

# La influencia de las plagas antiguas y modernas

Beatriz S. Méndez

*Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.*

*Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. Argentina*

[bea@qb.fcen.uba.ar](mailto:bea@qb.fcen.uba.ar)

*En recuerdo de los que murieron de SIDA sin saber la causa de su enfermedad.*

La influencia de las plagas puede pasar inadvertida a lo largo de la historia, sin embargo, su aparición produjo cambios históricos de magnitud.

*Yersinia pestis* ocupa un lugar destacado en ese aspecto. Responsable de la Plaga de Justiniano (541-543) se supone que causó innumerables muertos y marcó el fin del Imperio Romano.

Entre 1346 y 1353, bajo el nombre de Peste Negra, se extendió por Europa, Asia y África causando la muerte de 75 a 200 millones de personas. Indudablemente semejante fenómeno produjo profundos cambios y algunos de ellos, como la disminución del número de habitantes, mejoró la salud y las posibilidades económicas de las poblaciones [1,2].

Las enfermedades causadas por bacterias siguieron afectando tanto a seres humanos como a animales hasta el siglo XX. El descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming tuvo lugar el 1928 [3] y a partir de 1943 se descubrieron y sintetizaron un gran número de antibióticos que dieron cuenta de la mayoría de infecciones causadas por bacterias.

Los virus, por su parte siguieron produciendo enfermedades, algunas de las cuales causaron y causan problemas de difícil solución.

En 1981 el SIDA comenzó a presentarse en Estados Unidos con la aparición de un pequeño número de casos que tenían la característica de afectar a hombres jóvenes homosexuales, principalmente en las ciudades de San Francisco y Nueva York. Las enfermedades que presentaban eran el sarcoma de Kaposi que se da habitualmente en individuos de mayor edad y la neumonía originada por *Pneumocystis carinii* que afecta a enfermos con linfomas y no eran habituales en hombres jóvenes. Estos hechos condujeron a definirlos como un síndrome que fue llamado GRID (gay-related immune deficiency) por sus siglas en inglés.

Las características tan particulares de la enfermedad llamaron la atención dentro de la comunidad científica y varios laboratorios comenzaron a investigar sus causas. En el Instituto Pasteur Françoise Barré-Sinoussi y Luc Montagnier lograron en 1983 aislar al agente responsable de la enfermedad al que nombraron LAV (lymphadenopathy virus). Más adelante el virus fue denominado HIV (human immunodeficiency virus) y la enfermedad que produce AIDS (acquired immunodeficiency disease syndrome) cuyas versiones en español son VIH y SIDA.

Barré- Sinoussi y Montagnier recibieron el Premio Nobel en 2008



**Figura 1:** Barré –Sinoussi en Yaoundé, Cameroon. 2008. nobelprize.org

VHI es un virus RNA de cadena simple, que al fusionarse con una célula receptora libera su RNA dentro de la misma. El virus lleva en su genoma una enzima llamada transcriptasa inversa que tomando como molde el RNA sintetiza un DNA de cadena doble. Este puede entrar en el núcleo celular y permanecer en el mismo sin replicarse o también iniciar un proceso de replicación originando nuevas copias, que conducirán a la formación de nuevos virus que a su vez infectarán otras células.

Paralelamente al conocimiento alcanzado sobre la biología del virus la Organización Mundial de la salud organizó la supervisión de poblaciones a escala mundial y se pudo comprobar que VHI podía infectar también a personas heterosexuales y asimismo transmitirse de madres infectadas a los bebés.

Para solidarizarse con las víctimas de esta enfermedad fue creado como símbolo un pequeño moño rojo para llevar prendido en la vestimenta. Pronto se convirtió en un símbolo de la prevención y lucha contra el SIDA.



**Figura 2:** Cinta roja símbolo de solidaridad con las personas que portan el virus

Múltiples esfuerzos se realizaron para tratar la enfermedad. Las estrategias fueron la búsqueda de drogas que la controlasen y asimismo encontrar una vacuna. El fármaco más utilizado durante el comienzo de la pandemia fue AZT ( zidovudina ) que es un inhibidor de la transcriptasa inversa. Pronto se vio que esta, como así otros fármacos utilizados individualmente no eran efectivos ya que carecían de efectos duraderos. En 1996 se comenzó a probar un tratamiento antiviral denominado HAART (highly active antiretroviral treatment) una combinación de distintos antivirales que redujeron en valores entre 60% y 80% las muertes originadas por SIDA.

En la actualidad se dispone de más de 30 medicamentos efectivos contra VIH. Si se dan en una combinación de 3 o más y si los pacientes son tratados al poco tiempo de ser infectados y prosiguen el tratamiento a lo largo de su vida pueden esperar una cierta expectativa de vida casi normal [4].

Aun así este logro no fue suficiente para detener el avance de la enfermedad. A pesar de los esfuerzos, tomando como ejemplo hasta el año 2014, alrededor de 39 millones de personas habían muerto a causa de esta enfermedad

Fue entonces cuando las Naciones Unidas decidieron lanzar un programa que encarase controlar y eliminar radicalmente la epidemia de SIDA mediante el programa UNAIDS cuya propuesta era alcanzar los siguientes objetivos para el año 2020 [5]:

1. 90% de las personas infectadas por VIH debían conocer su estado o sea que todas ellas hubiesen sido diagnosticadas.
2. 90% de las personas diagnosticadas con VIH debían recibir tratamiento antiviral.
3. 90% de las personas que recibieron tratamiento antiviral debían presentar supresión del virus.

Veamos los datos de 2016

<b>Objetivo 1 (ya cumplido)</b>		
70%	81%	79%
(51%-84%)	(58%-89%)	(70%-84%)
A nivel mundial	América Latina	Argentina
<b>Objetivo 2</b>		
77%	72%	82%
A nivel mundial	América Latina	Argentina

Objetivo 3		
82%	79%	77%
A nivel mundial	América Latina	Argentina

El programa llevado a cabo por las Naciones Unidas 90–90–90 ha obtenido logros importantes que merecen ser destacados. Cerca de 19.5 millones de personas han podido acceder a terapia anti retrovirus, por primera vez la mitad de las personas portadoras de VIH reciben un tratamiento antiviral y también importante muchos países han tomado a su cargo los tratamientos de VIH.

Si el objetivo propuesto por el programa se cumple en el año 2020 significará que la presencia de virus no será detectada en aproximadamente el 73% de la población mundial portadora de HIV. Si se diese dicha reducción se disminuiría a la vez la transmisión entre persona a niveles tales que el SIDA no sería considerado una pandemia. Aunque hay que reconocer que los valores señalados son generales y que si en general el 49% de las personas infectadas no conocían su estado el problema no parece de fácil solución.

¿Y las vacunas?

Los intentos de lograr vacunas desde 1998 han fallado. Algunas fallas fueron causadas por los vectores, generalmente parte del genoma de otros virus. En algunos casos los controles revelaron que había más infecciones en los que recibían la probable vacuna comparados a los que recibían el placebo. El último intento fallido fue al principio de 2020 en África. La respuesta de la máxima responsable: “*We have an answer – the regimen simply didn’t work.*” (Tenemos una respuesta el régimen simplemente no funcionó)[6] resume lo que ha estado sucediendo desde el principio dado que VIH es un organismo difícil de aceptar una vacuna. Se reproduce rápido es decir que resiste las defensas inmunológicas creadas por la vacuna tan rápidamente como desarrolla resistencia a la droga. Es un retrovirus por lo cual se inserta en el genoma humano y no es detectable por el sistema inmunológico.

Los Institutos de Salud de los estados Unidos (NIH) dentro de su programa para probar la eficacia de la (las) vacuna(s) para VIH ha desarrollado varios programas. Uno de ellos llamado MOSAICO, permitirá evaluar si una vacuna diseñada para producir una repuesta inmune contra una variedad de cepas de VIH, funciona de forma segura y efectiva para prevenir la adquisición de VIH en hombres que tienen relaciones sexuales con hombres y personas transgénero. Un estudio complementario comenzado en 2017 se realiza en mujeres que viven en cinco países del sur de África. Instituciones de Argentina, Brasil, España, Italia, Mexico, Perú y Polonia participan en el estudio.

El mismo está basado en la existencia de múltiples subtipos de VIH de manera que las vacunas a ensayar contendrán elementos de varios subtipos para inducir una amplia variedad de respuestas [7].

La Organización Mundial de la Salud se muestra escéptica sobre los posibles logros de Las Naciones Unidad y del NHI. Sus razones se basan en que uno de los mayores desafíos de la respuesta al SIDA no ha variado en 30 años: el virus afecta a la gente de poblaciones vulnerables que son marginalizadas y estigmatizadas. Justamente, incrementos significativos de VIH se dan en el sur de África en grupos discriminados por pobreza, drogadicción, actividades sexuales, presos, etc. Precisamente a los que no llega ayuda médica.

1982- 2020 casi cuarenta años han pasado y solo ahora aparecen tratamientos efectivos para controlar la enfermedad sin efectos colaterales dañinos. Sin embargo, llevar a la práctica a escala mundial dicho tratamiento, que es de por vida, presentará problemas de orden económico y cultural. Esperemos que UNAIDS sea efectivo. Todos los intentos para generar vacunas hasta ahora fallaron y es de esperar que los enfoques que desarrolla NIH aporten una solución.

A veces los humanos estamos muy indefensos y sin embargo seguimos siendo soberbios.

#### Referencias:

1. **Wagner DM et al.** (2014) *Yersinia pestis* and the Plague of Justinian 541-543 AD: a genomic analysis. *Lancet Infectious Diseases* 14 319-326
2. **Herlihy D** (1997) *The Black Death and the Transformation of the West* (Cambridge, Mass.: Harvard University Press).
3. **Fleming A** (1944) The discovery of penicillin. *British Medical Bulletin* 2(1):4-5
4. **Fauci, AF** (2017) An HIV Vaccine is Essential for Ending the HIV/AIDS Pandemic. *Jama, Network* October 24/31

5. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS(UNAIDS). Ending AIDS. Progress towards the 90-90-90 targets targets. [http://www.unaids.org/en/resources/documents/2017/20170720\\_GlobalIDS\\_update\\_2017](http://www.unaids.org/en/resources/documents/2017/20170720_GlobalIDS_update_2017)
6. <http://www.aidsmap.com/news/feb-2020/hiv-vaccine-trial-failure-wake-call-southern-africa-say-researchers>
7. **National Institutes of Health** (2019) NIH and partners to launch HIV vaccine efficacy trial in the Americas and Europe
8. **World Health Organization** (2020) Why the HIV epidemic is not over



ISSN 1666-7948

[www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)

*Revista **QuímicaViva***

*Número 1, año 19, Abril 2020*

[quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)

# Pandemia por SARS-CoV-2

Erina Petrerá

*Laboratorio de Virología: Agentes antivirales y citoprotectores. Departamento de Química Biológica.*

*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.*

[epetrera@qb.fcen.uba.ar](mailto:epetrera@qb.fcen.uba.ar)

Cuando comenzamos el 2020 con nuevos proyectos y metas por cumplir, nunca pensamos que a esta altura del año íbamos a estar aislados para prevenir una nueva enfermedad. Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) fue notificada el 31 de diciembre de 2019 sobre varios casos de neumonía atípica en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei en China. Rápidamente, el grupo de investigación del Dr. Zhang de la Universidad Fudan de Shanghai logró secuenciar el genoma del virus e identificarlo como un nuevo coronavirus al que se denominó 2019-nCoV y posteriormente se clasificó con el nombre de SARS-CoV-2. La obtención de la secuencia genómica permitió el diseño de las pruebas de diagnóstico que determinaron los casos positivos, los cuales fueron aislados y tratados. A pesar de las medidas efectivas y oportunas que llevó a cabo China, entre ellas el cierre de fronteras, el 30 de enero de 2020, la OMS declaró el brote como "emergencia de salud pública de interés internacional", requiriendo de una respuesta coordinada a nivel mundial debido a que habían sido reportados más de 9.500 casos confirmados con 213 muertes. A esa altura del año ya había 80 casos dispersos en 19 países fuera de China, a pesar del cierre de fronteras y de la disminución del número de vuelos. Menos de un mes y medio después, el 11 de marzo, el número de casos confirmados ascendía a 118.319 con 4.292 casos dispersos en 113 países o territorios. Ese día la OMS declaró el brote de COVID-19 (por coronavirus disease 19) como pandemia debido a la gran dispersión del virus en diferentes países de varios continentes.

La mayoría de los coronavirus infectan animales, aunque varios de ellos pueden infectar a personas y enfermarlas de forma leve o moderada. En raras ocasiones algunos virus de animales pueden mutar y adquirir la capacidad de infectar a humanos para luego transmitirse de persona a persona. En el caso de los coronavirus esto pasó con el SARS-CoV, el MERS-CoV y ahora con el SARS-CoV-2.

El primer brote de enfermedad grave por un coronavirus fue el del SARS-CoV en noviembre de 2002. Este brote tomó por sorpresa a toda la comunidad médica y científica que recién en abril de 2003 pudo identificar al causante de la neumonía atípica que se denominó SARS, por las siglas en inglés de síndrome respiratorio agudo grave. Este brote terminó gestando la primera pandemia del siglo 21. Comenzó en la provincia china de Guangdong y afectó a más de 8000 pacientes causando 774 muertes en 26 países de 5 continentes. El 5 de julio de 2003 la OMS declaró la contención de los brotes de SARS y llamó a continuar con la vigilancia. Por otro lado, el coronavirus del síndrome respiratorio de Medio Oriente (MERS-CoV) se identificó en 2012 en una muestra pulmonar de un paciente de Jeddah, Arabia Saudita. Desde el primer informe de MERS-CoV en septiembre de 2012, el número de casos notificados a la OMS ha aumentado constantemente. Hasta fines de enero de 2020, fueron reportados 2519 casos de MERS confirmados por laboratorio, la mayoría provenientes de Arabia Saudita, entre los que hubo 866 muertes (34,3% de mortalidad).

Aún no se ha establecido el origen del nuevo virus, aunque los casos iniciales están asociados con el mercado de mariscos de Huanan donde se venden animales domésticos y salvajes para consumo. Si bien muchos de los primeros pacientes trabajaron o visitaron el mercado, ninguno de los casos exportados tuvo contacto con él, lo que sugiere una transmisión de persona a persona o una fuente animal más extendida. Se cree que el virus podría tener su origen en los murciélagos, ya que comparten gran homología de secuencia, pero que ha tenido que pasar por otra especie, posiblemente el pangolín por las mutaciones adquiridas, para poder infectar a humanos.

El SARS-CoV-2 es un virus que se transmite por contacto estrecho con el infectado, la enfermedad es como una gripe que generalmente es leve o moderada y se estima que una alta proporción de la población la cursa de forma asintomática. Sin embargo, aproximadamente el 14% desarrolla una enfermedad grave que requiere hospitalización y soporte de oxígeno y el 5% requiere ingreso a una unidad de cuidados intensivos. El grupo de riesgo lo constituyen

los adultos mayores de 60 años con problemas coronarios, diabetes o enfermedades respiratorias. La tasa de mortalidad varía entre el 1 y el 6% según el país, pero al no tener en cuenta los casos asintomáticos, se estima que es menor. Por el momento, de los tres coronavirus que ocasionan falla respiratoria severa, el MERS-CoV es el que causa mayor mortalidad y el SARS-CoV-2 es el más contagioso.

No hay un tratamiento específico disponible para la COVID-19, es debido a esto que la prevención es fundamental para evitar el contagio. Las medidas a tomar son simples: mantener el distanciamiento social, lavarse las manos con agua y jabón regularmente y toser y estornudar en el pliegue del codo. Como el virus se propaga por las gotas que se expelen al toser o estornudar, es aconsejable el uso de cubrebocas para evitar la dispersión del virus desde las personas infectadas y aún asintomáticas. Se ha comprobado que cuando las gotas caen, depositan el virus que puede permanecer activo hasta nueve días dependiendo del material de la superficie receptora. Por lo tanto, lavarse las manos regularmente sigue siendo esencial y además se aconseja desinfectar las superficies amplias con hipoclorito de sodio al 0,1% y las pequeñas con alcohol al 70%.

Debido a la falta de fármacos específicos para inhibir al SARS-CoV-2 y a la urgencia por encontrar tratamientos para atenuar la gravedad de la enfermedad, se están llevando a cabo varios ensayos clínicos en distintos lugares del mundo. Las drogas que se están estudiando son diversas y, la mayoría han sido aprobadas para uso clínico en el tratamiento de otras enfermedades. La más prometedora, pero que aún está en fase experimental es el antiviral Remdesivir. Se trata de un inhibidor de la RNA polimerasa viral desarrollado para combatir al virus del Ébola que no ha tenido un buen desempeño en el último brote de esta enfermedad pero que puede inhibir a los coronavirus responsables del SARS y MERS. Su reciente aplicación a un grupo reducido de pacientes graves de COVID-19 ha mostrado su efectividad y, aunque es muy preliminar, el resultado parece ser alentador. Otra droga en evaluación que ha generado bastante polémica es la cloroquina que se utiliza para tratar la malaria y la artritis reumatoide. Este medicamento inhibe la entrada del virus a la célula al disminuir la acidez de los endosomas celulares. Los resultados previos son controvertidos, algunos estudios aseguran que su uso produce una mejora en los pacientes de COVID-19 mientras que otros declaran que debe usarse a muy alta concentración resultando tóxica para el organismo. Otros antivirales en estudio son el lopinavir y el ritonavir, dos inhibidores de proteasas que se utilizan para tratar la infección con VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana). Su uso en pacientes con SARS y MERS ha arrojado resultados ambiguos. Al evaluar su eficacia en enfermos de COVID-19 no se vieron diferencias entre los tratados y el grupo control, aunque se estima que si se utiliza en etapas más tempranas de la enfermedad podría arrojar mejores resultados. También se está evaluando la acción de ambos antivirales en combinación con el Interferón-beta, una molécula involucrada en la regulación de la inflamación que ha demostrado ser efectiva en monos infectados con MERS. Otras drogas en estudio son los fármacos antiinflamatorios, ya que una de las hipótesis planteadas es que la respuesta inmune al coronavirus puede ser exacerbada en algunos casos y llevar a un daño pulmonar mayor. El uso de un regulador de la respuesta inmune podría mejorar el cuadro clínico, por lo tanto, se están evaluando Tocilizumab, Sarilumab y Siltuximab que son agentes inmunosupresores que inhiben a la IL-6 (Interleuquina 6) y se utilizan en el tratamiento de la artritis reumatoide, los dos primeros, y para el tratamiento de la enfermedad de Castleman multicéntrica, el último.

La lista de drogas a evaluar se va actualizando a medida que avanza el conocimiento de la enfermedad y cada vez aumenta su número. Otro tratamiento que se quiere evaluar es el uso del suero de convaleciente. Los pacientes que se recuperan de una enfermedad infecciosa tienen grandes cantidades de anticuerpos específicos en su sangre. Entre estos anticuerpos hay unos especiales llamados anticuerpos neutralizantes que se unen al virus y no le permiten infectar a la célula. Cuanto mayor es la cantidad de anticuerpos neutralizantes, mayor será el efecto. No todos los virus inducen la producción de estos anticuerpos en igual medida, ni todos los pacientes generan grandes cantidades de anticuerpos. El plasma del paciente recuperado se estudia para descartar otras infecciones y es administrado al nuevo paciente. Este tratamiento se utiliza en nuestro país en los casos de Fiebre Hemorrágica Argentina desde 1970 siendo altamente efectivo, pero se ha usado también en brotes de Ébola, SARS, Influenza A y otras infecciones virales sin resultados concluyentes. Mientras en algunos casos han disminuido levemente la mortalidad, en otros casos no ha habido diferencia. En pacientes con COVID-19, la aplicación de plasma inmune parece contribuir a su recuperación, pero al tratarse de casos severos con otras comorbilidades para las cuales se administran drogas, no es concluyente que la mejoría se deba únicamente al plasma y no a la combinación de todos los tratamientos. Los estudios clínicos llevan tiempo, pero al terminar veremos cuáles son las drogas que se podrán usar con mayor evidencia científica. Tampoco hay vacunas para este nuevo virus, pero la buena noticia es que hay más de 50 en investigación.



Luchar contra un virus desconocido es muy complejo, se va aprendiendo sobre la marcha, de los aciertos y sobre todo de los errores. Este coronavirus se fue extendiendo de país en país y con él la información recogida, los tests realizados, el número de infectados y de muertos. Si bien la OMS publicó los protocolos a seguir, cada país los aplicó como pudo o como quiso, entonces los datos obtenidos son difíciles de comparar entre sí porque surgen de distintas políticas sanitarias. ¿Debe testearse a la mayor cantidad posible de habitantes? ¿Es necesaria la cuarentena obligatoria extendida a toda la población? ¿Hasta cuando hay que aplanar la curva? Son muchas las preguntas que surgen, lo cierto es que hemos sido testigos de la saturación de la capacidad hospitalaria en varios países donde la imposibilidad de tratar a los enfermos graves ha llevado a tasas de mortalidad muy altas. Y este es el gran desafío sanitario ya que la mortalidad parece ser similar a la producida por la gripe estacional, pero con una tasa de contagio superior y si muchos casos son severos al mismo tiempo, los hospitales colapsan. Además, los trabajadores de la salud se enfrentan a jornadas extenuantes y en condiciones que no son las óptimas para su propia protección y terminan contagiándose. La cuarentena o el distanciamiento social máximo parece ser una solución efectiva ya que logra pausar el contagio y aplanar la curva del número de casos positivos en función del tiempo. Esto permite ganar tiempo para preparar a los hospitales y hacer un uso más mesurado de las unidades de terapia intensiva, sin saturar su capacidad, ya que son las que van a ser necesarias para salvar a los casos más severos de COVID-19.

Esta pandemia será recordada fundamentalmente debido a la cuarentena dispuesta en casi todo el mundo. Porque con distintos matices y en mayor o menor medida el mundo está paralizado a la espera de que el coronavirus desaparezca de escena. Este es un acontecimiento que genera mucha incertidumbre, sobre todo desde el punto de vista económico, aunque también nos enfrenta a la certeza de que cuando abandonamos nuestra conducta habitual la tierra respira y los animales se pasean por las calles deshabitadas.

Seguramente esta pandemia nos permitirá reflexionar sobre variados temas, lo que vale la pena pensar es cuán importante es que el sistema sanitario funcione siempre y que la investigación científica no se detenga, ya que nunca sabemos cuando puede aparecer un nuevo brote infeccioso que nos ponga en jaque.

Nota: Al terminar esta nota, los casos confirmados son 2 719 897 y las muertes 187 705.

#### Referencias:

**Andersen KG, Rambaut AW, Lipkin I, Holmes EC, Garry RF** (2020) The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine* 26: 450–452.

World Health Organization. Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected: Interim guidance V 1.2. <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/clinical-management-of-novel-cov.pdf>

World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-2019) situation reports. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>

World Health Organization. Middle East respiratory syndrome. <http://www.emro.who.int/health-topics/mers-cov/mers-outbreaks.html>.

**Gabutti G, d'Anchera E, Sandri F et al.** (2020) Coronavirus: Update Related to the Current Outbreak of COVID-19. *Infectious Diseases and Therapy* 8:1-13. <https://doi.org/10.1007/s40121-020-00295-5>

**Kampf G, Todt D, Pfaender S, Steinmann E.** (2020) Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *Journal of Hospital Infection* 104: 246-251

**Dietz L, Horve PF, Coil DA, Fretz M, Eisen JA, Van Den Wymelenberga K.** (2019) Novel Coronavirus (COVID-19) Pandemic: Built Environment Considerations To Reduce Transmission. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00245-20>.



ISSN 1666-7948

[www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)

**Revista Quimica Viva**

Número 1, año 19, Abril 2020

[quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)



# RNA virus, emergencia y coronavirus

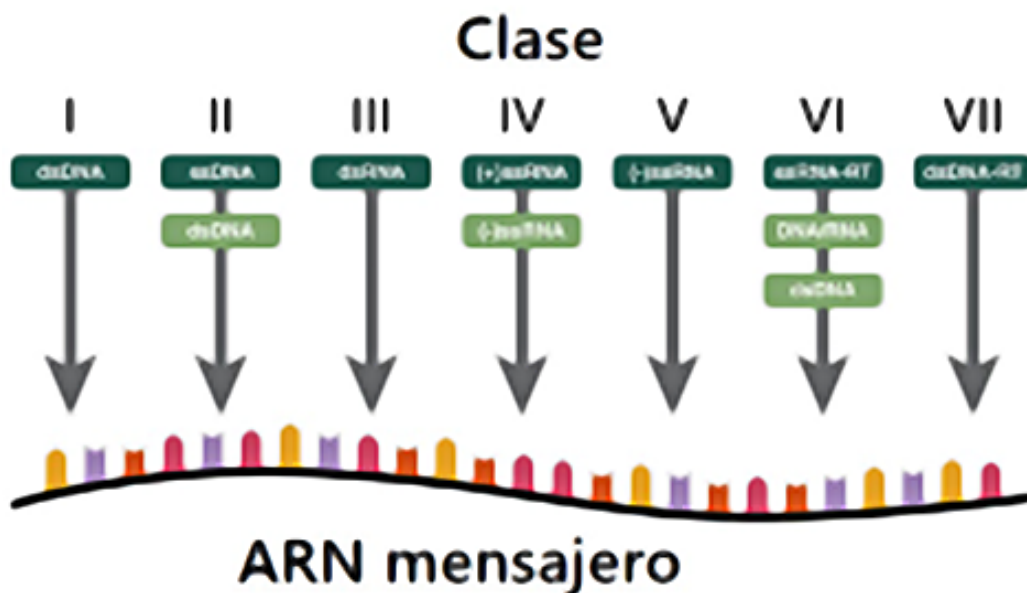
Sandra M. Cordo

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, IQUIBICEN, CONICET, Buenos Aires, Argentina.

[scordo@qb.fcen.uba.ar](mailto:scordo@qb.fcen.uba.ar)

## Generalidades de los RNA virus

La naturaleza del genoma de un virus y la estrategia para la síntesis del mRNA es la base de la "Clasificación Baltimore". Esta clasificación es práctica y divide a los virus en 7 grupos según posean genoma a DNA o RNA, el sentido (o polaridad) de sus moléculas sea positivo o negativo y estas se presenten en simple o doble cadena. La clasificación no es taxonómica, aunque las categorías taxonómicas reconocidas por ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*), por ejemplo Familias, pueden acomodarse dentro de estos 7 grupos.



**Figura #:** Clasificación de Baltimore según el genoma viral. Existen siete clases de genomas virales que pueden ser de DNA o RNA, y al mismo tiempo monocatenarios (ss) o bicatenarios (ds). Se muestra la ruta que toma cada tipo de virus para formar su mRNA (ARN mensajero) y la estrategia para su replicación (adaptado de Madigan et al., 2015)

Los virus animales a RNA, entonces, comprenden los Grupos III, IV y V de esta clasificación (Figura 1). El Grupo III contiene los virus de RNA doble cadena a partir del cual son sintetizados los mRNA. En el Grupo IV se encuentran aquellos virus con RNA de sentido positivo capaz de funcionar directamente como mRNA. El Grupo V contiene los virus con RNA de sentido negativo a partir del cual deben sintetizar sus mRNAs. Algunas de las Familias virales de importancia sanitaria humana en cada Grupo pueden observarse en la Tabla 1.

Grupo	Familia	Virus	Reservorio	Enfermedad
III	<i>Reoviridae</i>	Rotavirus	Humanos	Gastroenteritis, diarrea
IV	<i>Flaviviridae</i>	Dengue virus	Monos, humanos	Fiebre hemorrágica
		West Nile virus	Aves	Encefalitis
		Zika virus	Monos, ovejas, patos,	Fiebre de Zika, microcefalia

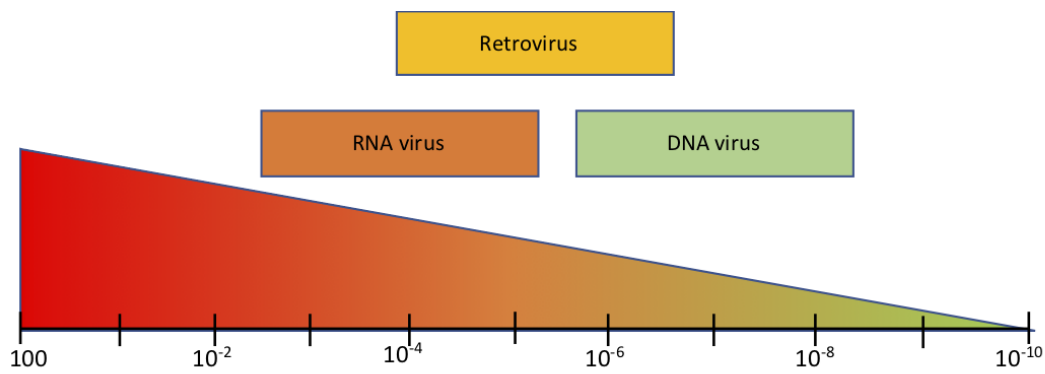
			caballos, murciélagos	congénita
	<i>Coronaviridae</i>	HCoV (Coronavirus-humano)	Murciélagos, roedores	Enfermedad respiratoria leve
		SARS-CoV (síndrome agudo respiratorio-coronavirus)	Murciélagos	Síndrome respiratorio agudo
		MERS-CoV (síndrome respiratorio del Medio Este-coronavirus)	Murciélagos	Síndrome respiratorio agudo
V	<i>Bunyaviridae</i>	Hantaan virus	Ratones salvajes	Fiebre hemorrágica
		Sin Nombre virus	Ratones salvajes	Síndrome pulmonar
	<i>Orthomyxoviridae</i>	Influenza H5N1	Aves salvajes	Enfermedad respiratoria (Vietnam, 2003)
		Influenza H7N9	Aves salvajes	Enfermedad respiratoria (China, 2013)
	<i>Paramyxoviridae</i>	Hendra virus	Murciélagos	Hemorragia pulmonar
		Nipha virus	Murciélagos	Encefalitis
	<i>Rabdoviridae</i>	Rabia virus	Murciélagos	Síndrome neurológico agudo
	<i>Mammarenaviridae</i>	Lassa virus	Ratones salvajes	Fiebre hemorrágica
		Junín virus	Ratones salvajes	Fiebre hemorrágica
	<i>Filoviridae</i>	Ebola virus	Murciélagos	Fiebre hemorrágica

**Tabla 1:** Familias virales de importancia sanitaria humana con genoma RNA. Se muestran algunas de las familias de virus RNA más relevantes para la salud humana. Se mencionan el virus particular, su reservorio en la naturaleza y la enfermedad que produce en el humano.

En cualquier caso, un virus a RNA es un virus que utiliza la RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp) para replicar o sintetizar su genoma. Esta polimerasa es siempre codificada por el genoma viral y en algunas Familias forma parte del virión, siendo una proteína estructural (Grupo V). Durante la replicación de los virus a RNA al menos tres tipos de RNA deben ser sintetizados: el genoma, la copia del genoma y los mensajeros. Algunas Familias de virus además sintetizan RNA subgenómicos, y en todos estos procesos se necesitará una RdRp.

Una característica saliente de los virus en general es su alta tasa de mutación. Durante el ciclo replicativo de un virus RNA la tasa es particularmente alta debido a la falta de actividad de corrección de la polimerasa viral en combinación con la naturaleza estructuralmente más flexible de las moléculas de RNA, en comparación con las de DNA. Por ejemplo, la tasa de mutación de un virus RNA se encuentra alrededor de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  en comparación a los virus a DNA en el rango de  $10^{-6}$  a  $10^{-8}$  (Figura 2).

La importancia de este fenómeno en el contexto del ambiente (viral) y sus fluctuaciones explica el proceso de "adaptación" o "evolución viral". Los RNA virus pueden mutar y evolucionar rápidamente en contextos del estrés antiviral producido por la célula hospedadora, la respuesta inmune del organismo infectado y/o la exposición a tratamientos antivirales. De esta forma no sorprende que la mayoría de los nuevos virus emergentes pertenecen al grupo de RNA virus.



**Figura 2:** Tasa de mutación en genomas virales. Las tasas de mutación responden principalmente al tipo de molécula presente en el genoma viral. Los números se expresan como: mutación/sitio/ronda de replicación. La tasa de mutación de un virus RNA es de 1:1000 a 1:100000

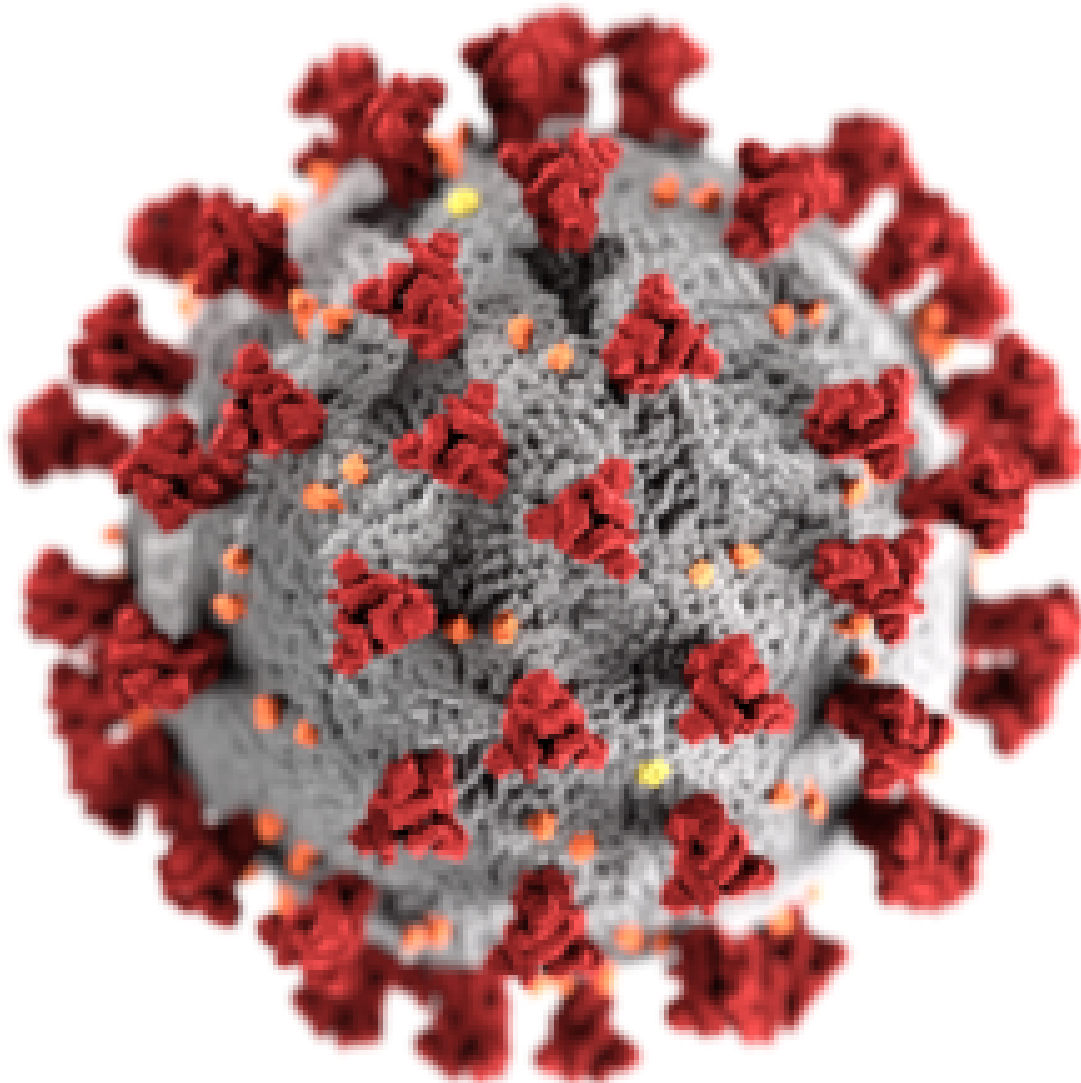
### Enfermedades y virus emergentes

Una enfermedad *emergente* es un término utilizado para describir la aparición de una infección previamente desconocida en una especie en particular, o una infección ya conocida pero que se presenta o expande en un nuevo huésped, nicho ecológico, o zona geográfica y a menudo estas características están acompañadas de un aumento importante en la patogenicidad. Ejemplos recientes de este fenómeno son: el cruce de influenza aviaria a humanos en el año 1995 (H5N1), la expansión del virus Ébola hacia África Occidental (2014) o la emergencia del virus Zika (originalmente conocido como una enfermedad febril en África Oriental) en zonas tan lejanas como Polinesia y Sudamérica. Más recientemente, por supuesto, la emergencia del coronavirus SARS en 2003 y 2019.

### Familia *Coronaviridae*

Dentro del Grupo IV de la Clasificación Baltimore, la Familia *Coronaviridae* incluye 3 géneros con virus ampliamente distribuidos en huéspedes tan variados como el humano, mamíferos pequeños, aves y otros, causando infecciones tanto agudas como persistentes.

La mayoría de los coronavirus se transmiten a sus huéspedes susceptibles por la ruta respiratoria o fecal, siendo el sitio inicial de replicación las células epiteliales. Algunos coronavirus humanos (HCoV) y también porcinos replican principalmente en las células epiteliales respiratorias causando infecciones restringidas y sintomatologías localizadas. Otros coronavirus (como el bovino, felino, canino) infectan células epiteliales del tracto entérico, causando diarreas agudas y a veces fatales. Los coronavirus felinos en ocasiones pueden producir infecciones sistémicas causando una enfermedad generalizada y muerte. Los coronavirus porcinos que causan predominantemente infecciones entéricas localizadas son sin embargo también neurotrópicos. Los coronavirus SARS-CoV y MERS-CoV son causantes de las más severas de las infecciones conocidas por coronavirus humanos. SARS-CoV-2 parece ser menos virulento (3-4 % de mortalidad reportado por WorldHealth Organization) en comparación con el SARS-CoV (10 % de mortalidad) y el MERS-CoV (35 % de mortalidad), con la excepción de la infección de SARS-CoV-2 en los ancianos y en aquellos con otras enfermedades de base. Este virus Infecta las vías respiratorias altas y bajas causando injurias de moderadas a severas en pulmones. El virus también es detectado en otros órganos como riñón, hígado e intestino.



**Figura 3:** Ilustración de la familia de los coronavirus.

El coronavirus humano HCoV-229E (del género Alfacoronavirus), capaz de producir enfermedades leves, utilizan como receptor celular hAPN (por sus siglas en inglés *Human-aminopeptidase N*). Una característica distintiva de SARS-CoV (del género Betacoronavirus) es que infecta las células blanco por medio del receptor ACE2 (por sus siglas en inglés *Angiotensin-Converting Enzyme 2*). Esta molécula es una proteína ubicada en la membrana celular e involucrada en la regulación de la presión sanguínea y la función cardíaca. En humanos se expresa en células epiteliales de pulmón e intestino delgado los cuales son los blancos primarios de SARS-CoV. ACE2 también se expresa en otros órganos como el corazón y riñones. Estudios estructurales han demostrado que la mutación de solo 2 residuos aminoacídicos en la proteína de superficie del SARS-CoV permitió el salto de especie: de la civeta asiática al humano. Recientemente se ha demostrado que esta proteína también funciona como receptor para el nuevo SARS-CoV-2. Sin embargo, aún no hay una clara relación entre patogénesis y receptor. Un estudio publicado recientemente sugiere que variantes genéticas de la proteína ACE2 en las distintas etnias poblacionales podrían presentar distintos niveles de afinidad y reconocimiento con SARS-CoV-2; y así explicar la severidad de la enfermedad en los distintos continentes.

Los distintos coronavirus humanos (HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63 y HCoV-HKU1) causan hasta el 30% de infecciones leves del tracto superior respiratorio considerándose endémicos de poblaciones humanas, desde los años 60 cuando el primero de ellos fue identificado. La emergencia y re-emergencia de nuevos RNA virus y en particular dentro de esta familia (SARS-CoV, MERS-CoV) está siendo más frecuente de lo esperado. Las características altamente transmisibles y patógenas de estas nuevas emergencias ponen en evidencia la urgencia de comprender en mayor profundidad los factores que facilitan éste fenómeno y acelerar los estudios que permitan mitigar y prevenir las consecuencias de estas infecciones en la salud humana.

#### **Recuadro 1. La intrincada estrategia de replicación de los Coronavirus.**

Los coronavirus son virus envueltos de genoma no segmentado, es decir que la información genética se encuentra en una sola molécula de RNA. Esta única molécula de 26 Kb a 30 Kb de longitud es la más grande entre todos los virus de RNA, incluyendo aquellos cuyo genoma es segmentado. Sin embargo, la estrategia

replicativa dista de ser sencilla y muestra características distintivas dentro del grupo. Todos sus miembros presentan una idéntica organización genómica que consta del gen de la replicasa río arriba de los genes de las proteínas estructurales. El gen de la replicasa corresponde a dos tercios del total de la molécula y es el único que se traduce directamente del genoma, dando dos productos proteicos diferentes. Por un intrincado mecanismo de desplazamiento de los ribosomas celulares se traducen dos polipéptidos definidos pp1a (440–500 kDa) y pp1ab (740– 810 kDa). A partir de estos y por un proceso autoproteolítico se expresan las proteínas no estructurales (designadas nsp1 a nsp16) necesarias para formar el complejo replicasa-transcriptasa (RTC) y completar un ciclo de infección exitoso. Todos los eventos posteriores en la replicación de los coronavirus están determinados por la expresión inicial de la replicasa.

## Referencias:

**Brierley I, Digard P, Inglis SC** (1989) Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudo-knot. *Cell* 57:537–547.

**Cao Yanan, Lin Li, Zhimin Feng, Shengqing Wan, Peide Huang, Xiaohui Sun, Fang Wen, Xuanlin Huang, Guang Ning & Weiqing Wang** (2020) Comparative genetic analysis of the novel coronavirus (2019-nCoV/SARS-CoV-2) receptor ACE2 in different populations. *Cell Discovery* 6: 11,

**Siobain D.** (2018) “Why are RNA virus mutation rates so damn high?.” *PLoS biology*. doi:10.1371/journal.pbio.3000003

**Knipe DM, Howley PM, editors** (2013) *Fields Virology* (6th Edition). Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins.

**Guo YR, Cao QD, Hong ZS, Tan YY, Chen SD, Jin HJ, Tan KS, Wang DY, Yan Y** (2020) The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Military Medical Research*. 13;7(1):11. doi: 10.1186/s40779-020-00240-0.

**Li F** (2008) Structural analysis of major species barriers between humans and palm civets for severe acute respiratory syndrome coronavirus infections. *Journal of Virology* 82:6984–6991.

**Li W, Zhang C, Sui J** (2005) Receptor and viral determinants of SARS- coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO Journal* 24:1634–1643.

**Li W, Moore MJ, Vasilieva N** (2003) Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426: 450–454.

**Masters PS** (2006) The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research* 66:193–292.

**Wang-Shick, R** (2017) *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*. 1st. Edition. Academic Press, Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-800838-6.00016-3.

**Cann, AJ** (2016) *Principles of Molecular Virology* Sixth Edition. Academic Press, Elsevier.

**Zhang H, Penninger JM, Li Y, Zhong N, Slutsky AS** (2020) Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Medicine*. 56:586-590 doi: 10.1007/s00134-020-05985-9.



ISSN 1666-7948

[www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)

**Revista Química Viva**

Número 3, año 19, Abril 2020

[quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)


## **Norovirus en aguas de uso recreativo: correlación con indicadores de calidad de agua.**

**Díaz, SM(1); Barrios, ME(1); Cammarata, RV(1); Torres C(1); Fortunato, MS(2); García López, G(2); Korol, S(2); Gallego, A(2); Blanco Fernández, MD(1); Mbayed, VA(1).**

*(1) Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Capital Federal, Argentina. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina; (2) Cátedra de Salud Pública e Higiene Ambiental, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. CABA. Argentina.*

Contacto: [diazsofiamicaela@gmail.com](mailto:diazsofiamicaela@gmail.com)

El agua es un recurso fundamental para la vida, pero en ocasiones puede convertirse en el vehículo de patógenos que llegan a ella a través del vuelco de desechos de diferentes actividades humanas. Numerosos brotes de gastroenteritis virales alrededor del mundo, incluido nuestro país, han sido causados por agua contaminada. El objetivo de este trabajo consistió en estudiar la calidad microbiológica del agua de dos playas de la región costera del Río de la Plata en la localidad de Berisso, provincia de Buenos Aires: La Balandra y Bagliardi y determinar la presencia de patógenos importantes para la salud pública en dichos sitios. Este análisis de situación permitirá recabar información para el posterior desarrollo de un análisis cuantitativo de riesgo microbiológico. Desde diciembre a febrero, en los periodos de 2017-2018, 2018-2019, se realizó un muestreo semanal de cada playa. Se evaluaron parámetros físico-químicos y microbiológicos. La cuantificación de indicadores fecales bacterianos se realizó mediante pruebas convencionales; la de virus humanos, a través de concentración por ultrafiltración y qPCR y la de bacteriófagos, por recuento en placa. Las determinaciones de los parámetros fisicoquímicos e indicadores microbiológicos indican que la playa Bagliardi supera ampliamente los límites fijados por la Resolución 42/2006, para y enterococos. Mientras que los valores obtenidos para la playa La Balandra, estuvieron en el mismo orden de los valores límite. En cuanto a las determinaciones virológicas, la frecuencia de detección de los indicadores propuestos para modelar la contaminación viral, los bacteriófagos F-RNA específicos y poliomavirus humanos (HPyV, específicamente JCPyV y BKPyV), fue del 83% (20/24) y 75% (36/48) respectivamente en playa Bagliardi. Mientras que, en La Balandra, la frecuencia de detección de F-RNA y de HPyV fue del 42% (10/24) y 48% (23/48), respectivamente. Sin embargo, 14 de las 23 detecciones de HPyV fueron no cuantificables. El patógeno viral norovirus (NoV), fue detectado en el 29,2% de las muestras de la playa Bagliardi (14/48), correspondiendo la mitad a genogrupo I y la otra mitad a genogrupo II, con detección simultánea de ambos genogrupos en 3 de esas muestras. En la playa La Balandra, solo se detectó un 4% de NoV (2/48), perteneciendo cada muestra a un genogrupo diferente. Es de destacar que no hubo correlación de los indicadores bacterianos con los indicadores virales propuestos (bacteriófagos y HPyV) ni con el patógeno NoV. La detección de NoV refleja un peligro para la población que realiza actividades en estas playas, justificando la implementación de un análisis cuantitativo de riesgo microbiológico. El uso de indicadores virales de contaminación y el estudio de la prevalencia de virus entéricos patógenos para la evaluación cuantitativa de riesgo en aguas recreacionales están siendo reportados con creciente frecuencia en ámbitos internacionales, pero tiene escasos antecedentes locales.

 <p>ISSN 1666-7948</p> <p>www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</p>	<p>Revista <b>QuímicaViva</b></p> <p>Número 1, año 19, Abril 2020</p> <p><a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a></p>
---	---

## Efecto de los agroecosistemas en la actividad del virus St. Louis encephalitis y en la comunidad de mosquitos vectores

**Mansilla, AP(1); Laurito, M(2,3); Gallardo, R(4); Farías, AA(4); Díaz A(3,4)**


*(1) Instituto de Ciencias de La Tierra y Ambientales de La Pampa (INCITAP) – (CONICET), Santa Rosa, Argentina; (2) Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Centro de Investigaciones Entomológicas de Córdoba, Córdoba, Argentina; (3) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET, Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIByT), Córdoba, Argentina; (4) Laboratorio de Arbovirus, Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella”, Facultad de Ciencias Médicas, UNC, Córdoba*

Contacto: [mansilla.anap@gmail.com](mailto:mansilla.anap@gmail.com)

Saint Louis encephalitis (SLE) es un arbovirus que pertenece al género *Togavirus*, y que es mantenido en la naturaleza a través de interacciones complejas entre distintas especies de mosquitos y aves. En Argentina, se identificó a *Culiseta inornata*, *Culiseta tritaeniorhynchos* y *Culiseta morsitans* como amplificadores implicados en el mantenimiento de este virus, pero al tratarse de una especie que puede utilizar multi-vectores y multi-hospedadores, su red de mantenimiento dependerá de las características ambientales y biológicas que posea un determinado lugar en un momento en particular. El objetivo de este trabajo fue analizar la composición de las comunidades de mosquitos y determinar la actividad del VSLE en distintos agroecosistemas de la provincia de La Pampa para obtener evidencias sobre el efecto del uso de la tierra sobre la actividad de los Arbovirus. Durante el mes de Febrero de 2017 se realizaron capturas de mosquitos utilizando trampas de luz tipo CDC suplementadas con hielo seco en 7 sitios del Norte de la Pampa. Se colocaron 3 trampas por sitio permaneciendo activas durante una noche (20 a 8h). Los mosquitos capturados se determinaron taxonómicamente y se dispusieron formando pools según: sitio de captura, fecha, especie, sexo y estado alimenticio de la hembra. Cada pool (1 a 25 hembras no alimentadas) se sometió a un proceso de homogenización, dilución en MEM, extracción de ARN y detección molecular específica del VSLE mediante la aplicación de técnicas de amplificación genómica RT- Nested PCR. Se colectaron un total de 2.090 mosquitos, y se agruparon en 124 pools de los cuales se analizaron 110 de hembras no alimentadas. Los mosquitos correspondieron a 10 especies, siendo la más abundante con 699 individuos, seguida de con 683 individuos. El VSLE fue detectado en 15/110 pools y en 3 de los 7 sitios muestreados. Se realizaron Modelos Lineales Generalizados (GLM) para determinar si el sitio, la abundancia específica, abundancia general y riqueza de mosquitos influyen en la actividad del VSLE. El modelo que contuvo la variable “sitio” fue quien obtuvo casi el 50% del peso de Akaike ( $w_i$ ) el cual es una medida del peso de la evidencia a favor del mejor modelo en el conjunto. Todos los pools de mosquitos positivos correspondieron a especies del género *Culiseta*, reafirmando a este género como el principal vector de VSLE y siendo la mitad



de los pools positivos de la especie (7/15). Los sitios muestreados se encuentran en una zona altamente modificada por prácticas agrícolas, lo que puede generar cambios en las comunidades de los vectores y hospedadores de este virus y es por ello que nos encontramos trabajando en el análisis de la actividad del VSLE en relación a los diferentes tipos de uso de suelo.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>QuímicaViva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	--

## **Virus entéricos en verduras de hojas: frecuencia de detección y probabilidad de infección de los consumidores.**


**Prez, VE (1, 2); Martínez, LC (1); Masachessi, G (1, 2); Giordano, MO (1); Nates, SV (1); Barril PA (2, 3).**

*(1) Instituto de Virología Dr. J.M. Vanella – Facultad de Ciencias Médicas – Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. (2) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina. (3) Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria (CIATI A.C.) - Neuquén, Argentina.*

Contacto: [vprez@fcm.unc.edu.ar](mailto:vprez@fcm.unc.edu.ar)

Los virus entéricos son una de las principales causas de enfermedades transmitidas por el consumo de verduras crudas debido a que presentan una alta tasa de propagación y persistencia en el ambiente. La contaminación de los alimentos puede originarse en la etapa de la pre-cosecha como consecuencia del riego de los vegetales con agua contaminada con virus. Actualmente en Argentina no hay normas que regulen la calidad virológica de alimentos y aguas de riego, y son escasos los datos relacionados con esta temática. El objetivo de este estudio fue evaluar la frecuencia de detección de rotavirus (RV), norovirus (NoV) y enterovirus infeccioso (iEV) en vegetales de hojas verdes y sus correspondientes aguas de irrigación. Además se estimó la probabilidad de infección por el consumo de 150 g de estas verduras. Durante un período de un año (junio 2014-junio 2015) se colectaron un total de 101 verduras de hoja y 24 aguas de irrigación de una chacra productora de vegetales de la localidad de Colonia Caroya, a 50 km de la capital de Córdoba. A las muestras vegetales se les realizó un lavado previo con un caldo peptonado para favorecer la elución de las partículas virales y luego, al igual que con las muestras de agua, se llevó a cabo la concentración y precipitación viral con polietilenglicol. Se realizó RT-qPCR para la detección y cuantificación de RV y RT nested-PCR para la detección y caracterización de genogrupos de NoV. Para la detección de iEV los concentrados virales fueron inoculados en cultivo de células CaCo-2 y posteriormente revelados por inmunofluorescencia. Se detectó RV en un 23% (23/101) de las verduras con un rango de carga viral entre  $7,5 \times 10^2$  y  $1,2 \times 10^3$  cg/g, y en un 20% (5/24) en las aguas de irrigación y NoV en el 52% (53/101) de los vegetales y en el 37% (9/24) de las aguas. El genogrupo GI fue el más prevalente tanto en verduras (75%, 40/53) como en aguas de irrigación (78%, 7/9), mientras que el genogrupo II se detectó en el 41% (22/53) de las verduras y el 22% (2/9) de las aguas sugiriendo que la fuente de

contaminación de las verduras son las aguas de irrigación. El 36% de las verduras y el 37% de las aguas estudiadas revelaron la presencia de iEV. La probabilidad media de infección asociada al consumo de estas verduras es de 0,86/1. La detección de genomas virales y partículas víricas infecciosas en los vegetales y en sus respectivas aguas de irrigación, sugiere que las aguas serían la fuente de contaminación. Asimismo, estos resultados revelan que la contaminación de las verduras de hoja de Colonia Caroya es frecuente, y que los consumidores de estos alimentos están expuestos a un elevado riesgo de infección viral.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---

## Diseño de Antivirales contra la entrada del virus chikungunya


**Battini, L(1, 2); Fidalgo, DM(2); Bollini, M(2); Álvarez, DE(1)**

(1) *Laboratorio de Virología Molecular, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB-INTECH) CONICET, Universidad Nacional de San Martín;* (2) *Laboratorio de Química Medicinal, Centro de Investigaciones en Bionanociencias (CIBION) CONICET, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.*

Contacto: [leandro.battini@cibion.conicet.gov.ar](mailto:leandro.battini@cibion.conicet.gov.ar)

El virus de chikungunya es un alphavirus perteneciente a la familia Togaviridae. Es transmitido por mosquitos del género *Aedes* y es el agente etiológico de la fiebre de chikungunya, una enfermedad re emergente que alcanzó una escala global en la última década. La partícula viral de chikungunya está compuesta por las glicoproteínas de membrana E1 y E2, una envoltura lipídica derivada de la membrana celular y una nucleocápside proteica asociada al genoma viral de ARN. E1 y E2 conforman un heterodímero y están dispuestas con simetría icosaédrica en la envoltura viral. E2 es la proteína que interactúa con el receptor celular en la adsorción del virus y E1 cataliza la fusión de la envoltura viral con la membrana del endosoma en el proceso de entrada. Nuestro objetivo es el desarrollo de antivirales contra chikungunya dirigidos contra el heterodímero E1-E2. Creemos que ligandos de E1-E2 serán capaces de inhibir las etapas tempranas del ciclo de infección viral. Llevamos a cabo un screening virtual utilizando como receptor a la estructura cristalizada del heterodímero E1-E2. En primer lugar detectamos bolsillos drogables dentro de la proteína. Seleccionamos un bolsillo que poseía las características fisicoquímicas adecuadas y que además era biológicamente relevante. Luego, se realizó el docking de aproximadamente 80000 compuestos de dos bases de datos comerciales en el bolsillo utilizando el programa Autodock Vina. Sintetizamos o compramos los compuestos mejor rankeados y evaluamos su citotoxicidad y su actividad antiviral utilizando un virus reportero que porta GFP en el genoma. Uno de los compuestos seleccionados fue activo, con una concentración citotóxica 50 (CC50) mayor a 50  $\mu\text{M}$  y una concentración efectiva 50 (CE50) de 1,5  $\mu\text{M}$ . Estudiamos el mecanismo de acción del compuesto activo. Mediante ensayos de tiempo de adición del compuesto a distintos tiempos determinamos que el compuesto es activo en etapas tempranas de la infección. Adicionalmente, determinamos que el compuesto inhibe la entrada del virus a la célula y no tiene efecto en la adsorción. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis y

sugieren que el compuesto posiblemente este inhibiendo el proceso de fusión de membranas. Actualmente estamos llevando a cabo ensayos para determinar el efecto del compuesto en este proceso. En una aproximación complementaria, seleccionamos virus resistentes al compuesto en cultivo celular y secuenciamos las proteínas de envoltura de las poblaciones resistentes. Dentro de las mutaciones detectadas dos se encuentran cercanas al bolsillo propuesto, aportando evidencia de que el compuesto se está uniendo al mismo. En conclusión, pudimos identificar un compuesto activo contra la entrada del virus chikungunya mediante un screening virtual. Adicionalmente, distintas líneas de evidencia sugieren que el compuesto efectivamente está inhibiendo al heterodímero E1-E2 bloqueando la entrada del virus a la célula.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>QuímicaViva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	--

## Un flavonoide natural con actividad dual, antiviral y antiinflamatoria, frente al virus sincicial respiratorio


**Benedetti, M(1); Nabaes Jodar, MS(2, 3); Viegas, M(2, 4); Bueno, CA(1, 5)**

*(1) Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química Biológica, Laboratorio de Virología, Buenos Aires, Argentina; (2) Laboratorio de Virología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina; (3) Ministerio de Salud de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina; (4) CONICET, Buenos Aires, Argentina; (5) CONICET - Universidad de Buenos Aires. Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN). Buenos Aires, Argentina.*

Contacto: [martina\\_benedetti97@hotmail.com](mailto:martina_benedetti97@hotmail.com)

Introducción: El virus sincicial respiratorio (RSV) incide en la inmunidad del hospedador provocando una fuerte respuesta inflamatoria que lleva al daño pulmonar y favorece la diseminación del virus. En consecuencia, una potencial estrategia terapéutica constituye la modulación de la respuesta inmune inducida por el virus. La cianidina es un flavonoide que se encuentra en muchos frutos rojos y otras frutas, que presenta diversas actividades biológicas, entre ellas antiinflamatoria. Se ha demostrado que en su mecanismo de acción inhibe la señalización dada por IL-17A, y por otro lado las vías de señalización NF- $\kappa$ B y AP-1, las cuales a su vez están involucradas en la patología pulmonar inducida por RSV. Además se conoce que flavonoides similares a la cianidina poseen actividad antiviral frente a numerosos virus. Entonces, en base a estos antecedentes, nos proponemos evaluar el efecto antiviral e inmunomodulador de la cianidina frente a la infección con RSV in vitro. Objetivo: Evaluar la actividad antiviral e inmunomoduladora de la cianidina frente al RSV, in vitro. Metodología: La citotoxicidad de los compuestos en las células Hep2 (células epiteliales de carcinoma de laringe humana), A549 (células epiteliales de carcinoma de pulmón humanas) y J774A.1 (macrófagos de ratón) fue evaluada por el método de MTT, y la actividad antiviral frente a las cepas A2 y Line 19 de RSV fue evaluada por un ensayo de reducción de placas. Las citoquinas IL-6 e IL-8 fueron

cuantificadas por ELISA. La expresión de la proteína viral F fue analizada por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), y la síntesis del RNA viral fue examinada por qRT-PCR a diferentes tiempos post-infección. Resultados: En las células HEp-2 y A549 infectadas con las cepas A2 y Line 19 de RSV y tratadas con distintas concentraciones de cianidina, se observó una reducción de los títulos virales dependiente de la concentración. Además, la cianidina no presentó efectos tóxicos en todas las concentraciones evaluadas. Asimismo, se detectó una reducción de la expresión de la proteína viral F y de la síntesis del RNA viral en las células HEp-2 y A549 infectadas con la cepa A2 de RSV y tratadas con la cianidina respecto de las células sin tratar. Por otro lado, en células HEp-2, A549 y J774A.1 infectadas con la cepa A2 de RSV y tratadas con cianidina, se observó una disminución significativa de la expresión de citoquinas inflamatorias en comparación con las células infectadas sin tratar. Conclusiones: La cianidina exhibe actividad antiviral y reduce la secreción de citoquinas en las células involucradas en la patología del RSV in vitro.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---

## **Inmunidad inducida contra el Virus de la Fiebre Aftosa por formulaciones conteniendo Virus Like Particles junto a Galectina 8 o ISPA, en el modelo murino**


**Bidart, JE(1, 2); Mignaqui, A(2); Kornuta, C(1, 2); Lupi, G(3); Langellotti, C(1, 2); Mongini, C(1, 2); Quattrocchi, V(1); Tribulatti, V(4); Wigdorovitz, A(5); Marcipar, I(2, 3); Zamorano, P(1, 2, 6)**

*(1) Instituto de Virología e innovaciones tecnológicas (IVIT), INTA-CONICET, Hurlingham, Argentina; (2) CONICET, CABA, Argentina; (3) Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina; (4) Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-Universidad Nacional de San Martín, Buenos Aires, Argentina; (5) INCUINTA, INTA, Hurlingham, Argentina; (6) Universidad del Salvador, CABA, Argentina.*

Contacto: [bidart.juan@inta.gob.ar](mailto:bidart.juan@inta.gob.ar)

La Fiebre Aftosa (FA) es una enfermedad contagiosa y económicamente muy importante, que afecta a animales de pezuña hendida. La vacuna, con adyuvante oleoso, utilizada es inactivada y posee ciertas desventajas (riesgo de escape viral desde las plantas productoras, dificultad para diferenciar animales vacunados de infectados, etc) Por lo cual se busca desarrollar nuevas vacunas que no involucren VFA infeccioso, las Virus-like particles (VLPs) son candidatos promisorios ya que mantienen los sitios antigénicos del virión sin ARN infeccioso. Asimismo, se busca utilizar un adyuvante de origen nacional que resulte más eficaz y económico que el utilizado actualmente. El ISPA (Immunostimulant Particle) es un adyuvante tipo ISCOM de origen nacional. La Galectina 8 (Gal8), expresada en E.coli, es una lectina secretada por mamíferos, y tiene actividad proinflamatoria. En el presente trabajo se utilizaron VLPs (serotipo A/Arg/01) obtenidas mediante transfección transitoria de células 293E y analizamos si la Gal8 y el ISPA potencian la respuesta inmune contra el VFA

generada por las VLPs. Se utilizó un modelo murino, puesto a punto en nuestro laboratorio, que es capaz de predecir la capacidad de una vacuna de inducir protección en bovinos. Se vacunaron ratones BALB/c con VLPs; VLPs+ISPA; VLPs+Gal8; VLPs+adyuvante comercial (ISA206); ISPA; PBS, Gal8, ISA206 y Vacuna Comercial. Los animales se inmunizaron los días 0 y 21, y se desafiaron a los 36dpv. 34 dpv los títulos de Acs (FL) fueron significativamente mayores en los grupos VLPs+ISPA ( $2,7\pm 0,2$ ) y VLPs+ISA206 ( $2,3\pm 0,3$ ) respecto a VLPs ( $1,00\pm 0,01$ ) y VLPs-Gal8 ( $1,04\pm 0,06$ ) y similares a los inducidos con la vacuna comercial ( $2,7\pm 0,3$ ). Se observó un aumento en IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 en los grupos VLPs+ISPA y VLPs+ISA206 comparado a VLPs y VLPs-Gal8 ( $p<0,05$ ). Acs SN fueron: VLPs-ISPA:  $1,05\pm 0,06$ ; VLPs-ISA206:  $1,41\pm 0,02$ ; y vacuna comercial:  $1,76\pm 0,08$ . La protección frente al desafío viral fue del 100% en los grupos VLPs+ISPA, VLPs+ISA206 y Vacuna comercial, del 60 % en grupo VLPs-Gal8 y del 40% en el grupo VLPs. Los esplenocitos de los animales vacunados y estimulados in vitro con VFAi, mostraron mayor proliferación en los grupos VLPs+ISPA y VLPs+ISA206 que el grupo VLPs ( $p<0,05$ ). Se observó un aumento de CD8+/IFN $\gamma$  en los animales vacunados con VLPs+ISPA comparado a VLPs ( $p<0,05$ ). Las formulaciones con VLPs serotipo A/Arg/2001 en combinación con los adyuvantes ISPA o comercial fueron efectivas en la generación de inmunidad humoral, celular y protección frente al desafío con VFA infeccioso, en el modelo murino. Aunque la Gal8 mostró actividad adyuvante fue insuficiente para proteger al 100% de los animales. Las VLPs y el ISPA pueden resultar una combinación promisoriosa para la formulación de una vacuna contra FA, ya que no se utiliza VFA infeccioso en su preparación y se adiciona un adyuvante de fabricación nacional que disminuiría notablemente los costos, y se obtiene una protección igual a la vacuna comercial

 ISSN 1666-7948 <a href="http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar">www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</a>	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---

## Diferencias en la capacidad neutralizante y el perfil isotópico de los anticuerpos inducidos en bovinos por la inmunización con vacunas anti-aftosa formuladas con VLP o partículas virales completas


**Bucafusco, D(1); Miraglia, MC(1); Sala, JM(2); Ayude, A(1); Capozzo, AV(1); Perez-Filgueira, DM(1).**

(1) Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas (IVIT-CONICET-INTA); (2) Estación Experimental Agropecuaria Mercedes-INTA

Contacto: [dbucafusco@fvet.uba.ar](mailto:dbucafusco@fvet.uba.ar)

La vacunación contra el virus de la fiebre aftosa (VFA) es la principal medida de control contra la enfermedad. En los libres, la producción del virus vacunal implica un elevado riesgo biológico, debido al manejo del agente infeccioso activo. Por este motivo, la investigación está dirigida a la generación de antígenos vacunales no infecciosos, que puedan ser producidos en forma segura y reduciendo los

costos aplicados a bioseguridad. Las cápsidas vacías se postulan como un potencial candidato a estos fines, al presentar todos los epitopes característicos del virus sin el ARN esencial para la replicación. El objetivo de este trabajo es identificar diferencias en los perfiles de respuesta inmune generada por una vacuna basada en cápsidas vacías (75S) del VFA con respecto a las vacunas basadas en virus completo (146S) en bovinos. Para este experimento 2 grupos de 4 bovinos libres de anticuerpos anti-VFA fueron vacunados con una única dosis de formulación oleosa de vacuna anti-aftosa conteniendo 3 µg de partículas 146S o 75S, de la VFA cepa A24/Cruzeiro y utilizando un adyuvante oleoso comercial. Los animales fueron muestreados a los 0, 7, 14, 21, 28 y 45 y 70 DPV para las mismas determinaciones. A los 70 DPV todos recibieron una dosis de una vacuna comercial tetravalente y fueron nuevamente muestreados a los 21 post-revacunación. Los sueros fueron evaluados mediante seroneutralización viral y distintos ELISA para titular los anticuerpos totales, así como los isotipos IgG1, IgG2 e IgM específicos contra el VFA. Además, se midió la capacidad de cada una de las formulaciones de producir respuestas celulares T de memoria a distintos tiempos post-vacunación, mediante la medición de la producción de IFN-γ antígeno-específica. Los animales vacunados con las formulaciones conteniendo el antígeno 146S generaron mayores títulos de anticuerpos totales y seroneutralizantes a los 28, 45 y 70 DPV, así como del isotipo IgG1 a los 21, 28 y 45 DPV ( $p > 0,01$  Mann-Whitney test). Si bien hubo diferencias en la cinética de anticuerpos IgG2 e IgM en ambos grupos, las mismas no fueron estadísticamente significativas. Ambas vacunas generaron títulos de anticuerpos similares luego de la revacunación. Tal como fue reportado previamente para cargas antigénicas vacunales mayores, se detectaron niveles significativamente superiores de respuesta de IFN-γ cuando la sangre de los animales vacunados fue re-estimulada con 146s independientemente de la vacuna aplicada. Esta dosis antigénica, sin embargo, no permitió observar diferencias significativas entre los dos grupos experimentales para un mismo antígeno estimulante. En conjunto, estos resultados demuestran que la naturaleza del antígeno vacunal afecta la calidad de los anticuerpos inducidos en bovinos contra el VFA: las vacunas formuladas con partículas 75S, generaron respuestas humorales con menor capacidad neutralizante y con un perfil isotípico alterado respecto a aquellas conteniendo partículas completas 146S.

 ISSN 1666-7948 <a href="http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar">www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</a>	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---

## **Alternativa natural para tratamiento antiviral de infecciones genitales. Estudio de la capacidad antiviral “in vitro” de extractos vegetales contra CpHV-1**


**Ferreccio, C(1); Maidana, SS(2); Graziotto, N(1); Salvat, A(1); Konigheim, B(3, 4); Romera, SA(1,2).**

*(1) Instituto Nacional de Tecnología agropecuaria (INTA); (2) IVIT (CONICET-INTA); (3) Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella”- Facultad de Ciencias Médicas-UNC ; (4) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)*



Contacto: caro\_ferreccio@hotmail.com

Para las herpesvirosis del hombre se han desarrollado drogas anti-virales como aciclovir, cuya aplicación en los animales por ahora no es generalizada. A pesar de la seguridad y eficacia, el uso clínico extenso de estos fármacos ha llevado a la aparición de cepas virales resistentes. El herpesvirus caprino 1 (CpHV1) es un alfa herpesvirus cuya patogenia sigue los lineamientos generales de la infección por herpesvirus: son epitelectropos y tienen afinidad por la mucosa respiratoria y genital, donde se multiplican, generan manifestaciones clínicas, graves en cabritos, subclínica en adultos o con abortos, vulvovaginitis o balanopostitis. Actualmente en cabras no existe tratamiento específico, hay reportes de desarrollo de vacunas clásicas inactivadas, sin embargo, no están licenciadas y el más común consiste en la administración de antibióticos para combatir la complicación secundaria. Además, el CpHV-1 comparte varias características biológicas con el HVS-2 por lo que cualquier nueva alternativa nueva que surja podría extrapolarse al herpesvirus humano. El objetivo de este trabajo fue probar in vitro la capacidad antiviral de diferentes extractos vegetales contra CpHV-1. Para ello ensayamos mediante placas de lisis y cinética viral de un paso, 3 extractos vegetales: Jarilla (*Larrea divaricata*), Menta (*Mintosthachys verticilata*) y Tola (*Parastrephia quadrangularis*). Como control positivo se utilizó Aciclovir. Primeramente, se realizaron ensayos de citotoxicidad para obtener la máxima concentración que no provoca efecto citopático. Para ello se realizaron ensayos de concentración citotóxica 50 (CC50) y de concentración inhibitoria 50 (CI50) por medio de captación del Rojo Neutro. Resultados: Para Jarilla, a una concentración de 1.04 mg/ml, obtuvimos una viabilidad celular del 58%, para Menta a la misma concentración se observó una viabilidad del 49.1%, para Tola (obtenida en noviembre 2016) fue del 53.8% y para Tola (obtenida en 2019) fue del 49.2%. Con Aciclovir se observó un 90% de viabilidad celular. La inhibición en esa misma dilución para Jarilla fue del 50% y para Menta del 32%. En el ensayo de placas de lisis, se realizó la infección con CpHV1 durante 45 min y se agregó extracto en dos tiempos diferentes (45 min PI y 24 hs PI), se realizó la lectura en el microscopio óptico a las 48 hs. En el control de virus (sin extracto) se visualizaron un total de 36 placas, en Welles con Jarilla se observaron 2 placas de virus (colocando el extracto a los 45 min PI) y 6 placas de virus (colocándolo a las 24 hs PI). En Welles con Menta se vieron 21 placas (45 min PI) y 38 placas (a las 24 hs PI). Conclusión: se observó que tanto jarilla como menta tienen actividad antiviral. Para fortalecer este resultado se realizarán ensayos de placas de infección y así poder establecer alguna relación con los resultados observados en la cinética viral. Por otro lado, se probarán actividad antiviral de la Tola contra CpHV-1, ya se demostró que tiene actividad antimicrobiana.

 <p>ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</p>	<p>Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a></p>
--	--

## **Expresión y purificación de la proteína NS1 del virus del Zika aplicable a la generación de nanoanticuerpos específicos con fines de diagnóstico**


**Idrovo, T(1); Malnero, C(2); Pavan, MF(3); Ibañez LI(3)**



(1) *Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) Guayaquil, Ecuador;* (2) *Centro de Virología Animal (CEVAN), CONICET;* (3) *Instituto de Ciencia y Tecnología: “Dr. César Milstein, CONICET*

Contacto: [loreitati@gmail.com](mailto:loreitati@gmail.com)

El virus de Zika (ZIKV) es un problema crónico de salud pública en Sudamérica. Su transmisión se lleva a cabo a través del mosquito, cuya distribución geográfica expone a riesgos a más de la mitad de la población mundial. La infección viral se ha asociado a malformaciones congénitas en fetos o al desarrollo del síndrome de Guillain-Barré en adultos, captando la atención de los organismos locales e internacionales de salud. En la actualidad, la detección oportuna y diferencial del virus es esencial para evitar complicaciones en pacientes. Sin embargo, la complejidad y costo de las técnicas utilizadas para determinar la presencia de ZIKV impiden un correcto diagnóstico y tratamiento a los habitantes de zonas de bajo nivel socioeconómico o alejadas de los centros especializados. Además, la alta homología entre flavivirus favorece la reactividad cruzada de los anticuerpos utilizados en el diagnóstico, lo que dificulta la obtención de un resultado preciso. Los Nanoanticuerpos son fragmentos de anticuerpos que se obtienen desde los anticuerpos de cadena pesada de camélidos. Han sido utilizados como moléculas de detección y neutralización ya que pueden tener alta afinidad y especificidad. Son estables en presencia de agentes tensioactivos, altamente solubles y se pueden producir a bajo costo. En presente trabajo se planteó como objetivo el clonado, expresión y purificación de la proteína viral NS1 de ZIKV, marcador temprano de infección, que será utilizado como inmunógeno para la generación de nanoanticuerpos que permitan realizar el diagnóstico dicho virus con alta especificidad. Para ello, se extrajo RNA de la cepa de referencia ZIKV MR 766, y usando primers específicos y polimerasas de alta fidelidad se amplificó la secuencia del gen que codifica para NS1. El fragmento amplificado se clonó en el vector de expresión pCAGGs que fue modificado por agregado de un de histidinas y una señal de secreción. Los clones se analizaron por restricción y se enviaron a secuenciar. Para determinar la expresión de la proteína se transfectaron células HEK-293T con los clones positivos utilizando PEI (polietilenimina), se analizó tanto el como el sobrenadante de células para evaluar la expresión de NS1 por . Se obtuvo como resultado una banda única de 40-45 kDa, que es el tamaño esperado para la proteína NS1. Con el fin de obtener una mayor cantidad de proteína para su purificación, se repitió la transfección a mayor escala en placas de 150 mm, a partir de estos cultivos se pudo purificar exitosamente la proteína de interés utilizando cromatografía de afinidad a níquel. La pureza de la proteína y su cuantificación se realizó mediante SDS-PAGE y posterior tinte con . Una vez que se obtenga suficiente masa de proteína, del orden de 2 mg, la misma será utilizada para inmunizar llamas y generar los nanoanticuerpos de interés.

 <p>ISSN 1666-7948 <a href="http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar">www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</a></p>	<p>Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a></p>
--	--

**Aplicación de CD40L y GEL01 en vacuna génica contra el Herpesvirus Bovino 1 (HVBo1) para potenciar la respuesta inmune del bovino**

**Kornuta, CA(1); Langellotti, C(1); Bidart, J(1); Soria, I(1); Quattrocchi, V(1); Gammella M(1); Angeletti P(1); Moore, DP(2, 4); Hecker, Y(2, 4); Cheuquepán Valenzuela, F(2, 4); Zamorano, P(1, 3)**

(1) Instituto de virología e innovaciones tecnológicas (IVIT, INTA-CONICET); (2) CONICET; (3) USAL; (4) EEA Balcarce, INTA

Contacto: [kornuta.claudia@inta.gob.ar](mailto:kornuta.claudia@inta.gob.ar)

CD40 ligando (CD40L) es una molécula co-estimuladora que se expresa transitoriamente sobre linfocitos T activados. Se demostró que CD40L puede modular y aumentar la respuesta celular específica al administrarla junto a una vacuna génica. El adyuvante Montanide™ GEL01 tiene la capacidad de potenciar la transfección y reclutar células al sitio de inyección. Por primera vez se inoculó en bovinos una vacuna a ADN que codifica la glicoproteína D truncada del HVBo1 (pCIgD); junto con el adyuvante GEL01 y un plásmido codificando CD40L. Grupos de bovinos (n=4/5) de 1-2 años de edad fueron inoculados a los días 0, 30 y 60 con 1) 600µg pCIgD; 2) 600µg pCIgD-GEL01; 3) 600µg pCIgD-1mg CD40L-GEL01 y 4) 600µg pCIneo como control. A los 90dpv observamos títulos de anticuerpos contra HVBo1 en todos los grupos tratados con pCIgD, siendo la diferencia significativa en pCIgD-CD40L-GEL01 ( $p<0,01$ ). Los títulos de IgG1 son significativos en el grupo pCIgD-GEL01 ( $p<0,001$ ) y en pCIgD-CD40L-GEL01 ( $p<0,001$ ) respecto a pCIgD. Al evaluar IgG2 se observa aumento en el grupo pCIgD-GEL01 y significativo para pCIgD-CD40L-GEL01 ( $p<0,01$ ) respecto a pCIgD. El porcentaje de HVBo1 neutralizado respecto al grupo control fue superior en pCIgD-GEL01 ( $p<0,01$ ) y en pCIgD-CD40L-GEL01 ( $p<0,01$ ). A los 90 dpv los bovinos fueron desafiados con 5ml de  $1 \times 10^{6.81}$  DICT50/ml de HVBo1 Los Ángeles. En algunos animales hubo retraso en la excreción viral y todos presentaron disminución respecto al control. La diferencia significativa se observa al 5 día post infección (dpi) en el grupo pCIgD-CD40L-GEL01 ( $p<0,001$ ) y en pCIgD-GEL01 ( $p<0,01$ ) comparado a pCIgD. El score clínico indica disminución de la sintomatología en pCIgD-GEL01 a los 6 dpi ( $p<0,01$ ) y en pCIgD-CD40L-GEL01 a los 6 y 7 dpi ( $p<0,01$ ) respecto al control. Ensayos de estimulación in vitro con GEL01 sobre células dendríticas obtenidas de vasos linfáticos aferentes de bovinos indujo regulación positiva de las moléculas de superficie CD40 ( $p<0,01$ ) y MHCII ( $p<0,001$ ) respecto al mock. A 12 dpi hubo linfoproliferación específica de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). El índice de proliferación indica que un porcentaje mayor de animales del grupo pCIgD-CD40L-GEL01 proliferó en contacto con el virus comparado a los demás grupos. En sobrenadante de 12dpi se evaluó secreción de citoquinas por las PBMC estimuladas con virus y se observó un mayor número de animales secretores de IFN $\gamma$  e IL-4 en el grupo pCIgD-CD40L-GEL01 respecto a los demás grupos, mientras que los niveles de TNF $\alpha$  fueron similares en todos los grupos. Los resultados demuestran que la combinación de CD40L y GEL01 es capaz de mejorar la vacuna a ADN; aumentando niveles de anticuerpos en suero, capacidad neutralizante, linfoproliferación específica y secreción de citoquinas involucradas en la inducción de una respuesta inmune humoral y celular. La disminución de la excreción viral luego del desafío es un dato de importancia cuando se evalúan vacunas contra el HVBo1.

 **Química Viva**

ISSN 1666-7948

[www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)

Revista **Química Viva**

Número 1, año 19, Abril 2020

[quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)


## **Primer reporte de actividad antiviral del ácido Nordihidroguayarético sobre el virus Bunyamwera**

**Martinez, F(1, 2); Aguilar, J(1); Contigiani, M(1); Nuñez Montoya, S(3, 4); Konigheim, B(1, 2)**

*(1) Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella"- Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina; (2) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina; (3) CONICET, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV); (4) Universidad Nacional Córdoba, Facultad Ciencias Químicas, Dpto. Ciencias Farmacéuticas, Farmacognosia. Córdoba, Argentina.*

Contacto: [florencia.89.martinez@gmail.com](mailto:florencia.89.martinez@gmail.com)

En la búsqueda de nuevos agentes antivirales a partir de plantas nativas, comenzamos a estudiar la especie CAV (Zigophyllaceae) y su principal metabolito: ácido nordihidroguaiaretico (ANDG). Si bien, el efecto antiviral de ANDG se ha reportado en otros estudios son escasos los reportes sobre arbovirus. En este contexto, nosotros previamente describimos actividad sobre el virus Dengue. Considerando, la actual falta de tratamiento antiviral para estas virosis de importancia médico-veterinaria nos planteamos ampliar el estudio de actividad antiviral del ANDG sobre otros arbovirus. Realizando un de actividad por el método de reducción de UFP, sobre los virus Encefalitis de Saint Louis, Chikungunya y Bunyamwera, encontramos actividad antiviral positiva solo sobre el virus Bunyamwera cepa CbaAR426 (BUNV-426), aislada de mosquitos, con una concentración efectiva 50 (CE50) de 22,2  $\mu$ M y un índice de selectividad (IS) de 5,1 y sobre la cepa SFCrEq231 (BUNV-231) recuperada de cerebro de un equino con encefalitis, considerada de mayor virulencia (CE50 = 28,4  $\mu$ M y IS = 4,0). Posteriormente, estudiamos la acción del ANDG en diferentes etapas del ciclo de replicación de estos virus, realizando el tratamiento en diferentes tiempos de infección: pre-tratamiento (1 h previo a la infección), durante la absorción (1 h a 4 °C), durante la internalización (1 h a 37 °C) y a diferentes tiempos post internalización (p.i. 1-8 hs). Determinamos que la cepa BUNV-426 se ve afectada cuando se realiza el pre-tratamiento (58% de inhibición, %I), durante la etapa de absorción viral (72 %I), pero siendo la inhibición más importante cuando se trata con ANDG p.i., independientemente del tiempo de aplicación del tratamiento con un 90 %I. Por su parte, sobre la cepa BUNV-231 el ANDG no mostró inhibición viral en el pre-tratamiento, pero si afecto las etapas de absorción (85 %I) e internalización (60 %I). De la misma manera, también la actividad del ANDG fue máxima sobre las etapas p.i. (95 %I), pero solo cuando el tratamiento se coloca durante las primeras dos horas p.i. Aunque existen pocas evidencias de la caracterización biológica de estas cepas, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que , ambas cepas se comportan de diferente manera. Los resultados de este trabajo sientan las bases para profundizar el estudio del ANDG como posible tratamiento antiviral, siendo relevante indagar en el mecanismo de acción sobre el virus Bunyamwera, y de esa manera explicar las diferencias encontradas entre ambas cepas. Por otro lado, considerando que son escasos los estudios sobre este virus, el ANDG podría convertirse en una herramienta para contribuir a su caracterización. Finalmente, si bien no hay datos de asociación de este virus a enfermedad humana en Argentina, se ha demostrado su participación en enfermedad neurológica de equinos por lo que es interesante continuar los estudios en este modelo viral.

 <p>ISSN 1666-7948</p> <p>www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</p>	<p>Revista <b>QuímicaViva</b></p> <p>Número 1, año 19, Abril 2020</p> <p><a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a></p>
---	---


## **Desarrollo de un vector adenoviral que dirige la formación de cápsides virales vacías del Virus de la Fiebre Aftosa serotipo O.**

**Ziraldó, M(1); Bidart, J(2); Mattion, N(1); Zamorano, P(2); D'Antuono, A(1)**

*(1) Centro de Virología Animal (CEVAN)-CONICET; (2) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA-Castelar)*

Contacto: [micaela.zirald@gmail.com](mailto:micaela.zirald@gmail.com)

Considerada por la Organización Mundial de Sanidad Animal como la principal enfermedad animal de declaración obligatoria, la fiebre aftosa (FA) es una epizootia que afecta a una amplia variedad de animales de interés pecuario, cuyo agente etiológico es el virus de la fiebre aftosa (VFA). Brotes recientes en países libres de FA resaltan la necesidad de nuevas vacunas que induzcan inmunidad temprana, no requieran el cultivo de VFA infectivo y confieran un amplio espectro de protección. Teniendo en cuenta que las partículas tipo virus (VLP) representan antígenos atractivos, ya que conservan todo el repertorio de epitopes conformacionales careciendo de infectividad, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar un Ad optimizado que dirigiera la generación de partículas tipo virus del VFA cepa O1Campos y que sea capaz de inducir inmunidad protectora contra el desafío homólogo en modelo murino. Así se desarrolló el Ad[P]VP2 que contiene el cassette de expresión P12A3C del VFA clonado en sentido inverso al genoma adenoviral (3'-5'), e incluye mutaciones puntuales en la secuencia que codifica la proteína capsidal VP2, específicamente las sustituciones S93F e Y98F en residuos involucrados en la interacción entre pentámeros de la cápside del VFA. Mediante western blot de extractos de células infectadas con Ad[P]VP2 se verificó que dicho vector dirige la expresión y el correcto procesamiento de las proteínas capsidales VP1 y VP3 del VFA. Por medio de experimentos de ELISA a lo largo de gradientes de sacarosa se determinó que las subunidades del VFA expresadas se asociaron mayoritariamente formando complejos con un coeficiente de sedimentación de 20S. Además se evidenció la presencia de un componente minoritario con un coeficiente de sedimentación similar al de las VLP nativas del VFA (75S). El análisis mediante microscopía electrónica permitió confirmar que dicho material corresponde efectivamente a VLP del VFA. Finalmente se evaluó la inmunogenicidad y la capacidad protectora del nuevo candidato en modelo murino. Para ello, ratones BALB/c recibieron una dosis de la vacuna a virus inactivado comercial o dos de Ad[P]VP2. En animales inoculados con Ad[P]VP2 se determinaron títulos de anticuerpos totales ( $4,5 \pm 0,15$ ) y neutralizantes ( $1,45 \pm 0,03$ ) contra el VFA, similares a los estimados en el grupo que recibió vacuna convencional. Interesantemente el nuevo candidato logró proteger al 90% de los animales inoculados. En conclusión, se logró desarrollar un Ad que dirige la expresión de altos niveles de subunidades del VFA cepa O1Campos, donde una proporción es capaz de autoensamblarse y formar partículas tipo virus. Además, el candidato desarrollado es capaz de inducir una respuesta inmune efectiva permitiendo alcanzar un nivel de protección del 90%, sin incluir ningún adyuvante, en pruebas de desafío homólogo en modelo murino.

 <p>ISSN 1666-7948</p> <p><a href="http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar">www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</a></p>	<p>Revista <b>QuímicaViva</b></p> <p>Número 1, año 19, Abril 2020</p> <p><a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a></p>
---	---


## **Correlación entre la respuesta inmune inducida por cápsides vacías naturales del VFA y la seroneutralización viral en el modelo murino.**

**Miraglia, MC; Bucafusco, D; Di Giacomo, S; Schammas, J; Ayude, A; Capozzo, A; Pérez Filgueira, M**

*IVIT (CONICET INTA)*

*Contacto: [miraglia.maria@inta.gob.ar](mailto:miraglia.maria@inta.gob.ar)*

El modelo murino se encuentra ampliamente aceptado para ser utilizado como un modelo de evaluación de la respuesta inmune inducida por las vacunas actuales contra el Virus de la Fiebre Aftosa (VFA). De esta manera, su uso podría utilizarse para evaluar diferencias cualitativas entre vacunas formuladas con virus completo inactivado (146S) y vacunas formuladas con cápsides carentes de ARN naturales (75S) focalizando la atención en los mecanismos que subyacentes a la respuesta inmune inducida por ambos antígenos. Los resultados presentados anteriormente por nuestro grupo en el modelo murino evidenciaron diferencias significativas, a partir de los 21 dpv, en la producción de anticuerpos IgG totales anti-VFA entre grupos de animales C57Bl/6 vacunados con una formulación conteniendo 0,3 ug/dosis de cápsides completas, 146S y cápsides vacías naturales (75S). A pesar de estas diferencias, la supervivencia fue del 100% para ambos grupos experimentales en el modelo murino de letalidad, aun cuando solo el grupo inmunizado con 146S presentó diferencias significativas de IgG total con respecto al grupo control, previo al desafío. El presente trabajo pretende evaluar la correlación de estos antecedentes con ensayos de seroneutralización viral. Para ello, los sueros procedentes de ratones vacunados con 0,3 ug/dosis de 146S y 75S fueron enfrentados a virus homólogo A24/cruzeiro con el fin de evaluar la presencia o ausencia de efecto citopático sobre células BHK. El grupo de animales vacunados con la formulación de 0,3 ug/dosis de 75S alcanzó niveles basales de anticuerpos neutralizantes con respecto al grupo de animales vacunados con la formulación de las cápsides 146S a los 26 dpv, previo al momento del desafío. Esta discordancia entre la ausencia de anticuerpos neutralizantes en el grupo 75S y la protección conferida frente al desafío viral, revelarían diferencias cualitativamente diferentes en la respuesta humoral inducida por uno u otro antígeno.

 <p>ISSN 1666-7948</p> <p><a href="http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar">www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</a></p>	<p>Revista <b>QuímicaViva</b></p> <p>Número 1, año 19, Abril 2020</p> <p><a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a></p>
---	---

## Nanoanticuerpos, potenciales moléculas antivirales para el virus de influenza

A.

**Pavan, MF; Gómez, JM; Ibañez, LI.**

*Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein, CONICET.*

Contacto: [mflorenciapavan@gmail.com](mailto:mflorenciapavan@gmail.com)

El virus de influenza A causa infecciones respiratorias en humanos y animales, y es responsable de epidemias estacionales en todo el mundo. Hasta ahora, las vacunas son la medida más efectiva para prevenir dichas infecciones, mientras que los antivirales representan una segunda estrategia para el control de la infección. Sin embargo, la aparición de múltiples cepas resistentes a estos antivirales ha marcado la necesidad de una mejora en el desarrollo de fármacos y de nuevas estrategias antivirales. Teniendo en cuenta esta necesidad, se han desarrollado nanoanticuerpos (VHHs) que reconocen una región conservada de la hemaglutinina (HA) de influenza. Los VHHs corresponden a la región variable de los anticuerpos de cadena pesada de camélidos y poseen ventajas en relación con los anticuerpos monoclonales, como su alta afinidad, especificidad, estabilidad y solubilidad y su bajo peso molecular y costo de producción. En este trabajo proponemos expresar y purificar los VHHs desarrollados y determinar el reconocimiento de los mismos frente a distintos tipos de virus de influenza A. A su vez, se plantea estudiar la capacidad inhibitoria de los VHHs monovalentes frente a la infección viral en modelo de ratón. Para la expresión de los VHHs monovalentes y bivalentes se utilizaron bacterias BL21, las cuales fueron transformadas con vectores de expresión pHEN6 que contienen la secuencia de los VHHs. Los mismos se obtuvieron en forma soluble desde periplasma y se purificaron mediante cromatografía de afinidad utilizando resinas de níquel. Tanto la expresión como purificación de los VHHs se analizó mediante y teñido con . Por otra parte, la capacidad de unión de los VHHs a la HA de los distintos tipos de virus de influenza se analizó mediante la técnica de ELISA, en donde se cubrieron microplacas (Maxisorp) con diluciones conteniendo 16 unidades hemaglutinantes de los diferentes subtipos de virus. Para el estudio de la capacidad inhibitoria, se utilizaron ratones BALB/c, a los que se administró intranasalmente VHHs en diferentes concentraciones, seguido de un desafío con el virus pH1N1. El peso de los ratones se monitoreó durante 14 días. Se lograron producir VHHs monovalentes y bivalentes, con rendimientos considerables, que tienen capacidad de reconocimiento heterotípica, ya que reconocen virus de influenza de distintos grupos filogenéticos. A su vez, los estudios preliminares en modelo de ratón mostraron que los VHHs poseen cierta tendencia a proteger de la infección viral. En este trabajo demostramos que es posible producir VHHs, que reconocen distintos tipos de virus de influenza, de manera sencilla, a bajo costo y con mucha pureza. Los VHHs generados serán utilizados para continuar con estudios e de la inhibición de la infección viral.

 **Química Viva**

ISSN 1666-7948

[www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)

Revista **Química Viva**

Número 1, año 19, Abril 2020

[quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)



## Relación estructura actividad de derivados de 2 fenil quinazolinas con actividad antiviral frente al virus de la diarrea viral bovina.

**Rosas, RA(1,3); Fernandez, GA(3), España de Marco, MJ(1); Fabiani, M(1); Castro, E(2); Bollini, M(3); Cavallaro, LV(1).**

*(1) Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Cátedra de Virología. Buenos Aires, Argentina; (2) CONICET-Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Cátedra de Virología. Buenos Aires, Argentina; (3) CONICET, Centro de Investigaciones en Bionanociencias (CIBION). Buenos Aires, Argentina.*

Contacto: [rosasrocioa@gmail.com](mailto:rosasrocioa@gmail.com)

Las infecciones por virus de la Diarrea viral bovina (BVDV) están distribuidas mundialmente y causan enfermedades gastrointestinales, respiratorias y reproductivas que afectan principalmente al ganado bovino. La vacunación (opcional) y la eliminación de animales persistentemente infectados son las estrategias de control disponibles actualmente. Desarrollar antivirales que puedan ser útiles para el tratamiento de las infecciones por BVDV resulta un objetivo muy atractivo. A partir de un screening in silico basado en la interacción de ligandos con la estructura de la ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp) de BVDV se seleccionaron varios compuestos con actividad anti-BVDV. Entre ellos, una quinazolina a la que se denominó compuesto 1 ( $EC_{50} = 9.68 \pm 0.49 \mu M$ ) fue seleccionada para su optimización estructural con el objetivo de aumentar su potencia antiviral y definir los requerimientos estructurales necesarios para la actividad antiviral. A partir del compuesto 1, se sintetizaron 26 nuevos derivados con distintas sustituciones químicas en su molécula. Los ensayos biológicos se realizaron utilizando células MDBK y el virus de la diarrea viral bovina cepa NADL biotipo citopático. En primer lugar, se evaluó la citotoxicidad para cada compuesto por el método MTS / PMS y a partir de la máxima concentración no citotóxica, se determinó la actividad antiviral mediante la reducción del efecto citopático viral. Se determinó los valores de concentración citotóxica 50 (CC50) y la concentración efectiva 50 (CE50), respectivamente de cada compuesto. El índice de selectividad (IS) =  $CC_{50} / CE_{50}$ . Los resultados obtenidos demuestran que al menos seis nuevas quinazolinas derivadas presentan mayor actividad antiviral que el compuesto 1 con valores de CE50 en el rango de 0,9 - 2,8  $\mu M$  y mayor IS. Los resultados obtenidos sugieren que la sustitución del grupo fenilo en posición 2 de la quinazolina por 2,4-dicloro fenil o por 4-Nitro-fenil aumenta la citotoxicidad del compuesto e inhibe la actividad antiviral. Por otro lado, una sustitución del grupo en posición 4 de la quinazolina (DV1 4-etilmorfolin) por 4-metipiridina N-óxido RdRp31 R3) anula la actividad antiviral e induce un efecto hiperproliferante en las células. Los compuestos que contienen H en posición 7, fenilo en posición 2 y metil piperazina o 2-hidroxiethylpiperazina en posición 4 de la quinazolina, presentan una mayor actividad antiviral.

 **Química Viva**

ISSN 1666-7948

[www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)

Revista **Química Viva**

Número 1, año 19, Abril 2020

[quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)




## **Desarrollo de vacunas orales contra enfermedades respiratorias utilizando proteínas variables de superficie (VSPs) de Giardia lamblia**

**Rupil, LL(1, 2); Serradell, MC (1, 3); Saura, A(1, 2); Luján, HD(1, 2)**

*(1)Centro de Investigación y Desarrollo en Inmunología y Enfermedades Infecciosas (CIDIE) - CONICET; (2) Universidad Católica de Córdoba; (3) Universidad Nacional de Córdoba.*

*Contacto: lrupil@cidie.ucc.edu.ar*

es un parásito unicelular que coloniza el intestino delgado superior de muchos vertebrados, y es el agente causante de la giardiasis. Para sobrevivir en el intestino, la superficie del trofozoito de está completamente cubierta por proteínas de superficie variante-específicas o “variant specific surface-proteins” (VSPs), que poseen alta inmunogenicidad y resistencia a cambios de pH y proteasas. En un trabajo reciente propusimos una nueva estrategia de vacunación oral al administrar las VSPs junto a un antígeno de interés, logrando así que las VSPs protejan al antígeno de la degradación en el tracto gastrointestinal y actúen como un adyuvante de mucosas. Como prueba de concepto, generamos una vacuna oral contra el virus de la influenza compuesta por partículas similares a virus (VLPs, del inglés “virus-like particles”) que contienen en su envoltorio VSPs de y el antígeno HA (hemaglutinina del virus de la influenza). La vacunación oral de ratones con VLPs recubiertas con VSPs confirió protección frente a la infección con el virus y también frente al desarrollo de tumores que expresan el antígeno viral HA, sin la necesidad de adyuvantes externos. Estos resultados evidenciaron que estas vacunas orales fueron capaces de activar diferentes componentes del sistema inmunitario, generando anticuerpos en mucosas que impiden la unión y la invasión por patógenos, anticuerpos séricos que controlan en un nivel sistémico a patógenos invasivos, como también una efectiva inmunidad celular. Nuestra hipótesis actual es que se puede inducir una efectiva respuesta inmune contra otros patógenos, tal como el Virus Sincicial Respiratorio (VSR), por medio de vacunación oral empleando VSPs como vectores. VSR es el agente viral más común de infecciones respiratorias en niños y aún no existe una vacuna contra el mismo. Nuestros objetivos serán clonar las proteínas del envoltorio viral del VSR (proteína de fusión F y proteína de unión G) y generar VLPs que presenten VSPs y dichas proteínas virales en su cubierta. Luego estas partículas serán administradas por vía oral a ratones y se medirá la eficacia y seguridad de las vacunas. Para cumplir estos objetivos, se obtuvieron muestras de aspirado naso-faríngeo positivas para VSR por inmunofluorescencia y se cultivó el virus en células HEp-2. Además se generaron anticuerpos policlonales y un anticuerpo monoclonal de ratón contra el virus. Actualmente nos encontramos en la etapa de clonación de los genes para obtener los plásmidos que se utilizarán para generar las VLPs. Con la realización de este proyecto esperamos obtener una novedosa y efectiva vacuna oral contra el patógeno VSR.

 <p>ISSN 1666-7948</p> <p>www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</p>	<p>Revista <b>QuímicaViva</b></p> <p>Número 1, año 19, Abril 2020</p> <p><a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a></p>
---	---

## Optimización y aplicación de una PCR multiplex para la detección de los géneros A, B, C y D de Influenza.


**Abeyá, MM(1, 2); Origlia, JA(1); Aspita, CG(3); Tizzano, MA(1); Echeverría, MG(1, 2); Sguazza, GH(1)**

*(1) Laboratorio de Virología (LAVIR) Facultad de Ciencias Veterinarias – UNLP; (2) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); (3) Cátedra de Patología Especial. Facultad de Ciencias Veterinarias – UNLP.*

Contacto: [mercedesabeya06@hotmail.com](mailto:mercedesabeya06@hotmail.com)

La Influenza es causada por distintos virus pertenecientes a la familia . En la actualidad se reconocen cuatro géneros dentro de esta familia capaces de producir enfermedades respiratorias en distintos animales. Los virus del género A (IAV) presentan un rango de huésped muy amplio y han sido aislados a partir de muchas especies incluyendo humanos, cerdos, equinos, mamíferos marinos y un vasto número de aves tanto domésticas como salvajes, siendo los únicos de los cuatro géneros que a su vez pueden ser divididos en subtipos de acuerdo a la composición de sus antígenos de superficie. Los virus del género Influenza B (IBV) son patógenos predominantemente para los humanos aunque también han sido aislados en otros animales como hurones y mamíferos marinos. Los virus del género Influenza C (ICV) son estructural y genéticamente distintos a los de los géneros A y B, se considera que el hombre es el reservorio natural de estos virus, aunque también han sido aislados en otros animales como cerdos y perros. El género Influenza D (IDV) se supone que deriva de ICV y ha evolucionado en el tiempo por la acumulación de mutaciones, por lo cual ha sido clasificado dentro de un género propio; fue aislado por primera vez en cerdos, posteriormente fue hallado en bovinos y pequeños rumiantes y recientemente se ha demostrado que también circula en equinos. El objetivo de este trabajo, fue desarrollar y poner a punto una prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa múltiple (mPCR) capaz de detectar los distintos géneros de a partir de muestras de animales de diversos orígenes. Con este fin, se diseñaron específicos para cada uno de los géneros a partir de un alineamiento múltiple de secuencias del segmento 5 (que codifica para la proteína NP) y la proteína M1 (segmento 7 de IAV e IVB o segmento 6 de ICV e IDV). Posteriormente, se verificó el correcto funcionamiento de cada par de en reacciones separadas utilizando los controles correspondientes a cada género. Luego, se estandarizó la mPCR considerando los parámetros más críticos de la PCR: método de extracción del ARN; mezcla de reacción (concentraciones de cada par de y MgCl<sub>2</sub>); ciclado (se probaron distintos número de ciclos); temperaturas y tiempos de , con el fin de optimizar la reacción de amplificación. Los productos de amplificación obtenidos con cada par de fueron secuenciados y posteriormente analizados para comprobar la especificidad de cada par de . Una vez puesta a punto la mPCR se procesaron

muestras (hisopados y órganos) de animales domésticos y silvestres. Si bien son necesarios mayores estudios para validar esta técnica, hasta el momento ha demostrado ser efectiva para la identificación de los virus circulantes en distintos animales y en el futuro podría constituir una herramienta de suma utilidad para comprender la epidemiología de estos virus y su dispersión en diversos ecosistemas.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---

## **Estrategia para mejorar la eficiencia de transducción de AcMNPV en células de mamíferos**


**Amorós Morales, LC; Fabre, ML; Pidre, ML; Ure, AE; Romanowski, V.**

*Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM-UNLP-CONICET)*

*Contacto: amorosleslie@gmail.com*

Los baculovirus son virus específicos de artrópodos, poseen un genoma de ADN de doble hebra circular que varía entre los 80 y 180 kpb y son ampliamente utilizados para el desarrollo de terapias génicas, ya que poseen la capacidad de ingresar a las células de mamíferos y expresar genes foráneos. El virus modelo utilizado es Nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) cuya eficiencia de transducción es muy diversa entre las diferentes líneas celulares de mamífero. El objetivo del presente trabajo consiste en obtener baculovirus pseudotipados para aumentar la eficiencia en el ingreso celular. Para ello, se ha desarrollado una línea celular transgénica de insecto que expresa constitutivamente la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV), la cual permitirá la incorporación de la proteína G en la membrana de los baculovirus propagados en las mismas. Se generó el plásmido de expresión pIP-VSVG a partir del clonado del ORF de VSV-G. Posteriormente, las células de insecto (Hi5) fueron transfectadas con este plásmido y seleccionadas con puromicina para la obtención de la línea monoclonal Hi5-VSVG. Para los ensayos de transducción, AcMNPV-dtomato fue amplificado en células Hi5- (Hi5-wt) y en Hi5-VSVG. Los sobrenadantes de infección se centrifugaron 1h a máxima velocidad y luego se incubaron en las células de mamífero durante 2,5 hs a temperatura ambiente. Finalmente, se procedió al conteo de placas por microscopía de fluorescencia. Las células Hi5-VSVG fueron analizadas por inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo primario anti VSVG seguido de una incubación con un anticuerpo secundario Cy3. Los resultados fueron analizados por microscopía confocal. Se generó la línea celular de insecto monoclonal Hi5-VSVG y la expresión de la glicoproteína G de VSV. Su localización en la membrana celular se verificó por inmunofluorescencia. El virus AcMNPV-dTomato fue propagado en estas células Hi5-VSVG y en células Hi5-wt (control). Ambos virus fueron utilizados en ensayos de transducción de células humanas de adenocarcinoma de pulmón (A549) y observación por microscopía de epifluorescencia. Se evidenció un aumento significativo en la eficiencia de la transducción con el virus amplificado en células Hi5-VSVG comparado con el control. Paralelamente, se ensayaron las mismas condiciones en células de riñón de embrión humano (HEK 293T) y en

células epiteliales de riñón de mono (Vero) en las que no se verificaron diferencias significativas en las eficiencias de transducción. En este trabajo, hemos generado una línea celular transgénica de insecto que permite la producción de baculovirus pseudotipados con la glicoproteína G de VSV. Se ha demostrado que el virus propagado en esta línea celular es más eficiente que el virus propagado en células de insecto wt en ciertas líneas celulares de mamífero. Esta plataforma nos permitirá aumentar el tropismo de los baculovirus para su aplicación como vectores para terapia génica.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>QuímicaViva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	--

## **Producción y caracterización de HB-VLPs expresadas en líneas celulares de mamíferos. Evaluación de su inmunogenicidad en animales de experimentación.**


**Battagliotti, JM; Fontana, D; Etcheverrigaray, M; Prieto, C.**

*Centro Biotecnológico del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.*

Contacto: [jbattagliotti@fbcbl.unl.edu.ar](mailto:jbattagliotti@fbcbl.unl.edu.ar)

La Hepatitis B es una infección hepática potencialmente mortal causada por el virus de la hepatitis B (HBV). Aún hoy en día, constituye un importante problema de salud a nivel mundial, afectando a más de 250 millones de personas. El principal antígeno de este virus y el de mayor importancia en la inducción de protección es su antígeno de superficie (HBsAg), el cual consta de tres proteínas denominadas S (Small), M (Middle) y L (Large). En la actualidad, la vacuna para Hepatitis B que se comercializa en Latinoamérica es producida en levaduras, expresando solo la proteína S en su forma no glicosilada. Si bien esta vacuna ha demostrado ser eficaz y segura, alrededor de un 10% de la población no logra desarrollar una respuesta inmune protectora. Una estrategia para mejorar esta situación, es la inclusión de las 3 proteínas de superficie (S, M y L) en sus formas glicosiladas. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo persigue la expresión de las tres glicoproteínas de envoltura del HBV en células de mamíferos como estrategia para el desarrollo de un candidato vacunal de nueva generación, a base de VLPs para hepatitis B (HB-VLPs). Para esto, se generaron líneas celulares de mamífero recombinantes estables productoras del HBsAg. El nivel de expresión y la localización subcelular de las proteínas recombinantes en cada línea celular fue analizada mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. El brote de HB-VLPs al sobrenadante de cultivo se determinó mediante un ensayo de ELISA sándwich. Posteriormente, para determinar si estas VLPs estaban compuestas por las tres glicoproteínas de superficie, se llevó a cabo una variante del ensayo de ELISA sándwich en el cual se emplearon anticuerpos monoclonales específicos para la captura de cada glicoproteína. A su vez, la antigenicidad de estas partículas fue evaluada mediante western blot. Posteriormente, la inmunogenicidad de estas partículas fue analizada en ratones. Se inyectaron 3

grupos de animales (n=5). A los grupos I y II se les inyectó HB-VLPs provenientes de las líneas recombinantes CHO y HEK, respectivamente. El grupo III fue inoculado con antígeno S proveniente de una vacuna comercial producida en levaduras. El título de anticuerpos fue determinado mediante ELISA específico indirecto. A su vez, se evaluó la presencia de anticuerpos específicos anti-L capaces de reconocer el sitio de unión del HBV con el hepatocito. En este trabajo, por lo tanto, ha sido posible expresar el antígeno de superficie del HBV en dos líneas celulares de mamífero y detectar el brote de HB-VLPs formadas por las tres glicoproteínas de superficie del HBV. A su vez, estas partículas fueron caracterizadas fisicoquímicamente y se pudo demostrar que resultan inmunogénicas al ser inyectadas en animales de experimentación. Además, en los sueros de los ratones inmunizados con HB-VLPs, ha sido posible confirmar la presencia de anticuerpos capaces de reconocer el sitio de interacción entre el HBV y los hepatocitos.

 ISSN 1666-7948 <a href="http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar">www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</a>	Revista <b>QuímicaViva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	--

## **Estudio de la utilización de anticuerpos de dominio único derivados de camélidos (VHH o nanoanticuerpos) como nuevas herramientas con potencial aplicación diagnóstica en Fiebre Aftosa.**


**Bozzo, J; Marchese, F; Seki, C; Periolo, O; Malirat, V; Grippo, V.**

*CEVAN - CONICET.*

*Contacto: [joaquini.bozzo@gmail.com](mailto:joaquini.bozzo@gmail.com)*

La Fiebre Aftosa (FA) es una enfermedad viral del ganado de alto impacto económico. Existen siete serotipos del Virus de la FA (VFA), habiendo circulado en el país los serotipos O, A, y C. Argentina ha logrado el estatus de la OIE como país "libre de FA" con zonas donde se aplica y donde no se aplica la vacunación. La potencia de la vacuna es controlada lote a lote por un ELISA de Competición en Fase Líquida (CFL) que utiliza suero policlonal de conejo como anticuerpo (Ac) de captura. El reemplazo del suero por Acs monoclonales (mAcs) brindaría una mayor reproducibilidad entre lotes, una mayor especificidad analítica y la posibilidad del escalado de la producción de Acs idénticos. A su vez, los Acs de dominio único derivados de camélidos (nanoanticuerpos o VHH) han revolucionado el campo de los mAcs presentando alta especificidad y afinidad por su blanco, pero caracterizándose por sus propiedades únicas como alta estabilidad y producción simple. Los VHH se han convertido en herramientas novedosas y versátiles de aplicación diagnóstica, terapéutica y en investigación. Por esta razón, el presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el uso de VHH específicos contra la cepa vacunal O1/Campos (O1C) del VFA como nuevos Acs de captura en ELISA. Para lograr tal objetivo, se inmunizaron dos llamas con la vacuna antiaftosa y se construyeron bibliotecas de VHH. En una primera etapa, se seleccionaron nanoanticuerpos (nanoAcs) específicos contra la cepa O1C por la metodología de "Phage Display". De los 13 VHH más reactivos, se

eligieron 4 para estudiar su uso como Ac de captura específico de la cepa O1C en ELISA. Estos VHH fueron expresados de forma soluble en *E. coli* y purificados por cromatografía de quelatos metálicos inmovilizados (IMAC). Se evaluó la captura del virus con distintas concentraciones de los VHH inmovilizados en placa de ELISA y se determinó la concentración óptima de uso. Como control positivo, se utilizó el suero policlonal de conejo generado contra la cepa O1C, empleado actualmente en ELISA CFL. La captura se realizó tanto con cada VHH como con paneles de combinaciones de los 4 nanoAcs. En todos los casos, la captura del virus por los VHH fue positiva y comparable a lo observado con el suero policlonal. Además, se estudió la especificidad analítica de los VHH como Ac de captura de las otras tres cepas vacunales del VFA. Se observó que los VHH presentaron una mayor especificidad analítica en comparación con el suero policlonal, como era de esperarse. En conclusión, los 4 VHH empleados como Ac de captura en ELISA fueron capaces de inmovilizar el virus, mostrando mayor especificidad analítica que el suero policlonal. Más aun, estos VHH tienen la potencialidad de aumentar la reproducibilidad y simplificar las condiciones de captura en la técnica de ELISA CFL utilizada para el control de la potencia de la vacuna. Estos VHH representan una herramienta potencial y versátil para la innovación de las técnicas en el control de la Fiebre Aftosa.

 ISSN 1666-7948 <a href="http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar">www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</a>	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---

## **Desarrollo de una plataforma de presentación antigénica para el virus de la fiebre aftosa mediante el empleo de la glicoproteína G del virus de la rabia. Generación de VLPs quiméricas.**


**Garay, E; Fontana, D; Prieto, C.**

*Centro Biotecnológico del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL*

*Contacto: [egaray@fcb.unl.edu.ar](mailto:egaray@fcb.unl.edu.ar)*

Las (VLPs) son estructuras macromoleculares autoensamblables de una o más proteínas virales, con una estructura similar a la del virus nativo pero que no contienen material genético en su interior. Son capaces de inducir respuestas inmunes potentes y duraderas, y permiten la generación de anticuerpos hacia epitopes heterólogos al fusionar dominios proteicos de otros organismos a las proteínas virales, constituyendo de esta forma VLPs quiméricas. En nuestro laboratorio se desarrolló previamente una VLP del virus de la rabia, mediante la expresión recombinante de la glicoproteína G del mismo (RV-G) en células HEK293. Para evaluar la capacidad de presentación de epitopes heterólogos por parte de dichas partículas, se planteó el diseño de una proteína de fusión entre la RV-G y el péptido G-H (20 AA) del virus de fiebre aftosa (FMDV), debido a su elevada inmunogenicidad. Con este objetivo, se fusionó la secuencia codificante del péptido (serotipo A/Arg/01) inmediatamente antes de la secuencia codificante de RV-G, de manera que éste se localice en el extremo N-terminal de la misma. Por transgénesis se insertó dicha secuencia en células SHEK293, generándose una línea celular que expresa en forma estable la proteína quimérica

(GH-RV-G). Mediante marcación con anticuerpos anti-RV-G y anti-FMDV se logró detectar dicha proteína en la membrana plasmática de la línea celular, tanto por citometría de flujo como por microscopía de fluorescencia. Posteriormente, mediante ELISA sándwich de sobrenadantes de cultivo se lograron detectar VLPs quiméricas utilizando anticuerpos específicos anti-FMDV y anti-RV-G. De esta manera se comprobó que el péptido G-H se encuentra expuesto y adquiere una conformación similar a la nativa en la cápside del virus. A su vez, dicha proteína es capaz de brotar en forma de VLPs exponiendo en su superficie el epítipo heterólogo. Por otro lado, se evaluó la co-expresión de una proteína de fusión entre Gag de HIV-1 y la proteína verde fluorescente (GFP, ) denominada Gag-GFP. Esta proteína es capaz de brotar al sobrenadante de cultivo arrastrando glicoproteínas de membrana, aumentando la eficiencia de generación de VLPs. Se realizaron transfecciones de células sHEK293 con la secuencia codificante de GH-RV-G y de Gag-GFP, y se cosechó el sobrenadante de cultivo conteniendo las VLPs de Gag-GFP pseudotipadas con la glicoproteína de fusión en la membrana, comprobándose un aumento en la productividad de VLPs. Finalmente, mediante un ensayo de inmunización de ratones BALB/c, se comprobó la capacidad de la proteína quimérica GH-RV-G de generar anticuerpos hacia el epítipo. Las VLPs de Gag-GFP pseudotipadas con GH-RV-G evidenciaron una mayor inmunogenicidad que las que contenían únicamente la glicoproteína de envoltura.

 <p>ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</p>	<p>Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a></p>
--	--

## Utilización de baculovirus recombinantes para delivery génico en células de cáncer de mama triple negativo

**Gómez Bergna, SM(1, 2); Marchesini, A(1); Gottardo, MF(2); Romanowski, V(1); Pidre, ML(1).**


(1) *Laboratorio de Virología Molecular, Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM-UNLP-CONICET); (2) Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes (UNQ)*

Contacto: [sgomezbergna@gmail.com](mailto:sgomezbergna@gmail.com)

El desarrollo y utilización de estrategias de terapia génica para el tratamiento de enfermedades no infecciosas se ha incrementado en los últimos años. Los vectores virales son muy utilizados para este fin debido a que tienen la capacidad de ingresar en células de mamífero y conducir a la expresión de genes heterólogos. En particular, el baculovirus (AcMNPV), es un virus patógeno de insectos que es capaz de transducir células de mamífero sin producir viriones infectivos. El cáncer de mama triple negativo (TNBC) es una neoplasia maligna caracterizada por la ausencia de la expresión de los receptores de estrógeno, progesterona y HER2. Estos tumores son muy agresivos y poseen una alta tasa de recurrencia. Además, pueden generar resistencia a la quimioterapia y la radioterapia. Diferentes trabajos demostraron que la sobreexpresión de miembros de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) es responsable de dicha resistencia. En particular, la proteína



BIRC6 es el miembro más grande de esa familia (528 kDa) y su rol en TNBC se encuentra poco estudiado. En nuestro laboratorio, se generó un baculovirus recombinante que expresa un shRNA complementario a la región 3'UTR del gen humano, y que además conduce a la expresión de la proteína reportera dTomato en células de mamífero. Los objetivos de este trabajo consistieron en evaluar la capacidad de los baculovirus recombinantes de transducir células de carcinoma mamario triple negativo murino (F3II) y humano (MDA-MB-231), optimizar el protocolo de transducción, y evaluar el efecto del silenciamiento de BIRC6 sobre las células utilizadas. Para ello, se incubaron las líneas celulares con diferentes cantidades de partículas baculovirales, con o sin el agregado de polietilimina. Se evaluó la eficiencia de transducción mediante la expresión de la proteína dTomato. Posteriormente, se evaluaron los niveles de apoptosis inducida por la transducción viral, mediante la técnica de TUNEL. Se evidenció el silenciamiento de la proteína BIRC6 mediante inmunofluorescencia indirecta. Se observaron células fluorescentes luego de la incubación con el baculovirus recombinante, producto de la transducción en las diferentes líneas celulares. Además, se observó una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de apoptosis inducidos en las células transducidas con el baculovirus silenciador en comparación con las transducidas con un baculovirus control. Por último, se observó mediante microscopía confocal una disminución en los niveles de expresión de BIRC6 en aquellas células efectivamente transducidas con el baculovirus silenciador. Estos resultados indican que las células de carcinoma mamario triple negativo murino y humano son permisivas para la transducción mediada por baculovirus. Además, el baculovirus recombinante generado fue capaz de silenciar la expresión de BIRC6 tanto en células humanas como murinas e inducir apoptosis.

 ISSN 1666-7948 <a href="http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar">www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</a>	Revista <b>QuímicaViva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	--

## **Producción de la proteína recombinante NS1 del virus del dengue para el diseño de ensayos diagnósticos**


**Niño, L; Alvarez, D; Del Giudice, M**

*Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB) – UNSAM*

*Contacto: [ludmilaninio2@gmail.com](mailto:ludmilaninio2@gmail.com)*

Los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV) pertenecen al género flavivirus y son transmitidos al hombre por la picadura de mosquitos del género Aedes. La viremia se extiende hasta 5-7 días y sólo en este período es posible el diagnóstico directo mediante aislamiento del virus o detección del genoma por RT-PCR. La detección de anticuerpos IgM/IgG contra DENV mediante técnicas de ELISA es un método de diagnóstico indirecto, sólo puede aplicarse al final de la fase aguda y es frecuente la detección de falsos positivos en pacientes previamente infectados con dengue o con otro flavivirus. Una alternativa para el diagnóstico de dengue durante la etapa aguda es la detección del antígeno viral NS1, los niveles de esta proteína se correlaciona con los niveles de viremia y la

proteína se detecta hasta los 9 días y puede persistir por 18 días. Por ende, NS1 es un marcador ideal para el diagnóstico directo de la infección por DENV en etapa aguda. Nuestro objetivo es generar un inmunoensayo cromatográfico basado en la captura de NS1 con el uso de anticuerpos monoclonales. NS1 es una proteína glicosilada que se asocia como homodímero a vesículas intracelulares, y se encuentra soluble en el medio extracelular formando un hexámero. Con el fin de obtener la proteína NS1 de dengue en su forma hexamérica, nos propusimos usar el sistema de baculovirus-células de insecto que permite producir proteínas recombinantes con buenos niveles de expresión y un procesamiento post-traducciona similar al de la proteína nativa. En primer lugar, se realizó el clonado de NS1 que se fusionó el péptido señal de la proteína de baculovirus GP64 y en el C-terminal una secuencia de 6xHis, lo que aportó un principio de purificación. Se clonó la proteína en un vector de transferencia y se obtuvieron genomas de baculovirus recombinantes por transposición sitio-específica del cassette de expresión de NS1 en un bácmido que contiene el genoma completo de baculovirus en la cepa de E. coli DH10Bac. Luego se prepararon los DNAs para obtener los virus recombinantes transfectando células de insecto Sf9. Para evaluar la expresión de NS1, se infectaron células Sf9 con los stocks de baculovirus y se ensayo la expresión en el sobrenadante de cultivo y en el lisado celular por Western blot con un anticuerpo contra 6xHis. Se detectó la presencia de una banda que corresponde a NS1 mayoritariamente en el sobrenadante. Finalmente se pusieron a punto las condiciones de expresión y purificación de NS1 a partir del medio de cultivo de células en suspensión. La proteína recombinante se purificó por cromatografía de afinidad a columnas de níquel con un rendimiento estimado de 4 ug/millón de células. Con el fin de obtener los anticuerpos monoclonales para la captura y detección de NS1 en ensayos diagnósticos, empleamos la proteína recombinante como antígeno para inmunizar ratones. Estos anticuerpos serán acoplados a plataformas de ELISA o a sistemas point-of-care.

 ISSN 1666-7948 <a href="http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar">www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</a>	Revista <b>QuímicaViva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	--

## **Generación y caracterización funcional de baculovirus recombinantes con potencial terapéutico contra adenocarcinoma pulmonar.**


**Marchesini, A; Gómez Bergna, SM; Perez Vidakovics, ML; Romanowski, V; Pidre, ML.**

*Laboratorio de Virología Molecular, Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM-UNLP-CONICET).*

Contacto: [abrilmarchesini@gmail.com](mailto:abrilmarchesini@gmail.com)

Los baculovirus son virus específicos de artrópodos, poseen un genoma de DNA de doble hebra circular, que varía entre 80 y 180 kpb. El baculovirus tipo (AcMNPV) ha sido ampliamente utilizado como vector de expresión de proteínas heterólogas y, más recientemente, como vector de terapia génica. Una de las enfermedades en las que ha incrementado el uso de vectores virales con fines terapéuticos es el cáncer, utilizando diferentes genes como blanco. En particular, se ha demostrado

el rol central de la familia de proteínas conocida como inhibidores de apoptosis (IAP) en el desarrollo, proliferación y agresividad de diferentes tumores. La proteína BIRC6 es un polipéptido de 528 kDa que presenta en la región N-terminal un dominio BIR de unión a caspasas y un dominio de ubiquitina ligasa (C-terminal) a través de los cuales puede inhibir la acción de diferentes proteínas efectoras de la apoptosis. Además, BIRC6 desempeña un rol fundamental en el proceso de autofagia. También, se ha demostrado que esta proteína es sobreexpresada en tumores pulmonares resistentes a las terapias convencionales. El objetivo de este trabajo consistió en la construcción de diferentes baculovirus recombinantes capaces de silenciar la expresión del gen mediante la expresión de distintos shRNA y la caracterización inicial de su efecto en células de adenocarcinoma de pulmón humano. Inicialmente se caracterizó la expresión de la proteína BIRC6 mediante inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo en condiciones normales y de inducción de autofagia. Por otro lado, se optimizó el protocolo de transducción con baculovirus en la línea celular A549, utilizando diferentes cantidades de partículas virales por célula. Posteriormente se diseñaron tres shRNA capaces de reconocer como blanco diferentes regiones del gen, fueron sintetizados y clonados en el vector pBacPAK9-sh. Este vector, además, expresa la proteína roja fluorescente dTomato. A continuación, se utilizaron los plásmidos obtenidos como vectores de transferencia para generar tres baculovirus recombinantes mediante recombinación homóloga en células de insecto. Finalmente, se evidenció el silenciamiento inducido por la transducción con los baculovirus recombinantes mediante inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo. La capacidad de los shRNA para inducir apoptosis fue evaluada mediante la técnica de TUNEL. En este trabajo pudo detectarse la expresión de la proteína BIRC6 en la línea celular A549. Uno de los baculovirus recombinantes obtenidos fue capaz de vehicular un shRNA con el gen como blanco y de reducir efectivamente su expresión. Por último, el mismo fue capaz de inducir apoptosis en un 30% de las células tratadas. Estos resultados son alentadores y abren camino a futuros ensayos en modelos animales, postulando al baculovirus recombinante obtenido como un posible vector de terapia génica contra adenocarcinoma de pulmón.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---

## **Prevalencia del Virus del Papiloma Humano (HPV) y Chlamydia trachomatis (CLT) y en un centro ginecológico en mujeres jóvenes de Córdoba Capital**


**Butassi, ED(1); Arriba, F(1); Elbarcha, O(1, 2); Martínez Wassaf, MG(1, 2)**

*(1) Departamento de Virología - LACE Laboratorios; (2) Cátedra de Virología - Fac. Ciencias Químicas - UCC*

Contacto: [eve\\_butassi@hotmail.com](mailto:eve_butassi@hotmail.com)

Hay más de 30 tipos infecciones de transmisión sexual pero 8 con mayor incidencia, de las cuales, la infección por Chlamydia trachomatis (CLT) es una de las cuatro bacterianas curables, mientras que la de Virus del Papiloma Humano (HPV), es una de las cuatro virales que no se cura. Hay más de 180 tipos de HPV, algunos causan verrugas en los genitales y otras partes del cuerpo y son llamados de

Bajo Riesgo (más comunes el HPV 6 y 11). Otros tipos de HPV pueden provocar cambios precancerosos en el cuello uterino o cáncer cervical, otros tipos de cáncer genital u orofaríngeos y son llamados de Alto Riesgo (más comunes HPV 16 y 18). La CLT ocasiona infertilidad, embarazos ectópicos y dolor pelviano crónico. Está asociada también con abortos, aumento de la mortalidad neonatal y rotura prematura de membranas. No existe vacuna para prevenir la CLT pero sí para HPV 6, 11, 16 y 18. Esta vacuna está en el calendario de vacunación en Argentina desde 2011 para mujeres y desde 2015 para varones de 11 años de edad. Se analizaron muestras de cepillado endocervical en pacientes de sexo femenino en un centro ginecológico de la ciudad de Córdoba entre 01/2018 y 08/2019, 90 para HPV y 287 para CLT. Las mujeres testeadas para HPV no estaban vacunadas para HPV y tenían diagnóstico de lesiones intraepiteliales escamosas (SIL) de alto y bajo riesgo, displasia de cérvix, cervicitis/vaginitis, leucorrea y leucoplasia de cuello. Las mujeres testeadas para CLT lo hicieron en su control anual ginecológico sin sintomatología. Se realizó qPCR el termociclador Cobas z480 Roche® utilizando el kit comercial high risk Human Papillomavirus, Multiplex screening (Genesig) que detecta genotipos 16, 18 y 12 genotipos de alto riesgo (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) y el kit comercial Chlamydia trachomatis, Cryptic Plasmid Helicade (DnaB) (Genesig) que detecta las serovariantes A, B, Ba, C, D, E, F, G, I, K, K1, L2, L3, H y J. Un 40% [36/90] de las muestras fueron positivas para HPV con una media de 27,5 años (20-36): 42% [15/36] resultaron otros genotipos de alto riesgo no 16, no 18; un 11% [4/26] HPV-16 y otros de alto riesgo; un 5.5% [2/36] HPV-16; un 5.5% [2/36] HPV-18 y otros de alto riesgo y un 36% [13/36] HPV no asociados a genotipos de alto riesgo. Un 4,2% [12/287] fueron positivas para CLT con una media de 24 años (20-29). En este estudio se observó una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) de otros genotipos de HPV de alto riesgo asociados a cáncer de cuello uterino respecto a las infecciones por HPV 16 y 18. Esta información nos alerta sobre qué tipos de HPV de alto riesgo están circulando, los cuales no están incluidos en la vacuna distribuida gratuitamente. Además se pudo mostrar la importancia del testeo en control ginecológico anual, sin necesidad de la presencia de síntomas, para la detección y tratamiento de CLT en mujeres de edad fértil antes de la aparición de problemas de salud en la mamá, el bebé y la disminución de costos para el sistema de salud.

 ISSN 1666-7948 <a href="http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar">www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</a>	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---


## **Aumento en la primoinfección de Citomegalovirus y Virus de Epstein-Barr en adultos inmunocompetentes en la Ciudad de Córdoba**

**Martínez Wassaf, MG(1, 2); Butassi, ED(1); Elbarcha, OC(1, 2)**

(1) Departamento de Virología - LACE Laboratorios; (2) Cátedra de Virología - Fac. Ciencias Químicas - UCC

Contacto: [maribel.martinez@laboratoriolace.com.ar](mailto:maribel.martinez@laboratoriolace.com.ar)

Los virus citomegalovirus (CMV) y Epstein-Barr (EBV) pertenecen a la familia Herpesviridae y se transmiten principalmente por contacto de saliva infectada. En niños producen un cuadro gripal leve a moderado y en adolescentes/adultos ocurre una mononucleosis infecciosa generalmente acompañado con aumento de transaminasas debido al compromiso hepático. La fase aguda de la infección de éstos virus se caracteriza por la rápida respuesta de los anticuerpos IgM e IgG. La respuesta de la IgM para CMV y EBV es transitoria y dura entre 1 y 3 meses. La respuesta de la IgG alcanza su punto máximo durante la enfermedad aguda, luego disminuye ligeramente y persiste a un nivel relativamente estable a lo largo de la vida. Las infecciones se dan todo el año. La prevalencia es del 50% a los 5 años y llega al 95% a los 30 años en adultos sanos y está íntimamente relacionado con el nivel socioeconómico del país. Se analizaron 4298 resultados de IgM-CMV (Elecys-ROCHE®) y 1326 de IgM-EBV (Immulite 2000-Siemens®) en muestras de pacientes inmunocompetentes que concurren a LACE Laboratorios entre 01/2018 y 09/2019 en la ciudad de Córdoba, Argentina. Se obtuvo un 1.9% de positivos para IgM-CMV (82/4298) y un 10.6% para IgM-EBV (140/1326) de los cuales se contaba con información epidemiológica de 48 pacientes con IgM-CMV[+] (58.5% [48/82]) y 77 con IgM-EBV[+] (55.0% [77/140]). Todas las muestras positivas se confirmaron por Inmunofluorescencia Indirecta con improntas comerciales MBL® BION. Para confirmar la primoinfección por EBV se debería corroborar la ausencia de anticuerpos IgG anti antígeno nuclear (IgG-EBNA) para diferenciarla de una reactivación (IgG-EBNA[+]). De los resultados de IgM-CMV[+], el 81.25% correspondieron a mayores de 18 años (39/48) con una media de 37.4 años [19-64] y de las IgM-EBV[+] el 35.0% (27/77), con una media de 32.1 años [18-67]. Además, de los pacientes IgM-CMV[+], el 64.6% [31/48] y el 22.0% [17/77] de los pacientes IgM-EBV[+] tenían solicitado análisis para Virus de la Hepatitis A (IgM-VHA), Virus de la Hepatitis B (AgHBs) y/o Virus de la Hepatitis C (anti-VHC), resultando en todos los casos resultados negativos. También se analizaron los valores de transaminasas y se obtuvo para los pacientes IgM-CMV[+] una media de 168.5 mUI/mL (39-598) de AST y de 198 mUI/mL (34-924) de ALT. Para los pacientes IgM-EBV[+] se obtuvo una media de 128.5 mUI/mL (13-705) de AST y de 203.2 mUI/mL (8-973) de ALT. En ambos casos se observó un perfil inflamatorio de transaminasas, con un aumento de 5 veces y 3.5 veces del valor normal de ALT y AST respectivamente. Los valores bajos de transaminasas pueden deberse a que el incremento de estos analitos haya ocurrido antes de la valoración, conservando los valores positivos de IgM. Luego del análisis de estos resultados, se puede concluir que en esta población de adolescentes/adultos se observa un elevado porcentaje de primoinfección de CMV y posiblemente de EBV con un moderado aumento de transaminasas por lo que ante una sospecha clínica de hepatitis aguda debería testearse antes o de manera concomitante con los virus hepatotropos clásicos (VHA, VHB y VHC).

 ISSN 1666-7948 <a href="http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar">www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</a>	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---

**Ausencia de evolución del reservorio de HIV-1 en circulación a lo largo de más de seis años de supresión virológica sostenida en niños infectados por transmisión vertical**

**Moragas, M(1); Golemba, MD(1); Distefano, M(1); Bologna, R(2); Mangano, A(1)**

(1) *Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus-CONICET, Unidad de Virología y Epidemiología Molecular, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"; (2) Servicio de Epidemiología e Infectología, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"*

Contacto: [matias.moragas@gmail.com](mailto:matias.moragas@gmail.com)

Introducción La erradicación del HIV por parte de la terapia antirretroviral combinada (TARVc) no es posible, aun en niños infectados por transmisión vertical (TV) que iniciaron TARVc en las primeras horas de vida. Esto se debe, principalmente, al rápido establecimiento de formas replicativas del HIV-1 en células de larga vida dentro del huésped, las cuales se denominan reservorios virales. Por ello, el estudio del mecanismos de persistencia de los reservorios del HIV-1 es de gran importancia para la implementación de nuevas estrategias terapéuticas. Objetivo Determinar si el reservorio de HIV-1 en circulación evoluciona genéticamente y como es la dinámica del tamaño del mismo a lo largo de más de 6 años de supresión virológica sostenida (SV) en niños infectados por TV, que iniciaron TARVc tempranamente y alcanzaron la SV antes del año de vida. Metodología Se estudió mediante la plataforma MiSeq de secuenciación de nueva generación una región de 423 pb de p17gag del HIV-1 en 5 niños infectados por TV antes del inicio de TARVc y durante 6 a 15 años de supresión virológica (SV). Para reducir los errores asociados a la PCR y secuenciación, las secuencias con frecuencias menores al error del método (<0.5%) fueron fusionadas con aquellas más frecuentes que no diferían en más de un nucleótido, formando haplotipos. Se estudiaron las relaciones filogenéticas entre los distintos haplotipos mediante el método y se evaluó la presencia de evolución viral mediante el análisis de . Por otro lado, se estimó el tamaño del reservorio de HIV-1 previo y durante el TARVc eficaz a partir de la cuantificación por PCR en tiempo real semi-anidada de los niveles de ADN total, círculos de 2-LTR y ARN intracelular. Resultados Los 5 niños estudiados iniciaron TARVc y alcanzaron la SV a una mediana de 4 y 10 meses de vida respectivamente. A partir del análisis filogenético, no se observó asociación entre los haplotipos obtenidos y el tiempo de muestreo. Esto se vio reflejado en la formación de clados a partir de haplotipos pertenecientes a distintos tiempos de muestreo. Asimismo, la regresión lineal obtenida para cada niño estudiado mediante el analisis varió en un rango de R2 de 0,003 - 0,154, indicando la ausencia de evolución viral. Por otro lado, en la muestra de la última visita (6 a 15 años de SV) se observó una elevada abundancia de haplotipos idénticos a los encontrados previo al inicio de TARVc: 100%, 94%, 75%, 66% y 34%. Finalmente, el nivel de ARN de HIV-1 intracelular fue detectable en la totalidad de los niños estudiados con una mediana de 3,6 (RIC: 1,5 - 3,76) log10 copias/ug RNA; mientras que el nivel de círculos de 2-LTR solo fue detectable hasta el comienzo de la SV. Conclusiones Nuestros resultados aportan nuevas evidencias en que el mantenimiento de los reservorios de HVI-1 se debe principalmente a la expansión clonal de células infectadas previo al inicio de TARVc.

 **Química Viva**

ISSN 1666-7948

[www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)

Revista **Química Viva**

Número 1, año 19, Abril 2020

[quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)



## Evaluación de metodologías diagnósticas para virus sincicial respiratorio en niños menores de 5 años en Córdoba durante el año 2018

**Moreno, C; Canna, F; Borda, Mariel; Oliva, A; Fransicetti, V; Suarez, ME; Barbás, MG**

*Laboratorio Central, Ministerio de Salud de la provincia de Córdoba*

Contacto: [morenoclaudia69@yahoo.com.ar](mailto:morenoclaudia69@yahoo.com.ar)

El Virus Sincicial Respiratorio (VSR) es el principal agente asociado a infección respiratoria aguda baja (IRAB) en niños menores de 5 años. Esto representa un aumento de las consultas médicas y hospitalización en época invernal. La vigilancia y el diagnóstico oportuno de los virus respiratorios en general, son un verdadero desafío para el sistema de salud. El objetivo de este trabajo fue, evaluar la concordancia entre una prueba cualitativa rápida, basada en inmunocromatografía (TR), y la prueba de inmunofluorescencia directa (IFD), metodología recomendada para el diagnóstico y la vigilancia del virus sincicial respiratorio, con el fin de establecer un criterio en la utilización de los TR en el laboratorio. Los métodos utilizados en el estudio fueron, el TR SD BIOLINE VSR marca Standard Diagnostics, y la IFD, D3 Ultra 8TM DFA Respiratory Virus Screening & Identification marca Diagnostic Hybrids Inc. siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante. El análisis estadístico de los resultados se expresó mediante el índice Kappa, utilizando el programa MedCalc. En el período mayo – septiembre del 2018, en el Laboratorio Central de la provincia de Córdoba, se estudiaron por IFD para diferentes virus respiratorios un total de 3971 muestras de aspirados nasofaríngeos (ANF), correspondientes a niños menores de 5 años de edad, internados por IRAB, de centros de salud públicos y privados. De ellas, 1112 se procesaron en paralelo por ambas metodologías (TR e IFD), resultando 974 resultados concordantes por ambas metodologías (88%) y 138 resultados discordantes (12%). De los resultados discordantes, el 100% de ellos resultaron TR negativo e IFD positivo. El coeficiente de concordancia kappa obtenido fue de 0,87, lo cual indica una buena concordancia entre las metodologías evaluadas. Uno de los criterios más importantes en la elección de un método de tamizaje para virus respiratorio, está dado por el valor predictivo positivo y negativo de dicho método. En este trabajo, dada la mayor circulación anual de estos virus, se asume un valor predictivo positivo alto para ambas metodologías. Es así que, durante la época de alta circulación de VSR, sugerimos el uso de TR como prueba de elección teniendo en cuenta que un resultado positivo por TR para VSR confirmaría la infección, mientras un resultado negativo no descartaría la misma, debiéndose realizar pruebas complementarias. Es de destacar que variables tales como, la edad, los días transcurridos desde el inicio de síntomas hasta la obtención del ANF y otras variables asociadas a la toma de muestra, podrían influir considerablemente en los resultados obtenidos por ambas metodologías.

 **Química Viva**

ISSN 1666-7948

[www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)

Revista **Química Viva**

Número 1, año 19, Abril 2020

[quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)



## **Validación de dos métodos para el diagnóstico de HPV para su utilización en el tamizaje de cáncer de cuello de útero**

**Viarengo, G(1)\*; Re-Louhau, MF(1)\*; Rodriguez, M(3); Lejona, S(4); Irazu, L(3); Bolatti, E(1, 2); Dip, G(5); Anchart, E(6); Giri A(1, 2); Chouhy, D(1, 2).** \*Ambos autores contribuyeron igualmente en este trabajo.

*(1) Laboratorio de Virología Humana, Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET/UNR); (2) Área Virología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas – UNR; (3) Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas INEI ANLIS “Carlos G. Malbran”; (4) Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Especialidades Médicas Ambulatorias de Rosario “M. H. Zuasnábar” (CEMAR); (5) Secretaría de Salud Pública de la Municipalidad de Rosario; (6) Ministerio de Salud de la Provincia de Santa Fe.*

Contacto: [viarengo@ibr-conicet.gov.ar](mailto:viarengo@ibr-conicet.gov.ar)

El cáncer de cuello de útero (CCU) es mundialmente una de las neoplasias más comunes que afecta a la mujer, con una estimación anual de 4.000 casos nuevos y de 1.800 muertes en Argentina. Actualmente está firmemente establecido que la infección persistente con ciertos tipos del Virus Papiloma Humano de Alto Riesgo oncogénico (HPV-AR) es necesaria para el desarrollo de CCU. En base a esto, numerosos estudios han establecido que la detección de ADN de HPV es significativamente más sensible que la citología (Papanicolaou) para la detección de lesiones de alto grado (H-SIL), consideradas precursoras del CCU. En base a esta evidencia, Argentina definió como prioritario el abordaje integral de la prevención de CCU, con la incorporación de la vacuna contra HPV y la introducción del ensayo de HPV como tamizaje primario. Sin embargo, los métodos comerciales están asociados a un elevado costo y la disponibilidad en el tiempo depende de los lineamientos de empresas extranjeras que no siempre van de la mano con los lineamientos de un país. Teniendo en cuenta que nuestro grupo de trabajo posee una amplia experiencia en el desarrollo de herramientas diagnósticas, se desarrollaron y validaron 2 kits para el diagnóstico de HPV. El primero, utiliza una metodología basada en PCR de punto final seguida de detección colorimétrica en formato de enzoinmunoanálisis (HPV PCR-EIA) y el segundo, utiliza PCR en tiempo real con sondas de hidrólisis tipo Taqman® (HPV qPCR). Los 2 kits detectan 13 tipos de HPV-AR (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y el kit HPV PCR-EIA detecta además 2 tipos de HPV de bajo riesgo oncogénico (HPV6 y 11). Para la validación analítica de los kits se realizaron ensayos de precisión, determinación del límite de detección (LOD) y especificidad. La validación clínica se realizó con 312 muestras de pacientes provenientes del Centro de Especialidades Médicas Ambulatorias de Rosario (CEMAR), previamente analizadas con la metodología COBAS HPV Test de Roche. Los resultados se contrastaron con los obtenidos por la metodología de COBAS, observándose para el kit HPV PCR-EIA un 91% de concordancia general, y una sensibilidad y especificidad clínica (relativa al COBAS) de 94% y 93%, respectivamente. La comparación del kit HPV qPCR con el COBAS dio un 94% de concordancia general, y una sensibilidad y especificidad clínica (relativa al COBAS) de 93% y 100%, respectivamente. El objetivo final es el de disponer en la Argentina de un desarrollo nacional, validado analítica y clínicamente según las normativas vigentes, y que pueda reemplazar a futuro las metodologías de origen importado tanto en el ámbito público como privado.

## Confirmación de nexos epidemiológicos en un caso de hepatitis aguda por Virus de Hepatitis E


**Acosta, J(1); Marziali, F(1); Galimberti, A(2); Bessone, F(2); Costaguta, A(3); Tanno, H(2); Reggiardo, V(2); Gardiol, D(1); Cavatorta, AL(1)**

(1) Área Virología, IBR-CONICET. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas- Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Argentina; (2) Servicio de Gastroenterología y Hepatología, Hospital Provincial del Centenario, Facultad de Medicina-Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Argentina; (3) Servicio de Gastroenterología y Hepatología, Sanatorio de Niños/Fundación Dr. J.R. Villavicencio. Rosario, Argentina

Contacto: [acosta@ibr-conicet.gov.ar](mailto:acosta@ibr-conicet.gov.ar)

El virus de la hepatitis E (HEV) se considera un problema de salud pública debido a su transmisión zoonótica a humanos, principalmente a través de cerdos, y su asociación con el desarrollo de casos graves de hepatitis en poblaciones de riesgo. En Argentina se ha demostrado la circulación de HEV genotipo 3 en cerdos y muestras medioambientales, sin embargo, se desconoce su potencial transmisión a los seres humanos. CASO CLÍNICO Paciente masculino de 81 años, diabético tipo II, con obesidad e HTA, consulta por coluria, ictericia, náuseas e hiporexia de 10 días de evolución. Se encuentra en estudio desde hace un año por anemia. Por dolores articulares, consume diclofenac y meloxicam. El paciente es productor porcino e ingiere embutidos de su propia elaboración. En el examen físico se constata ictericia cutáneo-mucosa marcada, no se palpa hepatoesplenomegalia ni signos de encefalopatía. El laboratorio de ingreso demostró: TGO: 1200UI/L, TGP:800UI/L, BrT:17mg/dl, BrD:14mg/dl, LDH:351UI/L, GGT:109UI/L, FA:407UI/L, TP:14 (12), Hb:10g/dl, HCTO:30%, GB:3930/mm<sup>3</sup>, Colinesterasa:1981UI/L, Albúmina:3.1g/dl, Ur:53mg/dl, Factor V: 100%. Se realizaron estudios serológicos para virus de hepatitis A, B, C y autoanticuerpos resultando negativos. Se diagnosticó hepatitis a causa de HEV por presentar IgG, IgM y PCR en suero positivos. Se administra ribavirina, suspendiendo el tratamiento por empeorar su cuadro de anemia. Mediante el empleo de una metodología de RT-PCR en tiempo real con control interno, previamente optimizada en nuestro laboratorio, se realizó un seguimiento de la carga viral de HEV del paciente en suero y heces. Así, se pudo determinar una mayor persistencia del virus en heces que en suero (13 y 7 días respectivamente). Para estudiar el potencial nexos epidemiológico de la infección, se recolectaron muestras de materia fecal de cerdos criados en su campo, logrando la detección de HEV con nuestra metodología. Mediante análisis filogenético del genoma viral, se demostró que la cepa de HEV del paciente y de los cerdos pertenecen al genotipo 3, con un 100% de similitud entre sí, confirmando la transmisión zoonótica. Además, dichas cepas se encontraron filogenéticamente relacionadas a unas previamente aisladas en cerdos de la región. Este trabajo demuestra, por primera vez en nuestro

país, un nexo epidemiológico en un paciente con hepatitis aguda por HEV. Si bien la infección se produce por contacto directo con los porcinos, podrían plantearse distintas hipótesis en relación con las vías de transmisión. El empleo de herramientas diagnósticas cada vez más sensibles es necesario para un mejor abordaje de la infección por HEV. La caracterización molecular de las cepas aisladas permitirá comprender mejor, la actual situación epidemiológica de nuestro país. A pesar de que Argentina es considerado un país de baja endemicidad, este trabajo contribuye a pensar que el HEV debe ser tenido en cuenta en el diagnóstico diferencial de hepatitis aguda.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>QuímicaViva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	--

## **Epidemiología molecular del metapneumovirus humano en la población pediátrica durante el período 2012-2019 en Buenos Aires: Estudio del impacto de cepas emergentes con duplicaciones de 180nt y 111nt**


**Acuña, D(1, 3); Polo, B(1, 3); Nabaes Jodar, M(1, 2); Goya, S(1, 2); Viegas, M(1, 2); Grandis, E(1); Mistchenko, A(1)**

*(1) Laboratorio de Virología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez; (2) CONICET; (3) Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.*

*Contacto: [doloacu@gmail.com](mailto:doloacu@gmail.com)*

**INTRODUCCIÓN:** El metapneumovirus humano (HMPV) es uno de los principales agentes etiológicos causantes de infecciones respiratorias agudas altas y bajas (IRAB) en bebés y niños, como también en ancianos y pacientes con enfermedades de base. Éste virus produce epidemias anuales con una distribución estacional con un pico durante el invierno y comienzos de primavera. En la actualidad se identifican dos grandes linajes de HMPV, A y B, y estos a su vez se dividen en los sublinajes A1, A2, B1 y B2 basándose en las variaciones nucleotídicas del gen de la proteína G de superficie (proteína de adhesión). En el año 2014 en Yokohama, Japón, se detectó una cepa de HMPV correspondientes al linaje A2 con una duplicación de 180 nt en el gen de la proteína G. Luego, en 2017, los mismos autores detectaron una nueva cepa con una duplicación de 111 nt también en el gen para la proteína G. **OBJETIVO:** En este trabajo se estudió la epidemiología molecular del HMPV en un periodo de 8 años (2012-2019), con el objetivo de caracterizar las muestras remitidas al Laboratorio de Virología del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez de la Ciudad de Buenos Aires para evaluar la dinámica evolutiva del virus y detectar el comienzo de circulación de cepas virales con las duplicaciones de 180 y 111nt. **METODOLOGÍA:** Se realizó el diagnóstico de HMPV de muestras de aspirados nasofaríngeos de pacientes pediátricos remitidas al laboratorio mediante real time PCR. Aquellas muestras positivas se amplificaron por RT-PCR para el gen de la glicoproteína G y fueron secuenciadas en ABI 3500. Las secuencias nucleotídicas fueron curadas manualmente y

posteriormente alineadas con MUSCLE. Se utilizaron los programas IQ-TREE y MrBayes para realizar los análisis filogenéticos y BEAST para los estudios filodinámicos. RESULTADOS: Del total de 5397 muestras analizadas, 363 resultaron positivas para HMPV (7,65% en promedio por año). De ellas, el rango de edad más frecuente fue de 0 a 1 año (49,5% del total). A partir de un muestreo aleatorio se obtuvieron 60 secuencias completas, de las cuales 27 pertenecen al sublinaje A2 (entre ellas 17 con duplicación de 180nt y 2 con duplicación de 111nt), 25 al B1 y 9 al B2, mientras que no se detectó ninguna cepa A1. El sublinaje A2.2 dominó en 2016 y en 2018 fue remplazado por los sublinajes B1 y B2. En 2015 se detectaron por primera vez cepas A2.2 con duplicación de 180nt y en 2017 con duplicación de 111nt. Sin embargo siguen detectándose cepas sin duplicación en la actualidad. Se observó que estos linajes que cocircularon fueron introducidos desde distintos países de origen. CONCLUSION: Dado la importancia del HMPV en la salud pública, los datos obtenidos aportan conocimiento sobre la circulación del virus en la población y ayudan a comprender su dinámica evolutiva. Continuar con estos estudios nos permitirá saber si estos drásticos cambios genéticos confieren ventajas adaptativas que repercutan en su frecuencia de aparición en la población.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---

## Descripción de primeros casos de infección por el virus Linfotrópico T Humano Tipos 1 (HTLV-1) en Santiago del Estero


**Benencio, P(1); Ducasa, N(1); Peressin Paz, R(2); Berini, C(1); Biglione, M(1).**

*(1) Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA, UBA-CONICET, Buenos Aires, Argentina; (2) Hospital Regional Dr. Ramón Carrillo, Santiago del Estero, Argentina.*

Contacto: [paulabenencio@gmail.com](mailto:paulabenencio@gmail.com)

El HTLV-1 es un retrovirus que se transmite por vía parenteral, sexual y de madre a hijo. En Argentina, es endémico en el Noroeste (Salta y Jujuy) al igual que sus patologías: la Leucemia/Linfoma a Células T del Adulto (ATLL) y la Mielopatía Asociada al HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP), que se desarrollarán en 5% de los infectados. La HAM/TSP lleva a la invalidez y reduce la expectativa de vida en más de 10 años. La ATLL es una neoplasia agresiva con una alta tasa de mortalidad. La tasa de supervivencia varía entre 4 a 9 meses para la ATL aguda y de 34 meses a más de 5 años para los otros subtipos (latente, crónica y linfoma). El objetivo de este trabajo es evidenciar la presencia del HTLV-1 y ATLL en la provincia de Santiago del Estero. En Mayo de 2018 llegó para diagnóstico al INBIRS la muestra de un paciente nacido en La Banda y residente en El Crucero, que fue derivado a Buenos Aires con leucemia T y sospecha de HTLV-1. Mediante ELISA (Diapro) y nested-PCR (detección de gen viral pol-1) se confirmó HTLV-1 y el diagnóstico de ATL aguda por citometría (CD3+, CD4+, TCRαβ+, TCRγδ-, CD25+, CD10-, CD8-, CD28+, CD5+, CD2+, CD7-/HLA-DR-, HLA-DR+D) y biopsia de piel. El paciente falleció en mayo. Su esposa

residente en El Crucero resultó HTLV-1. A partir del caso índice, se realizó en el INBIRS el diagnóstico a 5 de sus hermanos: 1 varón residente en Yacu Hurmana y 4 residentes en CABA (3 mujeres). De ellos, 1 hermana de CABA resultó negativa y el resto HTLV-1 positivos. Existe el antecedente de otros 2 hermanos y la esposa de uno de ellos, diagnosticados HTLV-1+ al donar sangre en el Sanatorio San Roque (Santiago del Estero) en 2005, de 1 hermano operado del corazón en Sanatorio 9 de Julio y su esposa, ambos positivos; y de una hermana fallecida en Bs AS por leucemia linfocítica T a los 67 años en enero 2018. La filogenia basada en la región LTR viral, detectó al subtipo HTLV-1 a (Cosmopolita) A (Transcontinental) en esta familia. Si bien Argentina presenta áreas endémicas, tanto para HTLV-1 en el Noroeste como para el HTLV-2 en la Región Chaqueña, el HTLV continúa siendo un evento “descuidado” u “oculto” y no existe conocimiento suficiente. A diferencia de otras leucemias, el tratamiento estándar de la ATL aguda y crónica es la combinación de IFN- $\alpha$ 2b con zidovudina mientras que la quimioterapia está contraindicada. Frecuentemente, el donante con resultado reactivo circula en un estado de angustia por los centros y servicios de salud en búsqueda de un diagnóstico final y asesoramiento médico preciso. Sería importante implementar centros referentes con herramientas de diagnóstico molecular para brindar un resultado certero, y capacitar profesionales para un asesoramiento adecuado. La inclusión de este retrovirus en un Programa Nacional, con el fin de prevenir la transmisión vertical y sexual, permitiría reducir la tasa de infección de HTLV-1/2 y sus patologías asociadas en nuestro país.

 ISSN 1666-7948 <a href="http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar">www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</a>	Revista <b>QuímicaViva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	--

## **Prevalencia de infección por HPV 16/18 entre mujeres diamantinas en edad reproductiva sin lesión cervical. Resultados preliminares.**


**Benitez, F(1); Herrera, ME(2); Caviglia, E(1); Jordá, GB(3); Martínez Maignac, VL(1)**

*(1) Laboratorio Interdisciplinario de Biología y Genética Molecular (IBIOGEM) – Centro de Investigaciones Científicas y Transferencia de Tecnología a la Producción (CICYTTP); (2) Laboratorio de Microbiología y Parasitología - Facultad de Ciencias de la Salud – Universidad Adventista del Plata (UAP); (3) Laboratorio de Microbiología Especializada, Módulo de Farmacia y Bioquímica - Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (FCEQyN-UNaM)*

Contacto: [florencibenitez1636@gmail.com](mailto:florencibenitez1636@gmail.com)

El HPV pertenece a la familia Papillomaviridae, un grupo diverso de virus de ADN doble cadena con una cápside proteica que los rodea. Infecta epitelios escamosos estratificados (mucosas y cutáneos), donde puede causar neoplasias o persistir asintóticamente. Los genotipos 16 y 18 son los causantes del 70% del cáncer cervicouterino. La prueba de HPV a través de reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se usa para buscar los genotipos de alto riesgo en las células del cuello uterino. En la mayoría de los casos, esta prueba puede detectar las infecciones por HPV que causan

las anomalías celulares antes de que sean evidentes por pruebas citológicas. Los objetivos del trabajo son: validar técnicas de extracción de ADN de bajo costo para el uso en un establecimiento de salud público. Por otro lado, determinar y genotipificar el HPV a través de PCR convencional y multiplex con iniciadores específicos y corroborar la genotipificación empleando la técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Se reclutó una cohorte femenina de 58 pacientes pertenecientes a un grupo etario de 14 a 35 años. La toma de muestra consistió en hisopado endocervical por parte de profesionales de la salud ginecológica de servicios públicos de la ciudad de Diamante, Entre Ríos. En cuanto a la extracción de ADN viral se utilizaron dos técnicas, una con kit comercial y otra técnica con un sistema "in-house" optimizado en el laboratorio IBIOGEM. Para evaluar la efectividad del método de extracción "in-house" en comparación con un kit comercial, se procesaron 30 muestras por ambos métodos de extracción de las cuales se observó presencia de ADN en el 100% de las extracciones in-house. Las 28 muestras restantes fueron purificadas solo a través del kit comercial, habiendo obtenido así 88 purificaciones de ADN genómico. Se utilizaron los iniciadores consenso MY09 y MY11 para la amplificación de un fragmento de 450 pares de bases del genoma viral que corresponde al fragmento L1, esta PCR convencional optimizada permitió detectar presencia del ADN genómico del virus sin discriminar por genotipo. De las 58 muestras endocervicales, se encontró infección por HPV en 42 mujeres (72,41%). Hasta el momento se realizó PCR multiplex con iniciadores específicos para detectar los genotipos 16 y 18 en 8 muestras HPV (+) obtenidas con ambas técnicas de extracción, de las cuales 4 dieron positivas para HPV 16 pero no se observó amplificación para HPV 16/18 en las 4 muestras restantes. Aún no se logró optimizar la técnica de RFLP que permite la confirmación de la presencia de los genotipos específicos en cuestión. Con estos resultados parciales podemos concluir que se evidencia una mayor prevalencia de HPV 16 en mujeres diamantinas y aquellas muestras que no resultaron amplificadas con PCR múltiple nos sugieren que podría tratarse de otros genotipos diferentes del 16 y el 18.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---

## **Rinovirus en pacientes pediátricos hospitalizados por infección respiratoria aguda grave: frecuencia y caracterización genómica**

**Dattero, M(1); Benedetti, E(1); Acosta, V(2); Avaro, M(1); Benso, M(2); Czech A(1); Macias, E(1); Pardón, F(1); Russo, M(1); Pontoriero, A(1); Cabral, G(2); Baumeister, E(1).**


*(1) Servicio Virosis Respiratorias. Laboratorio Nacional de Referencia para Influenza y otros Virus Respiratorios. INEI - ANLIS "Dr. C. G. Malbrán"; (2) Laboratorio de Virología. Hospital "Profesor Alejandro Posadas"*

Contacto: [mariaedattero@gmail.com](mailto:mariaedattero@gmail.com)

Los Rinovirus (RVH) son los principales agentes causales del resfrío común afectando principalmente a niños, personas mayores e inmunocomprometidos. Pertenecen a la familia Picornaviridae, son virus



RNAsc polaridad positiva. Existen tres especies (A, B y C) y más de 100 genotipos. En los últimos años, las técnicas moleculares evidencian la elevada frecuencia de detección de estos patógenos en enfermedades respiratorias graves, como bronquiolitis (BQL), neumonía (NMN) y exacerbaciones agudas de enfermedades respiratorias crónicas como el asma. Estas infecciones pueden ocasionar hospitalizaciones, principalmente en niños menores de 5 años. Describir la frecuencia, estacionalidad y características genómicas de los RVH detectados en muestras provenientes de niños menores de 5 años internados en un hospital del Gran Buenos Aires con infección respiratoria aguda grave (IRAG) en el año 2018. Se incluyeron en el estudio 727 pacientes menores de 5 años con IRAG que requirió internación a los que se les tomaron muestras respiratorias (ANF, HNF) en el período comprendido entre marzo y diciembre del año 2018 y que realizaron la consulta dentro de los 7 días de iniciados los síntomas. Todas las muestras fueron analizadas mediante detección de genoma viral para: Influenza A/B, RSV, ADV, PI, MPVh y RVH; utilizando protocolos cedidos por el CDC de Atlanta, USA. Se seleccionaron 17 muestras positivas para RVH como único agente (5 NMN, 5 BQL y 7 síndrome bronquial obstructivo) a las que se les llevó a cabo la secuenciación de una porción de 600 pb del gen que codifica para la poliproteína viral entre el extremo 3' de la región 5' no codificante y la VP4/VP2. Se analizaron además los datos clínico-epidemiológicos que se tomaron al momento de la consulta. Del total de muestras analizadas, se obtuvieron 220 (30%) muestras positivas para RVH como único agente. De éstas, 36 (16,36%) presentaron al ingreso el diagnóstico clínico de BQL, 33 (15%) NMN, 112 (52%) síndrome bronquial obstructivo (SBO) y 39 presentaron otros diagnósticos (exacerbación asmática, apneas, lactante febril y síndrome coqueluchoide). La mediana de edad de la población estudiada fue de 19 meses. Los pacientes con BQL tuvieron una mediana de edad de 4 meses, mientras que los que presentaron NMN y SBO fueron de 23 y 31 meses respectivamente. Los resultados de la caracterización genómica de las especies de RVH detectadas se encuentran en análisis al momento. La detección de RVH como único agente fue elevada (30%). El diagnóstico clínico de ingreso más frecuentemente asociado a RVH fue el SBO con una edad promedio de 2 años y 7 meses, seguido por BQL y NMN. Los resultados obtenidos resaltan la importancia del diagnóstico etiológico viral, no solo para evitar el uso excesivo de antibióticos, sino también para adoptar medidas de prevención y control de gran importancia en salud pública.

 ISSN 1666-7948 <a href="http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar">www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</a>	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---

## **Detección serológica y molecular del virus de la hepatitis E en donantes de sangre de Córdoba, Argentina**


**Di Cola G(1, 2); Pisano MB(1, 2); Blanco S(1,3); Fantilli A(1, 2); Martinez-Wassaf MG(4); Carrizo LH(3); Ré VE(1,2); Gallego S(1, 2, 3)**

*(1) Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella", Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba (UNC); (2) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); (3) Fundación Banco Central de Sangre, Córdoba; (4) LACE Laboratorios*



Contacto: [guadalupedicola@gmail.com](mailto:guadalupedicola@gmail.com)

El virus de la hepatitis E (HEV) es un virus RNA causante de hepatitis aguda, que puede progresar a hepatitis crónica en pacientes inmunosuprimidos. Es transmitido principalmente por las vías fecal-oral o zoonótica, pero existen evidencias actuales de que puede transmitirse por transfusiones de sangre. Los portadores asintomáticos de HEV juegan un rol como reservorios humanos, constituyendo una potencial amenaza para la seguridad transfusional. En Argentina, el HEV no se encuentra entre los patógenos de control obligatorio en bancos de sangre y la necesidad de su control es actualmente un tema de debate. El objetivo del estudio fue determinar la seroprevalencia para HEV y la viremia (RNA-HEV) en donantes de sangre, en el marco de un programa de hemovigilancia en Córdoba, Argentina. Se estudiaron 297 muestras de plasma de donantes de sangre (110 mujeres, 187 hombres; mediana edad: 35 años), obtenidas entre febrero y abril del 2016 (n=147) y durante marzo y abril del 2019 (n=150). La detección de anticuerpos anti-HEV se realizó por ELISA (Dia.Pro, IT), el RNA se analizó en todas las muestras por PCR en tiempo real y las positivas fueron sometidas a Nested-PCR (ORF-2). Para analizar estadísticamente las variables demográficas en relación con la seropositividad se utilizó el test  $\chi^2$  con significancias estadísticas de  $p < 0,05$  (programa InfoStat). La prevalencia global de IgG anti-HEV fue de 3,37% (10/297); siendo similar en ambos años: 2,04% en 2016 (3/147) y 4,67% en 2019 (7/150) ( $p=0,21$ ). La seroprevalencia resultó con una tendencia mayor en hombres que en mujeres, pero sin significancia estadística (3,03% vs 0,34%,  $p=0,07$ ). No se observó diferencia en la seropositividad respecto a la edad ( $p=0,96$ ). La presencia de RNA-HEV se observó en 0,33% (1/297) de los donantes estudiados sin evidencia serológica de infección. Los resultados obtenidos corroboran la circulación de HEV en Córdoba con prevalencias similares a las reportadas previamente en población general, y constituyen el primer hallazgo molecular en donantes de sangre de Argentina. Además, la prevalencia local está dentro del rango descrito para RNA-HEV (0,012% a 0,6%) en donantes de sangre de otros países no endémicos, entre los cuales se identificaron donantes inmunocompetentes RNA-HEV positivos sin evidencia serológica, destacando: 1) la importancia de la detección molecular de HEV en bancos de sangre y la existencia del potencial riesgo de transmisión por transfusiones en Córdoba, 2) considerando el estado de inmunosupresión y enfermedad subyacente de los receptores, la transmisión de este virus constituye un riesgo para el desarrollo de infecciones crónicas y/o enfermedad en los mismos, y 3) la necesidad de la vigilancia epidemiológica de HEV cubriendo toda la cadena de transfusión, desde la recolección de los hemocomponentes en los bancos de sangre al seguimiento de los receptores, para evaluar el riesgo transfusional y la necesidad de su control en la realidad epidemiológica regional.

 ISSN 1666-7948 <a href="http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar">www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</a>	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---


## Vigilancia de hepatitis A en Córdoba: disminución de casos en hombres que tienen sexo con hombres

Fantilli, A(1, 2); Mariojoules, J(3); Pisano, MB(1, 2); Castro, G(3); Di Cola, G(1, 2); Canna, F(3); Barbás, G(3); Ré, V(1, 2)

(1) Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella”, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina; (2) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina; (3) Laboratorio Central, Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba, Argentina.

Contacto: [anabellafantilli@gmail.com](mailto:anabellafantilli@gmail.com)

Desde 2016 a 2019, se registraron brotes de Hepatitis A (HA) en varios países del mundo, especialmente descritos en hombres que tienen sexo con hombres (HSH), principalmente adultos jóvenes. Se identificaron tres cepas europeas responsables: VRD\_521\_2016, RIVM-HAV16-090 y V16-25801. En este contexto, desde julio de 2017 a abril 2018, se registró en la ciudad de Córdoba un aumento de casos de HA (32 casos notificados). De acuerdo a un estudio realizado por nuestro grupo, muchos de estos casos fueron identificados filogenéticamente con la cepa VRD\_521\_2016, afectando mayoritariamente a HSH [de los 32 casos notificados en ese período, el 69,6% eran HSH (edad media: 31,9 años)]. A modo de comparación, en el mismo período de julio de 2014 a abril de 2015, de julio de 2015 a abril de 2016 y de julio de 2016 a abril de 2017, se informaron 3, 7 y 5 casos de HA, respectivamente. Entre estos, ninguno fue identificado como HSH. El propósito de este estudio fue continuar con la vigilancia epidemiológica molecular de HAV en Córdoba, a partir de muestras obtenidas durante un período posterior (noviembre 2018-septiembre 2019) al del inicio del brote de HA analizado previamente por nuestro grupo (Julio 2017-abril 2018). Para esto, se analizaron 23 casos confirmados de HA (IgM anti-HAV positivos) recolectados entre noviembre 2018 y septiembre 2019. Se detectó RNA-HAV en las muestras de suero y/o materia fecal mediante RT-Nested-PCR de la región genómica de VP1 / 2A (360 pb). Posteriormente, fueron secuenciadas y sometidas a análisis filogenéticos. De los 23 casos analizados (19 hombres y 4 mujeres; edad media: 30 años; rango: 4-63 años), 15 (65%) fueron positivas para la detección del RNA, y 14 fueron secuenciadas. Los análisis filogenéticos mostraron que todas las secuencias amplificadas pertenecieron al genotipo IA y 12 agruparon dentro de un clado monofilético con la cepa VDR521-2016 y con las secuencias del primer período del brote analizado (julio 2017- abril 2018). Cinco casos de este grupo (5/12) se identificaron como HSH, mientras que para el resto no se contaba con este dato. De las 23 muestras analizadas, 20 fueron recolectadas entre noviembre 2018 a abril 2019, obteniéndose solo tres muestras adicionales desde abril de 2019 a septiembre 2019, las cuales pertenecían a pacientes de género femenino del interior de Córdoba. Estos resultados muestran que el virus continuó circulando en la población de HSH hasta abril de 2019, con una disminución abrupta y ausencia de notificación de casos en HSH a partir de esa fecha, lo que evidencia la finalización del brote de HAV en ese grupo de riesgo. Los resultados invitan a continuar con la vigilancia del HAV, evaluar el manejo del brote y el impacto de la intervención durante el mismo, estimular al personal médico a estudiar la inmunidad de los pacientes adultos frente al virus y reforzar la vacunación en los mismos, principalmente en aquellos de mayor riesgo, como HSH, inmigrantes y viajeros a zonas endémicas.

 <p>ISSN 1666-7948 <a href="http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar">www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</a></p>	<p>Revista <b>QuímicaViva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a></p>
--	---


## **Individuos seronegativos portadores de HTLV-1 en Argentina: ¿un desafío para la Medicina Transfusional?**

**Frutos, MC(1); Blanco, S(1, 2); Balangero, M(1); Anderson Santos Rocha(3); Melo Franco, G(3); Lobato Martins, M(4); Edel Figueiredo Barbosa-Stancioli(3); Carrizo, LH(2); Nates, S(1); Gallego, S(1, 2).**

*(1) Laboratorio de Virus Linfotrópicos Humanos HIV y HTLV-I/II y Poliomavirus, Instituto de Virología Dr. J. M. Vanella. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. (2) Fundación Banco Central de Sangre, Córdoba, Argentina. (3) Laboratorio de Virología Básica y Aplicada, Departamento de Microbiología, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, Brasil. (4) Gerencia de Desenvolvimento Técnico Científico, Fundação Hemominas, Brasil.*

Contacto: [mariaceliafrutos@gmail.com](mailto:mariaceliafrutos@gmail.com)

Se conoce la existencia de individuos seronegativos con diferentes patologías y evidencias moleculares de infección por HTLV-1. Nuestro grupo comunicó previamente el hallazgo de individuos seronegativos infectados en la zona endémica en Argentina. La existencia de estos individuos seronegativos desafía el diagnóstico de HTLV-1/2 y el tamizaje pre-transfusional, los cuales se basan exclusivamente en serología. El objetivo de este trabajo es comunicar la evidencia de donantes seronegativos infectados con HTLV-1 en un banco de sangre en Argentina. Se estudiaron 317 muestras de donantes de sangre que donaron entre 2015-2016 en un banco de sangre de Córdoba. Los donantes estudiados habían nacido/provenían de zonas endémica para HTLV de Argentina o de otros países y eran negativos para anticuerpos HTLV-1/2 (ARCHITECT rHTLV-I/II immunoassay) en el tamizaje de rutina. De la sangre entera se extrajo el ADN y se realizó una nested-PCR para amplificar una secuencia del gen tax (219 pb) compartida por HTLV-1 y 2, posteriormente la infección se tipificó por nested-PCR con primers específicos. A las muestras positivas para HTLV-1 se les realizaron nested-PCR dirigidas a los genes env, tax (1119 pb) y a la región LTR, y dos PCR para otra región del gen tax (100 pb) y una secuencia de pol, respectivamente. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados y el dendograma se construyó utilizando el programa MEGA4 y bootstrap de 1000 pseudo-réplicas. Las muestras de los donantes seronegativos infectados con HTLV-1 se estudiaron también por un ELISA para anticuerpos anti-Tax de HTLV-1. De los 317 donantes 219 (69,1%) eran hombres, con una media de edad de 33,5 años (18-64 años). El 75,7% (240/317) de los donantes provenían/habían nacido en zona endémica de Argentina y el 24,3% (77/317) provenían de otro país endémico para HTLV. Todas las muestras de los donantes fueron negativas para los anticuerpos contra HTLV-1/2. Dos muestras (H94 y H256) de las 317 (0,63%) resultaron positivas por nested-PCR y correspondieron a HTLV-1. En ambas muestras se amplificaron dos secuencias diferentes del gen tax de 100 pb cada una, y la muestra H94 fue positiva para pol y LTR. Ambas muestras resultaron negativas para el gen env y para una secuencia de tax (1119 pb). En la muestra H256 se detectó anticuerpos anti-Tax. En el análisis de LTR, H94 agrupó en subgrupo Transcontinental (A) subtipo Cosmopolita (a) (HTLV-1aA). Si bien el significado de estos seronegativos portadores del virus es incierto, la existencia de los mismos es un desafío para la medicina transfusional debido a la imposibilidad de detectarlos por serología convencional. Esto indica la necesidad de re-evaluar la configuración antigénica de los equipos serológicos actuales y de incorporar esta problemática en los programas de hemovigilancia para clarificar el riesgo residual de infección por HTLV. Esto es de importancia en países como Argentina con zonas endémicas para HTLV-1/2.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>QuímicaViva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	--

## **Detección de Rinovirus en niños internados en el hospital infantil municipal de Córdoba**


**Herrera Simó, C(1); Liendo, ME(2); Rodríguez, PE(1); Frutos, MC(1); Cuffini, CG(1); Cámara, JA(1); García Oro, MC(2); Cámara, A(1).**

*(1) Instituto de Virología "Dr. J.M.Vanella" (INVIV) FCM-UNC; (2) Hospital Infantil Municipal Córdoba.*

*Contacto: [camaraalicia@yahoo.com.ar](mailto:camaraalicia@yahoo.com.ar)*

El objetivo de este trabajo fue determinar la circulación de Rinovirus Humano (RVh) por primera vez, en niños internados con Infecciones Respiratorias Agudas (IRAs) del Hospital Infantil Municipal (HIM) de la ciudad de Córdoba. Se sabe que las IRAs altas y bajas de origen viral representan la mayor causa de morbi-mortalidad en el mundo para niños pequeños, ancianos e inmunocomprometidos. Además, se conoce que este virus es uno de los principales agentes causante del resfriado común y de otras IRAs en general. En el Centro Estudios Médicos e Investigaciones Científicas se estudiaron 186 niños menores de 5 años, ambulatorios con IRA alta y baja, detectando un 27% (Marcone y Col.,2012) de RVh. El diagnóstico molecular ha demostrado el nuevo impacto de los Rinovirus en IRA baja en niños, siendo responsables del 43% de estas. Los RVh, son importantes co-factores al desarrollo de otitis media y sinusitis en niños. Metodología: Fue un estudio prospectivo de 326 muestras tomadas en el HIM, que ingresaron al Instituto de Virología, desde Julio de 2018, hasta enero 2019 inclusive. Las muestras se obtuvieron mediante métodos de Aspirados o Hisopados nasofaríngeos de niños hospitalizados de 1 mes a 14 años de edad. La técnica fue biología molecular por RT-PCR anidada de un solo paso (Marcone y col. 2012). La aplicación de esta técnica se encuentra en etapas de estandarización con adaptaciones. El HIM determinó el panel de virus respiratorios por IFD. Se seleccionaron sólo aquellos pacientes que presentaron signos y síntomas relacionados a las IRAs, Resultados: De las 326 muestras analizadas, 33 resultaron positivas para RVh, dando una prevalencia del 10%. Presentan co-infecciones con otros agentes detectados mediante técnicas de Inmuno fluorescencia Directa, cuya prevalencia se encontró para Virus Respiratorio Sincicial 30%, Virus Parainfluenza I 2%, Virus Parainfluenza III 4%, Metapneumovirus 4%, Influenza A 4%. Conclusiones: Nuestros estudios son los primeros sobre RVh por biología molecular en pacientes pediátricos del HIM de Córdoba. Se halló una prevalencia del 10% durante esta etapa preliminar. La prevalencia de RVh en las infecciones respiratorias ha sido subestimada, ya que su detección era lenta por aislamiento en cultivo celular con baja sensibilidad. Nuestros resultados por biología molecular aportan al conocimiento de dicho agente infeccioso y son comparables a la prevalencia reportada por otros autores, considerando las particularidades locales.

Es importante su investigación, para conocer su circulación, evitar consultas médicas y estudios complementarios innecesarios, el abarrotamiento de hospitales, la prescripción inadecuada de antibióticos en busca de disminuir pérdidas económicas por ausentismo laboral y escolar. Es necesario continuar los estudios de prevalencia con el fin de evaluar el impacto de dichas infecciones en un número mayor de muestras de niños hospitalizados de Córdoba.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>QuímicaViva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	--

## **Vigilancia de cepas de rotavirus del grupo A y características epidemiológicas de los casos de gastroenteritis agudas en Buenos Aires en la era post vacunal.**


**Mandile, MG(1, 3); Díaz, V(1, 2); Peri Ibáñez, E(1, 3); Silvestre, D(1, 3); Argüelles, MH(1, 2); Temprana, CF(1, 3); Mistchenko, A(4); Glikmann, G(1); Castello, AA(1, 2)**

*(1) Laboratorio de Inmunología y Virología, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes; (2) Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional Arturo Jauretche; (3) CONICET; (4) Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, CABA.*

Contacto: [mgmandile@gmail.com](mailto:mgmandile@gmail.com)

Los rotavirus del grupo A (RVA) son una causa importante de morbi-mortalidad en niños pequeños. Las vacunas actualmente en uso (una monovalente, RV1, y otra pentavalente, RV5) han demostrado alta eficacia, aunque su desempeño es menos exitoso en regiones de bajos ingresos y pobres condiciones socio-sanitarias. Nuestro grupo de trabajo ha reportado ya en 2014 ciertas anomalías en el reemplazo típico de genotipos a lo largo del tiempo que podrían atribuirse a la vacunación masiva con la RV1 en la región sudamericana. En concordancia con esto, recientemente otros grupos también han mostrado evidencia que sugiere que las vacunas mencionadas afectarían la frecuencia de los genotipos circulantes, lo que, potencialmente, podría conducir a la evolución de cepas de escape. Este efecto se puede ver dinamizado en las regiones de peores condiciones sanitarias en las cuales los inóculos, la diversidad de cepas humanas y la probabilidad de contacto con cepas animales de la población son mayores. Sobre la base de este conocimiento se comprende la importancia de establecer sistemas de vigilancia de enfermedad por RVA y monitoreo de cepas para evaluar el impacto de la vacuna monovalente que se aplica masivamente en nuestro país desde 2015 según el Calendario Nacional de Inmunizaciones. Respecto a la genotipificación, el periodo reportado en este trabajo corresponde a muestras brindadas por el Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez (HNRG) de los años 2015 y 2016. Se ha encontrado que el tipo G dominante fue G12 con una frecuencia de 42,5%, cepa considerada común a nivel global. Por otro lado, la cepa codominante fue G2, con una frecuencia de 34,5%, debido quizás a la presión de selección establecida por la vacunación masiva. Luego, se vio que el genotipo P dominante fue P[4] con una frecuencia de 56,5%

y por debajo P[8] con 43,5%. Para el estudio epidemiológico de las gastroenteritis agudas (GA) se utilizaron datos brindados por el mismo Hospital comprendiendo el periodo 2008-2018, abarcando parte de la era pre vacunal (hasta 2014) y post vacunal (2015 en adelante). Se determinó un importante descenso del 61,5% de las internaciones asociadas a RVA para la era post vacunal respecto al periodo pre vacunal. Por otro lado, se vio un corrimiento en las edades de los casos GA por RVA, siendo la mayoría de los casos previos al 2015 a los 14 meses de edad y de 36 meses para los casos posteriores a ese año. Además, se ha observado un corrimiento en la estacionalidad, observando que el pico de infecciones por este agente pasó de ser invernal a primaveral. Por todo lo anterior, podemos decir que la implementación del plan de vacunación contra rotavirus disminuyó significativamente las internaciones por diarrea aguda asociada a esta etiología, así como el número global de internaciones por diarrea de la población pediátrica del HNRG.

 ISSN 1666-7948 <a href="http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar">www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</a>	Revista <b>QuímicaViva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	--

## **Estudio epidemiológico de bronquiolitis virales en cohortes de lactantes internados y ambulatorios durante dos periodos invernales consecutivos (2018-2019)**

**Nabaes Jodar, MS(1, 2); Goya, S(1, 2); Paglieri, L(3); Lucion, MF(3); Gentile, A(3); Mistchenko, A(1); Viegas, M(1, 2).**


*(1) Laboratorio de Virología, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, Ciudad Autónoma de Buenos Aires; (2) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Buenos Aires; (3) Departamento de Epidemiología, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.*

Contacto: [msnabaes@gmail.com](mailto:msnabaes@gmail.com)

La bronquiolitis es la causa más común de hospitalización por infección respiratoria aguda baja (IRAB) en niños menores de 2 años y la principal causa de morbilidad durante el primer año de vida. La mayoría de los estudios epidemiológicos se centran en hospitalizaciones, pero la mayoría de los casos de bronquiolitis se tratan en forma ambulatoria; por lo tanto, la bibliografía refleja una subestimación de la incidencia de la bronquiolitis en la población general. El objetivo de este trabajo fue describir la epidemiología viral de la bronquiolitis en una cohorte de pacientes menores de 1 año atendidos en el Hospital de Niños R. Gutiérrez durante los años 2018 y 2019. Se incluyeron pacientes que requirieron internación y pacientes que cursaron con la enfermedad de forma ambulatoria. Partiendo de muestras de aspirados nasofaríngeos se determinó la etiología viral a través la detección de genoma viral mediante real time-PCR. Se evaluaron los virus más frecuentemente asociados a las IRAB: virus sincicial respiratorio (VSR), virus de parainfluenza 1, 2 y 3 (PIV 1,2,3), enterovirus (EV) y rinovirus (RV), adenovirus humano (AV), virus de influenza A y B



(FluA y FluB) y metapneumovirus (MPV). La técnica de PCR-Multiplex desarrollada en el Laboratorio de Virología permitió determinar la presencia de los 10 virus en solo cuatro paneles de real time-PCR por muestra. Se reclutaron 46 pacientes internados y 71 pacientes ambulatorios con diagnóstico clínico de bronquiolitis en el periodo invernal de 2018 y 2019. En el 46,2% de los pacientes internados se detectó VSR, en el 10,9% se detectó concomitantemente VSR y RV; y en el 2,2% de los pacientes no se detectó ningún agente viral. Los siguientes agentes virales se detectaron en una proporción menor al 10% siendo RV (6,5%), PIV3 (6,5%), MPV (4,34%) FluA (2,2%), AV (2,2%), EV (2,2%). En el 17,30% de los casos restantes se detectaron coinfecciones entre los virus estudiados con porcentajes menores al 2%. En el 35,2% de los pacientes ambulatorios se detectó VSR, en el 15,5% se detectó concomitantemente VSR y RV; en el 11,3% se detectó RV y en el 2,8% de los pacientes no se detectó agente viral. Los siguientes agentes virales se detectaron en una proporción menor al 10% siendo MPV (7,0%), PIV 3 (5,6%), FluB (5,6%), FluA (2,8%), EV (1,40%). En el 12,8% de los casos restantes se detectaron coinfecciones entre los virus estudiados con porcentajes menores al 2%. Los resultados en ambas cohortes se corresponden con aquellos publicados en bibliografía sobre las IRAB en lactantes, siendo el VSR el agente viral más frecuente en dicho rango etario y siguiendo el RV como agente viral productor de infecciones respiratorias. En este trabajo se presentan los resultados preliminares de lo que será un estudio integral de la infección por virus respiratorios donde se profundizará la caracterización genética de los virus en conjunto con el estudio del microbioma nasofaríngeo y de la respuesta inmune desarrollada en cada paciente

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>QuímicaViva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	--

## **Coronavirus Humano en Niños Hospitalizados de Córdoba Análisis epidemiológico Anual.**

**Pérez, NI(1); Herrera Simó, C(1); Rodríguez, PE(1); Liendo, ME(2); Frutos, MC(1); Cuffini, CG(1); Cámara, JA(1); García Oro, MC(2); Cámara, A(1).**


*(1) Instituto de Virología "Dr. J M Vanella" FCM-UNC; (2) Hospital Infantil Municipal de Córdoba.*

Contacto: [camaraalicia@yahoo.com.ar](mailto:camaraalicia@yahoo.com.ar)

Los Coronavirus humanos (CoVh) respiratorios han cobrado importancia en 2002 y 2012 respectivamente por la epidemia de SARS- CoVh y MERS-CoVh. Este agente viral causa enfermedades respiratorias, entéricas, cardiovasculares y desórdenes neurológicos tanto en el hombre como en animales. Provoca resfrío, rinitis, sibilancias, síndrome obstructivo bronquial, bronquiolitis, neumonía y exacerbación del asma en niños, adultos e inmunocomprometidos. En Argentina Maffey (2008) detectó prevalencia del 2% en pacientes con infección respiratoria. Estudios realizados en el Instituto de Virología-FCM-UNCórdoba durante 2012-2013 reportaron prevalencia de 2 al 3 % en población general, siendo mayor en niños internados. Mano J. en 2018 informó un brote



de infección respiratoria humana por Coronavirus, de los cuales 3 de cada 20 pacientes murieron. Esta patogénesis viral severa inusitada hace necesario continuar con su vigilancia epidemiológica. Objetivo: Determinar la circulación de CoVh-OC43 en niños internados con infección respiratoria aguda (IRA) en el Hospital Infantil Municipal (HIM) de Córdoba. Metodología: Se analizaron 1.127 muestras de aspirados e hisopado nasofaríngeo de niños recién nacidos a 14 años de edad, internados con IRA. Fue un estudio prospectivo anual de Julio de 2018 a julio de 2019. La técnica fue biología molecular: RT-PCR de un solo paso para CoVh. El HIM determinó el panel de virus respiratorios de rutina por IFD. El criterio de inclusión fue la clínica compatible con IRA pediátrica. Resultados: Cuarenta y nueve de las 1.127 muestras analizadas por RT-PCR de un solo paso, resultaron positivas dando una prevalencia del 4,34% (49/1.127). Las prevalencias por Inmunofluorescencia Directa, para Virus Respiratorio Sincicial fue del 30%, Virus Parainfluenza I 2%, Virus Parainfluenza III 4%, Metapneumovirus humano 4%, Influenza A 4% e infecciones bacterianas, posibilitaron un marco de coinfecciones. Conclusiones: Los resultados obtenidos demuestran la necesidad de continuar investigaciones sobre CoVh, ya que circula en población pediátrica del HIM de Córdoba. La prevalencia de 4,34% obtenida está en concordancia con la descrita por varios autores y en Córdoba por nuestro grupo de investigación. El diagnóstico clínico es insuficiente, es necesario implementar el diagnóstico molecular de laboratorio rápido y sensible. Este diagnóstico viral diferencial permite conocer la situación epidemiológica de la región y las cepas virales circulantes, que pueden influir en la gravedad de los casos como lo reportó Mano J. en 2018.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---

## **Fibropapilomatosis asociada a Chelonid Alphaherpesvirus (ChHV-5) en tortuga verde: primera descripción en aguas argentinas.**


**Tizzano, MA(1); Origlia, JA(1,2); Loureiro, JP(3); Abeyá, MM(1,4); Maydup, F(5); Alvarez, K(3); Rodriguez Heredia, S(3); Echeverria, MG(1,4); Sguazza, GH(1).**

*(1) Laboratorio de Virología (LAVIR) Facultad de Ciencias Veterinarias - UNLP; (2) Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos Facultad de Ciencias Veterinarias - UNLP; (3) Fundación Mundo Marino. San Clemente del Tuyu – Buenos Aires; (4) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); (5) Facultad de Ciencias Veterinarias - UNLP*

Contacto: [m\\_tizzano@hotmail.com](mailto:m_tizzano@hotmail.com)

En aguas argentinas se encuentran presentes cuatro especies de tortugas marinas: tortuga verde (*Chelonia mydas*), tortuga laud (*Dermochelys coriacea*), tortuga cabezona (*Caretta caretta*), y la tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*), las cuales utilizan la zona como ruta migratoria y área de alimentación y desarrollo. Estas especies están expuestas a diversas amenazas como la destrucción del hábitat, la contaminación, el desarrollo costero, las actividades pesqueras y enfermedades como

la fibropapilomatosis (FP), que se caracteriza por el desarrollo de tumores de piel que pueden producir directa o indirectamente impacto sobre sus poblaciones. Los objetivos del presente estudio fueron caracterizar la FP mediante análisis histopatológicos y moleculares en una neoformación cutánea obtenida de una tortuga verde hallada en la costa argentina, y determinar su asociación con el Chelonid Alphaherpesvirus tipo 5. El 8 de febrero de 2019 una tortuga verde es encontrada varada en la costa del Río de la Plata (Quilmes, Buenos Aires). El animal presentaba 7 neoformaciones de aspecto verrucoso de color blanco a rosado distribuidas en aletas, cuello y parpado inferior izquierdo. De esta última se realizó biopsia y se obtuvieron muestras en formol buferado al 10 % para histopatología y refrigeradas para estudios moleculares. El estudio histológico reveló una hiperplasia ortoqueratótica, acantosis con moderada cantidad de células abalonadas con el núcleo en ocasiones desplazado hacia un costado y citoplasma transparente (edema). Las células basales se presentaron con vacuolización del citoplasma y otras necróticas. La dermis se observó hiperplásica con abundante vascularización y tejido conectivo con una amplia proliferación de fibroblastos con marcado predominio en el área papilar. Además, verificamos una infiltración difusa de células mononucleares en la dermis. Posteriormente, ADN total fue extraído a partir de 25 mg de la neoformación con un kit comercial. Se realizó una PCR para la detección de un fragmento de 483 pb correspondientes al gen de la ADN polimerasa de herpesvirus quelonio (Chelonid Alphaherpesvirus 5) con los siguientes primers GTHV2 (5'- GACACGCAGGCCAAAAGCGA-3') y GTHV3 (5'-AGCATCATCCAGGCCACAA-3'). El producto obtenido fue purificado y secuenciado. La presencia de herpesvirus se confirmó con la amplificación de un producto específico de 483 pb, y la secuencia de aminoácidos fue altamente homologa a otros fragmentos de ADN polimerasa de ChHV-5 previamente almacenados en GenBank. De esta manera el presente trabajo constituye el primer reporte de fibropapilomatosis asociada a herpesvirus en tortugas marinas que utilizan el estuario del Río de la Plata y el litoral marítimo de la República Argentina como área de alimentación y desarrollo.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---

## Diagnóstico molecular de enfermedades virales equinas de importancia en la industria hípica


**Tordoya, MS(1); Olguin Perglione, C(1); Álamos, F(1); Barrandeguy, M(1, 2); Vissani, A(1, 2, 3).**

*(1) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Virología, Argentina;(2) Escuela de Veterinaria, Universidad del Salvador, Pilar, Buenos Aires;(3) CONICET.*

Contacto: [tordoya.maria@inta.gob.ar](mailto:tordoya.maria@inta.gob.ar)

La Argentina es el primero productor de caballos de Polo y el tercero de embriones y caballos Sangre Pura de Carrera a nivel mundial. Las actividades relacionadas con el sector involucran la cría de caballos de distintas razas, la importación y exportación de caballos con distintos fines, entre los

cuales los más destacados son actividades deportivas, reproductivas y ventas. Las enfermedades infecciosas causadas por agentes virales son una amenaza para el estatus sanitario de la población equina. El movimiento nacional e internacional de caballos, pone en manifiesto la necesidad de contar con un régimen de vigilancia epidemiológica activa y permanente compatible con los lineamientos internacionales. Esto ha llevado a nuestro laboratorio a la utilización de técnicas diagnósticas moleculares para la detección de los agentes virales implicados en las enfermedades infecciosas de equinos. El presente trabajo tiene por objetivo, presentar los resultados obtenidos en el periodo comprendido entre los años 2013-2019, para el diagnóstico viral en muestras equinas analizadas en el laboratorio. Se analizaron un total de 352 muestras de semen para la detección del virus de Arteritis Equina (EAV); 282 muestras de hisopados nasofaríngeos (HN) provenientes de animales con signos respiratorios para la detección del virus de influenza equina (EIV), Herpesvirus equino 1 y 4 (EHV-1 y 4) y EAV; 1592 HN de animales sanos en cuarentena de pre-exportación para la detección del EIV; 18 muestras de sistema nerviosos central (SNC) y 32 líquidos cefalorraquídeos (LCR) de equinos con signos nerviosos para la detección del Virus del Oeste del Nilo (WNV), virus de Encefalitis equina del Este y Oeste (EEEV y WEEV), EHV-1 y EHV-4; 406 muestras de fetos abortados y natimortos para la detección de EHV-1, EHV-4, EAV. Como método diagnóstico se utilizó el ensayo de PCR y sus variantes, siguiendo las recomendaciones de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Se detectó genoma de EAV en 1 muestra de semen importado en cuarentena de pre-importación en el año 2017. Se detectó EIV en el 14,89% (42/282) en relación al brote de EIV ocurrido en 2018 y EHV-4 en 5% (14/282) de los HN de animales con signos respiratorios. Del total de abortos/natimortos analizados, se detectó genoma EHV-1 en el 4,67% (19/406). No se detectó genoma de WNV, EEEV y WEEV ni EHV-1 en las muestras de SNC y LCR de casos neurológicos. Tampoco se detectó genoma viral de EIV en los HN de caballos en cuarentena de pre-exportación. Los resultados obtenidos ponen en manifiesto la importancia del diagnóstico virológico molecular, como soporte para las autoridades sanitarias en la prevención y el control de infecciones virales. Esta tecnología es una herramienta fundamental permitiendo un accionar rápido en situaciones de brote, como durante el brote ocurrido en 2018 de EIV ó en el diagnóstico EAV en 1 semen importado en 2017.

 <p>ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</p>	<p>Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a></p>
--	--

## Primeros pasos en la secuenciación y el análisis genómico del virus de Epstein Barr


**Blazquez, AC(1); Berenstein, A(1); Rojo, G(2); Altchek, JM(1); Moscatelli, G(1); Gonzalez, N(1); Lezama, C(3); Izquierdo, A(4); Zaiat, J(5); Martí, M(5); Lorenzetti, MA(1); Preciado MV(1).**

(1) Instituto Multidisciplinario de Investigaciones en Patologías Pediátricas (IMIPP) CONICET-GCBA, Hospital de Niños Dr. R. Gutiérrez; (2) Laboratorio de Virología, Hospital de Niños Dr. R. Gutiérrez – CONICET; (3) Unidad de Hepatología, Hospital de Niños Dr. R. Gutiérrez; (4)

Centro de Investigaciones Endocrinológicas Dr. Cesar Bergada (CEDIE) CONICET-GCBA, Hospital de Niños Dr. R. Gutiérrez; (5) Plataforma Bioinformática Argentina (BIA), Instituto de Cálculo, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

Contacto: [blazquez.a.catalina@gmail.com](mailto:blazquez.a.catalina@gmail.com)

El virus de Epstein Barr (EBV) es agente etiológico de la mononucleosis infecciosas y se asocia a patologías malignas linfoides o epiteliales. Existen 2 tipos, EBV1 y EBV2, que se diferencian por polimorfismos en los genes de latencia EBNA2 y EBNA3A, 3B y 3C. Nuestro grupo de trabajo ha caracterizado la variación de EBV a nivel genético. Sin embargo, con el advenimiento de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva (NGS), se ha comenzado a nivel mundial a estudiar el genoma completo de EBV. Se han secuenciado más de 200 genomas completos de diversas regiones del mundo; no obstante, nuestra región geográfica está subrepresentada. Se incluyeron 16 muestras de pacientes pediátricos con patología asociada a EBV con carga viral mayor a  $10E6$  copias/ug de ADN. Las librerías de secuenciación se construyeron con el equipo SureSelect QXT Target Enrichment, basado en la hibridación y captura del genoma vira con sondas específicas diseñadas con la plataforma SureDesign, a fin de enriquecer su proporción respecto del ADN humano. Luego se secuenciaron en el equipo NexSeq500. Para el análisis bioinformático, se desarrolló un automatizado que incluyó el pre-procesamiento de las lecturas, mapeo contra los genomas de referencia de EBV1 y EBV2, llamado de variantes y obtención de las secuencias consenso. Se realizó la tipificación viral mediante amplificación de una región polimórfica de EBNA-3C por PCR. Se obtuvieron 15/16 genomas completos. El análisis bioinformático sobre el gen EBNA2 y la EBNA3A, 3B y 3C permitió realizar la tipificación viral, identificando 9 aislamientos con EBV1 y 6 con EVB2. El análisis de componentes principales y la reconstrucción filogenética de genomas completos avalaron este resultado, que luego se validó mediante la tipificación de las muestras por PCR. A partir del análisis discriminante de componentes principales, se identificaron dos dentro de la población de EBV1, que difieren en BBLF2-BBLF3. Actualmente, se está estudiando la segregación de las secuencias obtenidas respecto a las de otras regiones geográficas. Se obtuvieron los primeros 15 genomas completos de EBV de muestras locales secuenciados y analizados en Argentina. El estudio bioinformático sobre los genes EBNA2 y EBNA3A, 3B y 3C, resultó adecuado para lograr la correcta tipificación viral dado que presentó resultados concordantes con la PCR cualitativa sobre el gen EBNA3C. El análisis discriminante de componentes principales nos permitió identificar distintos dentro de la población EBV1 lo cual sugiere que la clasificación en EBV1 y EBV2 no refleja la completa variabilidad del el genoma viral. Además haciendo uso de las herramientas bioinformáticas, se lograron poner en evidencia de forma rápida y precisa las diferencias entre los grupos observados. Finalmente, cabe destacar que este trabajo contribuyó a incrementar el número de genomas virales completos de nuestra región geográfica.

 <p>ISSN 1666-7948 <a href="http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar">www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</a></p>	<p>Revista <b>QuímicaViva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a></p>
--	---

## Estandarización de técnicas para el diagnóstico del Virus de Estomatitis Vesicular.

**Alamos, F(1); Tordoya, MS(1); Olguin Perglione, C(1); Barranteguy, M(1,2); Vissani, MA(1,2, 3)**

*(1) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas; (2) Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Escuela de Veterinaria, Universidad del Salvador; (3) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)*

Contacto: [alamos.florencia@inta.gob.ar](mailto:alamos.florencia@inta.gob.ar)

La Estomatitis Vesicular (EV), enfermedad altamente contagiosa y caracterizada por la aparición de vesículas en la lengua, labios, mucosa bucal, ubres y rodete coronario de equinos, bovinos y porcinos, es producida por el virus de estomatitis vesicular familia , siendo los serotipos circulantes New Jersey (VSV-NJ) e Indiana (VSV-IND). Se transmite por contacto directo, a través de vectores (mosquitos y moscas) o elementos contaminados. La morbilidad es elevada pero los animales se recuperan en 2 semanas sin complicaciones. Es endémica en algunos países de América como México y Brasil, mientras que en Estados Unidos se reportan brotes esporádicos. Esta enfermedad es muy importante porque si bien no compromete la vida del animal, en biungulados no puede distinguirse clínicamente de la fiebre aftosa siendo entonces de denuncia obligatoria. En Argentina, en el año 2015, se detectó la enfermedad en vacas lecheras en Córdoba, Corrientes y Santa Fe, y en 2018 en equinos en Buenos Aires. Debido a esto, algunos países requieren el diagnóstico serológico de VSV en equinos previo a la importación desde Argentina. Objetivo: estandarizar el diagnóstico serológico y molecular para la detección de VSV. Para el diagnóstico serológico se estandarizó la técnica de seroneutralización. Se amplificó VSV-IND y NJ, y se establecieron las diluciones para las 100DICT50%. Se utilizaron sueros de referencia contra ambos serotipos (cedidos por el Veterinary Service AMES, Iowa). Se analizaron 259 muestras de suero provenientes de equinos estabulados en los hipódromos de San Isidro y Palermo (n: 248), de animales con signos clínicos compatibles con EV (n: 6) y de un panel de proficiencia (n: 5) remitido por el Laboratorio de Referencia, ANSES (EU-RL), Francia. Para la detección del genoma, se estandarizó una RT-PCR convencional utilizando One Step RT PCR Kit (QIAGEN) y primers para la amplificación del gen L de VSV-IND y VSV-NJ y como controles positivos los virus anteriormente descritos. Se analizaron 16 muestras de ARN correspondientes a hisopados de lesiones de equinos con signos compatibles con EV (n:6), y a un panel de proficiencia remitido por ANSES (n:10). Las muestras positivas serológicamente fueron 4/259, 2 al serotipo VSV-IND y 2 al serotipo VSV-NJ, todas incluidas en el panel de proficiencia de ANSES. Se detectó genoma de VSV en 8/16 muestras analizadas, correspondientes todas al panel de proficiencia siendo 4 positivas a VSV-IND y 4 a VSV-NJ. No se detectó genoma viral, ni anticuerpos en las muestras de animales de nuestro país. Los resultados obtenidos con los materiales incluidos en el panel de proficiencia (sueros y ARN), 100% concordantes, evidencian que la metodología utilizada es confiable para realizar el diagnóstico rápidamente en caso de la reemergencia de esta enfermedad en la región, así como para certificar exportaciones de equinos.

 **Química Viva**

ISSN 1666-7948

[www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)

Revista **Química Viva**

Número 1, año 19, Abril 2020

[quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)

## **Abejorros silvestres, un potencial reservorio de virus de abejas en el noreste de Argentina.**


**Bravi, ME(1, 2); Alvarez LJ(2, 3); Lucia M(2, 3); Genchi García ML(1, 4); Sguazza GH(1); Salina Marcos(1); Barbeito CG(2, 5); Reynaldi FJ(1, 2).**

*(1) Laboratorio de Virología, FCV-UNLP, La Plata, Argentina (UNLP); (2) CCT-CONICET, La Plata, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, La Plata, Argentina; (3) División Entomología, Museo de La Plata, UNLP, Edificio Anexo Museo, Unidades de Investigación FCNyM; (4) CIC, Comisión de Investigaciones Científica de la provincia de Buenos Aires, La Plata, Argentina. (5) Cátedra Histología y Embriología, FCV, UNLP.*

Contacto: [memiliabravi@hotmail.com](mailto:memiliabravi@hotmail.com)

La abeja melífera es uno de los polinizadores más importantes del mundo. La actividad apícola y los servicios de polinización se han visto afectados recientemente por la disminución de la población de abejas. Existen múltiples factores, entre los que se destacan la presencia de patógenos virales. En Argentina se detectaron seis virus en abejas: el Virus de la parálisis aguda (ABPV) y el de la parálisis crónica (CBPV), el Virus de la cría ensacada (SBV), el Virus israelí de la parálisis aguda (IAPV), el Virus de las celdas reales negras (BQCV) y el Virus de las alas deformadas (DWV). En este sentido, se ha demostrado la presencia de algunas de estas virosis en otras especies de insectos que cohabitan el ambiente de los polinizadores, lo que resulta en el hecho de que estos organismos podrían ser considerados como reservorios naturales de estos virus y poseer un rol importante en su dispersión en el ambiente. Es por ello, que el objetivo de este estudio fue determinar la presencia de virus de abejas melíferas en abejorros silvestres (Hymenoptera: Apidae: Bombini) en la región del noreste argentino. Esto nos permitirá evaluar su rol como posible reservorio de estos patógenos. Las muestras fueron recolectadas en Misiones y Corrientes desde noviembre de 2015 hasta abril de 2018. Cada abejorro se consideró una unidad de muestra y se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta ser procesado. Se analizaron un total de 93 abejorros de tres especies: ; y . Se realizó una extracción de ARN seguido por una retro transcripción. Luego se procedió a realizar una múltiplex PCR que permite la detección simultánea de siete virus: ABPV, BQCV, CBPV, DWV, SBV, IAPV y KBV (Virus de Cachemira). Se detectaron cuatro virus: IAPV, DWV, SBV y ABPV. Particularmente, tres de 26 especímenes de fueron positivos para IAPV. De 51 muestras de , 8 fueron positivas para IAPV, 2 para DWV y 6 coinfecciones (entre ABPV-SBV; IAPV-ABPV; ABPV-DWV-IAPV y DWV-IAPV). Finalmente, para (n: 16) dos muestras fueron positivas, una para IAPV y la otra para ABPV. Nuestros resultados confirman la presencia de virus de abejas melíferas en abejorros silvestres. En este sentido, los abejorros podrían considerarse un reservorio potencial para los patógenos de las abejas, lo que podría conducir al desarrollo de enfermedades infecciosas emergentes en estos insectos. Sin embargo, se requieren más estudios para confirmar esta suposición y determinar la dirección de la propagación entre las abejas melíferas y las abejas silvestres, como así también con otras especies que conviven en el ambiente, y determinar el rol que cumplen como posibles vectores mecánicos, reservorios o huéspedes. Comprender los diferentes mecanismos de dispersión de las virosis en el ambiente nos permitirá el desarrollo de diversas estrategias para el control, tanto de las colonias infectadas como de la dispersión de las virosis en el ambiente.



 <p>ISSN 1666-7948</p> <p>www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</p>	<p>Revista <b>QuímicaViva</b></p> <p>Número 1, año 19, Abril 2020</p> <p><a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a></p>
---	---

## Caracterización de subpoblaciones de NK en amígdalas de pacientes pediátricos en el contexto de la infección por EBV comparada con pacientes no infectados

**Ferressini Gerpe, NM(1); Vistarop, A(1); Caldirola, MS(2); Galliard, MI(2); De Mateo, E(3); Preciado, MV(1); Chabay, P(1)**


*(1) Laboratorio de Biología Molecular, División Patología, Instituto Multidisciplinario de Investigaciones en Patologías Pediátricas. IMIPP-CONICET, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. (2) Servicio de Inmunología, Instituto Multidisciplinario de Investigaciones en Patologías Pediátricas. IMIPP-CONICET, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez (3) División Patología, Instituto Multidisciplinario de Investigaciones en Patologías Pediátricas. IMIPP-CONICET, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.*

Contacto: [nferressini@gmail.com](mailto:nferressini@gmail.com)

En Argentina, los linfomas asociados al virus de Epstein Barr (EBV) tienen una mayor incidencia en niños menores de 10 años. La respuesta de NK juega un papel importante en el control de la infección y la transformación mediada por EBV. Se describió un rol fundamental de la población NKG2A+ como la principal efectora de la respuesta antiviral, gracias a la producción de IFN $\gamma$ , en niños pequeños de países desarrollados, donde la infección por el virus es sintomática. Sin embargo, se desconoce la respuesta de NK en el marco de la infección asintomática en niños de países subdesarrollados. Resultados preliminares del grupo mostraron una correlación positiva entre la expresión de CD56 (marcador de células NK) y de IFN $\gamma$  inmunohistoquímica (IHC). Es por ello que nuestro objetivo fue caracterizar las subpoblaciones de células NK presentes en el sitio de entrada y reactivación viral, las amígdalas, en niños infectados de nuestro hospital. Analizamos 76 pacientes (rango etario 1-15 años, mediana 5 años), que fueron amigdalectomizados en el servicio de otorrinolaringología del HNRG: 23 eran pacientes primoinfectados (PI), 38 portadores sanos (PS), 10 cursaban reactivación de la infección viral (R) y 5 no infectados (NI). Para identificar las subpoblaciones de NK presentes en el tejido y su funcionalidad se realizó IHC para CD56, CD16, IFN $\gamma$  y GrzB. Los resultados se expresaron como células positivas/mm<sup>2</sup>. Además, en un subgrupo de 29 pacientes se realizó Citometría de Flujo (CF) para los marcadores CD3, CD56, CD16, NKG2A y NKG2D y un ensayo funcional para determinar la producción de IFN $\gamma$  de las células estimuladas con IL12- IL15 e IL-18. El número de células CD56+ e IFN $\gamma$ + analizadas por IHC presentaron correlación positiva entre ellas en el conjunto de pacientes ( $r=0.2997$ ,  $p=0,0090$ ) y específicamente en PI ( $r=0.4464$ ,  $p=0.0328$ ). En todos los grupos de pacientes predominó la población NKG2A-NKG2D-. Sin embargo, el análisis por CF demostró, en pacientes PI, correlación positiva entre la edad y las células NKG2A+NKG2D+ ( $r=0,7697$ ,  $p=0,0279$ ). Por otro lado, cuando se comparó entre grupos la



producción de IFN $\gamma$  medida por CF, no se observaron hasta el momento en el número de pacientes analizados diferencias significativas ( $p > 0,05$ , Kuskall-Wallis). Estos resultados indican que la respuesta a EBV, fundamentalmente en pacientes primoinfectados, estaría mediada por células NK CD56+ productoras de IFN $\gamma$ . A diferencia de lo descrito en países desarrollados, en donde el marcador NKG2A prevalece en niños pequeños y negativiza a mayores edades, en la serie analizada la principal subpoblación fue la NKG2A-NKG2D-, mientras que, en PI, las células NK NKG2A+NKG2D+ se observan a mayores edades, lo cual podría indicar una deficiencia en el manejo de la infección primaria y la transformación mediada por el virus en niños de corta edad.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---

## Monitoreo de parásitos y patógenos de importancia sanitaria en cabañas apícolas


**Ferrufino, C(1); Gonzalez, F(1); Fighini, E(2); Boca, T(3); Salvador, R(4) y Dus Santos, M J(1).**

(1) Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas (IVIT) INTA-CONICET. Centro de Investigaciones en Ciencias Agronómicas y Veterinarias (CICVyA). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Buenos Aires. Argentina; (2) Agencia de Extensión Rural Tandil. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). PROAPI. Fac. Cs. Veterinarias. UNICEN. Buenos Aires. Argentina; (3) Escuela de posgrado (EPG). Facultad de Agronomía (FAUBA). Universidad de Buenos Aires (UBA); (4) Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA). Centro de investigaciones en Ciencias Agronómicas y Veterinarias (CICVyA). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Buenos Aires. Argentina.

Contacto: [ferrufino.cecilia@inta.gob.ar](mailto:ferrufino.cecilia@inta.gob.ar)

El mercado apícola argentino cuenta con 29.000 apiarios georreferenciados y un total de 2.449.000 colmenas. Durante el año 2018 se exportaron 70.668 tn. de miel por un valor de U\$S175.008.265. Estos apiarios son abastecidos de material vivo (celdas reales, reinas, paquetes de abejas y núcleos) por cabañas apícolas, siendo éstas el primer eslabón de la cadena de comercialización de producción apícola. Además, durante el año 2018 se exportó material vivo por un valor de 253.036 dólares. Este tipo de producción implica un manejo especial en el cual las colonias son sometidas al estrés del manipuleo y, por ello, son susceptibles a diferentes agentes patógenos y a la aparición de problemas sanitarios que interfieren en una productividad eficiente. Dentro de estos, se destacan la infección con el microsporidio, la infestación con el ácaro y las infecciones virales. Las abejas son infectadas por diferentes virus y varios estudios confirman que su transmisión puede ser vertical, horizontal o mediada por vectores biológicos como varroa. El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de los agentes mencionados en 13 cabañas apícolas pertenecientes a 6 provincias de la Argentina. Para este fin, se colectaron muestras de abejas nodrizas de cuadros de cría y pupas de reinas, completando un total de 439 muestras, durante los años 2015, 2016 y 2017. Se analizaron 6

virus que afectan a las abejas (DWV, BQCV, ABPV, SBV, CBPV e IAPV) mediante RT-PCR, y se obtuvieron los resultados del número de esporas de y del porcentaje de infestación de . También se registraron los datos de temperatura media y humedad relativa al momento del muestreo, para evaluar si estos parámetros están relacionados con la presencia de los diferentes patógenos. Los virus detectados fueron ABPV (7%), DWV (5%), BQCV (3%), SBV (0,2%). Se detectó coinfección entre ABPV-BQCV, DWV-BQCV y DWV-ABPV. Respecto a , se detectó en el 80,2% de las muestras y la prevalencia de colonias con alta infestación (mayor al 3%) fue del 6,56%. se detectó en el 86,8% de las muestras analizadas. Se encontró que la presencia de Nosema tendía a incrementarse con la humedad relativa, no así con la temperatura; en cambio la presencia de Varroa y virus no mostraron relación alguna con las variables meteorológicas registradas. Dado que las cabañas son el primer eslabón en la cadena de comercialización de productos de la colmena, es relevante realizar estos monitoreos para poder establecer medidas de control de patógenos adecuadas y comercializar material vivo en óptimo estado sanitario.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---

## DetECCIÓN DE VIRUS EN COLMENAS DE EN LA REGIÓN CENTRO DE ARGENTINA


**Genchi García, ML(1, 2, 3); Bravi, CM(2, 4); Reynaldi, FJ(3, 4)**

*(1) Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC-PBA); (2) Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE); (3) Laboratorio de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias – UNLP, (4) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)*

Contacto: [ml.genchigarcia@gmail.com](mailto:ml.genchigarcia@gmail.com)

Las abejas melíferas (), revisten una gran importancia económica y ecológica para nuestro país contribuyendo en gran medida a los sistemas de polinización. Desde hace una década, se registran disminuciones en el número de colmenas, y se han propuesto diferentes factores como causales de las alteraciones de los mecanismos de defensa, como la presencia de otras enfermedades, que permiten a los virus circulantes generar infecciones en las poblaciones. En este trabajo fue analizada la presencia de los virus ARN de cadena positiva (IAPV), (DWV), (ABPV), (SBV), (BQCV), (KBV) y el (CBPV). La colección de muestras se realizó durante los años 2016 a 2019 en la Zona Centro del país que comprende las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Entre Ríos y Santa Fe y que concentra el 80% de las colmenas destinadas a la producción. El muestreo se realizó en una colmena por apiario, 135 en total para toda la region y el análisis de presencia de virus fue realizado a partir de la extracción del ARN total con TRIzol® partiendo de un pool de 15 abejas. Posteriormente, se empleó la técnica de PCR múltiple para detección de los virus, previamente desarrollada en nuestro laboratorio. Los amplicones fueron analizados en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. Todos los virus fueron hallados a excepción de KBV [IAPV (38), BQCV (20), SBV (17), DWV (10), ABPV (5) y CBPV (1)]. Del total de muestras analizadas, 54 exhibieron presencia de virus en infecciones simples (29) o múltiples (25) de dos, tres o cuatro virus. Teniendo

en cuenta que el ingreso de los virus puede producirse por debilitamiento del sistema inmune por parte de otros factores, como la infestación por el ácaro , propuesto como vector de virus, se analizaron los porcentajes de infestación de las colmenas por este parásito y pudo evaluarse que el 44,4% de las colmenas positivas para virus presentaban porcentajes de infestación elevados. Estos resultados confirman la presencia de seis de los virus estudiados en las poblaciones de abejas en la Región Centro de la República Argentina. Algunos de estos virus han sido detectados en abejas nativas y otros insectos que comparten el mismo ambiente con las abejas melíferas. Por este motivo, es de especial interés, realizar muestreos periódicos para determinar la presencia de virus en las colmenas, ya que estos circulan en el ambiente afectando a más de una población y contribuyendo a la disminución de las poblaciones de distintos insectos.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>QuímicaViva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	--

## **Infeción por virus Encefalitis Saint Louis y West Nile en perros de Anisacate, Córdoba (Argentina): su utilidad en la vigilancia de flavivirus neurotropos.**


**Currenti, L(1); Gleiser, R(2); Díaz, MP(3); Contigiani, M(1); Spinsanti, L(1).**

*(1) Instituto de Virología "Dr.J.M.Vanella", Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba; (2) Cátedra de Ecología, FCEfyN, UNC; CIC CONICET CREAM - IMBIV (UNC CONICET); (3) Cát. Estadística y Bioestadística, Escuela de Nutrición e INICSA-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.*

Contacto: [luisinacurrenti@hotmail.com](mailto:luisinacurrenti@hotmail.com)

Los virus encefalitis Saint Louis (SLEV) y West Nile (WNV) (Flavivirus) se mantienen en la naturaleza a través de ciclos que involucran aves y mosquitos del género Culex. Humanos y equinos son hospedadores finales. varios estudios serológicos y virológicos han dado evidencia de la actividad de estos virus en Argentina. Los perros domésticos juegan un rol vital en la sociedad, compartiendo estrechamente el ambiente con el hombre. Esta relación aumenta las oportunidades de transmisión de patógenos entre humanos, animales y vectores. Existe consenso acerca de que para ser centinela una especie ideal debe ser susceptible a la infección, sobrevivir a ella, desarrollar anticuerpos detectables, no generar riesgo a los operadores ni desarrollar un nivel suficiente de viremia como para infectar mosquitos. Pruebas realizadas en distintos países sostienen por estas características, la elección de perros como centinelas. Para conocer la actividad de los virus WN y SLE en perros domésticos, y evaluar su potencial como centinelas se condujo un estudio en la población canina de la localidad de Anisacate, Córdoba. Se aplicó una encuesta serológica y se recolectaron 157 muestras (edad 3 meses a 14 años), durante enero de 2017, en el marco de una campaña municipal de vacunación antirrábica. En julio del mismo año, se realizó una segunda toma de muestras a los

perros que resultaron seronegativos al primer análisis. Se detectaron anticuerpos neutralizantes para ambos virus por la técnica de neutralización. Se utilizó un modelo de regresión logística para estimar la relación entre la edad de los perros y la probabilidad de ocurrencia de la infección. Para detectar y evaluar si los canes seropositivos estaban espacialmente agrupados, se usaron estadísticos de barrido ("Scan statistics") del software libre SaTScan. Se obtuvo 18.5% (29/157) de respuesta inmune homotípica para SLEV, mientras que 2 perros resultaron seropositivos para WNV los cuales también lo fueron para SLEV (reacción heterotípica); 2.5 % (2/79) de los perros seroconvirtieron para SLEV entre enero y julio. La edad estuvo asociada con la probabilidad de ser seropositivo para SLEV, ya que la chance de ser positivo de los cachorros fue del 20% de la que tuvieron los adultos. No se detectaron agrupamientos significativos de casos positivos (high) o negativos (low) ( $p > 0,05$ ), por lo tanto, no se evidenciaron zonas "calientes" de transmisión de SLEV. Los resultados aportan al conocimiento de estos virus en perros de una zona rural, ya que se conocen resultados obtenidos en zonas urbanas de Córdoba (10.3%) y de Buenos Aires (16%). La tasa de incidencia en perros centinelas indicó transmisión activa. La probabilidad de ser positivo asociada a la adultez nos confirma la endemidad del SLEV en Córdoba. Estos hallazgos colocan a estos animales como potenciales centinelas epidemiológicos, de fácil acceso como indicadores serológicos de lo que podría ocurrir en la población humana respecto a estas zoonosis.

 ISSN 1666-7948 <a href="http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar">www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</a>	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---

## **Situación Epidemiológica de la Infección Perinatal por el VIH en Córdoba - Periodo 2013-2017**


**Luque, LG(1) ; Castro, GM(2)**

*Laboratorio Central de la Provincia de Córdoba*

*Contacto: [lilyluque08@gmail.com](mailto:lilyluque08@gmail.com)*

Introducción: la transmisión vertical (TV) del VIH es la principal vía de transmisión de la infección en población pediátrica. Puede ocurrir intraútero, en el trabajo de parto y en el postparto. Factores como carga viral (CV) materna, tipo de parto, lactancia y tratamiento antiretroviral (TARV) influyen en la transmisión de la infección. Objetivo: presentar la situación epidemiológica en relación a la TV del VIH en Córdoba, en el periodo 2013-2017. Materiales y métodos: se analizaron los datos presentes en las fichas clínico-epidemiológicas de solicitud de diagnóstico de VIH congénito de muestras derivadas al Laboratorio Central de la Provincia de Córdoba y los resultados de CV obtenidos del sistema de laboratorio, pertenecientes a los individuos bajo estudio. Resultados: sobre un total 736 niños nacidos de madres infectadas por VIH en el periodo 2013-2017, de los cuales 685 completaron el algoritmo diagnóstico, 21 (3,1%) resultaron con TV confirmada. Las tasas de TV para cada año fueron las siguientes: 2013: 3,3% (4/123); 2014: 1,7% (2/118); 2015: 3,7% (5/135); 2016: 3,6% (5/137) y 2017: 2,9% (5/172). Si bien, en promedio, las madres presentaron 5 controles obstétricos

durante la gestación, 8,3% de ellas se diagnosticaron durante el trabajo de parto o postparto, el 47,9% contrajo la infección antes del embarazo y el 40,3% durante el mismo. En relación al tipo de parto, el 23,2% de los casos fue por parto vaginal y 74,5% por cesárea. Para los casos con TV confirmada, en el 38,1% de los casos el diagnóstico materno tuvo lugar previamente o durante el embarazo y en el 52,4% de los casos durante el trabajo de parto o postparto. En cuanto al tipo de parto, el 50% de los casos de TV fueron por parto vaginal y el 40,9% por cesárea. Referido al TARV, de las 8 madres con diagnóstico previo a, o durante el embarazo, solo 3 (37,5%) recibieron TARV durante el embarazo y en el momento del parto, 2 (25%) solo en el parto y 3 (37,5%) en ninguna de estas instancias. En los 12 casos en los que el diagnóstico tuvo lugar durante el parto o postparto, solo 4 (3,3%) recibieron TARV, 5 (41,7%) no lo recibieron. Para el grupo de pacientes diagnosticadas previamente o durante el embarazo en curso, solo se contó con el dato de CV en los siguientes casos: una paciente con CV no detectable y buena adherencia y dos pacientes con CV > log 3, ambas sin TARV. En aquellos casos con diagnóstico durante el parto o postparto, dos pacientes registraron CV > 3 log, posteriores al parto. Conclusión: el diagnóstico oportuno de la infección por VIH en niños es una prioridad de salud pública. Toda mujer embarazada o que planifique un embarazo debe ser alentada a conocer su estado frente al VIH y ser informada de las consecuencias del embarazo cuando son portadoras del virus. Los resultados reflejan que el diagnóstico oportuno de la mujer embarazada, el TARV, y la aplicación de medidas que minimicen el contacto del niño con sangre y otros fluidos maternos, permiten disminuir la TV.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---

## Producción de inmunoglobulina Y aviar (IgY) específica anti-virus Junín


**Maiza, A(1); Gamboa, G(1); Leiva, C(2); Canet, Z(3); Mogetta, H(1); Giovannoni, N(1); Chacana, P(2); Saavedra, MC(1).**

*(1) Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. Julio I. Maiztegui. INEVH-ANLIS; (2) Instituto de Patobiología, INTA; (3) Estación Experimental Agropecuaria Pergamino, INTA*

Contacto: [andreas.maiza@gmail.com](mailto:andreas.maiza@gmail.com)

La Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) es una enfermedad viral infecciosa grave producida por el virus Junín (JUNV) perteneciente a la familia Arenaviridae. Para prevenir esta enfermedad existe una vacuna denominada Candid#1 (C#1) que se produce en el INEVH. Se requieren diferentes controles de calidad previos a su lebaración para su uso en humanos, entre ellos están los ensayos in vivo en los que se utiliza suero hiperinmune anti C#1 obtenido en conejo. Una alternativa al uso de conejos para la producción de anticuerpos (Ac) policlonales es la utilización de gallinas ponedoras. Está demostrado que el modelo aviar es útil para el desarrollo de Ac específicos para diferentes virus, tales como Sendai, chikungunya, dengue y otros, sin embargo, no hay estudios realizados con ningún arenavirus. La utilización de huevos de gallina para la producción de anticuerpos policlonales es de gran interés debido a que las inmunoglobulinas Y (IgY), en reemplazo de los anticuerpos de

mamíferos, presentan grandes ventajas: alto rendimiento, técnica económica, no invasiva y no estresante para el animal, ya que no se requieren sangrados para la obtención de la inmunoglobulina. El objetivo del trabajo fue demostrar que las gallinas inoculadas con JUNV producen IgY anti C#1, permitiendo de esta manera reemplazar al conejo por el modelo aviar. Materiales y métodos: El día 0 se inocularon cuatro gallinas ponedoras de 20 semanas: dos con diluyente (gallinas controles C1 y C2) y dos, con una emulsión de la cepa patógena de JUNV (P3790) y adyuvante completo de Freund (ACF) en proporción 1: 1 (gallinas en estudio G1 y G2). El día 28 se inoculó una emulsión con C#1+1% Suero normal de gallina (SNG) y adyuvante incompleto de Freund (AIF) en proporción 1:1. Las inmunizaciones se llevaron a cabo por vía subcutánea e intramuscular. Se extrajo sangre a las gallinas G1, G2 y C1, C2 previo a la primera inoculación con P3790, y en los días 16 y 51 post inoculación (pi). Se recolectaron los huevos previos a la primera inoculación y entre los días 39 al 47 pi. Se extrajo la yema de cada huevo y los anticuerpos (Ac) fueron precipitados con sulfato de amonio y purificados por diálisis. La titulación de Ac anti C#1, fue realizada sobre monocapas de células Vero por prueba de neutralización (NT) por reducción del 80 % de UFP (unidades formadoras de placas). Resultados: El título de Ac NT anti C#1 en suero fue Negativo en la muestra pre inoculación y a los 16 días pi y se obtuvo un título de 1738 a los 51 días pi en la gallina G1. En el purificado de yema de huevos recolectados entre los 39 y 47 días pi el título de Ac NT fue 3583 en la gallina G1, mientras que en la gallina G2 y en las gallinas C1 y C2 los resultados fueron negativos tanto en las muestras pre como en las muestras pi. Conclusiones: Estos resultados sugieren que las IgY específicas anti-JUNV C#1 pueden ser producidas en gran escala y ser utilizadas como reactivo biológico tanto en los controles de calidad in vivo e in vitro de la vacuna C# 1, como en pruebas de ELISA y ensayos de IFI para el diagnóstico de JUNV.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---

## **Caracterización de EFE's en genomas de Aedes aegypti y su impacto en la detección de flavivirus a partir de muestras de mosquitos.**

**Ripoll, L(1); Bonica, M(2); Micieli, MV(2); Ghiringhelli, PD(1); Bilén, MF(1)**


*(1) Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular – Área de Virus de Insectos. Dto. de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Quilmes; CONICET; (2) CEPAVE (Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores); CONICET.*

Contacto: [lucas.ripoll22@gmail.com](mailto:lucas.ripoll22@gmail.com)

**INTRODUCCIÓN** Los elementos flavivirales endógenos (EFE's) son secuencias flavivirales parciales o completas integradas en el genoma del hospedador. Se han reportado y caracterizado numerosos eventos de integración en genomas de Aedes spp. En los últimos años se ha identificado que algunos de estos elementos se encuentran activos y pueden producir transcritos, ARNs de interferencia e incluso pueden traducirse produciendo proteínas incompletas. El rol biológico de estos



elementos es un área de estudio actual y puede generar información importante respecto del sistema inmunológico de los vectores como también de la evolución de los arbovirus. METODOLOGÍA Detección de elementos flavivirales: Para la detección de flavivirus se partió de tres pools de diez ejemplares de *Aedes aegypti* correspondientes a muestras colectadas en Tartagal, Santo Tomé y de la colonia del CEPAVE. Se realizó una extracción de ADN total y de ARN total. A partir de las muestras de ADN, se llevó a cabo una Nested PCR utilizando primers específicos. Sobre el ARN extraído se realizó una retrotranscripción utilizando los primers sense y antisense sobre la muestra de Tartagal y luego una Nested PCR. Las muestras positivas fueron secuenciadas para determinar la identidad de las secuencias involucradas. Caracterización de la región genómica: A partir de los datos de secuenciación, se pudieron identificar los elementos flavivirales insertos en el genoma de *Aedes aegypti*. Basándonos en datos bibliográficos se utilizaron estrategias moleculares alternativas para detectar la posición de la inserción. RESULTADOS Se detectaron elementos flavivirales endógenos correspondientes al gen NS5 de Kamiti River tanto en las muestras de DNA como en las de RNA. Los resultados de secuenciación nos muestran que esta sección del virus se encuentra inserta en el cromosoma 2 del genoma de *Aedes aegypti*, dentro de una región transcripcionalmente activa, detectando transcritos que lo contienen en ambas polaridades. CONCLUSIONES Los resultados obtenidos indican la presencia de una secuencia de Kamiti River en el genoma de *Aedes Aegypti*. Conocer el diverso repertorio de EFE's insertos en genomas de diferentes poblaciones de *Aedes spp.* puede ayudar a comprender el rol que estos poseen en el sistema antiviral de los vectores de transmisión de enfermedades con alta incidencia en la población. Por otra parte, la existencia de estos elementos puede influir en los métodos de detección de flavivirus sobre muestras de mosquitos colectadas en campo.

 ISSN 1666-7948 <a href="http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar">www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</a>	Revista <b>QuímicaViva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	--

## Sentimiento y actitud frente a las vacunas en entornos urbano y rural de Córdoba.

Sepich, MM(1); Prado, B(1, 3); Salbetti, MB(1); Pedranti, M(1); Eynard, M(2); Martínez Wasaff, M(3); Adamo, MP(1).


(1) Instituto de Virología Dr. J. M. Vanella, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba; (2) Cátedra de Medicina Antropológica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba; (3) Laboratorios LACE Córdoba.

Contacto: [marlene.sepich@gmail.com](mailto:marlene.sepich@gmail.com)

La reticencia a las vacunas es un problema global y dinámico que requiere vigilancia y este año ha sido identificada por la OMS como una de las 10 amenazas principales para la salud mundial. Por ello investigamos la percepción sobre las vacunas en comunidades urbana y rural de la provincia de Córdoba, Argentina. Método: estudio observacional, descriptivo, de corte transversal, aprobado por el



Comité de Ética del Hospital Nacional de Clínicas (REPIS 3411), con un cuestionario estandarizado por el Grupo de Asesores Expertos de la OMS, adaptado y validado in situ. Los participantes fueron adultos residentes de la ciudad de Córdoba (COR, ámbito urbano) y del pueblo de Villa Yacanto de Calamuchita (YAC, ámbito rural). El muestreo fue no probabilístico por cuotas. Los datos se analizaron mediante medidas de tendencia central, frecuencia, odds ratio (OR), intervalos de confianza del 95% (IC95%). La significancia estadística se evaluó por prueba Chi<sup>2</sup>. Resultados. En COR se encuestaron 1111 adultos (error 3%), edad mediana 26 años, 66% mujeres, 82% con estudios superiores y 31% con hijos. En YAC se encuestaron 301 habitantes (error 5%), edad mediana 39 años, 72% mujeres, 32% con estudios superiores y 87% con hijos (OR 14, IC95% 10-20). En COR y YAC 17% y 23% (p=0,02) manifestó haber tenido dudas o desconfianza acerca de vacunarse o vacunar a sus hijos, en tanto que 10% y 9%, respectivamente, señaló haber rechazado alguna vacuna indicada. En YAC la mayoría de las dudas o desconfianza se refiere a “las vacunas en general” (52% entre los que expresan reticencia), no así en COR (18%, p<0,00001). Individualmente las más controvertidas fueron las vacunas contra gripe y VPH en ambas localidades. Considerando el total de encuestados, 0,72% en COR y 1,33% en YAC rechazan todas las vacunas. En COR y YAC las razones más frecuentes de reticencia fueron preocupación por la seguridad / efectos adversos (26% y 35%), haber escuchado o leído comentarios negativos (25% y 39%) y pensar que una vacuna no es necesaria (20% y 18%, respectivamente); en tanto 50 y 18% (p<0,00001) creen que es difícil para algunas personas de su comunidad tener acceso a las vacunas, principalmente porque los servicios de salud no los incluyen (75 y 26%). Por otra parte, 57 y 38% de los encuestados en COR y YAC recibió u oyó información negativa, de los cuales 8 y 24% (p<0,00001) cambiaron de opinión sobre vacunarse o vacunar a sus hijos luego de ello. En COR y YAC 80 y 72% cree que los niños aún necesitan vacunas para enfermedades que ya no son comunes y, además, 86 y 90% de los encuestados con menores a cargo manifiesta que los niños tienen la cartilla completa. Conclusiones. Una proporción significativa en el contexto de la temática expresa dudas o desconfianza sobre la seguridad de las vacunas, siendo una de las principales causas la falta de información exacta. A pesar de ello, la mayoría de los padres refiere que vacuna a sus hijos con todas las vacunas de la niñez recomendadas.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>QuímicaViva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	--


## **Método de diagnóstico específico para el virus de la encefalitis de Saint Louis utilizando una proteína no estructural como antígeno.**

**Simari, MB(1); Goñi, SE(1); Luppó, VC(2) ; Fabbri, CM(2); Argüelles, MH(3) ; Lozano, ME(1); Morales, MA(2); Iglesias, NG(1)**

*(1) Laboratorio de Virus Emergentes, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes. Bernal, Buenos Aires, Argentina; (2) Departamento de Investigación, Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Dr. Julio Maiztegui”, ANLIS, Pergamino, Argentina; (3) Laboratorio de Inmunología y Virología, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Buenos Aires, Argentina.*

Contacto: [milisimari18@gmail.com](mailto:milisimari18@gmail.com)

El virus de la encefalitis de San Luis (SLEV) es un flavivirus transmitido por mosquitos reemergente en Argentina. Los inmunoensayos para diagnosticar SLEV carecen de especificidad debido a que se basan en la detección de proteínas virales estructurales y las inmunoglobulinas humanas producidas durante la infección contra estas proteínas reaccionan de forma cruzada con otros flavivirus. Por lo tanto es necesario desarrollar pruebas serológicas específicas que puedan discriminar eficientemente entre los flavivirus que circulan en nuestro país. En este trabajo describimos un inmunoensayo enzimático desarrollado para detectar anticuerpos IgG humanos contra la proteína no estructural viral NS5. Para ello expresamos y purificamos NS5 de SLEV en bacterias y la utilizamos en un ensayo ELISA indirecto (EIA) para la detección de IgG en sueros humanos. Se analizaron 59 sueros, 19 positivos para SLEV, 14 positivos para Dengue, 9 positivos para Fiebre Amarilla, 4 positivos para Zika, 7 para Chikungunya, 6 para Hantavirus, 7 positivos para Fiebre Hemorrágica Argentina y 14 negativos. De los sueros positivos para SLEV 16 resultaron positivos con nuestro método (84%), interesantemente ninguna de las muestras positivas para otros flavivirus, otros virus o negativas resultaron positivas con nuestro método, mostrando que el ensayo es específico. Los resultados indican que NS5 es un antígeno prometedor para discriminar SLEV de otros flavivirus circulantes.

 ISSN 1666-7948 <a href="http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar">www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</a>	Revista <b>QuímicaViva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	--

## **Nuevos hallazgos del Virus de la Parálisis Aguda Israelí (IAPV) en insectos asociados a la comunidad de polinizadores del Cinturón Hortícola Platense (Buenos Aires, Argentina).**


**Susevich, ML(1, 2); Marti, GA(2, 3); Echeverría, MG(1, 2).**

*(1) Laboratorio de Virología (LAVIR), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina; (2) CONICET (CCT La Plata). La Plata, Argentina; (3) Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) (CCT La Plata CONICET-UNLP), La Plata, Argentina.*

Contacto: [misusevich@hotmail.com](mailto:misusevich@hotmail.com)

En la región del Cinturón Hortícola Platense (CHP), que comprende los partidos de Berazategui, Magdalena y La Plata (Provincia de Buenos Aires, Argentina), se llevó a cabo un relevamiento de virus patógenos de abejas de las familias Dicistroviridae e Iflaviridae en artrópodos diversos: *Diabrotica speciosa* (Coleoptera, Chrysomelidae); *Cycloneda sanguinea* y *Eriopis connexa* (Coleoptera, Coccinellidae); *Nezara viridula*, *Edessa mediatubunda*, *Piezodorus guildinii* y *Dichelops furcatus* (Hemiptera, Pentatomidae). Para este trabajo se procesaron 105 individuos de los insectos

mencionados anteriormente. Todas las muestras se tomaron de invernáculos tanto a cielo abierto como cerrados y fueron congelados a -20 °C para su posterior análisis. Los insectos se agruparon de a 15 individuos adultos de cada especie y se trituraron en un mortero con 2 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las muestras se purificaron y clarificaron de acuerdo al protocolo descrito por Susevich et al. (2017) y luego fueron corridas en geles de poliacrilamida para evaluar la posible presencia de proteínas de peso molecular característico. De acuerdo a estos resultados, las muestras que mostraron las bandas proteicas esperadas fueron seleccionadas para realizar su posterior extracción de ARN con Trizol. Se utilizaron 5 µl del ARN total para la síntesis de ADN complementario (ADNc). Se realizó una PCR múltiple (mPCR) como metodología de screening en un volumen final de 25 µl. Esta PCR múltiple amplifica 6 virus: Virus Sacbrood (SBV) y virus de las alas deformadas; DWV (ambos de la familia I flaviridae); virus de las celdas reales negras (BQCV); virus de la parálisis crónica de las abejas (ABPV) y el virus de la parálisis aguda Israelí (IAPV); todos de la familia Dicistroviridae y CBPV (Virus de la parálisis crónica de las abejas; aun sin clasificar). Luego de la amplificación las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 2,5% durante 40 minutos a 100 V que fue inmediatamente teñido con bromuro de etidio y observado bajo luz UV. Como control positivo se utilizó una muestra previamente aislada y caracterizada en el Laboratorio de Virología como IAPV. De las siete especies analizadas, cinco (*D. speciosa*; *C. sanguínea*; *E. connexa*; *N. viridula* y *D. furcatus*) fueron positivos solo a IAPV, tanto en la PCR múltiple como en la PCR específica, en la cual se evidenciaron amplicones de 185 pb específicos. Estos resultados permitirían inferir que las infecciones con IAPV en los insectos son de gran importancia, información que podría ser útil para conocer la dinámica del virus en la naturaleza. Este trabajo detecta por primera vez la presencia de IAPV en los insectos analizados. Serán necesarios estudios adicionales para entender la ecología de este virus en las comunidades de artrópodos del CHP y determinar el rol que cumplen estos artrópodos como posibles reservorios de este virus en el ambiente.

 <p>ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</p>	<p>Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a></p>
--	--

## **Optimización de la sensibilización del antígeno de un ELISA para detectar anticuerpos contra el virus de parainfluenza bovina tipo 3(BPIV3)**


**Tau, R(1); Ferreccio, C(1); Torales, FA(1); Romera, SA(1, 2); Maidana, SS(2)**

*(1) Instituto Nacional de Tecnología agropecuaria (INTA); (2) IVIT (CONICET-INTA)*

Contacto: [rotau\\_1996@hotmail.com](mailto:rotau_1996@hotmail.com)

El virus de la parainfluenza bovina tipo 3 (BPIV3) es un agente infeccioso respiratorio que afecta al ganado. Miembro del género *Respirovirus*, con un genoma de ARN no segmentado, su transmisión está asociada con fluidos nasales siendo aparentemente asintomático pero generando una

predisposición a colonizaciones bacterianas e infecciones secundarias. Además, junto con otros virus y bacterias conforma el llamado complejo de respiratorio bovino (CRB) que causa pérdidas económicas para productores ganaderos. La técnica Gold standard para el diagnóstico serológico del virus es la inhibición de la hemoaglutinación sin embargo es un método laborioso y subjetivo por lo que resultó necesario contar con nuevas técnicas rápidas y sencillas de diagnóstico. Es por ello que nuestro grupo desarrolló y validó un ELISA de tipo indirecto para detección de anticuerpos bovinos y de cobayo. Con el fin de validar este ELISA en un formato kit comercial, se avanzó a la siguiente etapa: determinar la estabilidad del antígeno de las placas sensibilizadas y secas. Para ello se probaron tres tipos de placas (Inmulon 1B, Polysorp y Maxisorp) utilizando el método de estabilidad acelerada que consiste en sensibilizar las placas con buffers de saturación y post-saturación para estabilizar el antígeno y almacenarlas a 37°C por 3 días (equivalente a estabilidad por 3-6 meses a 4°C) y 7 (equivalente a estabilidad por 1 año a 4°C) días. El revelado fue con sueros (bovinos y cobayos) control positivo y negativo en diferentes diluciones. Para los ELISA PIV3 revelados con sueros de ambas especies y ensayado en placas Inmulon 1B resultaron estables por 1 año ya que el título de los sueros positivos fue idéntico a aquellas placas reveladas de manera inmediata sin almacenamiento. Los sueros ensayados en placas Polysorp mostraron títulos menores comparado al revelado en el momento tanto en las incubadas por 3 y 7 días. Respecto de la placa Maxisorp, los sueros ensayados mostraron títulos menores en las incubadas por 3 días y en las placas de 7 días no hubo detección. En conclusión, las placas Inmulon 1B sensibilizadas y estabilizadas para ELISA PIV3, dan resultado conforme y en coincidencia con la placa reveladas en el acto indicando que este protocolo permite la estabilidad por 1 año a 4°C.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>QuímicaViva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	--

## **Modelo experimental de encefalitis causada por virus Río Negro, Alphavirus de circulación regional**


**Albrieu-Llinás, G(1); Rivarola, ME(1); De Olmos, S(2); Gruppi, A(3); Contigiani, MS(1)**

*(1) Laboratorio de Arbovirus, Instituto de Virología "Dr. JM Vanella", Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba; (2) Servicio de Neuroanatomía e Histología Experimental, Instituto de investigación médica Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC-CONICET), Córdoba; (3) Centro de Investigación en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET), Córdoba.*

Contacto: [guillermoalbrieu@gmail.com](mailto:guillermoalbrieu@gmail.com)

El virus Río Negro (RNV, género Alphavirus) es una especie enzoótica del complejo antigénico Encefalitis Equina Venezolana (VEEV, subtipo VI). Teniendo en cuenta su comportamiento atenuado y diversos bio-marcadores, este y otros subtipos enzoóticos fueron reclasificados como especies diferentes. Si bien no ha causado brotes epidémicos, se ha demostrado por serología y detección

molecular su circulación en mosquitos, equinos y humanos en Argentina y Paraguay. En nuestro laboratorio contamos con una cepa local de RNV aislada de roedores silvestres, capturados durante un brote de enfermedad febril en la provincia de Formosa (1991) y nuestro objetivo es caracterizar la enfermedad causada por esta cepa en ratones albinos suizos Rw1. Observamos que ratones adultos produjeron anticuerpos neutralizantes detectables a los 15 días post-infección (pi) y no desarrollaron signos de enfermedad ni viremias detectables por cuantificación de unidades formadoras de placa (ufp) en monocapa de células Vero. Sin embargo en ratones lactantes de diferentes edades (10-21 días) infectados con RNV registraron signos de morbilidad y mortalidad en curso temporal. Observamos altas tasas de mortalidad en animales de hasta 18 días de edad (100% en ese experimento). En estos animales infectados la titulación de virus en sangre demostró viremias relativamente bajas y efímeras, comenzando a las 24 horas pi, con un pico de 102 ufp/ml a las 30 horas pi, y volviéndose indetectables a las 48 horas pi. Se evaluó el órgano-tropismo mediante la titulación diaria de carga viral durante 10 días en muestras de diferentes tejidos de interés, observándose títulos altos en: cerebro, timo, páncreas, bazo, pulmón y ganglios linfáticos inguinales (determinaciones realizadas por triplicado). El título máximo en cerebro fue registrado al día 4 pi (media: 7.43 log ufp/g), aunque los síntomas neurológicos se hicieron visibles a partir del día 7 u 8 pi. Un análisis histopatológico de los tejidos mencionados teñidos con hematoxilina-eosina permitió identificar focos inflamatorios y meningitis en cerebro, e infiltrado inflamatorio y neumonitis en pulmones. Se observó una marcada pérdida de la arquitectura folicular en bazos y ganglios linfáticos. Además, se evaluó la neurodegeneración mediante tinción amino-cupro-argéntica de cortes de cerebros de ratones infectados, a los 2 y 8 dpi, observándose extensas áreas dañadas a los 8 dpi, sobre todo en corteza motora y cuerpo estriado, con focos densos alrededor de vasos sanguíneos. Estos resultados forman parte de la primera caracterización in vivo del RNV que muestra, no sólo evidencias sobre la capacidad patogénica en individuos cuyo sistema inmune podría no estar completamente desarrollado (ratones lactantes wild type), sino que también ofrece un nuevo modelo experimental para el estudio de la progresión de una infección con virus neurotrópico.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>QuímicaViva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	--

## **Rol de los diferentes fenotipos de macrófagos bovinos en la infectividad del virus de la diarrea viral bovina**


**Barone, LJ(1, 2); Cardoso, NP(1, 2); Capozzo, AV(1, 2)**

*(1)Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) - Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas (IVIT); (2)Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).*

Contacto: [barone.lucas@inta.gob.ar](mailto:barone.lucas@inta.gob.ar)

La infección por el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) se asocia con inmunosupresión, promovida por diversos mecanismos que afectan a las células del sistema inmune. El VDVB es un virus

monocitrópico, capaz de infectar monocitos y macrófagos. Los macrófagos pueden polarizarse hacia a un fenotipo proinflamatorio “M1” o alternativamente, a un perfil antiinflamatorio o reparador, “M2”; dependiendo del microambiente de citoquinas, la edad o el estado inmunológico del animal, entre otros factores. El rol de los diferentes perfiles de macrófagos en la infección por el VDVB no ha sido estudiado. En este trabajo analizamos la capacidad del VDVB de infectar los distintos fenotipos de los macrófagos bovinos diferenciados de monocitos sanguíneos CD14+. El VDVB presenta dos genotipos principales 1 y 2, y dos biotipos, citopático (cp) y no citopático (ncp) según su comportamiento en cultivos epiteliales, siendo las cepas ncp las que circulan en el campo. Observamos que cepas cp de ambos genotipos infectan y matan a los macrófagos, mientras que los virus ncp infectan activamente a los macrófagos sin alterar su viabilidad. El análisis de la cinética de replicación de una cepa de campo de tipo 2-ncp muestra un aumento máximo en la traducción del ARN viral a las 24 hpi, con un tropismo preferencial por las células M2. La infección de células con perfil M1 induce un aumento en los niveles de IL-10 secretados por estas células, promoviendo un ambiente antiinflamatorio. Con el fin de evaluar el papel de los perfiles de macrófagos en condiciones naturales, preparamos macrófagos a partir de monocitos CD14+ de terneras de 2 meses de edad, y de hembras adultas preñadas y no preñadas, que fueron infectadas con la cepa ncp. El perfil de los macrófagos fue caracterizado midiendo la producción de óxido nítrico y la actividad de arginasa, asociadas a los perfiles M1 y M2, respectivamente. Los macrófagos de las terneras y de las hembras gestantes redujeron significativamente la producción de óxido nítrico después de la infección, aumentando la síntesis de arginasa, indicando que la infección favoreció un estado antiinflamatorio M2, de mayor susceptibilidad al virus. Este trabajo muestra que el fenotipo de los MØ se relaciona con la capacidad replicativa del virus en estas células. El VDVB replica activamente en el fenotipo favorable existente (M2) y a su vez sería capaz de modular activamente el fenotipo desfavorable, por lo que el estado inmunológico innato del hospedador guardaría relación con la susceptibilidad a la infección.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>QuímicaViva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	--

## **Papel de la prostaglandina E2 en la persistencia de la inflamación durante la infección crónica por VIH**


**Di Diego García, F(1); Cabrerizo, G(1); Bello, N(2); Perez, PS(1); Paletta, A(1); Geffner, J(1); Fridman, V(2); Stecher, D(2); Ceballos, A(1); Remes Lenicov, F(1)**

*(1) Instituto de investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS), Universidad de Buenos Aires / CONICET; (2) División Infectología, Hospital de Clínicas “José de San Martín”, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

Contacto: [facundo.unq@gmail.com](mailto:facundo.unq@gmail.com)



La infección crónica con VIH, aún bajo tratamiento antirretroviral exitoso, está asociada a una activación inmunológica persistente que contribuye a la aparición de comorbilidades no infecciosas como la enfermedad cardiovascular, diabetes y deterioro cognitivo. Por otro lado, diversas patologías caracterizadas por activación inmunológica persistente cursan con niveles plasmáticos elevados de prostaglandina E2 (PGE2), un mediador al que se le reconocen tanto acciones inflamatorias como anti-inflamatorias. El objetivo de este proyecto es evaluar el papel de la PGE2 como mediador inflamatorio en pacientes crónicamente infectados por VIH. Para ello, reclutamos una cohorte de pacientes con infección crónica por VIH con carga viral indetectable por más de un año (VIH+, mediana edad 37 años, n=37) y un grupo control de donantes no infectados (NI, mediana edad 40 años, n=29). Se expresan los valores p tras comparación intergrupos por Mann-Whitney U. En primer lugar comprobamos la mayor activación inmunológica en el grupo VIH+ con respecto al grupo NI, mediante la determinación de IFN-gama y de TNF-alfa en plasma (ambos  $p < 0,01$ ), así como mayor activación monocitaria determinada por una proporción mayor de monocitos no clásicos CD14+CD16+. Asimismo, demostramos niveles plasmáticos de PGE2 en el grupo VIH+ en comparación con los NI ( $p < 0,01$ ). A continuación, estudiamos por PCR cuantitativa la expresión de genes relacionados a la PGE2 en monocitos aislado de sangre periférica. Encontramos expresión más elevada de ciclooxigenasa-2 (COX2,  $p < 0,01$ ) y PGE2-sintasa-1 de membrana (mPGE-s1,  $p < 0,01$ ), en el grupo VIH+. Por el contrario, en el grupo VIH+ la expresión del gen PTGER2 (receptor de PGE2 EP2,  $p < 0,05$ ) se encuentra disminuida. Dada la disminución de expresión del receptor EP2, decidimos estudiar si los monocitos de pacientes VIH+ responden adecuadamente a un estímulo de PGE2. Para ello, obtuvimos monocitos de muestras pareadas de donantes infectados y no infectados (por edad, sexo y hábitos de tabaquismo) y construimos curvas de dosis-respuesta en las que dosis refiere a un tratamiento con diluciones seriadas de PGE2 y respuesta es la inhibición de la producción de TNF-alfa inducida por LPS. Comparamos 7 pares de muestras evaluando la inhibición de la producción de TNF-alfa mediante citometría de flujo (n=3) o mediante ELISA en sobrenadantes de cultivo (n=4). En 6 de las 7 parejas de donantes las curvas dosis-respuesta de los pacientes VIH+ se ubicaron a la derecha (aumento de IC50) de las curvas de los donantes no infectados, indicando una desensibilización frente a la acción inhibitoria de la PGE2. Nuestros resultados comprueban que los pacientes con infección crónica por VIH+ poseen niveles plasmáticos elevados de PGE2 y que sus monocitos son menos sensibles a la acción inhibitoria de la PGE2. La desensibilización de los monocitos a la acción inhibitoria de la PGE2 podría contribuir a la persistencia de la activación inmune asociada a la infección por VIH.

 ISSN 1666-7948 <a href="http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar">www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</a>	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---

## **El microambiente hepático como reflejo de los diferentes estadios de enfermedad durante la Hepatitis B crónica**

**Giadans, CG(1); Ríos, DA(1); Ameigeiras, B(2, 6); Alonso, I(2); Pietrantonio, A(3); Haddad, L(4); Mullen, E(5); Heinrich, F(6); De Matteo, EN(1); Flichman, D(7); Valva, P(1); Preciado, MV(1).**

(1) Instituto Multidisciplinario de Investigaciones en Patologías Pediátricas (IMIPP-CONICET-GCBA), División Patología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Bs As, Argentina; (2) Sección Hepatología, Hospital J M Ramos Mejía, Bs As, Argentina; (3) División Patología, Hospital J M Ramos Mejía, Bs As, Argentina; (4) Servicio de Hepatología, Hospital Italiano de Buenos Aires, Bs As, Argentina; (5) División Patología, Hospital Italiano de Buenos Aires; Bs As, Argentina; (6) Hospital San Antonio, Gualeguay, Argentina; (7) Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS-UBA-CONICET), BsAs, Argentina.

Contacto: [ceci\\_giadans@hotmail.com](mailto:ceci_giadans@hotmail.com)

La patogenia de la infección crónica por el HBV (CHB) es un proceso inmunomediado, pero el rol que tienen las poblaciones linfocitarias y el virus en el daño hepático ha sido poco estudiado. Nuestro objetivo fue evaluar el impacto de la interacción entre los componentes inmune y viral en el contexto de la CHB. Se estudiaron 33 biopsias hepáticas fijadas en formol e incluidas en parafina y 6 muestras de sangre periférica (SP) concomitantes de pacientes adultos con CHB, libres de tratamiento (39,4% y 50% HBeAg+, respectivamente). En biopsias se determinó por inmunohistoquímica: 1) frecuencia de poblaciones linfocitarias en el infiltrado [LTh (CD4+), LTc (CD8+), LTreg (FoxP3+), LTh17 (IL-17A+) y LTh1 (Tbet+)] tanto portal/periportal (P/P) como lobulillar, 2) expresión de PD-1 en las células del infiltrado y 3) expresión de antígenos de superficie (HBsAg) y core (HBcAg). En SP se evaluó por citometría de flujo el % de LT CD3+, CD4+, CD8+, CD56+ y LT CD4+/CD25hi/FoxP3+ en pacientes y dadores no infectados. El daño hepático se determinó mediante la actividad histológica y el estadio de fibrosis. Se observó un predominio de los LTh a expensas de LTreg en el área P/P, y de LTc seguido de LTreg en el infiltrado lobulillar. La mayor severidad de la hepatitis se asoció a mayor frecuencia de LTh P/P ( $p=0,0015$ ) y LTc lobulillares ( $p=0,0022$ ). Por otro lado, la fibrosis significativa se asoció a un aumento en la relación Th17/Treg ( $p=0,039$ ). El HBsAg se detectó en el 68% de las biopsias y el HBcAg en un 35% evidenciándose en el 97% de los casos un patrón mutuamente excluyente. Los pacientes HBcAg+ hepático fueron HBeAg+ a nivel serológico y presentaron mayor severidad de hepatitis ( $p=0,006$ ) con mayores frecuencias de LTreg P/P y lobulillares ( $p=0,02$ , ambos). Solo el 33% de los casos fue PD-1+, con localización P/P y en menos del 10% del infiltrado. El 90% de dichos casos fue HBeAg+, sin asociación a la expresión de los antígenos virales ni a los parámetros de daño evaluados. Finalmente, las frecuencias de las poblaciones linfocitarias en SP resultaron ser similares en pacientes y dadores. En CHB el equilibrio dinámico entre la respuesta inmune y la actividad viral definen el curso de la enfermedad. Se observaron diferentes estadios, en donde la presencia del HBcAg estaría vinculada a un proceso de replicación viral activa asociada al status HBeAg+ y a una mayor severidad de daño. En el mismo se favorecería un microambiente hepático regulador, con aumento de LTreg tendientes tanto a limitar el daño como a mantener la cronicidad de la infección. Resaltan el rol de los LTc lobulillares y del balance Th17/Treg en el proceso de injuria hepática. Por otro lado, la baja expresión de PD-1 sugeriría una función efectora activa en infiltrado. Finalmente se destaca que la CHB sería un proceso crónico con manifestaciones localizadas y escaso reflejo a nivel periférico.

 **Química Viva**

ISSN 1666-7948

[www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)

Revista **Química Viva**

Número 1, año 19, Abril 2020

[quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)

## Modulación de la vía de NFκB por el dominio Metiltransferasa de la proteína NS5 del virus de dengue

**Gonzalez Lopez Ledesma, MM(1); Costa Navarro, GS(1); Pallarés, HM(1); Iglesias, NG(1); De Maio, FA(1); Rajsbaum, R(2); Gamarnik, AV(1).**

(1) *Laboratorio de Virología Molecular. Fundación Instituto Leloir-CONICET, Buenos Aires, Argentina;* (2) *Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Medical Branch, Galveston, USA.*

Contacto: [mgonzalezlopez@leloir.org.ar](mailto:mgonzalezlopez@leloir.org.ar)

El virus de dengue (DENV) es uno de los patógenos humanos más relevantes transmitidos por insectos; es responsable de 390 millones de infecciones anuales a nivel mundial. Es un virus de ARN de simple cadena positiva, perteneciente al género . La proteína NS5 de los flavivirus juega múltiples funciones durante la infección viral: es responsable de la síntesis del ARN viral y de contrarrestar la respuesta celular antiviral. Con el fin de investigar la interacción de NS5 con componentes celulares, se realizaron estudios de proteómica utilizando al DENV marcado con un tag en el extremo carboxi terminal de NS5. Se identificaron 53 proteínas celulares que se unen o forman complejos con NS5. Entre ellas se detectaron proteínas con actividad antiviral, como STAT2, un factor que participa en la vía de señalización de interferón, y que es degradado durante la infección viral al unirse a NS5 (Ashour et al. J Virol 2009). Asimismo se encontró una proteína, ERC1, que al ser silenciada incrementa la replicación viral. Para esclarecer el mecanismo de acción de ERC1 se evaluaron sus niveles en la infección viral, los cuales se vieron significativamente reducidos por western blot y citometría de flujo. Se logró determinar que ERC1 es degradada vía proteasoma y que dicha degradación es mediada por UBR4, una E3 ligasa identificada en el proteoma de NS5. Para validar el rol de NS5 en este proceso, se transfectaron células con plásmidos de expresión y se demostró que NS5 es suficiente para la degradación de ERC1. NS5 tiene dos dominios definidos, Polimerasa y Metiltransferasa, los cuales fueron expresados por separado. Ello nos permitió demostrar que la Metiltransferasa es el responsable de inducir la degradación de ERC1. ERC1 es una proteína de andamiaje, con múltiples funciones dentro de la célula, entre las que se destaca su rol en la activación de la vía de NFκB (Wu ZH et al. Mol Cell 2010). Frente a distintos estímulos, NFκB induce la expresión de citoquinas proinflamatorias, las cuales juegan un papel fundamental en los casos de dengue grave. Por ende, mediante ensayos de sobreexpresión y silenciamiento de ERC1, se corroboró su rol en la activación de NFκB. Dicha activación es también necesaria para la inducción de interferón. Acorde con ello, se observó que durante la infección viral, los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias e interferón eran menores en aquellas células silenciadas para ERC1 respecto a las no silenciadas. Por ende, al inducir menos citoquinas e interferón, la ausencia de ERC1 generaría un ambiente más favorable para la replicación viral. Este estudio revela el mecanismo por el cual ERC1 es degradada durante la infección viral, así como su función antiviral. Dado que ERC1 tiene múltiples funciones en la célula, su degradación abre un abanico de posibilidades respecto a las consecuencias que podría traer su ausencia en las células infectadas, tanto como .

 **Química Viva**

ISSN 1666-7948

[www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)

Revista **Química Viva**

Número 1, año 19, Abril 2020

[quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)


## **Alteración de la expresión de proteínas de polaridad como potenciales MECANISMOS PATOGENICOS DEL VIRUS ZIKA.**

**Leiva, S(1); Dizanzo, MP(1); Fabbri, C(2); Luppo, MV(2); Bugnon Valdano, M(1); Morales, MA(2); Cavatorta, AL(1); Levis, S(2); Gardiol, D(1).**

*(1) Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario - Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéutica, Universidad Nacional de Rosario, UNR-CONICET; (2) Instituto Nacional de Enfermedades Viroológicas Humanas, "Dr. Julio Maeztegui" (INEVH), ANLIS, Pergamino.*

Contacto: [leiva@ibr-conicet.gov.ar](mailto:leiva@ibr-conicet.gov.ar)

El virus Zika (ZikV) pertenece al género de los Flavivirus; in embargo, durante los últimos brotes en América se identificaron características únicas de este virus dentro de su género. Entre ellas, su capacidad de transmitirse por otras vías, además de la vía vectorial. Además, se estableció una asociación entre su infección y patologías graves como malformaciones congénitas, principalmente microcefalia, y trastornos neurológicos como el síndrome de Guillan-Barré. Esto evidencia la capacidad del virus de diseminarse a lo largo del organismo e infectar diversos tejidos. Para esto, ZikV debe atravesar múltiples barreras biológicas como son las barreras hemato-encefálica y la placenta. Sin embargo, hasta el momento, los mecanismos biológicos por los cuales el virus lo logra, no han sido totalmente dilucidados. En el presente trabajo, nos propusimos estudiar si ZikV es capaz de alterar la polaridad y las uniones intercelulares de células epiteliales, que son claves para el mantenimiento de la integridad de las barreras biológicas. Con este objetivo, establecimos una colaboración con el INEVH, y trabajamos con dos aislamientos de ZikV, uno autóctono y otro importado. Con ambos, se realizaron infecciones in vitro, evaluando distintas multiplicidad de infección (MOI) y diferentes tiempos de incubación post infección para los análisis posteriores. La capacidad de replicación de ambos aislamientos se determinó por RT-q-PCR para cuantificar el genoma viral. Ambas cepas mostraron una capacidad replicativa semejante para las mismas condiciones y de manera independiente al MOI utilizado. El tiempo adecuado para nuestros análisis resultó ser 48 post infección donde se observó una eficiente replicación viral sin la destrucción completa de la morfología celular. Además, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia (IF) sobre las células infectadas, utilizando anticuerpos específicos contra una de las proteínas virales con el fin de detectar a las células infectadas, en conjunto con anticuerpos contra la proteína celular Disc large 1 (DLG1), una de las proteínas claves para el mantenimiento de la polaridad celular y las uniones intercelulares. Para comprobar si la infección provocaba cambios en los niveles o localización de dicha proteína celular, se analizaron cuantitativamente las imágenes obtenidas a partir de microscopia de fluorescencia. Observamos cambios en la expresión de DLG1 lo que sugiere alteraciones en los niveles de proteínas relevantes para la polaridad celular. Esto sería un fuerte indicio de que el virus sería capaz de utilizar este mecanismo de patogénesis para facilitar su diseminación a través de barreras biológicas. Actualmente estamos abocados a identificar las posibles proteínas virales que podrían estar involucradas en el fenómeno observado.

 ISSN 1666-7948 <a href="http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar">www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</a>	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---


## **Estudio funcional del 3' UTR del virus Chikungunya en el ciclo de replicación viral en mosquitos**

**Merwaiss, F(1, 2); Filomatori, CV(1); Bardossy, ES(1); Saleh, MC(2); Alvarez DE(1)**

*(1) Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, UNSAM; (2) Viruses and RNA Interference, Institut Pasteur*

Contacto: [fmerwaiss@iibintech.com.ar](mailto:fmerwaiss@iibintech.com.ar)

Chikungunya es un arbovirus perteneciente al género Alphavirus de la familia Togaviridae que luego de 60 años de circulación exclusiva en Asia y África se ha expandido a Europa y las Américas. Notablemente, esta expansión ha sido asociada tanto a cambios puntuales en la secuencia de proteínas estructurales así como a variaciones drásticas en el 3' UTR, el cual contiene repeticiones de secuencia conservadas que varían en el número de copias entre los diferentes linajes. Nuestro grupo y otros han mostrado previamente que versiones de chikungunya recombinantes portando deleciones en el 3' UTR presentan una cinética de replicación disminuida en células de mosquito, mientras su replicación en células de mamífero no se ve afectada. Con el objetivo de analizar la importancia de estas repeticiones de secuencia específicamente en el ciclo replicativo en mosquitos y en su posterior transmisión y expansión de la infección, realizamos infecciones de colonias de mosquitos tanto con virus como con deleciones en el 3' UTR. En primer lugar hicimos ensayos de competencia para evaluar el fitness de ambas variantes, obteniendo como resultado que los virus portando un 3' UTR intacto desplazan a los virus con deleciones en dicha región. A continuación estudiamos el Extrinsic Incubation Period (EIP), es decir el tiempo transcurrido entre la ingesta de sangre con virus y la capacidad de transmitir dicho virus, mediante la detección y titulación de UFP en midgut, cabeza y saliva de mosquitos infectados como una forma de medir la capacidad infectiva, la eficiencia de diseminación y la eficiencia de transmisión respectivamente, para cada una de las variantes virales. Nuestros resultados indican que el virus con un 3' UTR intacto tienen un EIP más corto y que en particular esta ventaja se debe a una mayor capacidad para salir del midgut durante el inicio del ciclo infeccioso. En base a estos resultados creemos que un estudio sistemático del 3' UTR viral podría proveer información relevante que correlacione la capacidad replicativa del virus con aspectos aun no conocidos de su patogénesis y evolución.

 <p>ISSN 1666-7948</p> <p>www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</p>	<p>Revista <b>QuímicaViva</b></p> <p>Número 1, año 19, Abril 2020</p> <p><a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a></p>
---	---

## **Rol de viperina durante la infección con el arnavirus Junín ¿Una historia de amistad o enemistad?**

**Morell ML(1, 3); Nilsson, E(2); Överbj, AK(2); Cordo, SM(3); García, CC(1)**


*(1) Laboratorio de Estrategias Antivirales, IQUIBICEN-CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina. (2) Department of Clinical Microbiology, Virology, Laboratory for Molecular Infection Medicine Sweden (MIMS), Umeå University, Umeå, Sweden. (3) Laboratorio de Procesos moleculares de la interacción virus- célula, IQUIBICEN-CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.*

Contacto: [laurimorell@gmail.com](mailto:laurimorell@gmail.com)

El virus Junín (JUNV) causa la Fiebre Hemorrágica Argentina y pertenece a la familia . Su genoma se compone de 2 moléculas de ARN simple cadena y ambisentido denominadas L y S las cuales codifican para 4 proteínas, todas ellas estructurales. El segmento L codifica para L, la ARN polimerasa ARN dependiente y Z, la proteína de matriz. S codifica para GPC, complejo glicoproteico y N, nucleoproteína. Viperina es una proteína celular asociada a retículo endoplasmático, con actividad antiviral frente a diversos virus. Hemos demostrado en trabajos anteriores que ejerce un efecto antiviral sobre JUNV, sin embargo, el mecanismo antiviral permanece desconocido. Se sabe además que viperina interactúa con GBF-1, proteína celular que actúa como factor proviral de los virus ARN aunque se desconoce su función durante la infección con JUNV. Con el objetivo de dilucidar el mecanismo antiviral de viperina se estudió la interacción entre dicha proteína y la glicoproteína viral GPC, a través de un ensayo de Co-InmunoPrecipitación (CoIP). Al demostrar la existencia de interacción entre ambas proteínas, se procedió a mapear la región de interacción empleando diferentes mutantes de viperina deletéreas para las regiones N terminal, dominio Radical SAM y C terminal, a través de ensayos de CoIP. Todas las versiones mutantes de viperina, demostraron interactuar con GPC de JUNV excepto por VipTN50 de localización nuclear. Se demostró también, que la estabilidad de GPC no es afectada por la sobreexpresión de concentraciones crecientes de viperina ya que no altera sus niveles de expresión. Por otro lado, se observó que la sobreexpresión de viperina alteró el nivel de GPC contenida en las Virus Like Particles (VLPs) cosechadas. El rol de GBF-1 se investigó infectando células HEK293T con JUNV (MOI 0.1) y tratándolas con Golgicida A, inhibidor reversible de GBF-1. A través del método de placas se observó un 50% de disminución en la liberación de viriones infectivos. A su vez, células sobreexpresando viperina, GBF-1 o ambas proteínas fueron infectadas con JUNV (MOI 0.1), observándose a las 48 horas post infección una disminución en la expresión del ARNm viral (qPCR) como de viriones infectivos (método de placas) al sobreexpresarse viperina mientras que se observó un aumento de ambas variables al sobreexpresar GBF-1. Al sobreexpresar GBF1 y viperina se



observó un rescate moderado de viperina sobre la actividad antiviral contra JUNV. Finalmente, demostramos la interacción entre GBF-1 y GPC a través de ColP. Dado que viperina no ejerce un efecto antiviral directo sobre GPC, el efecto podría ser indirecto a través del secuestro de GBF-1 para evitar su interacción con GPC y evitar la producción de viriones infecciosos como ha sido reportado para TBEV. Se estudiará si la sobreexpresión de GBF-1 y la coexpresión de GBF-1 y viperina afectan de alguna manera la liberación de GPC como VLP y se realizarán estudios de localización subcelular.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>QuímicaViva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	--

## Los exosomas de semen inhiben la infección del virus del Zika en células dendríticas


**Paletta, AL; Varese, A; Castillo, L; Di Diego García, F; Cabrerizo, G; Geffner, J; Remes Lenicov, F; Ceballos, A**

*Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA, UBA-CONICET*

Contacto: [anapaletta@hotmail.com](mailto:anapaletta@hotmail.com)

En los últimos años se han reportado diversos eventos de transmisión sexual del virus Zika (ZIKV), cambiando el paradigma de la interacción arbovirus-huésped. Además, se ha observado que ZIKV infeccioso puede ser detectado en el semen hasta seis meses después del inicio de los síntomas. Por otra parte, el plasma seminal (PS) contiene billones de exosomas, pequeñas vesículas extracelulares que median la señalización intercelular. Sabiendo que el semen no es simplemente un portador de enfermedades de transmisión sexual, nuestro objetivo fue evaluar el papel de los exosomas de semen (SE) en la infección por ZIKV de las células dendríticas (CDs). Las muestras de plasma seminal fueron obtenidas de donadores sanos y los exosomas fueron purificados por medio de una cromatografía de exclusión por tamaño. Los preparados de vesículas fueron analizados por western blot y microscopía electrónica. Las CDs se obtuvieron a partir de monocitos de sangre periférica (mediante un gradiente de densidad) diferenciados con GM-CSF e IL-4 (30ng/ml) durante 5 días. La infección de ZIKV se cuantificó por qPCR, UFP/ml, citometría de flujo y microscopía de epifluorescencia. El fenotipo de las CDs se analizó por citometría de flujo. Se evaluó la proteómica de los preparados de exosomas. Inicialmente infectamos CDs ( $2 \times 10^5$ ) con ZIKV ( $2 \times 10^5$  ufp) en presencia o ausencia de PS o PS depletado de SE (1/100 a 1/100000 dil) o SE (200ug/ml) durante 48 hs. Observamos que la presencia de PS inhibió la infección, mientras que PS-SE no lo hizo ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ). Los SE también fueron capaces de inhibir la infección por ZIKV ( $p < 0.01$ ,  $n = 8$ ). Sin embargo, los exosomas purificados de plasma sanguíneo no inhibieron la infección ( $n = 3$ ). La proteómica de los SE arrojó la presencia de proteínas ya descritas en otras publicaciones, indicando la pureza de nuestros stocks de SE. Con el objeto de evaluar si los SE comprometían la unión del virus a la célula, se trataron CDs ( $1 \times 10^6$ ) con SE (200 ug/ml) 60 min, luego se incubaron con ZIKV ( $5 \times 10^5$  ufp) 2 hs y

se lavaron tres veces para eliminar el virus libre. Observamos que la unión de ZIKV a CDs (n = 9) no estaba alterada. En el mismo ensayo estudiamos si los SE inducían IFN-I, encontramos que la presencia de SE inducía un aumento en la expresión de ARNm de IFN- $\beta$  (p <0.05, n = 6). Adicionalmente, se observó un aumento en la expresión de moléculas efectoras de la respuesta de IFN-I (OAS, MX1, IRF7) 6hs post infección en CDs tratadas con SE (p <0.05-n = 6), lo que sugiere que IFN- $\beta$  está involucrado en la inhibición de la infección por ZIKV en DC. Ensayos preliminares con un anticuerpo bloqueante del receptor de IFN-I (IFNAR/2) soportan estos resultados (n=2). Por último, analizamos el fenotipo de las CDs infectadas en presencia de SE. Las CDs expuestas a SE mostraron un aumento en la expresión de CD86 y CD83 (p <0.05-n = 4). Nuestras observaciones sugieren que SE inhiben la infección por ZIKV en CDsC induciendo un aumento de la expresión de IFN-B.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>QuímicaViva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	--

## Estudio de la dinámica de las proteínas de cápside de DENV y ZIKV en células vivas durante la infección


**Costa Navarro, GS(1); Gabriel, M(2); Pallarés, HM(1); De Borba, L(1); Byk, LA(1); Rossi, AH(1); Gonzalez, LL MM(1); Estrada, LC(2); Gamarnik, AV(1)**

(1) *Fundación Instituto Leloir-CONICET*; (2) *Departamento de Física, FCEyN, Universidad de Buenos Aires and IFIBA-CONICET*.

Contacto: [gcosta@gmail.com](mailto:gcosta@gmail.com)

Los virus de dengue (DENV) y Zika (ZIKV) son importantes patógenos que pertenecen al género flavivirus. Estos virus contienen un genoma de ARN simple cadena de polaridad positiva que codifica para una poliproteína que se procesa en proteínas estructurales y no estructurales. La proteína de cápside es una proteína estructural pequeña y altamente básica que forma homodímeros y se asocia con el genoma viral formando las nucleocápsides. La proteína de cápside libera el ARN viral durante el desnudamiento y recluta el genoma en la morfogénesis. Aunque se ha demostrado que la proteína de cápside se une a numerosas proteínas del huésped y se acumula en diferentes compartimentos subcelulares, no se conocen los mecanismos de encapsidación y desnudamiento. Para estudiar la dinámica intracelular de las proteínas de cápside de DENV y ZIKV en células vivas infectadas, generamos virus genéticamente modificados marcados con mCherry o GFP que combinamos con herramientas de análisis de correlación de imágenes, como espectroscopía de correlación de imágenes (RICS) y correlación espacial de pares en dos dimensiones (2D-pCF). Aplicamos RICS para determinar las constantes de difusión de las proteínas y su concentración en diferentes compartimentos subcelulares, incluyendo citoplasma/membranas del retículo endoplásmico, núcleo y nucléolo. Además, utilizando 2D-pCF, generamos mapas que describen las rutas preferenciales de difusión de cápside dentro de la célula. Los resultados obtenidos revelaron un comportamiento

sorprendentemente diferencial para las proteínas de cápside de DENV y ZIKV. La proteína de cápside de DENV posee una circulación altamente organizada en las interfaces citoplasma/núcleo y núcleo/nucléolo muy diferente a la observada para cápside de ZIKV. Aunque se observó que ambas proteínas se acumulan en las membranas del retículo endoplásmico, lipid droplets (LDs) y nucléolo, en el caso de la infección por DENV, cápside se acumula primero en el nucléolo, mientras que en el caso de ZIKV se detecta primero en los LDs y alrededor de la membrana nuclear, y luego en etapas tardías de la infección se observa dentro del núcleo, en el nucléolo. Estos estudios brindan información novedosa y cuantitativa sobre la concentración, localización y difusión de las proteínas de cápside de DENV y ZIKV en células vivas infectadas, revelando propiedades únicas para cada una de ellas.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---

## La modulación de la autofagia condiciona al virus Linfotrópico Humano Tipo 1 (HTLV-1).


**Ducasa, N(1); Benencio, P(1); Grasso, D(2); Biglione, MM(1); García, MN(2); Berini, CA(1)**

(1) CONICET-Universidad de Buenos Aires. Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y Sida (INBIRS). Buenos Aires, Argentina. (2) CONICET-Universidad de Buenos Aires. Instituto de estudios de la inmunidad humoral Prof. Ricardo a. Margni (IDEHU), FFyB-UBA. Buenos Aires, Argentina.

Contacto: [nicolasducasa@gmail.com](mailto:nicolasducasa@gmail.com)

**Introducción** La autofagia es un mecanismo catabólico, conservado en eucariotas y esencial para la homeostasis celular. Varios autores reportan como los virus manipulan el flujo autofágico para facilitar la progresión de la infección viral. **Objetivo** El objetivo de este estudio fue describir si la distribución de la proteína viral Tax es condicionada por el estado autofágico en células infectadas por HTLV-1. Específicamente, se evaluó la distribución celular de la proteína viral Tax en relación a la inducción o inhibición del flujo autofágico. **Metodología** Se infectó la línea celular HeLa con HTLV-1 por la técnica de co-cultivo con la línea celular MT2, persistentemente infectada. Se determinó la efectiva infección por Western Blot y citometría de flujo. Por medio de inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal se analizó la proteína viral Tax y el marcador de autofagia LC3 en las células HeLa infectadas. Luego, se realizaron tratamientos de inducción fisiológica de la autofagia con ayuno e inhibición del flujo autofágico en estadios iniciales con spautina-1 y tardíos con cloroquina, para determinar cómo se condiciona la distribución viral. Adicionalmente, se evaluó el comportamiento de Tax y LC3 en líneas linfoides como MT2 y en la línea celular Jurkat infectada por el virus. **Resultados** Se observó como la modulación de la vía autofágica por diferentes tratamientos provoca cambios significativos en el comportamiento de Tax. La inducción por ayuno de la autofagia provocó un incremento significativo del tamaño promedio de los dominios positivos de Tax en citoplasma. El

tratamiento con los dos inhibidores de la vía autofágica, spautina-1 y cloroquina, indujo un aumento significativo en el número de dominios fluorescentes de Tax. Esto confirma que el comportamiento de Tax es condicionado por el estado de autofagia. Además, se observó cómo Tax se ubica en muchos casos asociado a membrana plasmática y en estructuras esféricas, las cuáles se observaron al hacer una reconstrucción 3D a partir de planos Z por microscopía confocal. Conclusiones Existe una clara relación entre el estado de la autofagia y la distribución de la proteína Tax de HTLV-1. Los resultados sugieren un entrecruzamiento entre la vía autofágica y la proteína Tax en la infección por HTLV-1.

 <p>ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</p>	<p>Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a></p>
--	--

## Internalización y tráfico endocítico de miembros del complejo de Encefalitis Equina Venezolana


**Ghietto, LM(1); Gil, PI(1); Neira, M(1); Kunda, P(1); Contigiani, M(1); Paglini, MG(1, 2).**

(1) Instituto de Virología "J.M.Vanella". Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba; (2) Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra – INIMEC-CONICET-UNC.

Contacto: [lghietto@fcm.unc.edu.ar](mailto:lghietto@fcm.unc.edu.ar)

Introducción: Durante las últimas décadas se ha registrado un resurgimiento a nivel mundial de los Arbovirus, particularmente aquellos transmitidos por mosquitos. Desde fines del Siglo XX, en nuestro país se conoce la circulación de subtipos enzoóticos de complejo de Encefalitis Equina Venezolana (VEE), familia Togaviridae, género Alphavirus. Poco se conoce hasta el momento sobre los mecanismos de entrada y transporte citoplasmático de estos virus, sin embargo ha sido descrito que algunos Alphavirus utilizan el tráfico intracelular endocítico para desnudarse y continuar con su ciclo replicativo, es por ello que se seleccionaron los virus Pixuna (PIXV) y Rio Negro (RN) para este estudio. Objetivo: Obtener evidencias sobre la participación de la maquinaria endocítica en el proceso de internalización y de liberación del genoma del PIXV y del RNV dentro del compartimiento citoplasmático mediante la expresión de proteínas dominantes negativas y el uso de agentes lisosomotropos. Materiales y métodos: Cultivos de células Vero Clon 76 fueron transfectados con plásmidos para EPS 15 (proteína involucrada en el proceso de endocitosis dependiente de clatrina) en su forma wild type (WT) y dominante negativa (DN) e infectadas con PIXV y RNV a MOI 10. A las 8 horas postinfección (hpi) fueron fijados, procesados para inmunofluorescencia (IFI) y analizados por microscopía. Por otro lado, cultivos de células Vero fueron preincubados durante 30 min con 15 mM de Glucosamina o 25 mM de NH<sub>4</sub>Cl a 4°C e infectados con PIXV o RNV con MOI 0,1 y 10. Los sobrenadantes fueron recolectados a las 4, 8 y 24 hpi para su titulación por placas de lisis. Paralelamente, monocapas infectadas con MOI 10 y tratadas con las drogas fueron fijadas a las 8 hpi para determinar la presencia del virus por IFI. Resultados: La sobreexpresión de la forma DN de

Eps15 provocó una disminución en el porcentaje de infección en comparación con la forma WT, tanto en los cultivos infectados con PIXV como RNV. Por otro lado, los cultivos tratados con los diferentes agentes lisosomotropos e infectados con el PIXV o con el RNV muestran una disminución significativa en los títulos virales extras e intracelulares a las 8 y 24 hpi en comparación con los no tratados. Es importante destacar que esta disminución fue más marcada en los cultivos infectados con el RNV. La cuantificación del porcentaje de células infectadas mediante IFI, en todas las condiciones experimentales, se correlaciona con los resultados obtenidos por ensayo de placa. Conclusión: Nuestros resultados proporcionan evidencias de la participación de clatrina en la endocitosis tanto del PIXV como del RNV, junto con la dependencia del pH endosomal para su desnudamiento. Tomados en conjunto, nuestros resultados sugieren que dos miembros del complejo de encefalitis equina venezolana utilizan la endocitosis mediada por receptores dependiente de clatrina y la vía endosomal para liberar su contenido al citoplasma y continuar con su ciclo replicativo.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---

## Potencial importancia de la variabilidad viral y la presencia de isomiRs en la acción antiviral de los miRNAs


**Morando, N(1); Pando, MA(1); Rosenzvit, MC(2); Rabinovich, RD(1).**

(1) Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS), UBA-CONICET; (2) Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médicas (IMPAM), UBA-CONICET.

Contacto: [nicolasmorando94@gmail.com](mailto:nicolasmorando94@gmail.com)

La variabilidad viral podría ser relevante para su supresión por microRNAs (miRNAs) ya que su acción depende de la complementariedad de secuencia. Los miRNAs a su vez sufren modificaciones post-transcripcionales que generan variantes (isomiRs) de la secuencia canónica que pueden diferir en su afinidad al sitio blanco. Una de las características del Virus de Inmunodeficiencia Humana (HIV) es la elevada variabilidad de sus secuencias nucleotídicas. La proteína viral Nef tiene múltiples funciones en la replicación del virus y constituye un epítipo importante para la respuesta celular. Evaluar *in silico* el efecto de las diferencias genéticas entre subtipos/recombinantes virales y de las diferencias entre los miRNAs canónicos y sus correspondientes isomiRs sobre la supresión de genes virales por miRNAs humanos, tomando como caso paradigmático al gen nef del HIV. Se comparó el  $\Delta G$  de hibridación blanco-miRNA mediante la aplicación Two State Melting (DINAMelt Server), empleando 43 secuencias del gen nef de HIV (fuente: HIV Sequence Database, NIH), pertenecientes a 7 subtipos o recombinantes diferentes circulantes en Argentina y Brasil (B, BF12, BF17, BF28, BF29, BF40, C) y los 6 miRNAs con sitio blanco reportado en nef (miR-1290, miR-196b, miR-223-3p, miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-326 – fuente: miRBase v22.1). Para cada miRNA se compararon los  $\Delta G$  entre subtipos/recombinantes mediante pruebas de t múltiples. También se analizaron los 10

isomiRs más abundantes para cada miRNA (fuente: IsomiR Bank). Para estudiar la estructura secundaria del RNA blanco se utilizó el mfold2.3. Al comparar para cada miRNA canónico los  $\Delta G$  de hibridación entre pares de subtipos/recombinantes se encontraron diferencias significativas ( $p$ -valores:  $0,026-7,5 \times 10^{-5}$ ) para todos los miRNAs excepto miR-223-3p. Virus de distintos subtipos/recombinantes pueden unir al mismo miRNA con diferente  $\Delta G$ , con diferencias de hasta 3,7 kcal/mol. Considerando los isomiRs, se observó que para 2 de los 6 miRNAs el canónico no es el más abundante. La mayoría de los isomiRs hibridan con el blanco con igual o mayor  $\Delta G$  que el miRNA canónico (diferencias de hasta 11,2 kcal/mol), pero para dos miRNAs se encontraron isomiRs con menor  $\Delta G$  de hibridación que el canónico (diferencias de hasta 2,1 kcal/mol), viéndose más favorecida la unión para estos últimos. Estudiando las estructuras secundarias del RNA blanco se observó que acorde a los  $\Delta G$  de plegamiento, si bien para casi todos los miRNAs el canónico encuentra su sitio blanco más accesible, en el caso del miR-29b-3p hay dos isomiRs para los cuales el sitio blanco sería más accesible que para el canónico. Observamos por un lado que un mismo miRNA puede unir dos variantes virales con distinta afinidad y por otro que la eficiencia de unión al blanco varía entre el miRNA canónico y sus isomiRs. Esto sugiere que la variabilidad viral y entre isoformas de miRNAs podría afectar la eficiencia de silenciamiento y por ende la acción antiviral de los miRNAs.

 ISSN 1666-7948 <a href="http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar">www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</a>	Revista <b>QuímicaViva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	--

## **Estructuras de RNA del genoma del virus del Zika actúan en forma cooperativa y modulan diferencialmente la infección viral en células de mosquito y humano**

**Pallarés, HM; Costa Navarro, GS; de Borba, L; Villordo, S; Gonzalez López Ledesma, MM; Gamarnik, AV**


*Fundación Instituto Leloir, IIBBA-CONICET, Buenos Aires*

*Contacto: [hpallares@leloir.org.ar](mailto:hpallares@leloir.org.ar)*

El género Flavivirus comprende cerca de 70 virus incluyendo patógenos humanos transmitidos por mosquitos, como el virus de Zika (ZIKV), Fiebre amarilla y Dengue. El Zika es un virus emergente que a partir de su introducción en Brasil en el 2015 se ha extendido causando brotes y epidemias en más de 60 países, confirmándose en abril del 2016 el primer brote de transmisión vectorial de nuestro país. El virus posee un genoma de RNA de simple cadena y polaridad positiva que posee un único marco de lectura abierto, flanqueado por regiones altamente estructuradas 5' y 3' no codificantes (UTR). Los clones infecciosos son la herramienta de mayor utilidad para manipular genéticamente al RNA viral y estudiar sus funciones. Con el fin de desarrollar esta herramienta en nuestro laboratorio, se ensambló un cDNA completo del genoma de un ZIKV epidémico proveniente



de un aislamiento realizado en nuestro país en el año 2016, y otro clon no epidémico proveniente de un aislamiento de mosquito del año 1953 de Senegal. Ambos cDNA se clonaron exitosamente en plásmidos de bajo número de copias, a partir de los cuales se pudo generar RNA viral que fue infectivo en células de mosquito y humanas. Con el objetivo de estudiar la función de las estructuras de RNA conservadas en el 3'UTR del ZIKV, se diseñó en los clones infecciosos una batería de virus con deleciones y mutaciones en estos elementos. A partir de este análisis, se reveló el rol fundamental de un dominio formado por dos Stem-Loops (SL1 y SL2) para la infección en mosquitos y humanos. La deleción de los SLs dio origen a virus que infectaron y propagaron eficientemente en células de mosquito pero que fueron incapaces de infectar productivamente células humanas. Este hallazgo es único para el ZIKV, ya que si bien los SLs modulan la replicación diferencial en los dos hospedadores en otros flavivirus, este es el primer ejemplo en el que su función es esencial para la infección de ambos. En relación a la función de los SLs, estudios previos empleando distintos flavivirus demostraron su importancia en la generación de RNA no codificantes virales llamados sfRNAs. Estos RNA son productos de la degradación parcial del genoma viral y participan en el control de la respuesta antiviral innata de la célula. Por este motivo estudiamos los determinantes estructurales presentes en los SLs de ZIKV para la formación de los sfRNA. Sorprendentemente, encontramos que los dos SLs funcionan en forma cooperativa, donde mutaciones o deleciones del SL2 impidieron el funcionamiento del SL1. Estos hallazgos indican que este dominio del 3'UTR del ZIKV tiene una supra-estructura donde los SLs están asociados, modulando la producción de sfRNAs y la replicación viral en los dos hospedadores. La comprensión a nivel molecular del modo de acción de estas estructuras de RNA permitirá entender los mecanismos por los cuales los virus adquirieron la capacidad de evadir el sistema antiviral de especies distintas.

 ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar	Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a>
---	---

## **Evaluación in vitro de la capacidad replicativa de recombinantes de Alfaherpesvirus bovino tipo 5 (BoHV-5) delecionados en su LR**


**Romero, SA; Silvestro, CA; Bratanich, AC.**

*Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Cátedra de Virología.*

*Contacto: [silvina364@gmail.com](mailto:silvina364@gmail.com)*

Alfaherpesvirus bovino tipo 5 (BoHV-5) es el agente causal de la meningoencefalitis no supurativa en terneros, un importante patógeno perteneciente a la subfamilia Alfaherpesvirinae que afecta la industria ganadera con alta prevalencia en Sudamérica. Con el fin de evaluar la función del gen relacionado a la latencia (LR) y su rol en la neurovirulencia en el contexto viral, se planteó la de producción de virus recombinantes. A partir de la cepa parental A663 (BoHV-5/1), se generó por

recombinación homóloga un BoHV-5/1 delecionado en el promotor mínimo del gen LR para anular la expresión del mismo sin alterar la expresión de otros genes como el bICP0 (codificado en la cadena opuesta). Además se agregó el gen de la Green Fluorescent Protein (GFP) a fin de facilitar su identificación, obteniéndose así los virus recombinantes BoHV-5 LR5(-)GFP(+) y BoHV-5 LR5(-)GFP(-) como control. Se verificó por secuenciación que los sitios de recombinación no alteraran secuencias de genes que rodean la deleción. Nos propusimos evaluar el comportamiento de las cepas en estudio mediante el tamaño de placa de lisis, tamaño de placa de infección y sobrevivida celular en células no neuronales. Se demostró que el virus con LR5 delecionado posee un tamaño de placa de lisis y de infección de la mitad respecto del virus salvaje y una sobrevivida celular del 20% respecto de la cepa parental a las 24, 48 y 72 hs post-infección en las distintas MOI (0,05; 0,01 y 0,005). Estos resultados hacen suponer que el crecimiento del virus BoHV-5/1 con el gen LR deleteado posee un crecimiento poco eficiente. Considerando lo anterior se podría deducir que el gen LR jugaría un rol importante durante la infección lítica que conspira contra la actividad replicativa del virus. Aun queda pendiente dilucidar los mecanismos implicados en este déficit de replicación viral entre los que se podrían proponer tanto la presencia de una acción antiapoptótica como una interacción/regulación entre genes tempranos inmediatos u otros genes involucrados en este evento.

 <p>ISSN 1666-7948 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar</p>	<p>Revista <b>Química Viva</b> Número 1, año 19, Abril 2020 <a href="mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar">quimicaviva@qb.fcen.uba.ar</a></p>
--	--

## Localización de la nucleoproteína de virus Junín y efecto de su expresión sobre el contenido total de Lipid Droplets celulares

**Vazquez, CA(1, 2); Hayashi, J(3); Leon, K(3); Moreira, JP(3); Tomar, S(3); Ott, M(3); García, CC(2); Cordo, SM(1)**

(1) Laboratorio de procesos moleculares de la interacción virus-célula, IQIBICEN, UBA-CONICET;  
(2) Laboratorio de estrategias antivirales, IQIBICEN, UBA-CONICET; (3) Gladstone Institutes

Contacto: [cecilia.alejandra.vazquez@gmail.com](mailto:cecilia.alejandra.vazquez@gmail.com)

Las gotas lipídicas o (LD) son organelas actualmente descriptas como relevantes en la multiplicación de diferentes virus, tales como los virus dengue y polio, aunque inicialmente se las consideró simples sitios de almacenamiento de lípidos. La Fiebre Hemorrágica Argentina está causada por el virus Junín (JUNV). Si bien existe una vacuna contra este virus, todavía no hay una quimioterapia disponible para tratar la enfermedad. JUNV es un virus envuelto que está conformado por cuatro proteínas: la nucleoproteína (N), asociada al genoma de ARN simple cadena, la ARN polimerasa (L), la proteína de matriz (Z) y la glicoproteína (G). En trabajos anteriores hemos observado que la modulación farmacológica de la biogénesis de los LD afecta los niveles de replicación viral. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la expresión de las proteínas virales sobre el número y tamaño de LD. Para ello, se trabajó con las líneas celulares de hepatoma humano HepG2 y Huh.7, JUNV cepa IV4454 o vectores lentivirales que codifican para N o Z, fusionados a la secuencia Flag.

Los cultivos celulares fueron infectados o transducidos por 48 horas. Las muestras infectadas se inmunomarcaron utilizando anticuerpos monoclonales contra N. Para las muestras transducidas, se utilizó un anticuerpo anti-Flag. Los LD se marcaron con la sonda LipidTox o con anti-perilipina 2, la proteína marcadora de LD. Mediante microscopía confocal de alta resolución se tomaron microfotografías de campos aleatorios. Utilizando imágenes en distintos planos focales y por medio de los softwares Imaris e ImageJ se realizaron reconstrucciones tridimensionales de cada célula y sus componentes. Se calculó el número y volumen de los LD por célula y se analizó la localización de las proteínas virales. En el presente trabajo demostramos que la infección con JUNV provoca una disminución significativa en el número de LD en aquellas células infectadas respecto de las no infectadas. Mediante la expresión independiente de las proteínas virales observamos que N es capaz de producir este efecto en el contenido de LD, en ausencia del resto de los componentes virales. En cambio, la expresión de Z no generó diferencias significativas respecto del control. Por otro lado, al analizar la localización de las proteínas virales observamos que una fracción N de JUNV está asociada a la superficie de los LD. Este fenotipo podría estar relacionado con la sublocalización celular de alguno de los productos de clivaje de N. Estos resultados nos permiten concluir que N juega un rol importante en la modulación de los LD durante la infección, aunque todavía no puede descartarse la relevancia de otros componentes virales. Además, es posible que esto se deba a una interacción directa de la proteína con los LD. Los factores que pudieran mediar la interacción entre N y el metabolismo de LDs están siendo estudiados para determinar la relevancia funcional de la disminución de los LD en células infectadas con JUNV



ISSN 1666-7948

[www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)

Revista **QuímicaViva**

Número 1, año 19, Abril 2020

[quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)