento, algunas pacientes mostraron un incremento en las frecuencias de LTh tipo 1, lo que indica que la respuesta inmune celular específica contra E7 puede ser modificada por efecto de la RT, y podría llevar a una mejor respuesta al tratamiento.

Palabras clave: VPH, cáncer cervical, variantes, respuesta inmune.

M3. BIOLOGÍA DEL VIRUS DENGUE

JUAN C. GALLEGO-GÓMEZ

Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET.

Línea de Investigación Biología Viral. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

La Biología Viral es un término bastante amplio que comprende, fenómenos moleculares, celulares del virus en la célula, el organismo hospedero y en las poblaciones, que pueden explicar el nicho tan particular que tienen los virus - "parásitos genéticos", así como sus implicaciones en la patogénesis, evolución y potenciales medidas de control. Como nuestra línea de investigación apunta a múltiples aproximaciones -unas en curso y otras por venir- la hemos denominado Biología Viral (BV). Estamos interesados en aclarar algunos puntos celulares y moleculares, que podrían aportar en la comprensión de la patogénesis viral, para ello nuestros frentes de trabajo son: 1. Patrón Evolutivo y Filogeografía del DENV en Colombia -Detección y Epidemiología Molecular, Evolución Experimental; 2. Obtención de un cDNA infeccioso del DENV recombinante-GFP, para análisis celular y molecular de la infección viral; 3. Clonajes moleculares de genes estructurales y no estructurales del DENV; 4. Participación del citoesqueleto en el ciclo replicativo del DENV; 5. Expresión inducible de Rac1 y RhoA (Rho GTPasas) y la infección con DENV; 6. Evaluación de la participación de las balsas de lípidos y las Rho GTPasas en la infección por DENV sobre células dendríticas y posible efecto antiviral de las estatinas. En nuestro laboratorio usamos y pensamos implementar metodologías convencionales como titulación por plaqueo y aislamiento de virus, purificación por ultracentrifugación en gradientes continuos de sacarosa, *western blot* e inmunoprecipitaciones. Así como técnicas más modernas - clonajes moleculares, bioinformática, RNAs interferentes, microscopía de fluorescencia de alta resolución -citoesqueleto, organelos celulares y virus. Además, la línea de BV trabaja en sociedad con la Dra. Gloria Patricia Cardona (Grupo de Neurociencias, Línea Neurobiología, UdeA) para desarrollar las áreas de terapia génica, vectores lentivirales, expresión micro-RNAs interferentes y bloqueo genes celulares implicados en enfermedades neurodegenerativas.

Palabras clave: dengue, biología viral, epidemiología molecular, citoesqueleto, Rho GTPasas.

M4. IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN DE RECEPTORES CELULARES PARA ROTAVIRUS Y BÚSQUEDA DE FÁRMACOS QUE INHIBAN LA INFECCIÓN

CARLOS A. GUERRERO

Laboratorio de Biología Molecular y Celular de Virus, Facultad de Medicina,

Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

RESUMEN

No se conoce el mecanismo utilizado por los rotavirus para infectar la célula, ni se conocen con exactitud las moléculas receptoras de la célula que los rotavirus utilizan para infectarla. Nuestro gran objetivo es conocer las interacciones iniciales rotavirus-célula hospedera, que conducen a una infección productiva, específicamente aquellas relacionadas con la unión a proteínas celulares de superficie que los rotavirus utilizan como receptores para infectar. Estudios realizados por el autor utilizando inhibidores metabólicos sugieren que los receptores para rotavirus en células epiteliales MA104 (derivadas de riñón de mono), involucran a una o varias glicoproteínas N-glicosiladas, cuya función de receptor depende de esfingolípidos y de la presencia de colesterol. Estos componentes forman parte de lo que se conoce como microdominios lipídicos de baja densidad (*rafts*). Mediante técnicas de separación por electroforesis se aislaron cinco bandas que contenían proteínas de la membrana citoplasmática de la línea celular MA104, con capacidad inhibitoria de la infección de los rotavirus RRV, Wa y nar. En dos de estas bandas encontramos la proteína integrina b3 y la proteína de choque térmico HSC70 (*heat shock cognate 70*). Utilizando anticuerpos específicos, proteínas recombinantes, ligandos naturales y células transfectadas se demostró que estas proteínas están implicadas en el proceso de entrada del rotavirus a la célula. Otros investigadores han confirmado estos hallazgos. En la actualidad hemos determinado que la proteína HSC70 y la integrina b3 se encuentran presentes en la membrana citoplasmática del enterocito de ratón lactante, ratón adulto, bovino, porcino y del humano, detectada mediante la técnicas

inmunológicas. Igualmente, mediante centrifugación en gradientes de sacarosa demostramos que las dos proteínas están ubicadas en los microdominios lipídicos denominados *rafts* y además, mediante coinmunoprecipitación y ELISA de captura encontramos que HSC70 y la integrina b3 están asociadas formando un complejo, dado que la unión se mantiene al disgregar los lípidos en cada una de las fracciones del gradiente de sacarosa (datos no publicados). Adicionalmente, mediante inmunoprecipitación determinamos que las proteínas VP6 y VP4 de la cápside de Rotavirus se unen a HSC70 a partir de lisados de células MA104 infectadas con rotavirus, sugiriendo que HSC70 se une con varias proteínas virales. Igualmente, encontramos que tanto las DLPs como los péptidos sintéticos (280-297) de VP6 y (531-554) de VP4, al adicionarlos a la célula MA104 y Caco-2, compiten con el rotavirus RRV, YM y WA. Igualmente los anticuerpos policlonales en conejos generados contra los péptidos sintéticos bloquean la infección de los rotavirus sugiriendo que las regiones (280-297) de VP6 y (531-554) de VP4 están implicadas en el proceso infeccioso. Del mismo modo, las células MA104 infectadas con rotavirus aumentan la expresión del mensajero y de la proteína HSC70 al analizarla mediante RT-PCR y técnicas inmunológicas (citoquímica, fluorescencia, ELISA y *Western blot*), respectivamente. Otra proteína encontrada en una tercera banda separada mediante técnicas de electroforesis fue la Proteína Disulfuro Isomerasa (PDI). Los resultados hasta ahora obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que las proteínas disulfuro isomerasa están implicadas en las reacciones tiol(-SH)/disulfuro(-S-S-) en los eventos iniciales de entrada del rotavirus a la célula. Este trabajo permitió el inicio de búsqueda de fármacos capaces de inhibir esta actividad con miras a tratamientos farmacológicos de la infección rotaviral. Al analizar diferentes AINES en las células MA104 y enterocitos humanos CCL-6, con rotavirus de origen humano (Wa, Wi, M69) encontramos que se aumenta la infección y en cambio inhibe en su totalidad la infección del rotavirus de origen animal RRV. Este hallazgo sugiere que los fármacos tienen efectos diferentes dependiendo del virus y quizá de la célula. Con base en estos resultados nos proponemos a futuro utilizar un modelo *in vivo* para determinar el efecto inhibitorio de fármacos AINES y con grupos sulfhidrilo en la infección de rotavirus en células del intestino delgado de ratón lactante. Los trabajos que se están realizados actualmente en el laboratorio bajo mi dirección y co dirección de Orlando Acosta son ejecutados por estudiantes de pregrado, maestría y doctorado vinculados al laboratorio.

Palabras clave: rotavirus, receptor, HSC70, integrina b3, PDI, fármacos.

MS. LOS VIRUS ENTÉRICOS COMO INDICADORES DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

MARÍA F. GUTIÉRREZ

Grupo de enfermedades infecciosas, Departamento de Microbiología.
Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Los virus entéricos y algunos otros que no causan gastroenteritis pero que son eliminados por materia fecal, han cobrado gran importancia como indicadores de la contaminación del ambiental. El motivo por el cual no se ha implementado esta búsqueda esta soportado por la dificultad de concentrar los virus presentes en estos ambientes. Por esta razón se usan los bacteriófagos como alternativas de contaminación. No obstante, se ha observado que los resultados de estos análisis, presentan inconvenientes que dificultan su interpretación. En caso de lograr incluir la detección de estos patógenos como sistema indicador de contaminación, nos vemos en la necesidad de utilizar procedimientos de muestreo, concentración y detección viral que garanticen alta sensibilidad y veracidad a los resultados. Es así que se han implementado técnicas de Adsorción – elusión y técnicas de ultrafiltración para lograr alta recuperación viral, sobre todo de ambientes acuáticos. Para el proceso de detección, es importante escoger una prueba que determine la presencia del ácido nucleico y ojala exista la posibilidad de secuenciar al menos un segmento del genoma que nos brinde información suficiente para entender el origen de dicha contaminación con el objeto de proponer estrategias para su disminución y control. Los rotavirus, adenovirus, norovirus, astrovirus y el virus de la hepatitis A, han sido los modelos más usados para demostrar como indicadores del problema ambiental que día a día va creciendo en nuestro país y en el mundo. Los adenovirus, el virus de la hepatitis E y el poliovirus, se están proponiendo como modelos alternos, de gran impacto para este fin. En la Universidad Javeriana, realizamos un estudio piloto buscando virus entéricos en el agua del municipio de Facatativá, Colombia y encontramos proteínas de rotavirus, astrovirus y norovirus en el agua potable, lo cual puede llevarnos a pensar que este es un vehículo importante de transmisión de esta patología y que puede estar asociado con los índices de diarrea reportados en esa región.

Palabras clave: contaminación ambiental.

M6. AVANCES EN EL DIAGNÓSTICO DE LA FIEBRE AMARILLA

JAIRO A. MÉNDEZ¹, JOSÉ USME², GLORIA J. REY¹, CRISTINA DOMINGO³,
ANTONIO TENORIO³

¹ Grupo de Virología, Laboratorio de Arbovirus, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia.

² Grupo Pecet, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

³ Laboratorio de Arbovirus, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

RESUMEN

En Colombia la fiebre amarilla ha sido una constante principalmente en el Atlántico y a lo largo del río Magdalena; aunque el último brote urbano en Colombia ocurrió en 1928 (El Socorro, Santander), el ciclo selvático de la enfermedad se ha venido presentando de forma endémica principalmente en zonas boscosas cercanas a los ríos Magdalena, Guaviare, Catatumbo, Orinoco y Amazonas, y se han confirmado casos humanos todos los años desde 1934 cuando se implementó el programa de diagnóstico basado en visceroatomía; a pesar de las medidas de vigilancia y control lideradas por el Instituto Nacional de Salud, durante los meses de junio y agosto de 2003 se presentó un brote epidémico en áreas selváticas del Catatumbo, departamento del Norte de Santander donde se confirmaron más de 64 casos con un 35% de mortalidad, siendo los más afectados hombres entre 15 y 45 años que por condiciones de trabajo (talador, aserrador, minero, trabajador agrícola, etc.) se ven obligados a internarse en áreas selváticas exponiéndose así a la infección. Teniendo en cuenta las condiciones epidemiológicas de la enfermedad en áreas endémicas y como una estrategia para evitar la reurbanización de la enfermedad, el control en zonas de alto riesgo debe incluir además de la vigilancia serológica, una vigilancia virológica sensible y específica que permita detectar de manera precoz la circulación del virus y sus posibles variantes genéticas. Así, aunque el estudio histopatológico acompañado de la inmunohistoquímica en cortes de hígado aún constituye el método de elección para realizar el diagnóstico, la aplicación de técnicas moleculares rápidas y relativamente sencillas tales como la RT-PCR a partir de muestras de suero o tejido para la detección del virus fiebre amarilla, se convierten en un complemento esencial para una vigilancia epidemiológica eficiente en zonas vulnerables que por condiciones socio-culturales representen un vehículo ideal para la reurbanización de la enfermedad.

Palabras clave: fiebre amarilla, diagnóstico molecular, RT-PCR.

M7. VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B: IMPLICACIONES CLÍNICAS Y TERAPÉUTICAS

MARÍA CRISTINA NAVAS

Grupo de Gastrohepatología, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

La infección por el virus de la hepatitis B (HBV) continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial, a pesar de la disponibilidad de una vacuna efectiva desde hace más de dos décadas. Además de la complejidad del manejo clínico de los pacientes, en su mayoría con infección persistente asintomática, esta situación epidemiológica en parte es consecuencia de la variabilidad genética del HBV. La ausencia de actividad correctora de la transcriptasa reversa viral es la causa de esta variabilidad. El primer grado de variabilidad corresponde a los ocho genotipos hasta el momento descritos, (A, B, C, D, E, F, G, H) con un grado de divergencia del 8%. La identificación de los genotipos circulantes en algunas poblaciones sugiere que el genotipo C es más frecuente en pacientes con diagnóstico de carcinoma hepatocelular (HCC) y el genotipo A en pacientes con infección asintomática. Además el genotipo C parece tener una menor respuesta al tratamiento con Interferón (IFN) que el genotipo B. También han sido caracterizados subgenotipos, como por ejemplo Aa/A1, Ae/A2, Bj/B1, Ba/B2, Cs/Cy y Ce/C2 y se ha tratado de establecer si existe correlación entre algunos subgenotipos, la tasa de replicación viral y la presentación clínica. Estudios de epidemiología molecular han permitido caracterizar mutaciones en el genoma del HBV, en particular en el “Enhancer II” y en el promotor Core. Las mutaciones T1762/A1764, asociadas con disminución de la producción de antígeno e (HBeAg), han sido identificadas en un alto porcentaje de aislados provenientes de pacientes con HCC. Estas mutaciones podrían estar modificando la tasa de replicación viral, el nivel de síntesis de la proteína Core y de la proteína X, implicada en el mecanismo de hepatocarcinogénesis. La presencia de las mutaciones T1762/A1764 en aislados provenientes de pacientes con infección asintomática, representa una posibilidad de implementar medidas tendientes a disminuir el riesgo de desarrollo de HCC. Una de las medidas es la selección del antiviral, teniendo en cuenta la carga viral, el genotipo y la seroconversión HBeAg/Anti-Hbe. La vigilancia epidemio-

lógica de la infección por HBV debe incluir no solo la identificación de los genotipos y subgenotipos circulantes, mutantes asociadas a mayor patogenicidad, variantes de resistencia a antivirales, sino además la búsqueda de variantes virales de escape a los Acs anti-HBs.

Palabras clave: virus de la Hepatitis B, variabilidad genética, genotipos, mutantes.

M8. PRELIMINARY ANALYSIS DENGUE TRANSMISSION DYNAMICS IN COLOMBIA, 2000-2005

HARISH PADMANABHA, SALUA OSORIO, GILMA MANTILLA
Instituto Nacional de Salud, Bogota, Colombia

ABSTRACT

Epidemiological models and field studies on the population dynamics of *Aedes aegypti*, dengue viruses and human hosts reveal that transmission dynamics are influenced by a number of factors acting in variable spatial and temporal scales. Assuming cross-protection and the potential for cross-enhancement between dengue serotypes, studies show that structure, growth rate and internal movement patterns of human meta-populations (country-wide) have a large bearing on dengue maintenance, extinction and (re)introduction across sub-populations (cities). Local dynamics, in turn, are governed by intra-city work-flows, human fertility and age-structure, host-vector ratios, temperature, humidity and rainfall. In particular, spatial and temporal heterogeneity in these factors has been shown to give rise to the observed pattern of dengue infection, particularly in Southeast Asia and Brazil. We present a preliminary analysis of how these assertions interplay in the observed dynamics of weekly DF cases in municipalities of Colombia from 2000-2005. In Colombia stable “endemic” maintenance is achieved only in cities above the population threshold of 100,000 inhabitants, whereas smaller towns, despite suffering large epidemics, are highly susceptible to stochastic extinctions in the dengue transmission chain. However, we found that viral maintenance is also affected by geographic location - that is, human movement between cities results in frequent re-introduction of dengue viruses, causing municipalities to continue reporting DF. We estimated the entomological inoculation rates (EIRs) of dengue per susceptible individual by analyzing 2001-2 DEN3 epidemic in a number of municipalities with high transmission. The results indicate that because of frequent viral introduction, cumulative incidence at the municipal level does not necessarily reflect the intensity of the “internal” ecological factors that combine to produce EIRs. We discuss the importance of these preliminary findings for the development of local indicators that permit epidemiological evaluation of anti-vectorial interventions and the utility for dengue surveillance and control systems.

Key words: dengue, vector ecology, transmission dynamics, spatial scale.

M9. GENÉTICA REVERSA DE VIRUS CON ARN DE SENTIDO NEGATIVO: CONSTRUCTOS Y EXPERIMENTOS PARA EL DESARROLLO DE UN CLON INFECCIOSO RECOMBINANTE PARA ARENAVIRUS

JUAN D. RODAS^{1,3}, ROGER HEWSON², MARÍA SALVATO³

¹ Grupo de estudios en Ciencias Veterinarias “Centauro” y Laboratorio de Inmunovirología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

² Centre for Applied Microbiology and Research, CAMR, Porton Down, UK.

³ Institute of Human Virology, University of Maryland Biotechnology Institute, Baltimore, USA.

Es bien sabido, que en los virus que poseen ARN de polaridad positiva (exceptuando los retrovirus), éste funciona como un mensajero celular; esto implica que su ciclo infeccioso puede ser iniciado a través de la transfección de análogos genómicos (como el ADN copia) insertados en un vector plasmídico. De otro lado, para los virus que poseen ARN de polaridad negativa, el molde de sus polimerasas es exclusivamente, un complejo Ribonucleoproteico (ARN genómico más Nucleoproteína). La carencia de sistemas de encapsidación de ARNs análogos a genomas virales de polaridad negativa ha obstaculizado la aplicación de la tecnología del ADN recombinante al análisis genético de estos virus. En los últimos 25 años, se ha logrado un avance substancial en el desarrollo de la genética reversa para los ARN negativos de forma que en la actualidad, cinco de las siete familias con estos genomas, han sido generados a partir de clones infecciosos recombinantes. Esta herramienta molecular ha sido un elemento muy ambicionado pues sería de gran utilidad para la investigación básica y aplicada. Con el fin de obtener un clon recombinante infeccioso para el prototipo de los arenavirus, el virus de la Corimeningitis Linfocítica (LCMV), insertamos los genes de las cuatro proteínas esenciales para su replicación en vectores de expresión y los segmentos genético largo y corto en vectores de

clonación. Acto seguido, desarrollamos técnicas para demostrar la funcionalidad de éstos y finalmente, los ensayos para tratar de recuperar el virus infeccioso a partir de la transfección de todos los clones en células eucarióticas. Como sucede a menudo en la ciencia, esta historia no tiene un final feliz; pero pretende al menos identificar las posibles causas de error y rescatar la validez de transmitir estudios “fallidos” y de difícil divulgación, como una enseñanza para las futuras generaciones de estudiantes de maestría y doctorado.

Palabras clave: clon infeccioso, arenavirus, genética reversa.

M10. CITOQUINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DEL DENGUE

JAIRO A. RODRÍGUEZ,

Grupo de Parasitología y Medicina Tropical. Universidad Surcolombiana.
Neiva, Colombia.

RESUMEN

En el dengue hemorrágico contribuyen diversos factores con su severidad, entre ellos la respuesta inmune del huésped cumple un papel preponderante. Las citoquinas proinflamatorias, al igual que las linfoquinas permiten coordinar el tipo de respuesta inmune que predominará en el individuo infectado por el virus dengue. Pocos estudios se han realizado en Colombia con el fin de determinar el comportamiento de las concentraciones de estas sustancias que pudieran sugerir un comportamiento particular de los niños afectados. Se realizó un estudio prospectivo en el Hospital Universitario de Neiva, en 30 niños con dengue hemorrágico comparándolos con 30 controles. Concentraciones séricas de TNF α , IL-6, IL-4, IFN γ e IL-10 fueron determinadas mediante ELISA en el día seis de instaurada la enfermedad y los datos fueron analizados usando el análisis no paramétrico de Kruskal Wallis. Se encontró un incremento de TNF α , IL-6 e IFN γ , en el grupo de estudio. El IFN γ muestra una correlación significativa con la presencia de Síndrome Shock Dengue. El nivel de IL-4 fue igual en ambos grupos. Aunque se esperaba un incremento en la IL-4 en el grupo de estudio dado un incremento en los títulos de IgE en un estudio previo, se explica por la cinética de la cascada de las citoquinas, cuyas concentraciones varían dependiendo del tiempo en el que se determinen en el transcurso de la enfermedad. Las concentraciones del estudio corresponden aproximadamente al día sexto de iniciado el cuadro clínico, lo que indica una persistencia de la respuesta Th1, posiblemente si se tomaran más concentraciones en días subsiguientes se pudiera apreciar el cambio descrito hacia Th2.

Palabras clave: dengue, citoquinas, patogénesis.

M11. MULTIFUNCTIONAL PROTEINS ATTACHED TO VIRAL GENOMES

EWA SADOWY^{1,2}, MALGORZATA MILNER², SILVIO URCUQUI-INCHIMA³,
ANNE-LISE HAENNI^{2,4}

1. National Institute of Public Health, Warsaw, Poland.

2. Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland.

3. Grupo de Inmunovirología-Biogénesis, Universidad de Antioquia.
Medellín, Colombia.

4. Institut Jacques Monod, CNRS, Universités Paris VI et VII, Paris, France.

ABSTRACT

The RNA or DNA genome of most viruses comply with the general strategies of the host, be it prokaryotic or eukaryotic, to regulate expression of the viral proteins and ensure replication of the virus. However, a large number of viruses obviate these general strategies, adopting other less common strategies. Among them, one that is frequently encountered is the covalent attachment of a virally-encoded protein to the 5' terminus of the viral genome or to viral replicative intermediates. These proteins perform a variety of functions depending on the virus to whose nucleic acid they are bound. In RNA viruses that adopt this strategy, the viral protein can participate in replication, translation and encapsidation of the genome; among plant RNA viruses, they can also participate in avirulence and systemic infection. Viral proteins covalently attached to viral DNA genomes or replicative intermediates are required for replication, providing a primer for DNA synthesis or performing DNA nicking functions; in conjunction with host factors, they also participate in a large array of other activities during the virus life cycle. Here we aim at presenting an overview of some of these functions, calling on a few examples to illustrate the diversity of activities attributed to these unique multifunctional proteins.

Key words: replication, RNA virus, DNA virus.

M12. MANIFESTACIONES ATÍPICAS DE LA INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE EN EL HUILA

DORIS SALGADO, CESAR PANQUEBA, MARISOL GARZÓN

¹ Grupo de Parasitología y Medicina Tropical. Universidad Surcolombiana. Neiva, Colombia.

² Hospital Universitario Hernando Moncaleano de Neiva, Colombia.

RESUMEN

En Colombia hay un número creciente de casos de fiebre dengue (FD) y fiebre dengue hemorrágico (FDH); en 2003 se reportaron 46504 casos de FD y 4100 de FDH, la incidencia actual es de 13 por 100.000 y para el departamento del Huila, Colombia, 60 por 100.000 habitantes. Los criterios de severidad de FDH establecidos en el año de 1986 por la OMS basados en las experiencias del sudeste asiático cuyos marcadores de oro la fuga vascular y la falla circulatoria, clasificaron a la enfermedad en formas complicadas con choque grados III y IV, siendo éste la causa de muerte; contrario a lo encontrado en los pacientes del Huila, en los cuales la mortalidad estuvo relacionada con presentaciones atípicas de la infección. Ésto puede ser explicado por la hiperendemicidad de la enfermedad en diferentes áreas del mundo, cambios relacionados con la agresividad de los serotipos e influencia del ambiente sobre la población vectorial. Gracias a los avances en el campo de virología e inmunopatología se ha reconocido la existencia de PCR viral en nuevas células como el miocito, hepatocito, célula glial. La principal causa de muerte por FDH en una serie de casos reportada por el Hospital Universitario de Neiva fue la miocarditis, complicación descrita como inusual y cuya severidad comparado con otros trabajos, sugiere características particulares que pueden ser dependientes del individuo y/o del virus. La segunda causa de mortalidad encontrada se relacionó con disfunción hepática; con un cuadro similar al Síndrome de Reyé, presentación que se compagina con lo descrito en la literatura en el sudeste asiático. Se plantea que el hepatocito y la célula de Kupffer son células blanco del virus. Otros sistemas como el neurológico, cuyo compromiso era atribuido a encefalopatía hipóxica, hoy se describe la afectación directa del sistema nervioso tanto central como periférico con cuadros encefalíticos, paréticos, S. de Guillain Barré y Mielitis transversa.

Palabras clave: dengue hemorrágico, mortalidad dengue, dengue patología.

TRABAJOS ORIGINALES

Dengue y fiebres hemorrágicas

T1. COINFECCIÓN LEPTOSPIRA – DENGUE, BROTE EPIDÉMICO URABÁ ANTIOQUEÑO, COLOMBIA, 2006

PIEDAD AGUDELO, MARGARITA ARBOLEDA, SUSANA CARRERO, GLADYS
CARTAGENA, BERTA N. RESTREPO

Instituto Colombiano de Medicina Tropical-CES. Sede Medellín, Colombia.

Instituto Colombiano de Medicina Tropical-CES. Sede Apartadó, Colombia.

Hospital San Sebastián de Urabá de Necoclí, Colombia.

RESUMEN

El dengue representa un grave problema de salud pública máxime cuando se presenta en forma simultánea con otras infecciones como la leptospirosis. Hasta el 31 de julio de 2006 se han procesado 179 muestras para estudio de leptospira - cultivo de sangre en medio *fletcher*, cultivo de orina y/o anticuerpos IgM e IgG por IFI en pacientes que han consultado por síndrome febril a las diferentes instituciones de salud de los municipios del eje bananero de la región de Urabá, Colombia. De estas muestras, 82 (46,3%) han sido reportadas como positivas con crecimiento de *Leptospira* spp. -aislamientos aún pendientes de identificar-, cuatro han sido negativas, 75 están pendientes por el reporte y a 17 no se les hizo cultivo. Así mismo, se han solicitado simultáneamente estudio para dengue a 69 de estos pacientes, siendo 16 positivos para dengue, 14 negativos y 39 pendientes por resultado. Del total de pacientes evaluados, seis han sido positivos simultáneamente para *Leptospira* spp. y dengue, cuya coinfección se ha documentado en la literatura, particularmente en momentos de brotes epidémicos. Los seis casos de coinfección comparten factores de riesgo relacionados con antecedentes de exposición a aguas contaminadas, y uno de ellos, incluso falleció con un cuadro de evolución de cinco días, en el municipio de Apartadó. Los otros cinco casos corresponden a pacientes de 10 meses, 5, 19,

26 y 62 años, que estuvieron gravemente enfermos y requirieron tratamiento hospitalario. Se destaca en este trabajo la gravedad de la situación por la que atraviesan los habitantes de esta región, desde el punto de vista sanitario y sus implicaciones sobre la magnitud de la morbilidad y la mortalidad.

Palabras clave: dengue, *leptospira*, coinfección, Urabá.

T2. DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA GLUTAMINA SINTETASA EN MOSQUITOS DEL GÉNERO *Aedes* COMO CONTROL INTERNO PARA LA DETECCIÓN DE INFECCIÓN DEL VIRUS DENGUE POR RT-PCR EN MOSQUITOS

NATALIA BASTO¹, MAURICIO BARRETO², MARÍA E. BURBANO³, FABIÁN MENDEZ³, BEATRIZ PARRA¹

¹ Grupo VIREM, Escuela de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle. Cali, Colombia.

² Laboratorio de Entomología, Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle. Cali, Colombia.

³ Grupo GESPE, Escuela de Salud Pública, Facultad de Salud, Universidad del Valle. Cali, Colombia.

RESUMEN

La vigilancia virológica en mosquitos infectados por virus dengue se realiza mediante la transcripción reversa y reacción de la cadena de la polimerasa (RT-PCR) por ser sensible y específica. Sin embargo, no se utiliza un control interno que verifique la integridad del RNA y los procesos de obtención del cDNA, lo cual puede arrojar resultados falsos negativos. Se implementó la detección del ARN mensajero ARNm del gen Glutamina Sintetasa (GS), constitutivo en mosquitos *Aedes*, como un control interno de la extracción y transcripción reversa del ARN para controlar la detección de virus dengue en mosquitos por RT-PCR. Se realizó un estudio *in vitro* en condiciones experimentales de laboratorio con mosquitos del género *Aedes* y en mosquitos infectados por dengue experimentalmente y colectados en campo. Mediante herramientas de bioinformática se diseñaron los *primers* específicos y se detectó la expresión del gen en diferentes estadios de vida, sexo, partes del mosquito adulto y número de individuos mediante RT-PCR. Se determinó la especificidad de amplificación mediante corte por enzimas de restricción del producto de PCR. El (ARNm) del gen GS se expresa en larvas y adultos del género *Aedes* independientemente del sexo. Adicionalmente, puede ser detectado encefalotórax o abdomen de un solo mosquito. La inclusión simultánea de *primers* para dengue y GS u oligo-dT durante la transcripción reversa no inhibió la detección del RNA viral o de GS en mosquitos infectados naturalmente o experimentalmente. Esta herramienta permite obtener resultados de RT-PCR para la evaluación de la infección por el virus dengue en mosquitos con mayor confiabilidad por que se disminuyen los resultados falsos negativos debido a la ausencia de RNA o poca eficiencia en los procesos de transcripción reversa. Así mismo, este control ofrece la posibilidad de ser utilizado en otros estudios de expresión génica en mosquitos.

Palabras clave: control interno RT-PCR, virus dengue, glutamina sintetasa, mosquitos.

T3. LINFOCITOS T CD8+CD4+ DOBLES POSITIVOS EN DENGUE

ANILZA BONELO¹, GERARDO LIBREROS¹, JAIME MUÑOZ¹, ADRIANA NAVAS², FABIÁN MÉNDEZ³, BEATRIZ PARRA¹

¹ Grupo VIREM, Escuela de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle. Cali, Colombia.

² Centro Internacional de Entrenamiento en Investigaciones Médicas, CIDEIM. Cali, Colombia.

³ Grupo GESPE, Escuela de Salud Pública, Facultad de Salud, Universidad del Valle. Cali, Colombia

RESUMEN

Un aumento de mediadores inmunológicos solubles en el plasma, o de marcadores de activación inmunológica temprana en linfocitos T (LT), sugiere que una activación inmunológica aberrante de los LT de memoria contribuye a la patología del dengue severo. Sin embargo, el papel protector y/o patológico de estos linfocitos no está aún claramente definido. La maduración en el timo de los LT que expresan el receptor, lleva a la diferenciación en LTCD4⁺ o LTCD8⁺, los cuales salen del timo como células maduras naïve. Así, la expresión de las moléculas CD4 o CD8 en los LT maduros en la periferia se considera mutuamente excluyente. Sin embargo,

se han encontrado LT dobles positivos en sangre periférica de individuos sanos, y varias enfermedades como algunas infecciones virales crónicas se caracterizan por la presencia de estas células. En un estudio en el que se examinaron marcadores de activación inmunológica en enfermedad por virus dengue y su relación con severidad se encontró la presencia de LT CD⁸CD⁴⁴ dobles positivos (LTDP) en sangre periférica de pacientes con dengue clásico y fiebre hemorrágica por dengue (FHD) especialmente en la fase aguda (días 5-7) de la enfermedad con un fenotipo de memoria efectora. En contraste, en la fase de recuperación las frecuencias de LTDP disminuyeron y en la fase febril muy temprana (días 0-3) no se observaron estos linfocitos, sugiriendo que los LTDP fueron inducidos por la enfermedad. La probabilidad de tener LTDP fue de casi diez veces para FHD comparado con FD durante la fase aguda (92% vs 54%; OR=9,8; 95%CI 1,81-96,9, P=0,02) y seis veces en la fase de recuperación 84% vs 48%; OR=5,7; 95%CI 1,15- 37,17, P=0,02). Éste es el primer estudio que muestra que los LTDP son inducidos durante una infección viral aguda y parecen estar relacionados con la severidad de la enfermedad.

Palabras clave: dengue clásico, fiebre hemorrágica por dengue, LTCD⁸CD⁴⁴.

T.4. ANÁLISIS DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE UNA LÍNEA CELULAR DE *Aedes aegypti* A LA INFECCIÓN CON VIRUS DENGUE Y VIRUS DE FIEBRE AMARILLA

NADIA Y. CASTAÑEDA¹, JAIME CASTELLANOS¹, ANGELA C. ZAPATA², FELIO BELLO²

¹ Instituto de Virología, Universidad El Bosque. Bogotá, Colombia.

² Laboratorio de Entomología, Biología Celular y Genética, Universidad de La Salle. Bogotá, Colombia.

Los cultivos celulares de mosquitos son frecuentemente utilizados para el aislamiento, identificación y caracterización de arbovirus. Para el estudio de virus dengue (DENV) y virus de fiebre amarilla (VFA) se emplean, principalmente, los cultivos celulares C6/36 (clon derivado de *Aedes albopictus*) y la línea celular de mono VERO. La línea celular AP-61, obtenida de *Aedes pseudoscutellaris*, ha sido también usada para el aislamiento e identificación de DENV y VFA. Previamente ha sido obtenida una línea celular de *Aedes aegypti* a partir de tejidos embrionarios del vector, la cual fue caracterizada morfológica, citogenética, bioquímica y molecularmente. Sin embargo esta células no han sido usadas en infecciones *in vitro* por arbovirus. El objetivo de este trabajo fue evaluar la susceptibilidad de la línea celular de *A. aegypti* a la infección por DENV y VFA. Para ello, los cultivos celulares fueron infectados a diferentes MOI (0.1, 1 y 10) con los VFA (V-341 Asibi) y DENV tipo 2 a diferentes tiempos. Posteriormente se realizó la detección de antígenos virales por la técnica de inmunocitoquímica y su cuantificación por la técnica de Cell-ELISA fluorométrica. Se usaron como controles positivos de infección, tanto células C6/36 como células VERO. Interesantemente, no se observó inmunoreactividad en las células de *A. aegypti* infectadas con ambos tipos de virus en ninguno de los MOI o tiempos estudiados. Tampoco se evidenció antígeno en la técnica fluorométrica ni fue posible detectar RNA viral por RT-PCR a partir de células infectadas. Por tanto se puede concluir que la línea celular de *Aedes aegypti* no es susceptible a la infección por virus dengue y virus de fiebre amarilla. Ello podría estar relacionado con características propias de la membrana celular o de la maquinaria enzimática necesaria para la replicación viral.

Palabras clave: *Flavivirus*, *Aedes aegypti*, dengue, fiebre amarilla.

T5. PREDICCIÓN DE microRNAs EN EL VIRUS DEL DENGUE Y SUS POSIBLES BLANCOS EN HOMO SAPIENS

ALEXANDER SALAZAR, JUAN C. GALLEGO-GÓMEZ

Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET.

Línea de Investigación Biología Viral. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

RESUMEN

Los microRNAs (miRNAs) son pequeños RNAs no-codificantes, de 22 nucleótidos (nts) de largo aproximadamente, inicialmente descubiertos como defensa contra virus, transposones y retroposones. Sin embargo, parecen ser elementos regulatorios post-transcripcionales de la expresión génica eucariota. Por su tamaño pequeño -supuestamente escapan a la vía PKR/IFN- los virus usan como inhibidores de los mecanismos de defensa de la célula hospedera. Previamente se han encontrado miRNAs virales en Epstein-Barr, citomegalovirus y herpes virus asociados a Sarcoma de Kaposi. En este estudio una búsqueda computacional, para predecir posibles estructuras miRNAs en el virus del Dengue fue llevado a cabo. Utilizando el *software on-line siRNA Target Designer* - Versión 1.51 sobre el genoma completo de la cepa Nueva Guinea del virus del dengue 2 (#

acceso M29095) fueron hallados 297 potenciales *short hairpins* (shRNAs). Los primeros 182 potenciales shRNAs correspondientes a los primeros 6.000 nt del genoma, fueron sometidos al GenBank utilizando el BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para buscar posibles genes blancos en el humano. Fueron halladas 78 homologías con genes de humano, estas homologías fueron seleccionadas basadas en un valor E máximo de 0,92, con una homología mínima de 19 nt; esta búsqueda es necesaria para el diseño de los shRNAs. Según nuestro conocimiento, éste es el primer trabajo de reporte de miRNAs en el virus del dengue. El paso siguiente será la comprobación experimental de esta predicción.

Palabras clave: microRNAs, miRNAs hairpins, dengue.

T6. CLONAJES DE GENES ESTRUCTURALES Y NO ESTRUCTURALES DEL VIRUS DENGUE

ALEXANDRA CUARTAS, LUIS C. BERROCAL, JOSÉ USME, JUAN F. ALZATE,
ALEXANDER SALAZAR, JUAN C. GALLEGO-GÓMEZ
Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET.
Línea de Investigación Biología Viral. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

RESUMEN

El dengue es la enfermedad arboviral más importante que afecta a los humanos en países tropicales, además la virosis más frecuente y endémica en Colombia. A pesar de los últimos avances en biología celular y molecular de la infección viral, algunos aspectos relacionados con la morfogénesis del virus son desconocidos; i. Origen de las factorías virales; ii. Pasos que sigue la formación de la partícula viral completa; iii. Papel que cumple cada una de las proteínas estructurales y no estructurales en el ciclo completo del virus. Para estudiar la relación de la proteína de la cápside con el citoesqueleto celular y asignar funciones a las proteínas de envoltura, NS3, NS4 y NS5 en la distribución subcelular y en los pasos del ciclo de vida del virus dengue, se realizó clonación de cada uno de los genes que codifican para estas proteínas. Los genes virales se amplificaron por RT-PCR, usando *primers* con secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción, que permitieron la clonación en diferentes vectores de expresión fusionados a proteínas fluorescentes. Los plásmidos pGFP-NS2 y pCORE-GFP con el gen para la proteína capsida clonada, fueron donados por el Dr. Shao-Hung Wang (Taipei, Taiwan). Los plásmidos fueron lipotransfectados en diferentes líneas celulares, luego se fijaron en condiciones de alta preservación para elementos celulares organelos y citoesqueleto, para seguir la distribución subcelular de las proteínas virales usando microscopio de fluorescencia. La identificación de las funciones de cada una de las proteínas virales, es importante porque al entender estos complejos procesos de infección viral, éstos pueden servir como dianas terapéuticas, en el desarrollo de vacunas o en terapia génica. Comercialmente no se dispone de anticuerpos específicos contra las diferentes proteínas virales, por tanto su clonación se puede aprovechar para la producción de anticuerpos policlonales, indispensables en diagnóstico clínico e investigación.

Palabras clave: dengue, genes estructurales, genes no estructurales, clonajes moleculares.

T7. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DENGUE EN COLOMBIA 1977-2004 Y VIGILANCIA DE GENOTIPOS CIRCULANTES 2005-2006

JUAN C. GALLEGO-GÓMEZ¹, GLORIA REY², JOSÉ USME², JAIRO MÉNDEZ³,
ALBA GÓMEZ¹, CRISTINA DOMINGO⁴, ANTONIO MATANZO⁴

¹ Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

² Grupo de Inmunovirología-Biogénesis, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

³ Laboratorio de Virología, Instituto Nacional de Salud. Bogotá, Colombia.

⁴ Laboratorio de Arbovirus y Enfermedades Viricas Importadas, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda, España.

RESUMEN

El virus dengue (DENV) es actualmente un serio problema de salud en países tropicales en desarrollo, donde diversos factores favorecen la proliferación del mosquito vector. Ante la falta de vacunas y tratamiento específico, se requieren nuevas estrategias para el diagnóstico y control de la enfermedad. El diagnóstico molecular del DENV no solo permite la detección y tipificación, sino también la genotipificación cuando se buscan regiones informativas, útiles en estudios de epidemiología molecular. El primer objetivo de esta investigación es implementar una RT-PCR y PCR-Anidada diseñadas para amplificar la región E/NS1 del genoma viral, teniendo

do en cuenta la gran variabilidad del virus, una técnica altamente sensible para la detección y genotipificación del DENV directamente sobre muestras clínicas. En segundo lugar con los datos obtenidos y mediante análisis filogenético, se buscará resolver el patrón filogeográfico del DENV a partir de cepas históricas y circulantes en Colombia. La implementación de la RT-PCR y PCR-Anidada con diluciones de RNA viral, mostraron alta sensibilidad y especificidad, muy importantes, cuando se trabajan con muestras clínicas -algunas con bajo título viral- y para evitar falsos negativos. Se logró además secuenciar el fragmento E/NS1 de 201 cepas del DENV, cuyo análisis preliminar muestra cocirculación de diferentes genotipos de un mismo serotipo (DENV-2 y DENV-3). Para DENV-1 y DENV-2, la evolución *in situ*, con intensa cladogénesis lleva a la formación de nuevos linajes, distantes de las demás cepas. Por la magnitud de los hallazgos, se procedió a secuenciar el gen de la envoltura (E) completo, para algunas cepas con posiciones claves en los cladogramas. El proyecto ha sido financiado por Programa Nacional de Ciencia y Tecnología de la Salud, Colciencias, y parcialmente con la infraestructura física y científica del CNM-ISCIII.

Palabras clave: virus dengue, epidemiología molecular, genotipificación, filogeografía.

T8. CITOQUINAS Y DENGUE HEMORRÁGICO EN NIÑOS DE NEIVA, COLOMBIA

MARISOL GARZON^{1,2}, JAIRO RODRÍGUEZ^{1,2}, ROCÍO VEGA^{1,2}, DOLLY CASTRO^{1,2},
DORIS SALGADO^{1,2}

¹ Grupo de Parasitología y Medicina Tropical, Universidad Surcolombiana.
Neiva, Colombia.

² Hospital Universitario Hernando Moncaleano de Neiva, Colombia.

RESUMEN

Este estudio busca establecer correlación entre niveles séricos de citoquinas y severidad del dengue hemorrágico en pacientes pediátricos en Neiva, Colombia. El presente es un estudio prospectivo realizado en el servicio de pediatría del Hospital Universitario de Neiva (año 2005), que incluyó 30 pacientes con criterios de la OMS para fiebre dengue hemorrágico (FDH) y se clasificaron de acuerdo a la severidad en Grupo 1 para FDH grado I- II y Grupo 2 para FDH grado III - IV. Se midieron los niveles séricos de TNF α , IL 6, IL 10, IL 4 e IFN γ el día seis de enfermedad mediante técnica Elisa, con controles de pacientes sanos. Se realizó un análisis univariado y bivariado aplicando el programa SPSS y prueba Kruskal Wallis para correlación no paramétrica. Del total de 30 pacientes, 9 fueron clasificados en el grupo 1 y 21 en el grupo 2. El promedio de edad fue de 80 y 48 meses respectivamente. Los síntomas como cefalea, vómito y sangrado fueron más severos en el grupo 2, asociados a un mayor tamaño hepático e índice de efusión pleural. La medición de citoquinas séricas mostró diferencia estadística para IL 6 entre controles (5,2 pg/mL), grupo 1 (485 pg/mL; p=0,002) y grupo 2 (252 pg/mL; p=0,001); para TNF α , entre controles (85 pg/mL), grupo 1 (696,7 pg/mL); (p=0,021) y grupo 2 (394,7 pg/mL; p=0,0001) y para IFN γ , entre controles (12,3 pg/mL) y grupo 2 (51,5 pg/mL; p=0,019). No se encontraron diferencias en IL 4 e IL 10. Los niveles de IL 6, TNF α e IFN γ se elevan en pacientes con dengue hemorrágico sin embargo, se sugiere una correlación importante del IFN γ con formas severas de choque.

Palabras clave: dengue hemorrágico, choque, citoquinas.

T9. EVALUACIÓN DE LA CITOQUINAS HUMANAS IL-10 E INF GAMMA FRENTE A LA INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE EN PACIENTES DEL MUNICIPIO DE ARMENIA, QUINDÍO, COLOMBIA

MERCEDES GONZÁLEZ DE SCHROEDER, JHON C. CASTAÑO, MARÍA A. GIRALDO,
LEONARDO P. SANABRIA

Grupo de inmunología molecular (GYMOL). Universidad del Quindío.
Armenia, Colombia.

RESUMEN

Se realizó un estudio de tipo descriptivo prospectivo en la población de la ciudad de Armenia, Colombia, que presente sintomatología y con criterios diagnósticos para dengue, entre enero del 2005 a abril del 2006. Se excluyeron todos aquellos pacientes que presentaron fiebre consecuente de fuente de infección focalizada (otitis media, neumonía) coriza, enfermedades crónicas. Se estudiaron 40 a quienes se les hizo cuadro hemático (hemoglobina, hematocrito, Leucocitos, plaquetas) y pruebas serológicas tipo ELISA IgM específicas para dengue mediante la técnica de (TECNOSUMA). RT-PCR para virus dengue usando *primers* descritos por la literatura, ELISA para INF- γ e IL-10 siguiendo las indicaciones del fabricante. Los resultados de cada uno de estas pruebas se correlacionaron con los valores del hematocrito. El ELISA para IgM antidengue fue positiva

en el 84,1% de los pacientes, la prueba de RT-PCR para virus dengue fue positiva en el 77,3% los valores de leucocitos fueron anormales en 69,1% bajos en el 54,8% y altos en un 14,3%) el 9,5% presentaron valores de hemoglobina y hematocrito anormales, el recuento de plaquetas fue anormal en el 59,5; los valores de IL10 oscilaron entre 0-280 pg/mL considerando las instrucciones para interpretación del *kit* reportamos el 57,5% como positivos, así mismo los valores de INF- γ oscilaron entre 0-64 pg/mL considerando las instrucciones para interpretación del *kit* reportamos el 47,5% como positivos. Al valorar la evolución de los valores de estas dos citoquinas en los primeros cinco días de inicio del cuadro clínico observamos valores de INF- γ máximos en el segundo día y de IL-10 en el día cinco. Cuando se correlacionaron los valores de las citoquinas determinadas con los resultados del cuadro hemático se observó correlación de la leucopenia con valores altos de IL-10 y bajos de INF- γ , así mismo, los valores altos de INF- γ se encontraron en pacientes con conteo de leucocitos normales. La plaquetopenia se presentó en todos los pacientes con valores altos de estas dos citoquinas, mientras que los valores bajos de hemoglobina y hematocrito bajos se presentaron cuando los valores de INF- γ e IL-10. Estos hallazgos a nivel hematológico son similares a los reportados en otros estudios, pero como novedad reportamos la asociación de las alteraciones sanguíneas con INF- γ e IL-10.

Palabras clave: dengue, IL-10, INF- γ .

T10. ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN POBLACIONES HUMANAS DE LOS DEPARTAMENTOS DE CÓRDOBA Y SUCRE, COLOMBIA

MARCO GONZÁLEZ¹, SALIM MATTAR¹, SUSAN WONG², JOSÉ PEÑA¹,
JAIME ÁLVAREZ¹

¹ Universidad de Córdoba, Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico.
Facultad de MVZ. Montería, Colombia.

² Departamento de Salud Pública. Nueva York, Wadsworth Center, USA.

RESUMEN

El virus del oeste del Nilo (VON) es mantenido en la naturaleza en un ciclo enzootico ave-mosquito-ave. En humanos las infecciones por VON se presentan como enfermedad febril autolimitada. La importancia actual del VON es su impacto en la salud pública en sur América y Colombia reúne todas las condiciones que favorecen su entrada y desarrollo. Existe información sobre detección de anticuerpos en caballos en la costa caribe colombiana, por lo que la detección de la infección en humanos es importante. El objetivo consistió en determinar la presencia de anticuerpos contra VON en poblaciones humanas rurales del caribe. 500 sueros humanos fueron analizados por ELISA IgM para VON para lo cual se utilizó el antígeno E proteico de envoltura; los sueros positivos fueron confirmados por test el de Reducción-Neutralización en Placa (PRNT) para flavivirus. Solo una muestra presentó anticuerpos de la clase IgM para VON por ELISA. En el ensayo de neutralización este suero solo presentó títulos para dengue en 320, y fue negativo para VON y virus encefalitis de San Luis (>10). Los resultados del ensayo de neutralización fueron negativos para el VON, a pesar que anticuerpos IgM pudieron ser detectados por ELISA. Es probable que exposiciones previas al virus del dengue, pueden modular la respuesta inmune, de modo que si el VON es adquirido, estos incrementarían los niveles de anticuerpos neutralizantes contra el virus dengue, teniendo en cuenta el que los anticuerpos heterólogos podrían generar reacciones cruzadas en los ensayos serológicos. Estudios previos en Colombia han demostrado la dificultad del serodiagnóstico del VON en países endémicos con flavivirus.

Palabras clave: virus del oeste del Nilo, seroprevalencia, humanos.

T11. ¿ES LA PRUEBA DE NEUTRALIZACIÓN ESPECÍFICA PARA LOS FLAVIVIRUS?

NATALIA HOUGHTON TRIVIÑO¹, DIANA MONTAÑA¹, JAIME E. CASTELLANOS^{1,2}

¹ Instituto de Virología, Universidad El Bosque. Bogotá, Colombia.

² Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

RESUMEN

El dengue y la fiebre amarilla son problemas importantes de salud pública en el mundo. La realización de programas de vigilancia apropiados para iniciar campañas de acción contra las epidemias requiere de ensayos diagnósticos rápidos y específicos. La prueba serológica considerada de mayor especificidad es la de neutralización, pero en la mayoría de países son preferidos los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) para detección de anticuerpos IgM e IgG contra DEN y VFA por rapidez y economía. Los flavivirus comparten epítopes antigénicos que inducen una respuesta de anticuerpos de reactividad cruzada en el suero de pacientes que com-

plican el diagnóstico diferencial durante las infecciones secundarias por diferentes flavivirus especialmente en regiones donde más de una especie circula. Basados en esto, nos propusimos evaluar la complejidad del diagnóstico serológico diferencial entre el dengue y fiebre amarilla, usando un ensayo de ELISA comercial para dengue y un ensayo de neutralización para fiebre amarilla en pacientes con dengue y fiebre amarilla y voluntarios sanos vacunados con el virus de la fiebre amarilla. Las pruebas de ELISA para detección de anticuerpos IgM contra DEN presentaron reactividad cruzada mayor al 42% en pacientes con fiebre amarilla e individuos sanos después de la vacunación con fiebre amarilla. Adicionalmente, el 94% de los pacientes con dengue presentaron anticuerpos neutralizantes para fiebre amarilla. Dado los altos niveles de reactividad cruzada encontrados en ambos ensayos, se plantea un gran desafío para el diagnóstico serológico del dengue y fiebre amarilla en regiones donde estos co-circulan puesto que ni siquiera las pruebas mas específicas dan solución al problema de reactividad cruzada. Además, es necesario el diseño de nuevas estrategias experimentales que permitan un diagnóstico específico de los flavivirus.

Palabras clave: reactividad cruzada, dengue, fiebre amarilla, ensayo de ELISA, ensayo de neutralización.

T12. GENOTIPIFICACIÓN DE CEPAS COLOMBIANAS DEL VIRUS DENGUE TIPO 3

JAIRO A. MÉNDEZ¹, JOSÉ USME², GLORIA J. REY¹, JUAN C. GALLEGÓ-GÓMEZ²,
CRISTINA DOMINGO³, ANTONIO TENORIO³

¹ Grupo de Virología, laboratorio de Arbovirus, Instituto Nacional de Salud.
Bogotá, Colombia.

² Grupo PECET, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

³ Laboratorio de Arbovirus, Instituto de Salud Carlos III. Madrid, España.

RESUMEN

Con el fin de caracterizar genotípicamente cepas del virus dengue tipo 3 que han circulado en Colombia, se tomaron 34 virus tipificados como dengue tipo 3 y conservados en el banco de cepas del laboratorio de virología del Instituto Nacional de Salud, aislados en diferentes departamentos y durante diferentes años. Las muestras fueron tratadas con *buffer* AVL y el ARN viral fue extraído con el estuche QIAamp (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante; el ARN obtenido fue sometido a reacción de Transcripción Reversa seguida de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) en un solo paso donde se utilizaron iniciadores EPIDEMOL y TRISTED específicos para el virus dengue, previamente reportados por el Instituto de Salud Carlos III de España. El producto amplificado fue purificado utilizando el estuche QIAquick PCR Purification (QIAGEN) siguiendo las indicaciones; los fragmentos purificados fueron secuenciados con el método automático de ABI Prism 310 (*Applied Biosystem*) y las secuencias obtenidas fueron alineadas con el programa CLUSTAL X y luego analizadas con el paquete MEGA donde además se generaron árboles filogenéticos (algoritmo *neighbour-joining*) que posteriormente se visualizaron con el mismo programa. En los árboles filogenéticos generados se observa que los virus que han circulado en Colombia corresponden al genotipo americano que más recientemente ha circulado, pero aparece un segundo genotipo que se relaciona estrechamente con cepas del Sureste Asiático e islas del Pacífico; podemos concluir que si bien el virus dengue tipo 3 circuló durante un corto periodo de tiempo durante la década de los 70, después de un largo periodo de silencio epidemiológico fue detectado nuevamente durante el año 2002 y desde entonces ha circulado regularmente; sin embargo, según los resultados obtenidos podemos inferir, que los virus aislados recientemente corresponden a la introducción de nuevos genotipos y no a la reemergencia de las cepas autóctonas circulantes años atrás.

Palabras clave: genotipificación, dengue tipo 3, RT-PCR.

T13. LA SOBRE-EXPRESIÓN DE TNF α EN CÉLULAS NEURONALES INFECTADAS CON VIRUS DENGUE 2 SE CORRELACIONA CON UN INCREMENTO EN LA APOPTOSIS

JOSÉ I. NEISSA^{1,2}, JAIME E. CASTELLANOS^{1,3}

¹ Instituto de Virología, Universidad El Bosque. Bogotá, Colombia.

² Facultad de Medicina, Fundación Universitaria San Martín. Bogotá, Colombia.

³ Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

RESUMEN

La infección por virus dengue puede producir algunas manifestaciones neurológicas llegando a comprometer severamente al paciente. Los mecanismos involucrados en el compromiso del sistema nervioso central son poco conocidos. Dado que TNF α es una citoquina que se ha involucrado en la producción de apoptosis du-

rante la infección por dengue, valoramos la expresión de mensajeros de TNF α en células fenotípicamente neuronales SH-SY5Y, después de evaluarse su susceptibilidad y permisividad al virus dengue tipo 2 (DENV2). Por primera vez, se corroboró el tropismo neuronal de un virus usando la técnica de plaqueo indirecto. Nuestros resultados de PCR en tiempo real, demostraron un incremento de mensajeros de TNF α de hasta 24 veces que se correlaciona con una disminución en la viabilidad celular a las 72 horas post infección determinada por MTT y un incremento en el número de células TUNEL positivas dependiente de la multiplicidad de infección (MOI) utilizada siendo de hasta 25 veces con una MOI de 1. Esta correlación sugiere que TNF α puede jugar un papel importante en la neuropatogénesis por virus dengue.

Palabras clave: dengue, neuropatogenia, neuroblastoma, TNF α .

T14. LINFOCITOS T CD⁸⁺ DE MEMORIA EFECTORA EN SANGRE PERIFÉRICA SE CORRELACIONAN CON LA FIEBRE HEMORRÁGICA POR DENGUE

BEATRIZ PARRA¹, GERARDO A. LIBREROS¹, EDWIN PARDO¹, GRACIELA RENGIFO¹, JUAN F ARIAS¹, NATALIA BASTO¹, ANILZA BONELO¹, FABIÁN MÉNDEZ²

¹ Grupo VIREM, Escuela de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle. Cali, Colombia.

² Grupo GESP, Escuela de Salud Pública, Facultad de Salud, Universidad del Valle. Cali, Colombia.

RESUMEN

La fiebre hemorrágica por dengue (FHD), es una enfermedad severa producida por la infección con el virus dengue (VD) la cual se considera una patología mediada por linfocitos T, especialmente LTCD⁸⁺ de memoria generados después de una infección primaria con el VD que reaccionan cruzadamente en infecciones secundarias. Los LTCD⁸⁺ de memoria se han dividido en tres subpoblaciones de acuerdo a la expresión de las moléculas CCR⁷, CD⁴5RA o CD⁴5RO. Las subpoblaciones de memoria efectora (CD⁸⁺TEM) son CCR⁷- pueden proliferar rápidamente y secretar citoquinas (CD⁴5RA⁺) o mediar citotoxicidad (CD⁴5RA⁻). Los LT de memoria central (CD⁸⁺TCM) son CCR⁷+ pierden las funciones efectoras inmediatas, migran a los órganos linfoides secundarios y pueden generar CD⁸⁺TEM después del reto con el antígeno. En este estudio, se determinaron las frecuencias de las subpoblaciones de LTCD⁸⁺ de memoria en mononucleares de sangre periférica durante y después de la infección por el virus dengue en 58 niños y adultos jóvenes. La infección se confirmó por aislamiento viral o RT-PCR y/o IgM en muestras pareadas. La severidad de la enfermedad se clasificó de acuerdo a los criterios de la OMS. Las células fueron teñidas con diferentes anticuerpos monoclonales y analizadas por citometría de flujo para determinar su fenotipo y secreción de IFN- γ . Se encontró una alta frecuencia de LTCD⁸⁺ de memoria efectora CCR⁷-CD⁴5RA⁺ durante la fase aguda (60% vs. 46%; p=0,02) y de recuperación (62% vs. 46%; p=0,02) de los pacientes con FHD en comparación con dengue clásico y una prolongada presencia de linfocitos T secretando IFN- γ . Consistentemente con el incremento en la activación de los LT durante la FHD, la replicación viral fue inhibida más rápidamente en estos pacientes. Estos resultados apoyan el papel de los LTCD⁸⁺ de memoria en la patogénesis de la FHD y la presencia de las subpoblaciones podría permitir diferenciar FHD de dengue clásico.

Palabras clave: linfocitos T CD⁸⁺, IFN- γ , dengue clásico, fiebre hemorrágica por dengue.

T15. EL GENOTIPO DE OLIGOADENILATO SINTETASA 1B NO ESTÁ RELACIONADO CON SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE EN MACRÓFAGOS DE DIFERENTES ESPECIES DE ROEDORES

JEANETTE PRADA, JAIME E. CASTELLANOS, VERÓNICA RINCÓN
Instituto de Virología, Universidad El Bosque. Bogotá, Colombia.

RESUMEN

El dengue es un síndrome febril caracterizado por un amplio rango de signos y síntomas. En humanos no existen datos que relacionen la severidad de la infección por virus dengue (DENV) con un gen específico; sin embargo, en ratones se mapeó un locus asociado con resistencia a virus *West Nile* en el cromosoma 5 de ratón y por estudios genómicos se identificó el gen oligoadenilato sintetasa 1b (Oas1b). El objetivo de este trabajo fue evaluar la susceptibilidad de macrófagos de roedores a la infección por virus dengue y correlacionar esta susceptibilidad con el genotipo de Oas1b. Para esto, se extrajeron macrófagos de ratones BALB/c, NIH, ICR y de rata, hámster y cobayo. Estas células fueron infectadas con virus dengue. Para cuantificar RNA viral se usó PCR en tiempo real a partir de RNA obtenido de sobrenadantes y de monocapas. Se hizo inmu-

nocitoquímica para detectar antígeno viral y TUNEL para detectar degradación del DNA. De cada animal estudiado se extrajo DNA genómico para secuenciar un fragmento de Oas1b. La cuantificación del RNA viral estableció que los macrófagos BALB/c producen mayor cantidad de virus que los macrófagos de los demás animales estudiados. La inmunocitoquímica confirmó que un mayor porcentaje de macrófagos BALB/c son positivos para antígeno viral. Los macrófagos BALB/c infectados con DENV (MOI:1) tienen una mayor proporción de células TUNEL positivas, comparados con células menos susceptibles. El análisis de Oas1b estableció que todos los roedores analizados tienen la mutación C→T820, correlacionada con alta susceptibilidad a la infección por flavivirus. Sin embargo los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que esta mutación no está relacionada con las diferencias en susceptibilidad a virus dengue en los roedores analizados.

Palabras clave: dengue, oligoadenilato sintetasa 1b, resistencia a flavivirus, apoptosis.

T16. GEOREFERENCIA DE POSIBLES ÁREAS ENDÉMICAS PARA HANTAVIRUS EN EL DEPARTAMENTO DE CÓRDOBA, COLOMBIA: INFORME PRELIMINAR

HENRY PUERTA¹, SALIM MATTAR¹, CÉSAR CANTILLO¹, HARISH PADNAMABHA², JOSÉ PEÑA¹, JAMES MILLS³, JORGE SALAZAR-BRAVO⁴

¹ Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad de Córdoba. Montería, Colombia.

² Organización Panamericana de la Salud, Instituto Nacional de Salud. Bogotá, Colombia.

³ Special Pathogens Branch, Viral and Rickettsial Diseases, Centers for Diseases Control and Prevention. Atlanta, USA.

⁴ Texas Tech University, Dept of Biological Sciences. USA.

RESUMEN

El síndrome cardiopulmonar por hantavirus (SCPH) es una zoonosis transmitida por roedores de la subfamilia *Sigmodontinae*. Hasta la fecha, en sur América se han presentado alrededor de 1.500 casos con una mortalidad aproximada del 40%. En Colombia, se realizó una serovigilancia en humanos y roedores que evidencia la circulación de hantavirus. Nuestro objetivo fue identificar una posible área endémica de hantavirus en el departamento de Córdoba, Colombia. Se tomaron 88 sueros humanos y 336 sueros de roedores capturados con trampas tipo *Sherman* los cuales fueron analizados por ELISA IgG. Las coordenadas de cada sitio de toma de muestra en humanos y captura de roedores fueron georeferenciadas mediante un sistema de posicionamiento geográfico (GPS). 12 muestras humanas (seroprevalencia: 13,5%) y 7 roedores (seroprevalencia del 2,1%) fueron positivos por ELISA. Un área endémica de aproximadamente 7964,4 km² fue identificada entre los 10° 9' y 07° 22' de latitud norte, y los 74° 32' y 76° 30' de longitud oeste, según datos de distribución de humanos y roedores seropositivos, y huéspedes competentes para hantavirus capturados. La extensión del área geográfica en la cual el huésped infectado puede ser hallado, podría indicar el área en la cual la enfermedad humana llegaría a ser endémica. La identificación de un área endémica de hantavirus en una región del norte de Colombia, no ratifica la inminente aparición de un posible brote de SCPH en la región; sin embargo, confirma que al menos un hantavirus podría llegar a ser endémico en esta zona. Distintas medidas de prevención y control de futuros brotes mediante la educación pública y el control de reservorios, deberían ser dirigidas completamente hacia zonas ya identificadas como potencialmente endémicas.

Palabras clave: hantavirus, georeferencia, endémico.

T17. NIVELES SÉRICOS DE IL-6, TNF α E IFN γ EN GESTANTES Y NIÑOS MENORES DE UN AÑO CON Y SIN DENGUE

BERTA N. RESTREPO¹, DIANA M. ISAZA¹, CLARA L. SALAZAR¹, RUTH RAMÍREZ¹, MARTA OSPINA², LUIS G. ÁLVAREZ³

¹ Instituto Colombiano de Medicina Tropical. Medellín, Colombia.

² Dirección Seccional de Salud de Antioquia. Medellín, Colombia.

³ Instituto de Ciencias de la Salud – CES. Medellín, Colombia.

RESUMEN

Se ha considerado que las citoquinas juegan un importante papel en la patogénesis de la infección por dengue. El presente estudio tuvo como objetivo, comparar los niveles de las citoquinas: IL-6, TNF α e IFN γ en 39

gestantes y 27 menores de un año con dengue versus 14 gestantes y 14 menores de un año sin dengue. La medición de las citoquinas se hizo mediante estuches comerciales (Quantikine® y Quantikine® HS-High Sensitivity (R&D Systems (Minneapolis, MN))), en una muestra de suero obtenida en los primeros cinco días del inicio de los síntomas. En las gestantes y en los niños el 33,3% tenían dengue hemorrágico (DH). Se encontró que los niveles de IL-6, TNF α e IFN γ , fueron más elevados en gestantes y niños con dengue que sin dengue, siendo estadísticamente significativa para IFN γ , ($p=0,01$) en gestantes y para IL-6, e IFN γ , en los niños ($p<0,05$). Según forma clínica se encontraron mayores niveles de IL-6 e IFN γ , en los niños con DC, mientras que los niveles de TNF α fueron mayores en los pacientes con dengue hemorrágico. Diferencias que no fueron estadísticamente significativas. Se detectaron niveles más elevados de IL-6, TNF α e IFN γ , en gestantes con DH con respecto a las gestantes con DC ($p<0,05$). Los niveles de IL-6 y TNF α fueron más elevados en los niños con infección secundaria, mientras que los niveles de IFN γ , fueron más elevados en los pacientes con infección primaria. En las gestantes los niveles de estas citoquinas fueron más elevados en los casos de infección secundaria. Diferencias que no fueron estadísticamente significativas. Dos niños fallecieron (7,4%) y una gestante (2,6%) a causa del dengue. Estos resultados sugieren que estas citoquinas están asociadas a la presencia de dengue independiente de la forma clínica.

Palabras clave: citoquinas, dengue, gestantes, niños.

T18. LA INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE 2 DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE GAP-43 Y SINAPTOFISINA EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA DIFERENCIADAS *in vitro* CON ÁCIDO RETINOICO

VERÓNICA RINCÓN, DIANA ALVEAR, OSCAR SOLANO, JAIME E. CASTELLANOS
Instituto de Virología. Universidad El Bosque. Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Existe poca evidencia directa acerca de la susceptibilidad *in vivo* de las células neuronales humanas a la infección con el virus dengue (DENV), aunque se conoce que el virus es capaz de causar una infección productiva *in vitro* en algunas líneas celulares de neuroblastoma murinas y humanas. En este estudio se determinó el papel del fenotipo neuronal en la infección en células de neuroblastoma SH-SY5Y indiferenciadas y otras inducidas a diferenciación con ácido retinoico (AR). Posteriormente, se evaluó la susceptibilidad a la infección al serotipo 2 de DENV midiendo la cantidad de antígeno viral producido y el efecto en la viabilidad celular por el ensayo de MTT-Formazán. Además, se cuantificó la expresión por inmunocitoquímica y por una técnica de Cell-ELISA fluorométrica de dos marcadores neuronales, la proteína asociada al crecimiento de 43 kDa (GAP-43, *Growth Associated Protein*) y sinaptofisina, las cuales participan en dinámicas específicas neuronales como la plasticidad, regeneración axonal y exocitosis de vesículas de neurotransmisores. Se encontró que las células diferenciadas con AR son más susceptibles a la infección, ya que se detectó tres veces más cantidad de antígeno viral que en las células indiferenciadas. Al tercer día post-infección se evidenció una significativa disminución en la viabilidad en ambos tipos celulares, siendo menor en las células diferenciadas (21,5% vs. 40,3%, $p<0,05$). A su vez, la infección con el DENV-2 provocó una disminución en los niveles de expresión de GAP-43 y sinaptofisina en las células SH-SY5Y diferenciadas, permitiendo sugerir una correlación entre la infección viral, la función neuronal y la neuropatología durante las formas severas de dengue. Por otro lado, la infección en las células indiferenciadas aumentó la expresión de ambos marcadores indicando que la infección activa señales intracelulares que provocan la diferenciación en neuronas inmaduras.

Palabras clave: células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, ácido retinóico, proteína asociada a crecimiento de 43 kDa (GAP-43), sinaptofisina.

T19. ROL DE LOS MICROTÚBULOS DURANTE LA INFECCIÓN CON EL VIRUS DENGUE EN CULTIVOS CELULARES

ANDREA I. TRUJILLO, ALBA M. GÓMEZ, DIANA C. QUINTERO,
JUAN C. GALLEGÓ-GÓMEZ
Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET.
Línea de Investigación Biología Viral. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

RESUMEN

El dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos de mayor importancia en humanos. Existen estudios epidemiológicos y moleculares del DENV en Colombia, sin embargo faltan estudios básicos sobre la

interacción virus-célula hospedera, cuyo conocimiento es imprescindible para explicar la patogénesis de la infección por DENV y el diseño de estrategias terapéuticas y preventivas. Los virus usan elementos del citoesqueleto para entrar, transportarse, replicarse y liberar los viriones maduros. Una forma de aproximarnos a la biología celular de la infección del virus dengue, es estudiando los componentes del citoesqueleto (microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos de actina), cuyos detalles sobre su participación en los distintos pasos del ciclo vital del DENV son aún desconocidos. Dentro de la célula las moléculas de gran tamaño (500 KDa o 50 nm) no pueden moverse libremente, es por esto que para transportarse intracelularmente, los virus -desnudos o empaquetados en vesículas- usan el citoesqueleto, en trayectos largos a través microtúbulos y cortos mediante actina. Con varios virus animales está demostrado que los microtúbulos participan en varios procesos del ciclo vital (transporte intracelular hasta factorías virales, ensamblaje y salida). Existen algunos reportes de microtúbulos y virus de la familia *Flaviviridae*, sin embargo para el DENV no existe ningún estudio, en cuanto al papel de los microtúbulos y las proteínas motoras durante la infección. Para determinar si el DENV usa microtúbulos durante la infección, líneas celulares (Vero y BHK-21), fueron tratadas con un agente despolimerizador de microtúbulos (Nocodazol) previamente a la infección con DENV. Las células fueron procesadas por inmunofluorescencia para detección de DENV y marcaje de tubulina. Los resultados demuestran que posiblemente existe una interacción entre el DENV y el citoesqueleto de microtúbulos, y que probablemente, las partículas virales necesitan de microtúbulos estables para su transporte en los diferentes pasos de su ciclo vital.

Palabras clave: microtúbulos, dengue, nocodazol.

T20. EVOLUCIÓN EXPERIMENTAL DEL VIRUS DENGUE

JOSÉ USME^{1,2}, ALBA M. GÓMEZ¹, JUAN C. GALLEGO-GÓMEZ¹

¹ Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

² Grupo de Inmunovirología-Biogénesis, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

RESUMEN

A pesar del gran desarrollo teórico en evolución molecular y de alguna aplicación en epidemiología molecular con diversos patógenos, solamente las metodologías para reconstrucción de árboles han sido exitosamente transferidas, por su utilidad en la vigilancia y distribución de genotipos. Muy pocos estudios buscan dar explicaciones desde el contexto evolutivo, probablemente por falta de información sobre el patrón evolutivo y filogeográfico de tales organismos. Actualmente es reconocida la importancia de estudios básicos que busquen la explicación biológica de tales patrones y variaciones, generándose la fundación de un nuevo campo a nivel científico, la evolución experimental. El virus dengue (DENV), por ser un virus RNA, presenta una alta tasa de mutación, tiempo de generación corto y tamaño de población grande, haciéndolo organismo idóneo para estudios de evolución experimental. El objetivo del estudio es realizar pases sucesivos a varias cepas del DENV, paralelamente en presencia y ausencia de anticuerpos neutralizantes, a fin de obtener mutantes de escape que puedan ser rastreadas al nivel molecular por mutaciones responsables de tales cambios. Adicionalmente, se busca evaluar las diferencias en la eficacia biológica (*fitness viral*) de las poblaciones virales obtenidas en el curso de los pases y por último, se realizarán pases alternos en células de vertebrado e invertebrado, semejando el ciclo de transmisión natural del DENV, para evaluar la restricción que es impuesta al virus, para poder replicarse en organismos filogenéticamente tan distantes. Se han realizado alrededor de 20 pases sin condiciones restrictivas. La secuenciación de un fragmento (306pb) de tres cepas de los pases cero y nueve, no mostró diferencia alguna a nivel nucleotídico, pero si hubo diferencias fenotípicas (en efecto citopático). Tales resultados de secuenciación no son contradictorios, pues el fragmento es muy pequeño y además no hubo una presión selectiva durante los pases.

Palabras clave: evolución experimental, potencial adaptativo, mutantes de escape, dengue.

T21. RESPUESTA DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES DEL VIRUS DE LA FIEBRE AMARILLA EN INDIVIDUOS VACUNADOS

SERGIO Y. GÓMEZ, HENRY B. AMOROCHO, RAQUEL E. OCAZONEZ
Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP).
Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.

RESUMEN

La vacunación con virus vivo atenuado es la forma más efectiva de inmunización contra la fiebre amarilla. Los títulos de anticuerpos neutralizantes $\geq 1:10$ se consideran protectores. El presente trabajo se propuso determinar el título de anticuerpos neutralizantes en relación con la edad y tiempo de vacunación, para lo cual se estudiaron 142 individuos de quienes se colectó suero previo consentimiento informado. En algunos el estado de vacunación se confirmó con la presentación del carnet y en los otros se consideró la información verbal junto con la residencia en Ocaña, Norte de Santander, Colombia (99% de cobertura). Se hicieron titulaciones de punto final usando la prueba de reducción de placa (PNRT). Los anticuerpos a títulos $\geq 1:10$ se detectaron en 87,5 % de los carnetizados ($n=32$) y 83,6 % de los otros ($n=110$). Títulos altos ($\geq 1:160$) fueron más frecuentes ($p<0,05$, χ^2) en individuos de 16-39 ($n=76$; 32,8%) ó 40 y más años ($n=26$; 34,6%) que en los de 0-15 años ($n=40$; 7,5 %). El tiempo promedio de vacunación fue 1,6; 2,2 y 1,8 años en el primero, segundo y tercer grupo, respectivamente. En carnetizados, títulos altos fueron más frecuentes en individuos con 0,5-1 año ($n=13$) de vacunación que en los de 1,5 - 8 años ($n=18$): 53,8 vs. 44,4 %. En 13% de los vacunados no se detectaron anticuerpos neutralizantes, la respuesta parece ser mayor en individuos con más de 15 años e independiente del tiempo de vacunación.

Palabras clave: vacuna, fiebre amarilla, flavivirus

T22. VIGILANCIA POR LABORATORIO DE LA FIEBRE AMARILLA EN CASOS CON SÍNDROME FEBRIL DEL MUNICIPIO DE OCAÑA, NORTE DE SANTANDER, COLOMBIA

SERGIO Y. GÓMEZ, RAQUEL E. OCAZONEZ
Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP).
Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.

El 60-70% de de los individuos infectados con el virus de la fiebre amarilla (VFA) no desarrollan síntomas o sufren un síndrome febril inespecífico. Estos casos generalmente no solicitan atención médica y cuando lo hace la infección no se presume considerando que la ictericia es el hallazgo en el que se sustenta la sospecha clínica. El objetivo de este trabajo fue investigar la frecuencia de infección por el virus de la fiebre amarilla en casos con síndrome febril inespecífico de una zona enzootica. Se seleccionaron 396 pacientes febriles atendidos en EPS del municipio de Ocaña, a quienes se les hizo seguimiento clínico y por laboratorio durante mínimo dos días consecutivos. De cada uno se colectó suero para aislar virus de la FA y en algunos investigar IgM y aislar virus dengue. En casos serológicamente positivos se determinó el título de anticuerpos neutralizantes (PRNT) y se hizo IgM anti-dengue. En ningún caso se aisló VFA y 307 (77,5%) manifestaron haber sido vacunados. IgM anti-FA se investigó en los 89 restantes por ELISA de captura usando como control negativo sueros no-inmunes a flavivirus o sueros de casos agudos de dengue. Con el primer ensayo resultaron siete positivos y con el segundo ninguno. En estos pacientes se investigó IgM anti-dengue y anticuerpos neutralizantes del VFA en suero agudo y todos resultaron positivos. El virus dengue se aisló de uno de ellos y cuatro de los negativos. En ninguno de los casos estudiados se detectó infección aguda por VFA. La reactividad cruzada con dengue obliga a investigar simultáneamente las dos enfermedades.

Palabras clave: fiebre amarilla, flavivirus.

T23. EFECTO DE SUERO INMUNE CONTRA DENGUE SOBRE LA INFECTIVIDAD DEL VIRUS DE LA FIEBRE AMARILLA

SERGIO Y. GÓMEZ, RAQUEL E. OCAZONEZ
Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP).
Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.

El virus de la fiebre amarilla (VFA) y el del dengue (VDEN) comparten epítopes inductores de anticuerpos que se ligan de forma cruzada. Los anticuerpos contra el segundo pueden neutralizar el primero y así disminuir su

capacidad infectiva. Se pretendió investigar la magnitud de inhibición de la infectividad del VFA por suero de individuos que sufrieron dengue. Se incluyeron cuatro grupos de sueros. I: con solo anticuerpos para VDEN (n=30). II: con solo anticuerpos del VFA (n=52). III: con anticuerpos para ambos virus (n=56). IV sin anticuerpos (n=6). Diluciones seriadas del suero reaccionaron con VFA (30 UFP) por dos horas a temperatura ambiente y la mezcla se adicionó a cultivos de células. Los resultados se expresaron como la dilución mayor del suero inmune que redujo el 50% de placas de infección (PNRT50 por análisis de probit) comparado con el suero no inmune. No se encontraron diferencias de los valores ($p>0,05$, *Mann Whitney U*) o el promedio (1:286,8 vs. 1:310,8, $p>0,05$, *Student*) del PNRT50 de los sueros con solo anticuerpos anti-VDEN versus sueros con solo antiVFA. Los valores y promedio (1:619,3) del PNRT50 de los sueros con ambos tipos de anticuerpos fueron mayores al compararlos con los otros ($p<0,05$, *Mann Whitney U*). Los valores mayores del PNRT50 de suero inmune al VDEN no siempre correspondieron con mayores títulos de anticuerpos. Los anticuerpos del VDEN pueden neutralizar *in vitro* VFA de manera similar a como lo hacen anticuerpos homólogos sugiriendo probable protección cruzada.

Palabras clave: anticuerpos, flavivirus, PNRT.

VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA

T24. LA EXPRESIÓN DE NF90/MRFP DISMINUYE LA EXPRESIÓN INTRACELULAR DE LA PROTEÍNA P24 EN CÉLULAS QUE EXPRESAN EL PLÁSMIDO PROVIRAL PHIV/DENV.GFP

JORGE E. FORERO, SILVIO URCUQUI-INCHIMA.

Grupo de Inmunovirología-Biogénesis. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

RESUMEN

Rev es una proteína viral fundamental en la replicación del genoma del VIH-1; es la responsable de exportar los ARNm virales semiprocados y sin procesar hacia el citoplasma, gracias a la interacción de Rev con la estructura RRE, presente en dichos transcritos. En el citoplasma, los ARNm son traducidos en las proteínas estructurales y no estructurales, necesarias para el ensamblaje de las nuevas partículas virales. Ensayos previos realizados en nuestro grupo mostraron que NF90 inhibe la expresión del gen reportero CAT, cuya expresión es dependiente de la actividad de exportación de Rev. Igualmente por inmunoprecipitación se mostró que NF90 interactúa con Rev; además, NF90 afecta la localización celular de Rev. También se ha descrito que NF90 induce la expresión de genes implicados en respuesta antiviral. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la sobre-expresión de NF90 en la replicación del VIH-1. Células 293T fueron cotransfectadas con una concentración constante de pHIV/Denv.GFP (expresa el genoma de VIH-1, pero presenta una delección en la secuencia que codifica para la proteína Env, produciendo partículas virales no infecciosas y en lugar de Nef, expresa GFP), con concentraciones crecientes de pNF90/mRFP, el cual expresa NF90 fusionada a la proteína monomérica roja fluorescente (mRFP). Como se esperaba, la evaluación por microscopía de fluorescencia, por citometría de flujo y por inmunodetección, muestran que los dos plásmidos se expresan eficientemente en las células 293T, y el nivel de expresión de pNF90/mRFP es proporcional a la concentración de ADN plasmídico usado por la fluorescencia. Los resultados de inmunodetección indican que NF90 afecta el nivel de expresión intracelular de p24 de VIH-1; la disminución de dicha proteína es dependiente del nivel de expresión de NF90. Sin embargo, al evaluar el contenido de p24 en los sobrenadantes de las células 293T, se encontró el nivel de expresión permaneció constante.

Palabras clave: VIH-1, replicación, antiviral, antígeno p24.

T25. DETECCIÓN DEL DNA VIRAL POR PCR EN EL DIAGNOSTICO DE LA INFECCIÓN NEONATAL DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA

JULIÁN GUEVARA, ELIZABETH CAICEDO, BEATRIZ PARRA

Grupo VIREM, Escuela de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle. Cali, Colombia.

RESUMEN

El diagnóstico de la infección VIH en niños es complicada debido a que las técnicas usadas en adultos se basan en pruebas serológicas que detectan anticuerpos IgG anti-VIH, que atraviesan libremente la barrera pla-

centaria y pueden persistir en los niños hasta los 15 meses de edad, por lo tanto su presencia en menores de dos años no es indicativo de la infección. El presente estudio optimizó la técnica de PCR para la detección de DNA proviral del VIH tipo 1, con el propósito de ser utilizada en el diagnóstico de VIH en neonatos. Mediante bioinformática se evaluó la homología de secuencias de los iniciadores candidatos entre los subtipos del VIH-1 (GenBank) y se optimizaron las condiciones de amplificación del DNA viral integrado en células de sangre periférica de individuos VIH-1 positivos. Se determinó el límite de detección del DNA proviral de acuerdo a la carga viral y número de LTCD⁺. Se logró detectar DNA proviral en muestras con cargas virales menores a 400 hasta más de 30.000 copias/mL determinadas con el método estándar de detección (*Kit Amplicor sensible Roche*) y en muestras con conteos de LTCD⁺ inferiores a 200 células/ml de sangre, a excepción de una muestra que resultó negativa, la cual tenía solo cinco células/mL. La PCR optimizada fue específica para el VIH dado que fue negativa para virus ADN persistentes e individuos VIH negativos. Se determinó así, la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo de la prueba. Posteriormente, evaluamos su utilidad en la detección de DNA proviral en un grupo de niños menores de cinco años nacidos de madres VIH positivas, provenientes de hospitales del Valle del Cauca, Colombia. La PCR optimizada surge como una alternativa para el diagnóstico de la infección por VIH-1, puesto que se pudo detectar ADN proviral en muestras donde la carga viral es indetectable.

Palabras clave: VIH, PCR-DNA, RT-PCR, transmisión vertical del VIH.

T26. VIGILANCIA CENTINELA DE RESISTENCIA A ANTIRETROVIRALES EN EL PROYECTO REDUCCIÓN DE LA TRANSMISIÓN VERTICAL MADRE-HIJO DEL VIH, COLOMBIA 2003-2005

GLORIA REY¹, ANDRÉS PÁEZ¹, MARTHA GONZÁLEZ¹, FRANKLYN PRIETO²,
RICARDO GARCÍA²

1. Grupo de Virología, Subdirección Red Nacional de Laboratorios, Instituto Nacional de Salud,

2. Proyecto Madre-Hijo ONUSIDA

A pesar de la introducción de la terapia antirretroviral (ARV), la epidemia mundial de infección por VIH continúa creciendo; para el año 2003 se estimaron 40 millones de personas infectadas con el VIH/Sida, de ellas, 40.072 vivían en Colombia. Una de las principales consecuencias del uso de la terapia ARV ha sido el desarrollo de resistencia, que se asocia con falla virológica e inmunológica, ésta puede detectarse por pruebas de genotipificación. El estuche de genotipificación Trugene HIV-1 (BAYER) y el sistema de secuenciación *Open Gene* son utilizados en la detección de mutaciones genómicas del VIH-1, en la proteasa y región 5' de la transcriptasa reversa, las cuales confieren resistencia a tipos específicos de drogas ARV, por lo que son utilizadas como una ayuda en el tratamiento y seguimiento de los pacientes VIH positivos. Realizar una vigilancia centinela de genotipos del VIH-1 en mujeres gestantes del Proyecto Madre-Hijo, Colombia 2003-2005 y determinar si existen cepas de VIH-1 resistentes al tratamiento antirretroviral (ARV). Se seleccionaron 56 muestras de plasmas de gestantes y neonatos captados en el Proyecto de Reducción de la Transmisión Vertical Madre-Hijo del VIH (Onusida), todos los pacientes sin tratamiento previo y carga viral mínima de 1.000 copias por mililitro. Para la determinación de resistencia se utilizó el estuche TRUGENE VIH-1 (BAYER), siguiendo la metodología descrita en el inserto. Brevemente, se emplearon las siguientes técnicas: a) Extracción de ARN a partir del plasma; b) Amplificación por RT-PCR de un fragmento de ADN complementario a la región de proteasa y retrotranscriptasa viral; c) Secuenciación automática del fragmento amplificado (reacción CLIP); d) Detección de mutaciones por comparación con la secuencia del genotipo salvaje; e) Análisis computarizado en el *software OpenGene*. De las 56 muestras procesadas (51 gestantes + 5 bebés) se logró la amplificación del genoma del VIH-1 en 46 muestras, 41 (89,1%) correspondían a gestantes y 5 (10,9%) a bebés de madres seropositivas. Las muestras procedían de 17 departamentos del país, la edad promedio de las gestantes fue de 24,5 años (mediana 25 años y rango 16-41 años), el promedio de la carga viral fue de 70.567 copias/mL (mediana 28.475, rango 3.259 a >500.000 copias/mL); todos los bebés eran menores de seis meses. Se encontró algún tipo de resistencia en 10 (21,7%) de las muestras amplificadas y procedentes de Antioquia, Bogotá, Caldas, Meta, Norte de Santander y Risaralda. Respecto al tipo de resistencia presentada en los casos se detectó lo siguiente: cinco casos con posible resistencia (PR) a atazanavir (inhibidor de la proteasa), un caso con PR a todos los inhibidores no-nucleosídicos de la transcriptasa reversa (nevirapina, delaviridina y efavirenz) y cuatro casos con resistencia (R) a inhibidores de la transcriptasa reversa (tres con R a lamivudina + PR a zalcitabina y uno con R a didanosina y zalcitabina). Uno de los diez casos correspondió a un bebé con resistencia a inhibidores de la transcriptasa reversa. Los hallazgos muestran que en Colombia existe transmisión horizontal de cepas resistentes a ARV y que el riesgo de transmisión vertical de cepas resistentes a los bebés es

evidente, por tanto, es cada vez más necesario realizar oportunamente las acciones que permiten disminuir la transmisión madre-hijo del VIH. Es recomendable continuar con estudios centinelas en éstas y otras poblaciones de riesgo con el fin de mejorar la evidencia de la transmisión de cepas resistentes y definir alternativas de tratamiento y seguimiento de pacientes en nuestro país seropositivos al VIH, además de aportar datos a la literatura nacional e internacional en la evidencia de resistencia del VIH-1 a ARV.

Palabras clave: antiretrovirales, resistencia, VIH, transmisión vertical.

T27. EL FACTOR NUCLEAR NF90, UNA PROTEÍNA CELULAR QUE INTERACTÚA CON ARN DE DOBLE CADENA, AFECTA LA FUNCIÓN DE EXPORTACIÓN DE REV DEL VIH-1

SILVIO URCUQUI-INCHIMA¹, MARÍA E. CASTAÑO¹, DANIÈLE HERNÁNDEZ²,
GEORGES ST. LAURENT III³, AJIT KUMAR³

¹ Grupo de Inmunovirología-Biogénesis, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

² Institut Jacques Monod, CNRS, University Paris VI and Paris VII. France.

³ Department of Biochemistry and Molecular Biology, The George Washington University. USA

RESUMEN

La proteína Rev del VIH-1 juega un papel fundamental en la replicación del genoma viral; es la responsable de la exportación de los transcritos semiprocesados y sin procesar desde el núcleo hacia el citoplasma. Para llevar a cabo su función, debe interactuar con una secuencia de ARN altamente estructurado, conocida como RRE, presente en dichos transcritos. Actualmente, muchos estudios están orientados a bloquear la función de Rev, como una estrategia para bloquear la replicación del virus. El factor nuclear NF90 (NF90), es una proteína que pertenece a una familia de proteínas que interactúan con ARN de doble cadena (dsARN). NF90 es un factor transcripcional, juega un papel fundamental en el desarrollo, traducción, edición del ARN, en estabilidad de ARNm y en respuesta antiviral. Teniendo en cuenta que la formación del complejo Rev-RRE, depende de interacciones proteína-proteína y proteína-ácidos nucleicos, nos interesamos en determinar si NF90 interfiere con la formación de dichos complejos. Utilizando como modelo el gen reportero CAT, mostramos que NF90 regula negativamente la función de exportación de Rev. Además nuestros resultados muestran que NF90 afecta la localización subcelular de Rev y este proceso es sensible al tratamiento con leptomizina B. Finalmente encontramos que NF90, directa o indirectamente esta implicada en la exportación de transcritos ligados a la estructura RRE, los cuales son exportados hacia el citoplasma, donde son traducidos en la respectiva proteína. En conclusión, nuestros resultados muestran que NF90 afecta la función de Rev, bien por una interacción proteína-proteína o afectando la afinidad de Rev por RRE.

Palabras clave: replicación, respuesta innata, transcripción, CRM1.

T28. EVALUACIÓN CUANTITATIVA Y FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS, CÉLULAS NKT CON TCR INVARIANTE Y CÉLULAS T REGULADORAS EN NIÑOS INFECTADOS CON EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH-1)

XIOMARA ÚSUGA¹, CARLOS J. MONTOYA¹, ALAN LANDAY², MARÍA T. RUGELES¹,

¹ Grupo Inmunovirología-Biogénesis. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

² Rush University. Chicago, USA.

RESUMEN

El estudio de la inmunidad innata durante la infección por el VIH-1 es un área de interés pues varios de sus componentes tienen actividad directa anti-VIH-1 y son susceptibles a esta infección. Sin embargo, la caracterización fenotípica y funcional de células de la inmunidad innata en los niños infectados por el VIH-1 apenas está siendo explorada, al igual que el papel de las células T reguladoras (CTr) en esta infección. El objetivo del presente trabajo fue determinar la frecuencia en sangre periférica y la respuesta funcional de las células dendríticas mieloides (CDm), CD plasmacitoides (CDp), linfocitos T con TCR invariante (iNKT) y CTr, en niños VIH-1+. Se evaluaron 13 niños VIH-1+ y 13 niños sanos; la frecuencia de las diferentes subpoblaciones celulares se determinó por citometría de flujo; esta técnica también se utilizó para evaluar la expresión de los marcadores funcionales GITR y CTLA-4 en las CTr. Para evaluar la respuesta funcional, las células mononucleares de sangre periférica fueron estimuladas con CpG ODN (agonista sintético del TLR9) o ácido lipoteicoico (agonista del TLR2), para determinar la producción de IFN- γ e IL-12 y la expresión de las moléculas CD80 y CD86 en las CD. Los niños VIH-1+ presentan una disminución significativa de CDp y células iNKT en comparación con los

controles. El marcador funcional CTLA-4 se encontró en mayor densidad en las CTr de niños VIH-1+. Adicionalmente, los niños VIH-1+ presentaron una disminución significativa en la producción de IFN- γ . Estos resultados indican que existen alteraciones en el sistema inmune innato y en las CTr de los niños infectados por VIH-1, lo que podría potenciar la inmunodeficiencia inducida por este virus y ayuda a explicar, al menos parcialmente, la evolución más agresiva y rápida de la infección por VIH-1 en la población pediátrica.

Palabras clave: células de la inmunidad innata, células T reguladoras, VIH-1.

T29. INFLUENCIA DEL MEDIO AMBIENTE INTRAUTERINO DE MADRES VIH-1 POSITIVAS EN LA FRECUENCIA Y FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN NEONATOS

PAULA A. VELILLA¹, CARLOS J. MONTOYA, MARÍA E. MORENO¹,
CLAUDIA RUGELES¹, ALVARO HOYOS, CLAIRE CHOUGNET², MARÍA T. RUGELES¹

1. Laboratorio de Inmunovirología, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

2. Division of Molecular Immunology, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, University of Cincinnati College of Medicine. USA.

RESUMEN

La inmadurez del sistema inmune es considerada la principal causa de morbilidad neonatal. Estudios recientes señalan que alteraciones en células presentadoras de antígeno, como las células dendríticas (CD), afectan la función de los linfocitos T (LT) neonatales. Adicionalmente, alteraciones en el fenotipo y función de los LT han sido observadas en niños no infectados nacidos de madres VIH-1+; no obstante, la evaluación de las CD en este grupo de neonatos no se había realizado. Este estudio determinó la frecuencia de las CD mieloides (CDm) y plasmacitoides (CDp) en neonatos nacidos de madres VIH-1 positivas y negativas, así como su expresión de las moléculas CD80, CD86 y B7-H1 (en condiciones basales y después de la estimulación con agonistas de los TLR) y la producción de IFN- α en respuesta al virus de influenza y al CpG ODN. Un grupo de adultos sanos se incluyó como control. Los neonatos no infectados nacidos de madres VIH-1+ presentaron aumento en el número de CDm, con niveles similares al grupo control, mientras que neonatos nacidos de madres VIH-1 negativas tuvieron una disminución significativa en el porcentaje de CDm y CDp comparado con el grupo control. La expresión basal de B7-H1 en CDp estaba disminuida en ambos grupos de neonatos comparada con el control. Las CDm de neonatos nacidos de madres VIH-1+ y del grupo control regularon positivamente las moléculas CD80 y CD86 después de la estimulación con LPS, mientras que la producción de IFN- α , después de la estimulación con CpG ODN, fue similar en los tres grupos. Estos resultados evidencian que la exposición intrauterina a antígenos del VIH-1 induce cambios en las CD neonatales, induciendo un fenotipo semejante al observado en individuos adultos sanos. Por lo anterior, es necesario determinar las implicaciones a largo término de estos hallazgos sobre la función de las CD de neonatos expuestos al VIH-1.

Palabras clave: neonatos, exposición intrauterina al VIH-1, células dendríticas, moléculas accesorias.

Virus RNA

T30. ACTIVIDAD DISULFURO ISOMERASA DE LA SUPERFICIE CELULAR SOBRE EL ROTAVIRUS DURANTE LOS EVENTOS INICIALES DEL PROCESO INFECCIOSO

MARTHA N. CALDERÓN, ORLANDO ACOSTA, CARLOS A. GUERRERO
Laboratorio de Biología Molecular y Celular de Virus. Facultad de Medicina.
Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Las interacciones de los rotavirus con los receptores celulares pueden ser secuenciales e implicar cambios conformacionales en las proteínas virales desplegando dominios no expuestos durante el proceso de unión y penetración a la célula. Con esta investigación se pretende determinar si el rotavirus utiliza las proteínas de actividad disulfuro isomerasa (PDIs) asociadas a la membrana celular, para generar cambios conformacionales, exponiendo diferentes dominios de interacción con los receptores celulares. Mediante técnicas inmunológicas se determinó que al menos uno de los miembros de las PDIs está presente en la membrana citoplas-

mática de las células MA104, la proteína disulfuro isomerasa (PDI); además hay inhibición de la entrada del virus a la célula, cuando se incuban las células con anticuerpos específicos de la PDI y también con inhibidores de la función disulfuro isomerasa superficial como son el DTNB (5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)) y la bacitracina. Igualmente incubando las células MA104 y Caco-2 con péptidos sintéticos de regiones virales que poseen cisteínas, se observó disminución de la infección. Al incubar anticuerpos generados contra los péptidos, con virus adheridos a 4 °C a las células o previamente incubados con el virus en suspensión, éstos bloquearon la entrada de los rotavirus a las células. En la actualidad se están determinando las proteínas de la cápsula viral involucradas en la reacción con la PDI, marcando con biotina los grupos disulfuro que queden expuestos durante los cambios conformacionales que sufre el virus en los diferentes eventos de unión con los receptores celulares. Los resultados hasta ahora obtenidos sugieren que las proteínas disulfuro isomerasa están implicadas en las reacciones tiol(-SH)/disulfuro(-S-S-) en los eventos iniciales de entrada del rotavirus a la célula. Este trabajo ha permitido el inicio de búsqueda de fármacos capaces de inhibir esta actividad con miras a tratamientos farmacológicos de la infección rotaviral.

Palabras clave: rotavirus, actividad disulfuro isomerasa, cambios conformacionales.

T31. ASOCIACIÓN ENTRE LA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO, *HEAT SHOCK COGNATE 70* (Hsc70) Y LA INTEGRINA AVB3 EN MICRODOMINIOS LIPÍDICOS *RAFTS* DE CÉLULAS INTESTINALES DE RATÓN LACTANTE Y SU POSIBLE PAPEL COMO RECEPTORES DE ROTAVIRUS

FABIO CASTILLO¹, DAVID A SASTRE², CARLOS VARÓN², CARLOS A GUERRERO¹

¹ Laboratorio de Biología Molecular y Celular de Virus. Facultad de Medicina.
Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia

² Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Las proteínas Hsc70 y la integrina avb3 se han reportado como posibles receptores de rotavirus localizadas en microdominios lipídicos *rafts* en las líneas celulares MA104 (derivadas de riñón de mono verde africano) y CACO2 (derivadas de adenocarcinoma de colon humano). El presente estudio se propuso investigar si estas dos proteínas se encuentran asociadas en microdominios lipídicos *rafts* de la membrana plasmática de células intestinales (hospedero natural de rotavirus) de ratón lactante. La metodología incluyó inmunocitoquímica e inmunofluorescencia para determinar si estas dos proteínas se encuentran localizadas en la membrana de estas células. Para verificar que están presentes en *rafts* se realizaron ensayos de centrifugación en gradientes de sucrosa del lisado celular tratados o no con b-metil-ciclodextrina, el cual deshace los *rafts*, las fracciones aisladas se separaron por SDS-PAGE y se analizaron mediante *western blot* con anticuerpos específicos para Hsc70 o para la integrina avb3. La asociación de las dos proteínas se determinó tratando las fracciones con octil-b-glucósido y b-metil-ciclodextrina, sometiéndolas a coimmunoprecipitación y ELISA de captura con anticuerpos específicos (anti-Hsc70 o anti-b3). Adicionalmente se plantean ensayos de bloqueo de la infección con anticuerpos contra Hsc70 y α - β 3 en segmentos de intestino delgado (duodeno, yeyuno e ileon) de ratones ICR *in vitro* para verificar la participación de estas dos proteínas como posibles receptores durante la infección por rotavirus. Con esta metodología se demuestra que la proteína Hsc70 y la integrina avb3 se encuentran asociadas en microdominios lipídicos *rafts* en la membrana plasmática de células intestinales de ratón lactante. Falta por definir el papel que juega este complejo proteico como posible receptor de rotavirus en las células intestinales del ratón lactante.

Palabras clave: rotavirus, receptores, Hsc70, integrinas.

T32. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE 10 PLANTAS DE LA FAMILIA EUPHORBIACEAE Y DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS RESPONSABLES: RESULTADOS PRELIMINARES

JORGE E. FORERO¹, LILIANA Y. ACEVEDO¹, ALBEIRO LÓPEZ-HERRERA³,
DIANA CARDONA², LUIS F. TORRES², LUIS F. ECHEVERRY², MARÍA T. RUGELES¹

¹ Grupo de Inmunovirología-Biogénesis. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

² Grupo Química Orgánica de Productos Naturales. Universidad de Antioquia.
Medellín, Colombia.

³ Grupo BIOGEM. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín, Colombia.

Las plantas de la familia *Euphorbiaceae* son reconocidas por ser fuente de sustancias bioactivas antimicrobianas, particularmente antivirales. En este trabajo, extractos etanólicos de hojas o látex de diez especies de

dicha familia fueron sometidos a partición en diferentes solventes para determinar la actividad antiviral contra los Virus del Herpes Simplex Humano 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2), e Influenza A (Flu-A) con el siguiente protocolo: i) Determinación semicuantitativa de actividad antiviral preliminar (AAVP); ii) Determinación de la concentración inhibitoria 50 (CI50) y citotóxica 50 (CC50) mediante la técnica de MTT; iii) Determinación del índice de selectividad (IS; relación CI50/CC50). Aquellas fracciones que mostraron un IS >2 fueron subfraccionadas y cada una de ellas fue sometida de nuevo al mismo proceso, hasta poder identificar metabolitos implicados en la actividad antiviral con el fin de realizar estudios que demuestren la relación entre la estructura y la actividad, apoyados en modelación química. Adicionalmente, se evaluó la actividad antitumoral de las fracciones en cultivos celulares mediante la prueba de viabilidad MTT. Los resultados obtenidos hasta el momento son: 1) La Fracción Soluble (FS) de *P. niruri* mostró una AAVP contra el virus Flu A. 2) Ninguna fracción fue activa contra HSV-1. 3) Los IS de las FS de *C. orinocense*, *J. acotinifolia* y *Croton* sp. para HSV-2 fueron: 2,05, 3,58 y 2,69, respectivamente. 4) Los IS de las Fracción Insoluble (FI) de *H. crepitans*, *C. orinocense*, *Phyllanthic* sp. y *Croton* sp. para HSV-2 fueron: 3,89, 4,04, 3,46 y 7,39, respectivamente. 5) El extracto etanólico del látex de *E. tirucalli* inhibió selectivamente el crecimiento de las líneas celulares tumorales Hela-H1 y Hep-2. Esta estrategia de fraccionamiento bio-guiado puede ser en el futuro utilizada para la búsqueda de principios activos contra otros virus de impacto epidemiológico importante a nivel mundial como el virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1, Rhinovirus humano 14 y virus Dengue.

Palabras clave: Euphorbiaceae, actividad antiviral, actividad antitumoral, productos naturales.

T33. UNA PROPUESTA PARA LA VIGILANCIA AMBIENTAL DEL POLIOVIRUS VACUNAL

MERCEDES GONZÁLEZ DE SCHROEDER¹, LUÍS R. SARMIENTO^{1,2}, JHON C. CASTAÑO¹, MARÍA A. GIRALDO¹, LEONARDO P. SANABRIA¹

¹ Grupo de inmunología molecular (Gymol). Universidad del Quindío. Armenia, Colombia.

² Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”. Habana, Cuba.

RESUMEN

Las cepas de poliovirus vacunal al replicarse en el tracto gastrointestinal y circular en la población tienden a revertir en las cepas salvajes que le dieron origen; de esta forma podrían producirse brotes epidémicos producidos por cepas modificadas originadas de las vacunales. La detección de poliovirus en aguas residuales brinda una información sobre la circulación de estos virus en la comunidad pues cantidades abundantes de poliovirus son excretadas en las heces de las personas inmunizadas y las aguas residuales actúan como vehículo de infección con las cepas vacunales. Describimos un método de recuperación viral a partir de aguas residuales y la identificación viral mediante métodos moleculares. Se recolectaron 18 muestras de igual número de sitios finales de descarga del alcantarillado de Armenia durante el mes de agosto por corresponder al período de tiempo seco. La recuperación y concentración del virus se realizó mediante el método de Sobsey. Se identificaron cuatro poliovirus tipo 1 y dos poliovirus tipo 3. En una de las cinco muestras que resultaron positivas para poliovirus se identificó la presencia de mezcla de los serotipos 1 y 3. No se encontró poliovirus tipo 2 en ninguna de las muestras estudiadas. En el aislamiento en cultivo celular de células L20B se observaron efectos citopáticos en las 6 muestras con amplificación por RT-PCR, así como una muestra con amplificación negativa; en otra muestra hallamos efecto citopático en células Vero. La detección de poliovirus mediante RT-PCR y cultivo celular en células L20B y Vero en siete de las 18 muestras (39,9%) indican que el sistema de vigilancia a partir de aguas residuales puede ser un método sensible para la detección de la circulación de poliovirus. Estos hallazgos indican la alta sensibilidad del sistema de vigilancia a partir de aguas residuales para la detección de poliovirus, lo que permite considerar a las aguas residuales como importantes herramientas a emplear en un futuro sistema de vigilancia en el país.

Palabras clave: poliovirus.

T34. LA INTERACCIÓN DE LAS REGIONES 531-554 DE VP4 Y 280-297 DE VP6 CON HSC70 INTERVIENEN EN EL PROCESO DE ENTRADA DEL ROTAVIRUS A LA CÉLULA

DIEGO F. GUALTERO, FANNY GUZMÁN, LUZ S. RODRÍGUEZ, ORLANDO ACOSTA, CARLOS A. GUERRERO

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

RESUMEN

El mecanismo de infección por rotavirus parece ser un proceso de múltiples pasos aún sin comprender. La proteína de choque térmico hsc70 ha sido propuesta como molécula co-receptora post-adherencia para la entrada de rotavirus a células susceptibles. Utilizando ensayos de co-inmunoprecipitación se demostró que hsc70 interactúa con proteínas estructurales del rotavirus en lisado de células MA104 infectadas, lo que nos sugiere una función in vivo para estas proteínas estructurales durante el proceso de infección. Además, mediante ELISA de captura, partículas virales de doble capa DLPs interactúan con hsc70; probablemente a través de VP6. La secuencia de los aminoácidos 531-554 de VP4 y 280-297 de VP6 fueron escogidas con base en secuencias reportadas de unión a Hsc70 utilizando el programa CLUSTAL_X. Mediante ensayos de infección se determinó que la incubación previa de DLPs y los péptidos sintéticos de VP6 (aa 280-297) y de VP4 (aa 531-554), individualmente o en combinación, inhiben la entrada de las cepas de rotavirus RRV, YM y Wa, de una manera dosis dependiente y aditiva, en células MA104 y CACO-2. Suero hiperinmune contra estos péptidos sintéticos bloquea la infección producida por partículas infecciosas TLPs. Estos resultados sugieren que VP6 toma parte durante la entrada celular del rotavirus uniéndose a hsc70. Estos resultados soportan la función coreceptora de hsc70 como ha sido demostrado por otros investigadores.

Palabras clave: proteínas del choque térmico hsc70, infecciones por rotavirus, péptidos.

T35. ASTROVIRUS (HAstV) COMO AGENTE CAUSAL DE DIARREA EN NIÑOS COLOMBIANOS: SIETE AÑOS DE ESTUDIO

MARÍA F. GUTIÉRREZ, ADRIANA MATIZ, JUAN C. ULLOA, MÓNICA ALVARADO

Departamento de Microbiología. Grupo de enfermedades infecciosas.
Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Con el objeto de determinar el comportamiento de los Astrovirus como agentes causantes de diarrea en algunas regiones colombianas, se colectaron 1.147 muestras de diarrea de niños menores de cinco años que acudieron a los servicios de consulta externa de cuatro centros de salud de regiones de Bogotá, Facatativa, Cartagena y Quibdó, Colombia, durante el período comprendido entre 1996 y el año 2002. La determinación de la presencia viral se realizó por medio de pruebas de ELISA encontrando una prevalencia global de 2,8%. De las muestras positivas se seleccionaron 14 a las cuales se les aisló el ARN, se realizaron pruebas de RT-PCR y secuenciación de un segmento de 348 pb del ORF 2 del genoma viral para elaborar dendrogramas con el método de *Neighbour joining* y así, determinar su comportamiento filogenético. Las conclusiones generales de este estudio son que en Colombia los HAstV poseen comportamientos endémicos y que las cepas colombianas no han sufrido cambios evolutivos que les permitan distanciarse de cepas de otros países.

Palabras clave: Astrovirus humano (HAstV), RT-PCR, filogenética.

T36. NEURONAS HUMANAS PERO NO MURINAS SON SUSCEPTIBLES A LA INFECCIÓN POR EV71

NATALIA HOUGHTON¹, MARLÉN MARTÍNEZ², DIOSELINA PELÁEZ³,
ESPERANZA RECIO-PINTO⁴, JAIME E. CASTELLANOS^{1,3}

¹ Instituto de Virología, Universidad El Bosque. Bogotá, Colombia.

² Laboratorio de Virología, Instituto Nacional de Salud. Bogotá, Colombia.

³ Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

⁴ Department of Anesthesiology, New York University. USA.

RESUMEN

Enterovirus 71 (EV71) es un agente viral re-emergente, que en los últimos tiempos ha causado importantes brotes epidémicos de enfermedad neurológica fatal en niños. Hasta el momento, los mecanismos de neuropa-

togenia de EV71 no son claros principalmente por la falta de sistemas experimentales adecuados. Basados en esto, nos propusimos caracterizar e identificar un modelo celular que permita estudiar los eventos relacionados con el ciclo biológico de EV71 y la proposición racional de fármacos antivirales efectivos. Hemos caracterizado la infección por EV71 en dos modelos de células neuronales humanas SH-SY5Y y murinas CAD-R1 mediante estudios de inmunocitoquímica, viabilidad celular y PCR en tiempo real usando como control positivo de infección la línea celular Te-671, ensayando diferentes diluciones virales y tiempos post-infección (p.i.). La línea celular neuronal humana SH-SY5Y presentó una expresión de antígenos virales correlacionado con la expresión de RNA viral y la pérdida de viabilidad celular dependientes del inoculo viral aunque con una tendencia a infección latente a partir de 24 horas p.i. Sorprendentemente, la línea celular neuronal murina CAD-R1 no mostró infección aparente por EV71, dado que no se observaron cambios en la viabilidad celular ni expresión de antígenos virales o presencia de RNA viral hasta 120 horas de infección. Es posible que las células de origen murino, como CAD-R1 carezcan de receptores virales para EV71 debido a un tropismo estricto por tejidos de primates como ha sido reportado con poliovirus. Por otra parte, la falta de infección por EV71 puede deberse a la ausencia de factores celulares necesarios para la replicación viral. Las células CAD-R1 resultan ser un modelo neuronal muy apropiado para comprobar la restricción de EV71 a células de origen primate humano y no humano, así como para el estudio de otros factores de neurovirulencia de EV71.

Palabras clave: enterovirus 71, neurotrópismo, CAD-R1, neuropatogenia.

T37. VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DEL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO EN LA INFECCIÓN RESPIRATORIA BAJA

CARLOS IZQUIERDO

Instituto de Ortopedia Infantil Roosevelt. Bogotá, Colombia.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es identificar el Virus Sincital Respiratorio (VSR) en la infección respiratoria baja en aquellos pacientes hospitalizados desde el 1 de enero al 16 de julio del presente año (n: 954 casos) y que en la institución consideramos de curso complicado (74 casos; 7,7%), que lo hemos definido bajo los siguientes criterios: 1) Estancia intrahospitalaria mayor de cinco días; 2) Aumento del trabajo respiratorio durante se estancia; 3) Aumento de los requerimientos de oxígeno durante la hospitalización; 4) Sospecha de sobre infección durante el tratamiento; 5) Traslado a Unidad de Cuidado Intensivo. El rastreo viral se realizó utilizando la prueba de detección rápida en aspirado nasofaríngeo para búsqueda de VSR, en los pacientes que cumplieran con los criterios descritos. Luego de tener el reporte se analizaron las características clínicas de los pacientes en los que fue positiva la prueba (24 casos), se encontró una incidencia del 32% de infección respiratoria baja asociada a VSR en los pacientes hospitalizados cuya evolución no fue satisfactoria. El cuadro clínico se presentó en forma de enfermedad aguda con emergencia en marzo y descenso en julio, síntomas que iniciaron 6 días antes de la hospitalización, el hallazgo clínico predominante fue un cuadro broncoobstructivo con infiltrados inespecíficos en la radiología y como dato asociado al cuadro hemático encontramos valores de monocitosis (no reportado en la literatura), antecedentes de prematuridad, contacto con gripe en su entorno, la mayoría de los pacientes fueron previamente sanos. La evolución de estos pacientes fue torpida en el 59% y se presentó fallecimiento en 4,1% de los casos. En el 87,5% de los pacientes se usó antibióticos de diferentes líneas, la estancia hospitalaria fue prolongada con riesgo de adquirir y provocar infección nosocomial (más de siete días) en cerca del 80% de los pacientes, y el 61% requirieron de oxígeno suplementario domiciliario al egreso. En conclusión el VSR es un agente etiológico de mucha importancia durante las epidemias de infección respiratoria en nuestro medio presentando aumentos considerables de hospitalización, generando un incremento en la morbilidad en la patología infantil de nuestro país y además ocasiona problemas intrahospitalarios por aumento de los días de estancia haciendo proclive a nuestras instituciones a la infección nosocomial viral dada su facilidad de contagio. Se presenta este análisis de casos como una propuesta de vigilancia epidemiológica para llevar a cabo en nuestras ciudades latinoamericanas y así lograr mejorar nuestras medidas de prevención local (aplicación de vacuna en el momento oportuno, educación en el control de infecciones en la comunidad y en el ámbito hospitalario cuando emerge la epidemia) y preparar a la población en general y de salud para evitar diseminación a los pacientes de mayor riesgo de mortalidad durante la temporada de infección respiratoria.

Palabras clave: virus respiratorio sincital, epidemiología, infecciones respiratorias.

T38. AGENTES CAUSANTES DE DIARREA EN NIÑOS MENORES DE CINCO AÑOS EN TUNJA, COLOMBIA

FRED G. MANRIQUE, DIANE BILLON Y. TIGNE, SANDRA E. BELLO, JUAN M. OSPINA
Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Tunja, Colombia.
Hospital San Rafael. Tunja, Colombia.
Clínica Saludcoop. Tunja, Colombia.

RESUMEN

El objetivo de éste estudio fue determinar el tipo de agentes infecciosos causantes de EDA en una muestra de niños menores de cinco años que consultaron a IPS de Tunja durante el año 2004. Es un estudio de corte transversal, la información se recogió mediante aplicación de una encuesta a 129 niños menores de cinco años afectados por EDA. Adicionalmente se recogió una muestra de heces, en las consultas externas del Hospital y Clínica Saludcoop de Tunja, Colombia. Se encontró la presencia de Rotavirus en un 48,1%, *Shigella* 0,8 %, *E. coli* 13,9%, *Campylobacter* 2,3%, *Giardia lamblia* 12,4 % *E. histolytica* 7%, en 15,5% de los casos no se identificó agente causal. La asociación fue creciente con la edad para Rotavirus ($p<0,01$), *E. coli* ($p<0,05$), y *Campylobacter* ($p<0,001$). Se concluyó que el Rotavirus es el mayor agente causal de EDA en menores de un año y en general, en menores de cinco años. Las prevalencias encontradas coinciden con lo reportado en estudios realizados en Facatativa, Bogotá, Santander, Manizales y Chocó, Colombia; también con estudios adelantados en Venezuela, Perú México.

Palabras clave: rotavirus, diarrea, salud pública.

T39. TAMIZAJE DE FÁRMACOS QUE INHIBEN LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS EN CÉLULAS MA104, CACO Y CCL6

ANDREA MURILLO, ORLANDO ACOSTA, CARLOS A. GUERRERO
Laboratorio de Biología Molecular y Celular de Virus. Facultad de Medicina.
Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

RESUMEN

En nuestro laboratorio los resultados de un trabajo de doctorado indican que las proteínas celulares pertenecientes a la familia disulfuroisomerasa (PDI) están implicadas en los cambios conformacionales de las proteínas externas de los rotavirus, las cuales son necesarias para su internalización e infección celular. Por otro lado, se ha reportado que el rotavirus aumenta la expresión y actividad de la enzima ciclooxigenasa (COX) y que la producción de prostaglandinas (específicamente PGE2) por parte de la célula, de alguna manera favorece la infección viral. En este trabajo nos propusimos hacer un tamizaje de fármacos comerciales de uso humano con posible inhibición de las reacciones tiol(-SH)/disulfuro(-S-S-) y de la actividad COX con el objetivo de determinar si estos fármacos inhiben o atenúan la infección del rotavirus. Al adicionar los fármacos a células MA104 infectadas con el rotavirus de origen animal RRV encontramos que los inhibidores de la COX (AINES) y fármacos con grupos sulfhidrilo inhiben la infección en diferente grado dependiendo del fármaco. El resultado se reprodujo al repetir los experimentos con los principios activos de los fármacos comerciales. Sin embargo, al revisar la literatura encontramos que un grupo de investigación ya había reportado en el 2004 el efecto inhibidor de la Indometacina (AINE) del virus RRV en las células Caco-2. Al analizar diferentes AINES en las células MA104 y enterocitos humanos CCL-6, con rotavirus de origen humano (Wa, Wi, M69), encontramos el efecto opuesto, se aumento la infección. Este hallazgo sugiere que los fármacos tienen efectos diferentes dependiendo del virus y quizá de la célula. Con base en estos resultados nos proponemos a futuro utilizar un modelo in vivo para determinar el efecto inhibitorio de fármacos AINES y con grupos sulfhidrilo en la infección de rotavirus en células del intestino delgado de ratón lactante.

Palabras clave: AINES, rotavirus, ciclooxigenasa.

T40. DETECCIÓN DE LINFOCITOS B DE MEMORIA ESPECÍFICOS DE ROTAVIRUS EN ADULTOS SANOS

CARLOS F. NARVÁEZ¹, JUANITA ÁNGEL¹, HARRY B. GREENBERG², MANUEL FRANCO¹

¹ Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

² Department of Medicine, Stanford University School of Medicine. USA.

RESUMEN

La respuesta inmune al Rotavirus (RV) y los mecanismos involucrados en la protección generada por las dos vacunas recientemente aprobadas son pobremente entendidos. Debido a que anticuerpos (Ac) RV-específicos son el factor de protección más importante contra las infecciones naturales y a la dificultad técnica que implica medir la respuesta de Ac intestinales (sitio donde el RV preferentemente se replica), detectar y enumerar LB RV-específicos se vuelve fundamental. Para cuantificar precursores de linfocitos específicos tradicionalmente se cuenta con el Ensayo de Dilución Límite (LDA). Adicionalmente, para RV contamos con VLPs-GFP recombinantes, que se unen a LB con inmunoglobulina de superficie RV “específica”, permitiendo su detección. Aquí nos proponemos reportar en sangre periférica de adultos sanos la frecuencia de LB RV-específicos en varias subpoblaciones de memoria. Se realizaron dos procedimientos a partir de LB purificados: 1) Detección directa por citometría de flujo de las frecuencias de LB de memoria (LBm) IgM y LBm switch (IgA/IgG) RV-específicos. 2) Cuantificación por LDA en poblaciones sorteadas, de los precursores de LBm IgM y LBm switch (IgA/IgG) RV-específicos. Observamos una correlación entre la frecuencia de LBm IgM RV-específicos detectada por citometría y LDA (siendo siempre mayor la frecuencia detectada por citometría que por dilución límite), lo que sugiere que por ambos métodos estamos analizando poblaciones similares. No se logró determinar la frecuencia de precursores de LBm switch RV-específicos por LDA. Por citometría se estableció que la frecuencia de estas células es 2,5-5 veces menor que la frecuencia de LBm IgM RV-específicos, lo que sumado a la baja eficiencia de la LDA en poblaciones sorteadas, explica este resultado. Por citometría, el 0,5% de los LBm IgM se unían a las VLPs, mientras que sólo el 0,2% de los LBm switch se fijaron a las VLPs. Estos resultados involucran la participación de la subpoblación LBm IgM en la respuesta inmune al virus, interrogante que queda por resolverse.

Palabras clave: linfocito B (LB), rotavirus (RV), Viral Like-Particles (VLPs), ensayo de elusión límite.

T41. EVOLUCIÓN *IN SILICO* DE UNA POBLACIÓN DE VIRUS RNA SEGMENTADO SOMETIDA A MUTACIONES PUNTUALES Y RECOMBINACIÓN BAJO SUCEIVOS CUELLOS DE BOTELLA EN CONDICIONES CONSTANTES

CÉSAR SALDAÑA

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Las altas tasas de mutación, tiempos cortos de replicación, grandes tamaños poblacionales, la recombinación, los rearreglos, la alternancia de hospederos bajo la influencia de la densidad viral (m.o.i) permiten a las poblaciones de virus RNA (cuasiespecies) evadir la extinción y adaptarse ante nuevos cambios en las condiciones ambientales como el uso de antivirales. Se diseñó y programó un algoritmo evolutivo que permite simular la evolución de una población de secuencias de Rotavirus SA11 (VP1 y VP2) sometida a deriva genética y cuellos de botella, bajo mutaciones puntuales, recombinación y presiones selectivas para la replicación. La eficacia biológica se calculó diferenciando entre silvestres y mutantes según la presencia o ausencia de nucleótidos y tripéptidos altamente conservados y homología en las secuencias implicadas en la replicación: (i) VP1 ugugacc y GDD y (ii) VP2 YXYXYXY y (iii) 98% de homología respecto a la secuencia maestra. Existen diferencias significativas entre las secuencias mutadas al azar y mutadas al azar y recombinadas simultáneamente, como lo muestra la prueba t (44gl, $\alpha < 0,05$). Los experimentos realizados *in silico* evidencian: (i) El efecto del trinquete de Muller por la acumulación de mutaciones puntuales deletéreas y por tanto pérdida de eficacia biológica bajo sucesivos cuellos de botella. (ii) La capacidad de la recombinación homóloga para corregir errores generados durante la replicación dada la ausencia de mecanismos de corrección en las enzimas encargadas de la replicación, dicha capacidad es directamente proporcional a la densidad viral (m.o.i). (iii) La adaptabilidad (W) disminuye con el transcurso de los cuellos, sin embargo si $W < 1$ entonces W aumenta con el transcurso de los cuellos acercándose a 1, indicando una tendencia a la neutralidad probablemente por el efecto de la acumulación de mutaciones silenciosas, o tal vez una posible evidencia de éxtasis evolutivo dado que las condiciones permanecieron constantes durante toda la simulación.

Palabras clave: mutación puntual, recombinación, cuello de botella, cuasiespecie.

T42. PERSPECTIVA EPISTEMOLÓGICA DE LA EVOLUCIÓN DE VIRUS RNA EN LA NATURALEZA

CÉSAR SALDAÑA

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.
Bogotá, Colombia.

RESUMEN

La evolución biológica se da mediante procesos de adaptación, extinción y optimización de variantes de una población. La evolución de poblaciones de virus RNA bajo un modelo de cuasiespecies se comporta como un sistema lejos del equilibrio en donde las altas tasas de mutación hacen fluctuar la información genética cerca al umbral del error de donde emergen mutantes que permiten a la población viral adaptarse a diferentes presiones selectivas como la acumulación de errores en la replicación por falta de mecanismos de corrección de copia, cambios de hospedero y el uso de antivirales, entre otras. Dichas poblaciones se auto-organizan colectivamente e interactúan por efecto del azar y la necesidad de cambios ante nuevas condiciones tendiendo a la estabilidad mediante procesos de optimización de la eficacia biológica o fitness de la cuasiespecie. Dicho proceso se debe a la retroalimentación e iteración de una triada evolutiva viral (i) causas internas: mutación, recombinación con el hospedero, rearreglos y reordenamientos; (ii) causas externas: deriva genética, cuellos de botella y densidad viral (m.o.i) la cual es determinante de la recombinación entre virus; (iii) causas sinérgicas es decir las interacciones intrapoblacionales, intracelulares, interorganísmicas y ecosistémicas que pueden facilitar o no el mantenimiento o la adquisición de un nicho que garantice la supervivencia de población.

Palabras clave: mutación puntual, recombinación, cuello de botella, cuasiespecie.

T43. MOLECULAR ANALYSIS OF A 348 BASE-PAIR SEGMENT OF OPEN READING FRAME 2 OF HUMAN ASTROVIRUS. A CHARACTERIZATION OF COLOMBIAN ISOLATES

JUAN C. ULLOA, ADRIANA MATIZ, LEONARDO LAREO, MARÍA F. GUTIÉRREZ

Grupo de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Microbiología.

Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

ABSTRACT

We are reporting computational studies of several genotyped strains of human HAsTV isolated in Colombia which we have genotyped using the 348-bp segment located between nucleotides 258 and 606 close to the amino terminal region of the complete ORF 2. By biocomputational techniques this 348-bp segment from the different strains was translated into amino acid sequence. The sequences were aligned and compared in order to build a dendrogram. Our results show that the 348 bp and the 116 amino acid peptides cluster in a very conservative way, showing slight genetic variations between them. This slight sequence variability does not allow us to identify common amino acid substitution patterns shared by all members of each HAsTV specific type, thus suggesting that antigenic epitopes are probably located outside the 116 peptide fragment of this capsid protein. These results show that there is little recombination among different regions of the ORF2, thus suggesting that this genotyping method should continue to be useful for serotyping HAsTV isolates.

Key words: human diarrhea, human Astrovirus, bioinformatics.

Virus DNA

T44. RESTAURACIÓN DE ADN DE PLASMA COMO ALTERNATIVA PARA LA DETECCIÓN DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH) EN MUESTRAS DE PACIENTES CON CÁNCER DE CUELLO UTERINO (CCU) Y NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL (NIC III)

YAZMÍN R. ARIAS, FABIÁN CARRILLO, FABIO A. ARISTIZÁBAL

Grupo de Farmacogenética del Cáncer, Departamento de Farmacia,

Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

RESUMEN

El ADN de plasma se ha convertido en los últimos años en un potencial marcador molecular que revela el comportamiento tumoral, varios estudios señalan la importancia y la alta correlación de hallazgos genéticos,

epigenéticos en tumores primarios, frente o lo detectado en plasma y sumado a esto la facilidad para acceder a la muestra del paciente lo convierten en un biomarcador en potencia para detección, pronóstico y seguimiento de pacientes con diferentes tipos de cáncer. Así mismo, la detección de secuencias virales en ciertos modelos tumorales ha revelado una importante relación con la progresión de la enfermedad y el desarrollo de metástasis. En pacientes con cáncer de cuello uterino se ha podido establecer la presencia de virus de papiloma humano (VPH) en muestras de ADN de plasma y algunos autores han relacionado esta detección con progresión de la enfermedad y desarrollo de metástasis; sin embargo los porcentajes de detección en la mayoría de los trabajos existentes a la fecha son bajos, abarcando del 7 al 20%, esto puede estar dado por diferentes métodos de detección, tecnologías empleadas y el tiempo de almacenamiento de las muestras, tanto de plasma completo como de ADN. Se implementó un proceso pre PCR denominado restauración de ADN, extraído de muestras de plasma, almacenadas provenientes, de pacientes con cáncer cervical y neoplasia intraepitelial de alto grado NIC III, para establecer si este era capaz de mejorar las condiciones del ADN obtenido de plasma para aplicaciones de PCR en la detección de secuencias virales. Los resultados nos indican que el proceso de restauración repara las cadenas de ADN de plasma y por lo tanto recupera su eficiencia como sustrato de PCR, basado en las condiciones deficientes de este ADN tumoral debido a los procesos que tiene que atravesar para llegar a la circulación sanguínea.

Palabras clave: ADN de plasma, VPH, restauración.

T45. ANÁLISIS DEL PERFIL DE PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS TH1 Y TH2 HACIA LA PROTEÍNA E7 DE VPH 16 EN MUJERES CON CÁNCER CERVICAL INVASIVO TRATADAS CON RADIOTERAPIA

GIOVANNI DELGADO, MARÍA A. CÉSPEDES, MARÍA M. BRAVO, ALBA L. CÓMBITA.
Grupo de Investigación en Biología del Cáncer. Instituto Nacional de Cancerología.
Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Una alteración de la respuesta Th1/Th2 hacia diferentes proteínas de VPH ha sido observada durante la carcinogenesis cervical. Se ha sugerido que la lisis de células tumorales por las radiaciones- γ podría conducir a la liberación de antígenos virales capaces de activar la inmunidad celular específica. En este trabajo se determinaron las frecuencias de linfocitos T CD4⁺ específicos contra E7 de VPH16 que expresaban IFN γ (Th1) o IL-4 (Th2), en mujeres con cáncer cervical invasivo antes y después de ser tratadas con radioterapia (RT). Se analizaron muestras de sangre periférica de 12 pacientes antes y después de la RT, de 15 pacientes solamente antes de la RT y de 16 mujeres sanas. Las células fueron estimuladas por 12 horas con células dendríticas pulsadas con la proteína E7 de VPH16 (CD-E7) o directamente con péptidos sintéticos derivados de esta proteína (E751-70, E765-84, E779-98). Posteriormente, fueron marcadas para la detección de moléculas de superficie (CD4, CD69) y citoquinas intracelulares (IFN γ , IL-4) y analizadas por citometría de flujo. Luego de la estimulación con CD-E7, respuestas Th1 específicas fueron detectadas en tres de 16 mujeres sanas (frecuencia media de 0,037 $\pm$ 0,009%) y en 13 de 27 pacientes con cáncer cervical antes de RT (frecuencia media de 0,063 $\pm$ 0,016%). Respuestas Th2 fueron detectadas en tres de los 13 pacientes que presentaron respuestas Th1 (frecuencia media de 0,027 $\pm$ 0,003%). Cuando el péptido E779-98 fue usado como estímulo, respuestas más altas fueron observadas en los mismos pacientes (frecuencia media Th1 de 0,233 $\pm$ 0,057%; frecuencia media Th2 de 0,097 $\pm$ 0,054%). Después de RT, ocho de 12 pacientes mostraron un incremento en la respuesta Th1 específica cuando se usó el péptido E779-98 como estímulo. Entre estos ocho pacientes, tres presentaron respuesta antes y después de la RT (frecuencias medias de 0,183 $\pm$ 0,139% y 0,567 $\pm$ 0,294%, respectivamente) y cinco respondieron solamente después del tratamiento (frecuencia media de 0,195 $\pm$ 0,046%). En contraste con algunos trabajos que reportan de la pérdida funcional de la inmunidad celular específica contra E7 de VPH16 en pacientes con cáncer cervical, nosotros detectamos repuestas de linfocitos T ayudadores contra esta proteína en cerca de la mitad de las pacientes analizadas. Después del tratamiento, algunos pacientes mostraron un incremento en las frecuencias de linfocitos Th1, lo que indica que la respuesta inmune celular específica contra E7 puede ser modificada por efecto de la RT, y que podría estar asociado con una mejor respuesta al tratamiento.

Palabras clave: cáncer cervical, radioterapia, citoquinas, Th1/Th2, proteína E7 VPH16.

T46. IDENTIFICACIÓN DE PAPILOMAVIRUS HUMANO ASOCIADOS A CÁNCER CERVICAL EN MUESTRAS DE CÉRVIX MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) Y PCR MÚLTIPLE USANDO CEBADORES CONSENSO Y TIPO-ESPECÍFICOS

DOLLY C. HERRERA, YULIANA TÉLLEZ, CATALINA HURTADO, ÁLVARO M. FLÓREZ
Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología, Universidad de Santander (UDES).
Bucaramanga, Colombia.

El virus del papiloma humano (HPV) es considerado como un agente infeccioso frecuentemente asociado al desarrollo de carcinoma de cérvix. En este estudio se demostró la utilidad de una técnica molecular para la identificación de genotipos específicos de HPV presentes en muestras clínicas usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con cebadores consenso MY09/MY11, GP5+/GP6+ y cebadores tipo específico para HPV 16 y 18. La primera amplificación genera un producto de 450 pb con MY09-MY11 y la segunda amplificación genera productos a partir de una PCR anidada con una mezcla de cebadores GP5+ - GP6+ y tipo específicos HPV 16 y 18 de 150, 230 y 300 pb respectivamente. De las 233 muestras recolectadas en la Liga Santandereana de Lucha Contra el Cáncer se han analizado 52 que corresponden a: 23 NICI (44,23%), 1 NICII (1,92%), 11 CONTROL (21,15%), 6 ASCUS (11,53%); 11 NORMAL (21,15%). De las 52, 28 (53,84%) fueron positivas para HPV de la siguiente manera: de las 11 muestras control, ocho fueron positivas; de las 11 normales cinco fueron positivas y de las 23 positivas, 15 estuvieron de acuerdo con el diagnóstico citológico. De las 52 analizadas, 24 fueron negativas para HPV (46,15%), dos (3,85%) fueron positivas para HPV 16 y tres positivas (5,77%) para HPV 18. Una muestra diagnosticada como normal por citología fue positiva para los dos tipos de HPV (16 y 18); las muestras positivas para HPV que fueron negativas para los serotipos serán tipificadas mediante cebadores tipo específicos para identificar el tipo de papiloma que presentan. Los productos iniciales de amplificación fueron secuenciados y cada muestra fue procesada por triplicado. Tomando lo anterior, esta técnica molecular es importante para el tamizaje de HPV y puede ser empleado como método para la detección precoz y confirmatoria de las pruebas citológicas.

Palabras clave: papiloma virus humano, reacción en cadena de la polimerasa, cáncer de cérvix, neoplasia.

T47. VARIANTES MOLECULARES EN E6 DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 16

ANTONIO HUERTAS, MÓNICA MOLANO, NUBIA MUÑOZ, PABLO MORENO,
LILIANA MARTÍN, MARÍA MERCEDES BRAVO.
Grupo de Investigación en Biología del Cáncer. Instituto Nacional de Cancerología.
Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Estudios sobre variantes de VPH16 muestran que algunas de ellas incrementan el riesgo de desarrollo de cáncer cervical. Aunque existen diferentes reportes acerca de la identificación taxonómica de variantes de E6 de VPH16, en la actualidad no hay a nivel mundial un criterio de agrupación y nomenclatura actualizado, lo que ha llevado a discrepancias en su agrupamiento y clasificación. El objetivo de este trabajo fue proponer un criterio de agrupación y nomenclatura de variantes en E6/VPH16 actualizado y unificado, basado en los análisis de comparación de secuencias de nucleótidos de reportes previamente publicados. Se hizo una revisión de literatura publicada a nivel mundial acerca de variantes en E6/VPH16 entre los años de 1991 y 2006, secuencias reportadas en el GENBANK y Compendio del VPH de 1996. Inicialmente se desarrollaron tablas para la comparación de las secuencias teniendo en cuenta las secuencias consenso. Debido a que se presentaron nuevos y comunes patrones de comparación, las variantes se reagruparon en ramas, clases y subclases. Se identificaron 201 variantes en E6/VPH16, de estas 125 pertenecen a la rama europea (E), 21 pertenecen a la rama asiática (As), 13 a la rama asiático americana (AA), siete a la rama norte americana 1 (NA-1), 18 a la africana 1 (Af 1) y 14 a la rama africana 2 (Af 2). Hubo tres variantes que no tuvieron un patrón común a alguna de estas ramas. Para la rama E se determinaron dos clases, para las ramas As, AA, NA-1 y Af 2 se determinaron tres clases y para la rama Af 1 se determinaron seis clases. Los cambios de aminoácidos mas frecuentes fueron el L83V, Q14H, Q14D, H78Y y R10T. Como conclusión, se presenta una propuesta de clasificación de variantes de E6 de VPH16 que lleva a complementar y actualizar el criterio de agrupación y nomenclatura utilizado hasta el momento

Palabras clave: VPH16, variantes, E6 ORF.

T48. DETECCIÓN DEL ESTADO DE INTEGRACIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 16 EN PACIENTES CON LESIONES INTRAEPITELIALES DE ALTO GRADO Y CÁNCER DE CUELLO UTERINO

JACQUELINE LÓPEZ¹, FABIO A. ARISTIZÁBAL^{1,2}

¹ Grupo de Farmacogenética del Cáncer, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

² Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Determinar el estado de integración del VPH tipo 16 en pacientes con lesiones intraepiteliales de alto grado (LIEAG) y cáncer de cuello uterino (CCU). En una población de estudio que consistió en 73 pacientes de Bogotá, Colombia diagnosticados con LIEAG y CCU. Se implementó una nueva metodología basada en PCR para la diferenciación de las formas físicas de VPH analizando la totalidad de la región E1-E2. La región E1-E2 fue dividida en ocho segmentos según Vernón (1997) y se empleó conjuntamente el enfoque de Yoshinouchi (1999) para calcular la relación densitométrica de E1/E6 y E2/E6. En el 82 y el 80% de las pacientes con LIEAG y CCU fue detectado el virus. De la misma manera, el tipo viral 16 estuvo presente el 48 y 58% de las pacientes con LIEAG y CCU respectivamente. En una población de 21 pacientes VPH 16 con CCU se identificaron nueve (43%) pacientes con formas integradas puras, uno (5%) con formas episomales puras y 11 (52%) con formas mixtas. Del mismo modo, en una población de 11 pacientes VPH 16 con LIEAG, dos (18%) pacientes presentaron formas integradas puras, cuatro (36%) formas episomales puras y cinco (45%) formas mixtas. El 56% del total de la población analizada presentó ruptura en E1, específicamente en la zona 5' de E1 (863-1221 nt), el 22% en los dos genes simultáneamente y el 6% en E2. El 78% de los casos VPH 16 presentó entre cero y tres rupturas, tendencia que se mantuvo al analizar los resultados de LIEAG y CCU por separado. Se encontró que existe asociación entre las formas físicas de VPH 16 y los estados clínicos analizados, en CCU hay mayor presencia de formas integradas y en LIEAG de formas episomales. Se implementó una nueva metodología basada en PCR para la diferenciación de las formas físicas de VPH que permite obtener resultados más cercanos a la realidad del evento de integración viral ya que analiza la totalidad de la región E1-E2.

Palabras clave: virus del papiloma humano, integración viral, cáncer de cuello uterino, lesiones intraepiteliales de alto grado.

T49. APOORTE DEL LABORATORIO EN EL DIAGNÓSTICO *post-mortem* DE UN CASO FULMINANTE DE NEUMONÍA POR VIRUS DE VARICELA ZOSTER

CLAUDIA MARTÍNEZ¹, GLORIA M. JIMÉNEZ¹, JAIME E. CASTELLANOS^{2,3}

¹ Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Bogotá, Colombia.

² Instituto de Virología, Universidad El Bosque. Bogotá, Colombia.

³ Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

RESUMEN

En el presente trabajo se reporta un caso fatal de neumonía por virus de varicela zoster (VZV) en una mujer de 22 años con antecedentes de consumo de bazuco que se encontraba en un centro de reclusión femenino en Bogotá, Colombia. Consultó el centro médico de la cárcel por presentar reacción exantemática sugestiva de varicela y dos días después falleció en su celda. Se practicó la necropsia en el Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses de Bogotá. Se describieron los signos externos y analizaron por histopatología pulmón, piel, corazón y cerebro. Se evidenciaron cambios por neumonía intersticial aguda necrotizante y fibrosis con abundante presencia de macrófagos alveolares con pigmentos oscuros, compatibles con los antecedentes de fumadora de bazuco. Los bloques parafinados de tejidos se procesaron para la extracción de DNA y amplificación del genoma de virus de varicela zoster. Muestras de sangre y suero se procesaron por ELISA para la detección de IgM e IgG específicos para el virus. Se encontraron altos títulos de IgM específica para VZV y se logró amplificar un fragmento de DNA viral, que fue confirmado por secuenciación. Las pruebas de laboratorio, permitieron confirmar el diagnóstico clínico y patológico inicial. Se concluyó que la muerte se produjo por insuficiencia respiratoria secundaria al compromiso pulmonar global por una infección por virus de varicela zoster. En este caso las pruebas moleculares y serológicas aportaron datos definitivos para confirmar la causa de la muerte.

Palabras clave: virus de varicela zoster, neumonía, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), PCR, IgM, IgG.

T50. VARIANTES EN E6/VP16 Y CARGA VIRAL EN MUJERES CON CITOLOGÍA NORMAL QUE PERTENECEN A LA COHORTE DE BOGOTÁ, COLOMBIA

MÓNICA MOLANO¹, ANTONIO HUERTAS², ALBA L. CÓMBITA¹, PABLO MORENO¹, MARÍA M. BRAVO¹, LILIANA MARTÍN¹, RAÚL MURILLO¹, CHRIS JLM MEIJER², ADRIAAN VAN DEN BRULE³, HÉCTOR POSSO⁴, NUBIA MUÑOZ¹

¹ Grupo de Investigación en Biología del Cáncer. Instituto Nacional de Cancerología. Bogotá, Colombia.

² Department of Pathology, Free University Hospital, Netherlands.

³ Pathology Laboratory, Stichting PAMM. Netherlands

⁴ Grupo de Investigación. Liga Colombiana de Lucha contra el Cáncer. Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Diferentes estudios a nivel mundial han sugerido que variantes en E6/VP16 y la carga viral pueden ser factores importantes de persistencia viral y progresión hasta cáncer cervical. No se han realizado estudios de variantes en E6/VP16 en mujeres colombianas con citología normal y tampoco se han reportado asociaciones entre variantes y carga viral. Se analizaron 29 raspados cervicales de mujeres con citología normal, que pertenecen a la línea de base de la cohorte de Bogotá, Colombia y que fueron positivas para E6/VP16. La presencia de variantes en E6 se detectó mediante secuencia directa y el análisis de carga viral se realizó usando un método semicuantitativo (GP5+/6+ PCR-EIA). Los valores de carga viral se dividieron en tres categorías: alta, intermedia y baja. Se detectaron variantes europeas en 26 muestras (89,6%), cuatro de ellas tuvieron la secuencia de referencia (15,4%), 18 tuvieron la variante E-G350 (69,2%), una tuvo la variante E-A176 (3,8%), una tuvo la variante E-A176/G350 (3,8%), una tuvo la variante E-G131/G350 y la última tuvo la variante E-G182. Variantes asiático americanas se detectaron en dos muestras (6,9%), una de las cuales tuvo una variante AA-a y la otra 1 variante AA-c. Finalmente una variante africana 1-b se detectó en una muestra (3,5%). El análisis de carga viral mostró que 25 muestras tuvieron carga viral alta (86,2%), dos tuvieron carga viral intermedia (6,9%) y dos tuvieron carga viral baja (6,9%). En conclusión, en mujeres colombianas con citología normal se observa una diversidad de variantes en E6/VP16, con una mayor prevalencia de variantes europeas, principalmente de la E-G350. Una alta carga viral se observó en la mayoría de las muestras. El papel que juegan estas variantes y la carga viral en la persistencia de la infección por VP16 podrá ser resuelto con el seguimiento de las mujeres infectadas.

Palabras clave: VP16, variantes, carga viral.

T51. VARIATIONS OF HPV TYPE 16 LCR AND E6 IN SQUAMOUS CARCINOMAS OF THE UTERINE CERVIX IN COLOMBIA

PABLO MORENO^{1,3}, MÓNICA MOLANO¹, ANTONIO HUERTAS¹, MARÍA M. BRAVO¹, MYRIAM SÁNCHEZ³, MAURICIO GONZÁLES², ALEJANDRO GARCÍA³

¹ Grupo Investigación en Biología del Cáncer, Laboratorio de Inmunología, Instituto Nacional de Cancerología. Bogotá, Colombia.

² Grupo de Ginecología. Instituto Nacional de Cancerología. Bogotá, Colombia.

³ Laboratorio de Hormonas, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

⁴ Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México - Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salud. México, D. F.

ABSTRACT

Human papillomavirus type 16 (HPV16) is usually found in 50% of cervical carcinomas and variants of this type have been found unevenly distributed in the world. It has been suggested that variations within E6 and LCR of HPV16 may be associated with cervical neoplasia. The aim of this work was to detect variations in the central part of the long control region (LCR) and in the E6 gene of HPV16-positive women with cervical cancer. Biopsies from 59 patients attending at Instituto Nacional de Cancerología in Bogotá, Colombia were collected and HPV detection was done using universal primers followed by non-radioactive single-stranded conformational polymorphism (SSCP) analysis. Sequence variations identified by SSCP in the LCR and E6 regions were confirmed by sequencing. European variants were identified in 76.3% of cases and the most prevalent variation was 350G (41.1%). Non-European variants were identified in 11.7% of the samples. A (G to A) transition at nucleotide 7521 was the most prevalent (80%) variation found in the central part of the LCR. The description and report of the

frequency of HPV 16 variants contributes to understand the role of these variants as risk factors of invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix in Colombia. The standardized conditions of the non radioactive SSCP and the sequencing to detection of HPV16 variants in this study allowed us to establish specific electrophoresis patterns that permitted to detect and differentiate within European and no European variants, to differentiate between subclasses and to do the specific detection of 350G variation. The non radioactive SSCP employed in this work is an excellent alternative method that can be used as a screening tool of variants.

Key words: HPV16, variants, LCR. E6.

Hepatitis Virales

T52. DETECCIÓN DEL ARNm DE LA PROTEÍNA p53 Y DE LA PROTEÍNA DEL CORE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN CASOS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR Y OTRAS HEPATOPATÍAS CRÓNICAS

CLAUDIA ÁLVAREZ¹, CATALINA MIRA¹, JUAN A. ESTRADA¹, JUAN C RESTREPO¹, GONZALO CORREA¹, GERMÁN OSORIO¹, SERGIO HOYOS¹, SERGIO JARAMILLO², LUÍS E. BRAVO³, MARÍA CRISTINA NAVAS¹

¹ Grupo de Gastrohepatología, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

² Hospital Pablo Tobón Uribe. Medellín, Colombia.

³ Hospital Universitario del Valle. Cali, Colombia.

RESUMEN

En el carcinoma hepatocelular (HCC), principal tipo de cáncer primario de hígado, se han descrito mutaciones en el gen p53, hasta en un 60% de los casos. La sobre-expresión de la proteína p53 ha sido ampliamente descrita en HCC. La disregulación del gen p53 es un evento común en la mayoría de neoplasias, incluyendo las asociadas a la infección por virus oncogénicos. En el caso del virus de la hepatitis C, asociado al desarrollo del HCC, diversos estudios han aportado evidencia de la capacidad de la proteína estructural Core del HCV de regular a nivel transcripcional, entre otros, la expresión del gen p53. El objetivo de este estudio fue explorar el nivel de p53, tanto de ARNm como de proteína, en casos de HCC asociado a la infección por HCV, con el fin de comprobar el posible efecto de la proteína Core descrito en modelos *in vitro*. 63 casos de tejido hepático con diagnóstico de HCC obtenidos en el período 1995-2004 de los departamentos de patología de la Universidad de Antioquia y del Hospital Pablo Tobón Uribe de la ciudad de Medellín, Colombia y del Hospital Universitario del Valle de la ciudad de Cali, Colombia, fueron analizados por inmuno-histoquímica para la detección de las proteínas Core y p53. Adicionalmente, fueron incluidos diez casos de tejido hepático congelado a -70 °C, de explantes provenientes de pacientes con diagnóstico de HCC, para determinación por RT-PCR del ARNm de p53. El 16% (10/63) de los casos fueron positivos para la detección de la proteína Core del VHC, estos resultados están acorde con el perfil epidemiológico esperado para Colombia. El 46% (29/63) de los casos fueron positivos para la detección de la proteína p53; los resultados obtenidos en la sobre-expresión de la proteína p53 se correlacionan con los datos reportados en la literatura. Con respecto al nivel de ARNm de p53, se observó una correlación entre el nivel de expresión del ARNm y el nivel de proteína de p53. De igual forma, se evidenció que en presencia de la proteína Core del HCV, se detectó un bajo nivel de ARNm de p53; aunque el número de muestras analizadas para la expresión del ARNm del gen p53 es reducido, los resultados obtenidos en HCC asociado al HCV podrían sugerir modificaciones de p53 inducidas por la proteína Core del HCV.

Palabras clave: carcinoma hepatocelular, virus de la hepatitis C, proteína core, proteína p53.

T53. EXPRESIÓN TRANSITORIA DE LA PROTEÍNA CORE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN LA LÍNEA DE HEPATOMA HUMANO HepG2: ENSAYOS PRELIMINARES DE EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS

CATALINA MIRA, ALEJANDRA VILLEGAS, JUAN A. ESTRADA, LUIS F. HENAO, JESÚS O. YEPES, CLAUDIA M. ÁLVAREZ, MARÍA CRISTINA NAVAS
Grupo de Gastrohepatología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.
Medellín, Colombia.

RESUMEN

La infección por el virus de la hepatitis C (HCV) y/o el virus de la hepatitis B se ha identificado como el principal factor de riesgo en el 80% de los casos de carcinoma hepatocelular (CHC). Diversos estudios han apor-

tado evidencia del papel de las proteínas Core, NSSA y NS3 del VHC en la carcinogénesis hepática. En el caso de la proteína Core parece estar implicada en la regulación de la expresión del gen supresor de tumor p53, entre otros mecanismos; sin embargo, los resultados han sido contradictorios. Con el propósito de dilucidar el efecto de la expresión de la proteína Core en el nivel de transcripción del ARNm de p53, se utilizó el sistema de expresión del Virus Semliki Forest (SFV). Células HepG2 fueron transducidas con partículas virales recombinantes rSFV-GFP o rSFV-Core (MOI 0,5). Células HepG2 no transducidas fueron usadas como control. El ARN total fue obtenido de los cultivos celulares 24 horas postransducción. La amplificación del ADNc se realizó utilizando primers interexónicos correspondientes al exón 4 y al exón 7 del gen p53. El nivel de ARNm de p53 fue cuantificado y comparado con el nivel de ARNm del gen constitutivo GAPDH por análisis densitométrico. Las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas, debido posiblemente al marcado efecto inducido por la eficiente replicación del vector viral y el límite de resolución de la técnica, RT PCR semicuantitativa. Adicionalmente, se observó un efecto citopático acentuado en las células transducidas con partículas virales recombinantes rSFV-Core, comparado con las células transducidas con rSFV-GFP. Se planea realizar la determinación del nivel de expresión de las proteínas Core y GFP en la línea de Hepatoma HepG2 con la técnica de *western blot* y realizar ensayos preliminares para evaluar la posible modulación de la apoptosis en presencia de la proteína Core del VHC.

Palabras clave: VHC, proteína core, Semliki Forest Virus, HepG2.

T54. BIOMARCADORES EN CARCINOMA HEPATOCELULAR (HCC)

DIEGO URIBE¹, CLAUDIA M. ÁLVAREZ¹, LUIS F. HENAO¹, CATALINA SANTA¹, GERMÁN OSORIO¹, JUAN C. RESTREPO¹, GONZALO CORREA¹, LUIS E. BRAVO², ROCÍO LÓPEZ³, PIERRE HAINAUT⁴, REGINA SANTELLA⁵, SERGIO JARAMILLO⁶, JORGE DONADO⁶, MARÍA CRISTINA NAVAS¹

¹ Grupo de Gastrohepatología, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

² Universidad del Valle. Cali, Colombia.

³ Fundación Santa Fe de Bogotá. Colombia.

⁴ IARC. Francia

⁵ Columbia University. USA.

⁶ Hospital Pablo Tobón Uribe. Medellín, Colombia.

RESUMEN

El principal tipo de cáncer primario de hígado corresponde al HCC, el cual esta asociado en mas del 80% de los casos a infección por el virus de la hepatitis C (HCV) y/o el virus de la hepatitis B (HBV). Adicionalmente, la aflatoxina B1 (AFB1), una micotoxina, también ha sido identificada como un factor de riesgo para el desarrollo de HCC. El objetivo de este estudio es describir la frecuencia de tres biomarcadores en biopsias de pacientes con diagnóstico de HCC registradas en el período 2000-2005 en cuatro hospitales de Bogotá, Medellín y Cali (Colombia). El primer biomarcador evaluado es la infección por HCV. Este biomarcador está siendo analizado por detección de la proteína Core del HCV por inmunohistoquímica en cortes de tejido hepático incluidos en parafina. El segundo biomarcador evaluado es la exposición a AFB1. Este biomarcador está siendo analizado por detección de los aductos AFB1-ADN, por inmunohistoquímica y detección de la mutación en el codón 249 del exón 7 del gen p53, por PCR-RFLP y secuenciación directa del ADN obtenido a partir de cortes de tejido hepático incluidos en parafina. La proteína Core del HCV se detectó en diez de 63 muestras analizadas. El aducto AFB1-ADN se detectó en dos de 27 muestras analizadas, mientras que la mutación en el codón 249 de p53 se demostró en una de 40 muestras evaluadas hasta el momento. En una muestra se detectó en forma simultánea los biomarcadores de HCV y AFB1. Este estudio representa la primera evaluación del porcentaje de casos de HCC asociado a la infección por HBV, HCV o coinfección y el primero que se realiza en Latinoamérica para evaluar la exposición a Aflatoxina; por lo cual aportará información indispensable en posteriores estudios de salud pública y de epidemiología del HCC.

Palabras clave: virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis B, aflatoxina B1, HCC.

Virología Veterinaria

T55. ACTIVIDAD BIOLÓGICA *in vitro* DE EXTRACTOS DE *Hura crepitans* Y *Codiaeum variegatum*

LILIANA ACEVEDO¹, JORGE FORERO¹, CLAUDIA P. ÁLVAREZ¹,
NATALIA A. TABORDA¹, ALBEIRO LÓPEZ-HERRERA²

¹ Grupo de Inmunovirología-Biogénesis. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

² Grupo BIOGEM Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín, Colombia.

RESUMEN

Dada la creciente necesidad de ampliar las herramientas terapéuticas contra enfermedades animales de importancia económica, las plantas de la familia *Euphorbiaceae* constituyen particularmente, una alternativa en la búsqueda de moléculas con actividad antiviral. En este sentido, se evaluó la actividad antiviral (AAV) de los extractos hexánico (HE), en acetato de etilo (AE), metanólico (ME) y acuoso (AC) de las plantas *Hura crepitans* y *Codiaeum variegatum* contra el virus de estomatitis vesicular (VEV) y herpes virus bovino tipo-1 (HVB-1). El tamizaje primario para establecer cuales de los extractos presentaban una relación entre la actividad antiviral (AAV) y actividad citotóxica (ACX) $\geq$ a dos (margen de seguridad preliminar: MSP), mostró que los extractos evaluados no presentaron AAV contra el VEV, mientras que los extractos HE, ME y AE de ambas plantas mostraron AAV contra HVB-1, cepa Bogotá; adicionalmente, los extractos HE, ME y AC de ambas plantas presentaron AAV contra HVB-1 cepa Cooper. La cuantificación mediante el ensayo MTT de la AAV y ACX de aquellos que presentaron MSP $\geq$ a dos en el tamizaje primario mostró que la mayor AAV fue: extracto HE de *Hura crepitans* y ME de *Codiaeum variegatum* contra HVB-1 Bogotá y extracto AC de *Codiaeum variegatum* contra HVB-1 cepa Cooper. Se determinó además que los extractos activos tienen capacidad virucida al disminuir la infectividad de ambas cepas de HVB-1 y que uno de los mecanismos por los cuales se inhibe la replicación viral es impidiendo la adhesión de los virus a la célula. Este estudio es pionero en reportar AAV de extractos de *Codiaeum variegatum* y AAV de extractos de plantas de esta familia contra el HVB-1. Estos resultados plantean la necesidad de nuevos estudios para establecer las moléculas responsables de la actividad antiviral y determinar su potencial terapéutico en patologías causadas por el HBV-1.

Palabras clave: actividad antiviral, *Euphorbiaceae*, virus de estomatitis vesicular, herpes virus bovino tipo 1.

T56. DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR INDIANA A PARTIR DE FLEBOTOMOS EN EL DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA, COLOMBIA

ALEXANDRA GÓMEZ, GLORIA RAMÍREZ, JOSÉ BARRERA, VÍCTOR VERA
Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
CORPOICA

RESUMEN

Con el fin de evaluar la participación de los flebótomos *Lutzomyia* spp., como reservorios del virus de la estomatitis vesicular en áreas endémicas de Cundinamarca, Colombia, se realizaron capturas de estos insectos durante la noche con trampas CDC cada dos meses durante una año en el municipio de Silvania, posteriormente se intentó el aislamiento del virus en cultivos celulares Vero, la detección del antígeno viral mediante la técnica de fijación de complemento en los cultivos celulares infectados y la detección del genoma viral por la técnica de transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa tanto en los insectos capturados como en los cultivos celulares. De forma paralela a los días de captura se realizó el sangrado de bovinos, lechones y aves para evaluar la actividad viral mediante la prueba microneutralización en placa. Se detectó el serotipo Indiana de los cultivos celulares Vero inoculados con *Lutzomyia* spp., y se confirmó por la amplificación de una secuencia de 227 pb del gen L del virus de la estomatitis vesicular. Al mismo tiempo la actividad viral por ambos serotipos estuvo presente en los animales evaluados durante el período de estudio en los bovinos con títulos neutralizantes entre 0,45-2,25 para Indiana y New Jersey. Estos hallazgos contribuyen a explicar de forma parcial el papel de las *Lutzomyia* spp. como reservorios en áreas endémicas favoreciendo de esta forma el mantenimiento y transmisión del virus como vector mecánico o biológico del agente. Es necesario iniciar estudios detallados para esclarecer el papel que como vectores puedan tener las especies de *Lutzomyias* spp. halladas en Silvania (Colombia).

Palabras clave: estomatitis vesicular Indiana, *Lutzomias*, vector.

T57. EVIDENCIAS DE RESISTENCIA NATURAL A LA INFECCIÓN VIRAL CON DOS MODELOS DE VIRUS RNA ANIMALES

ALBEIRO LÓPEZ-HERRERA^{1,2}, SILVIO URCUQUI-INCHIMA¹, JULIÁN RUIZ¹,
YENNY GOEZ¹, FABIO N. ZULUAGA¹, JOSÉ BARRERA³, JORGE OSSA LONDOÑO¹

1. Grupo de Inmonovirología-Biogénesis. Universidad de Antioquia.

Medellín, Colombia.

2. Grupo BIOGEM Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín, Colombia.

3. Laboratorio de Biotecnología Animal CORPOICA - CEISA. Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Utilizando cultivos primarios de fibroblastos de ganado criollo blanco orejinegro (BON) [CPF-BON], se determinó el grado de resistencia/susceptibilidad (R/S) a la infección por virus de fiebre aftosa (VFA) subtipos A24 y O1 y virus de estomatitis vesicular (VEV) serotipos Indiana y New-Jersey. Para VFA se presentó polimorfismo fenotípico en R/S así: 63% de los CPF-BON fueron muy resistentes (MR), 30% resistentes (R) y 7% susceptibles (S) a VFA-A24; mientras para VFA-O1, 20% fueron MR, 42% R y 38% S. Después se evaluó la correlación entre R/S y la expresión de la integrina $\alpha V-\beta 3$ (receptor de VFA). La correlación fue moderada para VFA-A24 y hubo diferencia significativa en el promedio de expresión de integrina entre las tres categorías de R/S, teniendo menor expresión las MR; no hubo correlación entre expresión de integrina y R/S para VFA-O1. Adicionalmente, se analizó el nivel de actividad antiviral (AA) en sobrenadantes (SN) de CPF-BON infectados con VFA, que éstos presentan. La correlación total entre R/S y AA del SN fue moderada, pero las correlaciones parciales fueron excelentes: SNs con alta AA provienen de CPF-BON MR y SNs con baja AA de CPF-BON S; hubo diferencia significativa en la AA de los SN en las tres categorías de R/S y se demostró que el factor antiviral en los SNs es termoresistente. Los resultados con VEV mostraron que hay polimorfismo de R/S *in vitro* a VEV; 33% de los CPF-BON fueron MR, 50% R y 17% S a VEV-Indiana y 20% MR, 50% R y 30% S a VEV-New-Jersey. También se determinó que la apoptosis (postulada como un mecanismo de resistencia a algunos virus) no se correlaciona con la R/S a VEV; hay inducción de apoptosis en los CPF-BON, independiente de la categoría de R/S; tampoco fue detectada AA en los SNs de los CPF-BON infectados con VEV.

Palabras clave: resistencia natural, actividad antiviral, receptores, apoptosis.

T58. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA VIRUS DEL OESTE DEL NILO EN EQUINOS DEL DEPARTAMENTO DEL MAGDALENA, COLOMBIA

JOSÉ PEÑA¹, NICK KOMAR², ERIC EDWARDS², CÉSAR PONCE³, KATIUSKA ARIZA³,
HENRY PUERTA¹, CÉSAR CANTILLO¹, MARCO GONZÁLEZ¹, SALIM MATTAR¹

¹ Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad de Córdoba. Montería, Colombia.

² Special Pathogens Branch, Vector-Borne Diseases,
Centers for Diseases Control and Prevention. USA.

³ Universidad de Cooperativa de Colombia sede Magdalena. Santa Marta, Colombia.

RESUMEN

El virus del oeste del Nilo (VON) es mantenido en la naturaleza en un ciclo enzoótico ave-mosquito-ave. El vector principal son los mosquitos del género *Culex*. Las aves son los huéspedes amplificadores primarios. Humanos y caballos son huéspedes incidentales finales. En humanos las infecciones se presentan como enfermedad febril autolimitada. En casos de enfermedad neurológica puede presentarse encefalitis, meningitis o meningoencefalitis. Se han reportado brotes en África, el medio Oriente, Europa y Asia. El virus apareció por primera vez en Estados Unidos en 1999 y se ha documentado su circulación en México, Islas Caimán, Jamaica, República Dominicana, Martinica, Guadalupe, Cuba, Puerto Rico, El Salvador, Guatemala y Colombia la cual reúne todas las condiciones que favorecen su entrada y desarrollo. Recientemente se documentó su circulación en caballos de dos departamentos del Caribe colombiano. El objetivo de nuestro trabajo fue determinar anticuerpos contra VON en caballos para establecer la circulación del virus en el departamento del Magdalena. Se tomaron un total de 95 sueros equinos del departamento del Magdalena, fueron analizados por el ensayo de Reducción-Neutralización en Placa (PRNT). Solo una muestra (1%) presentó títulos de anticuerpos para VON (>10). Ninguno de estos caballos había sido vacunado contra VON previamente. El hallazgo debe ser considerado como evidencia indirecta de la circulación del VON en el departamento del Magdalena. Además, pone en evidencia que el virus sigue su diseminación en la región Caribe colombiana, teniendo en cuenta los antecedentes de su presencia en

sueros equinos de los departamentos de Córdoba y Sucre. Esfuerzos adicionales, son necesarios para aislar el virus e identificar vectores y vertebrados que participan en la transmisión del VON en Colombia.

Palabras clave: Virus del Oeste del Nilo, equinos, flavivirus.

T59. DESARROLLO DE UNA VACUNA INACTIVADA CONTRA EL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

ANA M. RUBIO, ADRIANA FERRERO, ÁLVARO CASTELBLANCO, CÉSAR SALDAÑA
Laboratorio LIMOR Biotecnología de Colombia S.A.

RESUMEN

El virus de la fiebre aftosa no es letal para su huésped, sin embargo es causante de grandes pérdidas económicas para la ganadería, dado que ocasiona disminución de peso por afecciones severas en epitelios linguales y tracto digestivo que impiden la alimentación. En Colombia existen dos serotipos: A24 Cruzeiro (VA24) y O1 Campos (VO1C), por ésta razón se produce en el laboratorio LIMOR una vacuna inactivada en vehículo oleoso respondiendo así a las necesidades de la ganadería nacional e internacional. El proceso inicia con un cultivo de células BHK21 Cl13 en suspensión, en MEM suplementado con suero fetal bovino al 10% a 37 °C durante 48 horas, (hasta obtener recuentos de 1×10^6 /mL). Posteriormente se inocula 0,01 MOI de O1 Campos y 0,001 A24 Cruzeiro en cultivos de células en monocapa (100% de confluencia), incubándolas a 37 °C para adherencia, absorción y replicación del virus. Se observa en microscopio invertido el efecto citopático. Se realiza el análisis de control de esterilidad e integridad viral, inmunogenicidad y título viral (mayor de 107,3 DICT50% para O1 Campos y 108 DICT50% para A24 Cruzeiro). El antígeno producido es almacenado a 4 °C en constante agitación (evitar degradación de proteínas). Las partidas virales de O1 Campos y A24 Cruzeiro son inactivadas con azacitidina durante 24 horas, transcurrido este tiempo se realiza un control de inocuidad en células en monocapa (verificar ausencia de partículas virales viables por ausencia de efecto citopático). Finalmente se realiza la mezcla de las fases oleosas y acuosas, (obtención de la emulsión), a la que se realizan controles microbiológicos y físico-químicos. Por ultimo es almacenada como producto en proceso en agitación a 4 °C hasta el momento de su envase, para luego ser almacenados en refrigeración.

Palabras clave: vacuna oleosa, cultivo celular, siembra y cosecha de virus, inactivación.

T60. EVIDENCIA SEROLÓGICA DE LA INFECCIÓN POR HERPESVIRUS EQUINO TIPOS 1 Y 4 EN DOS REGIONES DE COLOMBIA

JULIÁN RUÍZ¹, YENNY GÓEZ¹, SILVIO URCUQUI-INCHIMA¹, AGUSTÍN GÓNGORA²,
ALBEIRO LÓPEZ-HERRERA³

¹ Grupo Inmunovirología - Biogénesis, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

² Grupo de Investigación en Reproducción y Genética Animal (GIRGA),
Universidad de los Llanos. Villavicencio, Colombia.

³ Grupo BIOGEM, Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín, Colombia.

RESUMEN

El herpesvirus equino (HVE) es un virus de distribución mundial, causante de graves pérdidas económicas, cuya infección primaria se produce en el tracto respiratorio, progresa a través de la mucosa y puede alcanzar otros sistemas orgánicos causando abortos, muerte perinatal de potros y síndromes neurológicos. Los animales infectados se recuperan sin tratamiento, pero permanecen infectados de por vida. En Colombia, aunque se ha reportado un aislamiento de HVE, hasta la fecha no se conoce ningún estudio que demuestre la prevalencia del virus en la población equina del país. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio serológico para HVE-1 y HVE-4, en animales clínicamente sanos no vacunados contra HVE. Las muestras fueron tomadas de animales procedentes del Valle de Aburrá y Oriente cercano (departamento de Antioquia, Colombia) y del municipio de Villavicencio (departamento del Meta, Colombia), regiones con fuerte influencia en cría y manejo de equinos en el país. Se tomaron 139 muestras de suero, a partir de las cuales se realizó un *test* de ELISA indirecto, para detectar la presencia de anticuerpos dirigidos contra la glicoproteína G de HVE-1 y HVE-4. Los resultados muestran que existe una seropositividad mayor al 96% para HVE-4 en las regiones evaluadas; resultados que son comparables con la prevalencia descrita para el mismo virus en regiones enzoóticas de otros países. Para el caso de HVE-1, la seropositividad fue del 18,8% en Antioquia y 33,3% en el Meta; dicho porcentaje de prevalencia es similar al reportado en Sao Paulo, Brasil, en donde se han descrito ciclos epidémicos de infección. Cabe resaltar la importancia epidemiológica del estudio, por ser el primero en el país que reporta

seropositividad en animales clínicamente sanos, lo cual sugiere la presencia del virus y su establecimiento en la población equina de las regiones evaluadas y probablemente en otras regiones del país.

Palabras clave: herpesvirus equino, seropositividad, enzootia, latencia.

T61. INFECCIÓN POR HERPESVIRUS EQUINO TIPOS 1 Y 4 EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA Y GANGLIOS TRIGÉMINOS DE EQUINOS

JULIÁN RUÍZ¹, YENNY GÓEZ¹, SILVIO URCUQUI-INCHIMA¹, ALBEIRO LÓPEZ-HERRERA²

¹ Grupo Inmunovirología - Biogénesis, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

² Grupo BIOGEM, Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín, Colombia.

RESUMEN

Luego de su la infección primaria en el tracto respiratorio superior, el herpesvirus equino (HVE) tipos 1 y 4 hace una viremia primaria asociada a células, principalmente linfocitos T y B; mecanismo a través del cual puede alcanzar otros sistemas orgánicos produciendo abortos en ultimo tercio de gestación, muerte neonatal de potros y síndromes neurológicos. Aunque los animales se recuperan sin tratamiento, la mayoría permanecen infectados latentemente de por vida, realizando principalmente esta latencia en ganglio trigémino (GT) y en células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) (linfocitos T CD5⁺/CD8⁺); siendo estos animales el principal recurso epizootiológico de infección para otros caballos. El objetivo del presente trabajo fue demostrar la presencia del genoma viral en muestras de CMNSP de equinos clínicamente sanos y en GT de animales de planta de beneficio usando una técnica de PCR semi-anidada, la cual reconoce la glicoproteína H (gH) de HVE-1 y la gB de HVE-4. Se encontró que 23,8% de las muestras de CMNSP eran positivas para la infección por HVE-1 y 18,95% eran positivas para la infección por HVE-4; por otro lado en muestras de GT se encontró un 57,8% de infección latente por HVE-1 y 47,7% de infección por HVE-4. Estos resultados nos confirman que la infección por HVE se encuentra presente la población equina del país y que existen animales infectados latentemente, los cuales son una fuente de infección para otros equinos; por tanto se hace necesario fomentar y establecer redes de diagnóstico y sistemas de prevención y control de la enfermedad, encaminados a mejorar la situación zoonosanitaria de la población equina del país y disminuir la presentación de la enfermedad y las pérdidas económicas en un sector tan importante de la economía nacional como es el de la explotación zootécnica de equinos.

Palabras clave: herpesvirus equino, células mononucleares, latencia.

T62. *Didelphis marsupialis* COMO RESERVORIO POTENCIAL U HOSPEDERO AMPLIFICADOR PARA EL VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR, SEROTIPO NEW JERSEY EN ANTIOQUIA, COLOMBIA

CARLOS M. TRUJILLO¹, LUIS L. RODRÍGUEZ², JUAN D. RODAS¹, JOHN J. ARBOLEDA¹

¹ Grupo de Investigación en Ciencias Veterinarias, Centauro, Facultad Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

² Foreign Animal Disease Research, ARS - USDA, PIADC. USA.

RESUMEN

Los virus de estomatitis vesicular (VEV) pertenecen al género *Vesiculovirus*, familia *Rhabdoviridae*. Estos virus producen una enfermedad que es enzoótica en Centroamérica y parte norte de Suramérica. Afecta principalmente bovinos, equinos y porcinos. Aunque la enfermedad se conoce desde hace varias décadas, son muchos los aspectos de su ciclo de vida que siguen sin resolverse. El objetivo de la investigación fue el de contribuir al conocimiento de la ecoepidemiología del VEV, serotipo New Jersey (VEV-NJ) en Antioquia, probando la participación de una especie silvestre, la zarigüeya común (*Didelphis marsupialis*), como posible reservorio u hospedero amplificador de este virus, a través de una infección experimental. Para esto, se infectaron con 106,5 (DICC50) cinco zarigüeyas adultas, las cuales no presentaron anticuerpos contra el VEV-NJ. Tres fueron inoculadas vía intradermolingual (IDL) y dos vía escoriación en el hocico (EH). Todos los animales infectados desarrollaron vesículas y desprendimiento del epitelio lingual, e inflamación de las aletas nasales laterales a las 72 horas postinfección (PI), evidenciando la susceptibilidad de estos animales al virus. El VEV se aisló de hisopados nasales, oculares y de esófago-faringe, así como de lesiones; lo cual nos lleva a proponer que estas secreciones pueden ser infecciosas para otros hospederos susceptibles y fuentes de diseminación viral. La imposibilidad de detectar viremia en estos animales, indica que una fuente de infección diferente a la sangre se requiere para que pueda ocurrir la transmisión del virus. *D. marsupialis* mostró ser susceptible a VEV-NJ y exhibió síntomas similares a los observados en hospederos naturales domésticos (vacas y cerdos). Nuestros

resultados sugieren que aunque esta especie no es un buen amplificador del virus, sí podría jugar un papel como reservorio y mantener el virus en el ciclo silvestre, así mismo podría servir como un buen modelo para estudiar otros aspectos de la patogénesis de los VEV.

Palabras clave: *Didelphis marsupialis*, hospedero amplificador, reservorio, virus de estomatitis vesicular.

Virología Vegetal

T63. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ELEMENTOS CIS-REGULATORIOS PRESENTES EN EL PROMOTOR DEL GEN DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDE DEL VIRUS DEL MOSAICO DORADO DEL CHILE (PEPGMV)

JUAN C. VACA¹, KARINA LÓPEZ¹, RAFAEL F.RIVERA²

¹ Departamento Ciencias Agrícolas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Valle, Colombia.

² Departamento de Ingeniería Genética de Plantas. CINVESTAV - Campus Guanajuato. México.

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación, fue posible identificar algunos elementos de secuencia conservados mediante el análisis del promotor del gen de la proteína de la cápside de 13 Geminivirus (género *Begomovirus*) del hemisferio occidental. Tres de estos elementos llamados E, D y G por su homología en secuencia con los motivos ERE, DOF y Caja G previamente reportados en diversos promotores de plantas, fueron seleccionados con el fin de estudiar el papel que desempeñaban dentro del promotor del gen de la proteína de la cápside tomando al Virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) como modelo de estudio. El núcleo del consenso de cada uno de estos motivos fue mutado y los efectos de tales cambios dentro del promotor de PepGMV fueron evaluados mediante ensayos transitorios y análisis de la expresión específica de tejido en plantas transgénicas de tabaco. Los resultados obtenidos muestran que los motivos E, D y G son importantes para la actividad y regulación del promotor del gen de la proteína de la cápside de PepGMV e indicarían que los motivos E, D y G hacen parte de un arreglo modular de elementos cis-regulatorios que influyen no sólo en la actividad del promotor de CP de este geminivirus sino además en su expresión específica de tejido. Los gemi-nivirus se han convertido en el principal grupo de patógenos vegetales en áreas tropicales y subtropicales del hemisferio occidental. Están conformados por uno o dos componentes de DNA circular de cadena sencilla (2,6-2,8kb). Cada componente contiene unidades de transcripción divergentes separadas por una región intergénica (300nt), que porta las regiones reguladoras que permiten la expresión coordinada en espacio y tiempo de los genes virales.

Palabras clave: geminivirus, promotor víra, PepGMV, elementos cis-

Trabajos en Póster

P1. GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (HCV) EN CASOS DE CIRROSIS Y CARCINOMA HEPATOCELULAR (HCC)

CLAUDIA M. ÁLVAREZ, IRIS SUÁREZ, JUAN C. RESTREPO, GONZALO CORREA, SERGIO HOYOS, MARÍA CRISTINA NAVAS

Grupo de Gastrohepatología, Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

RESUMEN

Según registros de la OMS se estima una prevalencia del 3% de la infección por el HCV a nivel mundial. Del 50%-80% de los pacientes infectados desarrollan infección persistente crónica y cerca del 20% de los casos progresan a cirrosis, que representa el principal factor de riesgo para el desarrollo de HCC. Hasta el momento seis genotipos del HCV han sido descritos, con un grado de divergencia del 30%. El objetivo de este estudio fue determinar los genotipos y subtipos del HCV en casos de cirrosis y HCC. Los casos estudiados incluyeron diez muestras correspondientes a explantes hepáticos, 6 provenientes de pacientes con diagnóstico de HCC

y cuatro provenientes de pacientes con diagnóstico de cirrosis asociados a la infección por HCV. Los explantes fueron conservados a -70 °C para posterior extracción del ARN total por el método TRIzol ®(Invitrogen). La amplificación de la región 5'UTR del genoma viral se realizó mediante RT-PCR *nested*. A partir del RNA total se realizó la síntesis de cDNA usando *random primers*. Luego de la PCR *nested* se obtuvo un producto de 236pb, correspondiente a la región nt 78 a nt 314. El genotipo se determinó mediante la técnica RFLP utilizando las enzimas de restricción MvaI y Bsh1236I con posterior análisis de los productos de digestión mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%. El patrón de bandas observado en los diez casos correspondió al genotipo 1, de los cuales ocho presentaban el patrón de subtipo 1a y 2 de subtipo 1b. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado en estudios previos realizados en pacientes con infección persistente en Medellín, Bogotá y Cali, Colombia. La identificación del genotipo viral es importante en la elección de los esquemas de tratamiento antiviral, teniendo en cuenta que en la infección por HCV genotipo 1 está asociado con resistencia al tratamiento con Interferón.

Palabras clave: HCV, Genotipos, Subtipos, RT-PCR *nested*, RFLP.

P2. BÚSQUEDA DE PROTEÍNAS INTERACTUANTES CON LA REGIÓN 5' NO TRADUCIDA DEL VIRUS DEL MOSAICO DE LA CAÑA DE AZÚCAR DEL GRUPO DE MAÍZ

GIOVANNI CHAVES-BEDOYA¹, ANA GUTIÉRREZ², SILVIA VALDÉS¹, LAURA SILVA ROSALES¹

¹ Centro de investigación y estudios avanzados, CINVESTAV, Campus Guanajuato, México.

² Centro de investigación y estudios avanzados, CINVESTAV, Zacatenco, México DF.

Un aislamiento del virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV) grupo maíz proveniente de la región de Veracruz en la costa Este de México, fue utilizado para buscar proteínas de su hospedante que interactuaran con las regiones no traducidas (RNT) del genoma viral, estas fueron amplificadas por RT-PCR y posteriormente clonadas y secuenciadas. La región 5' NTR tiene una longitud de 149 pb y la región 3' RNT de 245pb. Con los transcritos de las regiones NTR marcados radiactivamente se hicieron ensayos de retardo electroforético utilizando extractos proteicos totales de maíz sano e infectado y sintomático para SCMV. A continuación realizamos ensayos de entrecruzamiento ultravioleta con las RNT y proteínas de maíz. Preliminarmente hemos encontrado al menos dos proteínas de aproximadamente 25 y 37 kDa respectivamente que se unen y forman complejos estables con las RNT del RNA genómico del SCMV. Se están llevando a cabo ensayos de cromatografía de afinidad RNA-proteína para purificar y analizar por espectrometría de masas MALDI (MALDI-MS) (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry) las proteínas candidatas de interacción.

Palabras clave: interacción RNA-proteína.

P3. CARACTERIZACIÓN DE GENOTIPOS DE AISLADOS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B EN MEDELLÍN, COLOMBIA

FABIAN M. CORTÉS, GONZALO CORREA, JUAN C. RESTREPO, MARÍA C. NAVAS

Grupo Gastrohepatología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

Medellín, Colombia.

RESUMEN

Se estima que más de dos billones de individuos han sido infectados por el virus de la hepatitis B (HBV) en el mundo, de los cuales 350 millones presentan infección persistente. Ocho genotipos han sido caracterizados para HBV, con un grado de divergencia del 8%, designados con las letras A-H. Los genotipos F y H se consideran autóctonos de Sur y Centro América, respectivamente; sin embargo, también ha sido descrita la circulación de los genotipos A, B, C, D, y G en Latinoamérica. Algunas evidencias sugieren cierta relación entre la infección con algunos genotipos virales, mayor riesgo de carcinoma hepatocelular y baja respuesta a la terapia antiviral. En Colombia no han sido realizados estudios de genotipificación de HBV; el único registro disponible corresponde a un aislado proveniente de un paciente con infección persistente, clasificado como genotipo F. En este estudio se pretende realizar la caracterización de genotipos de aislados de individuos con infección persistente por HBV remitidos al Hospital Pablo Tobón Uribe de la ciudad de Medellín. El DNA viral será obtenido a partir de suero proveniente de pacientes con diagnóstico clínico y de laboratorio de infección por HBV. Los genotipos serán caracterizados por las técnicas de PCR y RFLP. Una vez realizado la PCR, utilizando primers específicos para la región S del genoma viral, los productos amplificados sometidos a digestión con las enzimas de restricción StylI, BsrI, DpnI, HpaII y EaeI, serán cargados en geles de agarosa al 2% para la obtención del patrón electroforético. Ensayos de estandarización están siendo realizados, utilizando aislados

virales previamente caracterizados. Una vez identificadas los genotipos de los aislados de pacientes, se tratará de evaluar si existe correlación con la presentación clínica de la infección.

Palabras clave: virus de la hepatitis B, genotipos, RFLP.

P4. EVALUACIÓN DEL RECONOCIMIENTO DE LOS ANTICUERPOS TIPO IgA-S, IgG E IgA PRESENTES EN SALIVA DE PARÓTIDA Y SUERO, DIRIGIDOS CONTRA LAS PROTEÍNAS V1/V2 GLICOSILADAS Y NO GLICOSILADAS DEL VIH-1, EN DOS COHORTES DE PACIENTES SEROPositivos

VIVIANA GRANADOS¹, LEIDY D. PIEDRAHITA², CLAUDIA P. PATIÑO², ABRAHAM PINTER³, CHRISTIAN GENIN¹, SERGE RIFFARD¹, SILVIO URCUQUI-INCHIMA²

¹ Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, Université Jean Monnet, Saint Etienne, Francia.

² Grupo de Inmunovirología-Biogénesis, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

³ Laboratory of Retroviral Virology, Public Health Research Institute. Newark, USA.

RESUMEN

La glicoproteína de envoltura (gp120) del VIH-1, está compuesta por cinco regiones constantes y cinco regiones variables (V); además presenta 24 sitios potenciales de N-glicosilación. Se ha descrito que estos carbohidratos juegan un papel muy importante en el reconocimiento del virus durante la respuesta inmune. Las regiones V1/V2/V3, juegan un papel muy importante en los cambios conformacionales, necesarios para una eficiente fusión virus-célula, en la etapa temprana del ciclo replicativo del genoma viral. Estudios previos han mostrado que existen anticuerpos neutralizantes de tipo IgA capaces de neutralizar aislamientos primarios. Para el presente trabajo, las regiones que codifican para V1/V2 se amplificaron a partir de genoma de aislamientos primarios de 3 subtipos (A, B y C) de VIH-1 y se clonaron en un vector de expresión. Las proteínas recombinantes V1/V2 fueron producidas y utilizadas para determinar el papel de la glicosilación en el reconocimiento de los anticuerpos IgA secretora (IgA-S), IgA e IgG, provenientes de dos cohortes (francesa y colombiana) de individuos VIH-1 seropositivos. En las dos cohortes se encontraron niveles significativos de IgA-S, IgA e IgG sérica contra las diferentes proteínas recombinantes. Se observaron diferencias significativas en cuanto al reconocimiento de anticuerpos, principalmente los de tipo secretor, provenientes de saliva de parótida. Al evaluar el papel de la glicosilación en dicho reconocimiento, se encontró que los anticuerpos secretadores reconocen mejor las formas glicosiladas que los anticuerpos séricos. Estos resultados muestran que existen diferencias entre la inmunidad secretora y la sistémica en respuesta a la infección por el VIH-1. Probablemente esos anticuerpos secretadores están implicados en la neutralización de diferentes subtipos virales a nivel de la mucosa oral. De ahí la importancia de continuar con este tipo de estudios, ya que su validación, contribuiría a la búsqueda de nuevas alternativas profilácticas para el tratamiento del VIH-1.

Palabras clave: neutralización, inmunología, gp120, reacción cruzada.

P5. REMODELACIONES DEL CITOESQUELETO DE ACTINA, DURANTE LA INFECCIÓN CON VIRUS DENGUE

CAROLINA QUINTERO¹, ANDREA TRUJILLO¹, MARLÉN MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ¹, ÁLVARO BARRERA², JUAN C. GALLEGO-GÓMEZ²

¹ Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET; Línea de Investigación Biología Viral; Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

² Grupo de Neurociencias de Antioquia; Línea de Investigación en Neurobiología; Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

RESUMEN

El virus dengue (DENV) es una de las principales problemáticas de salud a nivel mundial; por lo tanto, estudios de la relación virus - célula hospedera se hacen relevantes, debido a que pueden dirigirse a encontrar posibles blancos terapéuticos. En distintos virus animales y de plantas, el citoesqueleto (microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos de actina) participa en distintos pasos del ciclo vital: entrada, transporte intracelular, replicación, ensamblaje y salida. Está demostrado que la reorganización de la actina, está mediada por acción de las Rho GTPasas, proteínas que además de regular las dinámicas del citoesqueleto, participan en transcripción, tráfico de vesículas, diferenciación y proliferación celular. Para confirmar la relación existente entre la infección con el DENV y las remodelaciones del citoesqueleto de actina, se han infec-

tado células VERO y BHK-21 con DENV-2, y mediante microscopía de fluorescencia se ha detectado la proteína de envoltura y la actina, observándose cambios en la morfología celular durante la infección. Con el fin de determinar la participación de las GTPasas en las remodelaciones de la actina durante la infección con DENV, se han transfectado las líneas celulares VERO, 293T y BHK-21 con plásmidos expresando RhoA y Rac1 -en versiones constitutivamente activa y dominante negativa- y fusionadas a la proteína verde fluorescente (GFP), con lo que se determinó una buena eficacia de transfección para las 293T y las BHK-21, lo cual sugiere que estas líneas celulares serán útiles para nuestros próximos ensayos de transfección-infección. Estos experimentos aportarán nuevos datos sobre la biología del virus dengue, a nivel celular y molecular.

Palabras clave: dengue, citoesqueleto, actina, Rho GTPasas.

P6. EFECTO DE LA ISOFORMA TRUNCADA DE LA PROTEÍNA CORE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (HCV) EN MARCADORES DE ACTIVACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS (DC) HUMANAS

ALFREDO RÍOS, FABIÁN CORTÉS, IVONNE RUBIO, MARÍA CRISTINA NAVAS
Grupo de Gastrohepatología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.
Medellín, Colombia.

RESUMEN

La infección por el HCV se caracteriza por su alta frecuencia de infección persistente (80%), debido entre otros factores a la capacidad del virus para infectar células dendríticas, impidiendo el aclaramiento viral. DC provenientes de pacientes con infección persistente por el HCV presentan un bajo nivel de expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, lo que implica la modificación funcional de las DC y por tanto la alteración de la respuesta inmune. Se ha postulado que la proteína Core del HCV modifica la función de estas células, aunque el efecto directo sobre las DC no ha sido completamente esclarecido. En este estudio se propone evaluar la capacidad de la proteína Core truncada del HCV para inducir modificaciones funcionales de las DC. Las DC son obtenidas por diferenciación de monocitos de sangre periférica en presencia de GM-CSF e IL-4. Las DC inmaduras son obtenidas en el día siete de diferenciación y las DC maduras luego de incubación adicional por 72 horas con Lipopolisacárido (LPS). La proteína Core truncada del HCV se produjo en *Escherichia coli* y corresponde a la isoforma de 120aa deletada en la región C-terminal. Con DC inmaduras se realizaron ensayos de endocitosis de la proteína, además se evaluó por citometría de flujo el nivel de expresión de CD86 en DC maduras e inmaduras incubadas con la proteína recombinante. Ensayos preliminares del efecto de la proteína Core truncada del HCV sobre la función de las DC maduras evidenciaron una leve disminución del marcador CD86, comparado con las DC control con o sin estímulo con LPS. En estos ensayos se evaluó adicionalmente la isoforma de Core de 190 aa obtenida en el sistema de baculovirus; sin embargo, los resultados fueron invalidados al comprobarse contaminación con LPS. Se están realizando nuevos ensayos para confirmar la disminución del nivel de CD86 observado en los ensayos preliminares con la isoforma truncada de core de 120 aa.

Palabras clave: virus de la hepatitis C, células dendríticas, CD86.