

Rev Biomed 2000; 11:215-234.

Resúmenes de Congreso

*I Congreso Nacional (segunda reunión) de la Rama de Bioquímica y Biología Molecular de Virus de la Sociedad Mexicana de Bioquímica (Segunda Parte).**

Comité Organizador:

Alejandro García-Carrancá¹, Rosa Ma. del Angel², Rafael Rivera-Torres³.

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, ²Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., ³Centro de Investigación y de Estudios Avanzados - Irapuato del Instituto Politécnico Nacional, Guanajuato, México.

TRABAJOS LIBRES.

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RT-PCR PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DE MUESTRAS POSITIVAS ROTAVIRUS. Puerto-Solís, M. Polanco-Marín, G, Valadez-González N, Rodríguez-Angulo E. Manzano-Cabrera, L. González-Losa, MR. Laboratorio de Virología del Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" de la Universidad de Yucatán. Mérida, Yucatán.

El grupo A de rotavirus es el principal agente de la diarrea infecciosa aguda en el mundo y continúa causando serios problemas de salud, por lo que se requiere la realización de una vacuna, pero para esto es necesario conocer y caracterizar las cepas que circulan en las diferentes epidemias a nivel mundial, por lo que se han desarrollado técnicas más sensibles y específicas para facilitar el estudio de la epidemiología molecular. Por lo que objetivo de este trabajo fue estandarizar la técnica de RT-PCR para la caracterización de cepas de rotavirus. Para realizar el trabajo, se procesaron dos muestras positivas y como control la cepa Wa, se realizó la extracción de dsRNA de rotavirus a partir de heces con fenol:cloroformo 1%. Posteriormente el RNA se purificó con trizol y se precipitó con isopropanol, este proceso duró de 3 a 4 hr, posteriormente se realizó la transcripción, la 1a y 2a

amplificación para PCR con oligos correspondientes para el gen 4 y genotipos específicos. Se realizó un gel de poliacrilamida con tinción de nitrato de plata para visualizar los resultados. La amplificación se obtuvo para el gen 4, tipo P8 tanto para las muestras como para el control. Por consiguiente este método es más rápido y sensible si todas las condiciones de estandarización se cumplen ya sea con los reactivos, con el tiempo de almacenamiento de los mismos así como de los oligos.

ANÁLISIS DEL PERFIL DE CITOCINAS TIPO Th1/Th2 EN PLACAS DE PEYER EN LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS EN UN MODELO DE RATÓN. López, I.C.¹, Pedroza, A.², Baldovinos H.², Maldonado, M.², López, S.³, Arias, C.³, Gutiérrez-X, L.² y Esquivel, F.¹ (1) Facultad de Medicina, EUAEM, Cuernavaca, Morelos. (2) CISEI, INSP, SSA, Cuernavaca, Morelos. (3) Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos.

Una de las principales causas de diarrea aguda en infantes es la infección por rotavirus, la cual en países subdesarrollados puede causar hasta 1 millón de muertes anuales. En estudios previos en el modelo murino se ha observado la inducción de una amplia respuesta inmune específica

* Realizado en Guanajuato, Gto., México, del 19 al 21 de Enero de 2000.

Solicitud de sobretiros: Dr. Alejandro García-Carrancá, Depto. de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Apdo. Postal 70228, C.P. 04510, México, D.F., México.

Este artículo esta disponible en <http://www.uady.mx/~biomedic/rb001139.pdf>

Vol. 11/No. 3/Julio-Septiembre, 2000

al virus, en la que para su erradicación intervienen los linfocitos T citotóxicos (Tc) y los anticuerpos IgA intestinales, los cuales también están relacionados de manera importante con profilaxis. Estos hallazgos sugieren la existencia tanto de citocinas tipo célula T-cooperadora (Th) 1 como Th2 en respuesta a la infección. Para contribuir al entendimiento de la respuesta inmune en la infección por rotavirus, decidimos analizar el perfil de algunas citocinas tipo Th1 características de la inducción de la respuesta inmune celular como interferón-g (INF-g) e interleucina-2 (IL-2) y de Th2 características de la respuesta inmune humoral como IL-4 e IL10. Ratones hembras de la cepa BALB/c fueron inoculados oralmente con el rotavirus murino silvestre EDIM y a los días 0, 2, 4, 6 y 8 posteriores a la infección se extrajeron las placas de Peyer (PP). A partir de estos órganos se obtuvo el RNA total para someterlo a reacciones de RT/PCR específico para las citocinas de interés. Asimismo, se obtuvieron muestras de heces y suero para determinar la producción de anticuerpos IgA intestinales asociados a una respuesta tipo Th2 y anticuerpos IgG1 e IgG2a asociados a una respuesta Th2 y Th1 respectivamente. Se encontró en PP un aumento de mRNA para INF-g durante el 4° y 6° día de la infección y del mRNA para IL-10 al 4° día. También, se observó la presencia de anticuerpo IgA intestinales e IgG1 e IgG2a séricos rotavirus específicos a partir del 6° día. Estos resultados sugieren que en las PP de ratones infectados con rotavirus se producen citocinas tanto tipo Th1 como Th2, lo cual se refleja a nivel intestinal con la producción de IgA y a nivel sistémico con la presencia tanto de IgG1 como de IgG2a.

LOCALIZACIÓN RELATIVA DE LAS PROTEÍNAS ESTRUCTURALES Y NO ESTRUCTURALES DE LOS ROTAVIRUS EN CÉLULAS INFECTADAS. Espinosa, R, González, R, Romero, P, López S, Arias C. Instituto de Biotecnología, UNAM Cuernavaca, Morelos.

La replicación de los rotavirus, cuya cápside está constituida por tres capas concéntricas de proteínas, se lleva a cabo en inclusiones citoplásmicas llamadas viroplasmias. Estas inclusiones están formadas tanto por proteínas estructurales (VP) como no estructurales (NSP) del virus. Las partículas subvirales, formadas por dos capas de proteínas, geman desde los viroplasmias, hacia el retículo endoplásmico adyacente, donde se ensambla la capa más externa del virión, formada por las proteínas VP4 y VP7. Utilizando doble inmunotinción y microscopio confocal observamos que las proteínas víroplásmicas muestran patrones diferentes de distribución dentro del viroplasma. Las proteínas NSP2 y NSP5 ocupan espacios en el viroplasma diferentes a los que ocupan VP2 y VP6. Además, se observó una alta co-localización entre las proteínas virales residentes del retículo endoplásmico, NSP4 y VP7, y la proteína citoplásmica VP4.

Se encontró que estas tres proteínas se organizan en estructuras semicirculares, o similares a anillos, en asociación estrecha con viroplasmias. Se encontró también que VP4 presenta una distribución intracelular filamentosa. Las observaciones realizadas en este estudio subrayan la naturaleza altamente organizada de la morfogénesis de los rotavirus.

ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN 10 DE CEPAS DE ROTAVIRUS HUMANO QUE NO PRESENTAN CORRELACIÓN ENTRE SEROTIPO Y ELECTROFEROTIPO. Melo-Munguía M, Díaz de Jesús B, Rodríguez-Castillo A, Ramírez-González JE, Mayén-Pimentel E y García-Lozano H. Laboratorio de Rotavirus, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE), México, D.F.

Con base en la migración electroforética de los segmentos 10 y 11 se han definido 2 electroferotipos diferentes: a) Electroferotipos largos relacionados con el subgrupo 11 y serotipos G1, G3, G4 y G9; b) Electroferotipos cortos, donde los segmentos 10 y 11 presentan una migración más lenta y están relacionados con el subgrupo 1, serotipos G2 y G8. El gen 10 juega un papel muy importante en los mecanismos de patogenicidad del virus ya que codifica para la proteína no estructural NSP4, que es la responsable del ensamblaje vital, y se le ha reconocido como una posible enterotoxina viral. El objetivo de este proyecto es analizar las posibles diferencias moleculares que se presenten en el gen 10 de cepas poco comunes de rotavirus humano en las cuales no existe correlación entre serotipo y electroferotipo. Se propagaron las cepas prototipo: Wa-1 (serotipo G1 P1, electroferotipo largo), DS-1 (G2P2, electroferotipo corto) y 69M (G8, electroferotipo "super" corto) en células MA-104. Se analizó una colección de 50 muestras clínicas positivas a rotavirus por la técnica de electroforesis en PAGE al 5 y 10 %, Todas las muestras se tipificaron por RT-PCR para el gen de VP7 y VP4. Se seleccionaron 10 muestras con electroferotipo corto y serotipo G1 (4 fueron G1 P1, 2 G1 P2, 4 G1 P3) y 5 muestras con electroferotipo largo y serotipo G2 (3 fueron G2P2 y 2 G2P2). Se amplificó el gen 10 con los oligonucleótidos específicos (Beg 10, End 10) obteniendo un producto de 751 pb correspondiente a la secuencia completa de este gen. El producto se utilizó para el análisis con enzimas de restricción Hind II, Sau 3A, Taq I, Pvu II y Alu I. Se compararon los perfiles de restricción de las cepas prototipo, observándose que existen diferencias entre cada cepa, Al realizar el análisis de restricción con algunas de las muestras seleccionadas se observó que las cepas con electroferotipo corto G1P1 presentan un patrón de restricción similar a Wa-1 mientras que las cepas con electroferotipo largo G2P2 presentan mayores diferencias en los patrones de restricción al ser comparadas con esta

I Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Virus.

misma cepa prototipo.

PANORAMA DE LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS GRUPO C EN MÉXICO. Díaz de Jesús B, Melo-Munguía M, Rodríguez-Castillo A, Ramírez-González JE, Mayén-Pimentel E, García-Lozano H. Laboratorio de Rotavirus del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE). México. D.F.

Los rotavirus se clasifican en siete grupos (A-G). Los grupos A, B y C, se han relacionado con diarreas en humanos y animales. Los rotavirus del grupo C (RGC) han sido reconocidos por más de una década como agentes etiológicos productores de la gastroenteritis aguda en personas mayores de 4 años de edad. En China y Japón se consideran un problema de salud pública, sin embargo fuera de estos países la circulación de este agente viral es menor. En México, la importancia de los RGC como agentes etiológicos en la patología de las diarreas no ha sido establecida por lo que es importante determinar la circulación de estos agentes virales en la población mexicana. Durante el período de estudio (Enero 97-Junio 98) se analizaron 4021 muestras fecales de pacientes de 0 a 18 años de edad con gastroenteritis aguda, procedentes de diferentes entidades de la República Mexicana. Se realizó el diagnóstico por la técnica de rotaforesis y el análisis del patrón electroforético (pe) característico de los RGC (4-3-2-2) y RGA (4-2-3-2) por PAGE al 10%. La confirmación de estos grupos se realizó mediante RT-PCR con oligonucleótidos específicos de grupo A y C. El diagnóstico por rotaforesis indicó que de 4021 muestras procesadas, 14 (0.3%) fueron positivas a RGC, 1896 (47.1%) a RGA y 2111 (52.5%) negativas. El total de muestras fue dividido en dos grupos de acuerdo a la edad de los pacientes: a) menores de 4 años b) mayores de 4 años. En el primer grupo, de 3895 muestras, 1876 (48%) fueron grupo A y 2 (0.05%) pertenecieron a RGC. En el segundo grupo, de 126 muestras 12 (9.5%) correspondieron a RGC y 20 (15.9%) a RGA; las muestras de este último grupo fueron procesadas por RT-PCR, confirmando 12 casos a RGC, 18 a RGA, 94 negativas y 2 no confirmadas. Por PAGE se determinó la circulación de tres pe de RGC, a diferencia de lo encontrado en otros países donde sólo se han reportado dos. Estos datos sugieren que los RGC son genética y epidemiológicamente diferentes a los RGA y consideramos importante establecer una vigilancia epidemiológica para tener un panorama completo de la circulación de los RGC en México y la realización de estudios moleculares para la caracterización genómica de estos virus.

DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS G (VP7) Y P (VP4) DE CEPAS DE ROTAVIRUS AISLADAS EN LACTANTES CON DIARREA AGUDA EN MÉXICO.

Mayén-Pimentel E, Rodríguez-Castillo A, Díaz de Jesús B, Ramírez-González E, Melo-Munguía M, García-Lozano H. Laboratorio de Rotavirus del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos SSA. (INDRE). México, D.F.

Las infecciones por rotavirus en neonatos inducen inmunidad parcial a infecciones subsecuentes o bien disminuyen la severidad del cuadro diarreico. El panorama de la infección por rotavirus en lactantes sintomáticos en nuestro país es poco conocida, aún cuando este grupo de edad es severamente afectado por éste. El objetivo de este trabajo fue caracterizar a los genotipos G y P de cepas de rotavirus aisladas de lactantes con diarrea aguda en México. Se analizaron 51 muestras positivas a rotavirus de lactantes (0-6 meses) con diarrea aguda procedentes de diferentes entidades del país durante 1994-1998. El RNA viral fue extraído con fenol-cloroformo de las heces. Se purificó con CF-11 y se analizó en PAGE al 10% teñido con nitrato de plata para la observación del genoma viral. Por RT-PCR se determinaron los genotipos G (VP7) y P (VP4) con oligonucleótidos específicos. Los productos de amplificación se verificaron en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. De un total de 51 muestras, se determinó que la combinación más frecuente fue G1P1 (21.6%), seguida de G2P2 (1 5.7%) G3P1 (9.8%), G3P3 (5.9%), G3P2 (3.9%), G1P3(3.9%) G2P1 (1.9%). Se observó en menor proporción las coinfecciones G1+G3P1, G1P1+P2, G1P1+P3 y G2P1+P2. Es importante destacar la presencia de cepas con genotipo P3 asociados en lactantes sintomáticos. Estos resultados son de gran interés en caso de contemplar una campaña de vacunación contra este agente viral o bien para ampliar los estudios de epidemiología molecular de la diarrea por rotavirus en nuestro país.

OBTENCIÓN DE UN PANEL DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA PROTEINA NSP3 DE ROTAVIRUS. Esparza-Ibarra EL, Guzmán-León S, Padilla-Noriega L. Depto. de Biología Molecular, Inst. De Invest. Biomédicas, UNAM, México, D.F.

Los rotavirus del grupo A son el principal agente etiológico de gastroenteritis aguda infantil. Su genoma consta de 11 segmentos de RNA de cadena doble, los cuáles codifican, por 6 proteínas estructurales (VP1 a VP4, VP6 y VP7) y 6 proteínas no estructurales (NSP1 a NSP6). Entre las proteínas no estructurales, NSP3 podría tener un papel en regular la traducción de RNAM celulares y virales, de manera análoga al regulador celular PABP, ya que es una proteína dimérica, capaz de unirse específicamente a la secuencia UGACC del extremo 3' de los RNAM virales y al factor de iniciación de traducción eIF4G. Con el fin de localizar dominios inmunoreactivos de NSP3 nos propusi-

A García-Carrancá, RM del Angel, R Rivera-Torres.

mos producir un panel de anticuerpos monoclonales contra esta proteína. Para este fin se inmunizaron ratones con la proteína NSP3 recombinante expresada en bacteria, se demostró la especificidad de los sueros producidos para radioinmunoprecipitar esta proteína, y se produjeron hibridomas seleccionando clonas productoras de anticuerpos por inmunotinción de células infectadas con rotavirus. Los anticuerpos producidos se usarán para sondear regiones funcionales y dominios inmunoreactivos de NSP3.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS Y SU RELACIÓN CON LOS SEROTIPOS CIRCULANTES. Polanco-Marín G, Cámara-Mejía J, González-Losa M, Puerto-Solís M. Lab. De Virología. Centro de Investigaciones Regionales, Dr. Hideyo Noguchi, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán.

El rotavirus (RV) es el agente viral más frecuente de la diarrea infecciosa aguda (DIA), representa una de las principales causas de morbi-mortalidad en países en vías de desarrollo. La relación entre serotipos y la gravedad del cuadro clínico que presentan los pacientes, es controversial, ya que existen evidencias de que la severidad de la DIA dependerá del serotipo circulante en ese momento, Sin embargo hay otros estudios en los cuales no se ha podido poner de manifiesto esta relación. El objetivo de nuestro trabajo fue determinar si existe relación entre la severidad del cuadro clínico y el serotipo de RV. Se estudiaron a 92 pacientes con DIA a los cuales se les realizó una historia clínica y recolectó materia fecal que fue analizada por los métodos de PAGE Y ELISA utilizando monoclonales de grupo, subgrupo y serotipos G y P. De los 92 pacientes, 19 presentaron un cuadro clínico leve, 17 muestras tuvieron RV G1P1A y dos G3 sin poderles asignar serotipo P. El cuadro clínico moderado se presentó en 70 pacientes, en 57 se detectó RV G1P1A, en 11 G3, en uno G4P1A y en uno más G1P1 B. Solamente tres pacientes requirieron hospitalización en cuyas muestras fecales se determinó RV G1P1A. Nuestros resultados dejan en claro que la severidad de la DIA por RV, fue independiente de los serotipos circulantes, durante la epidemia de 1998 en la Cd. De Mérida, Yuc, por lo que la presentación del cuadro clínico que dependerá de características propias del huésped.

LOCALIZACIÓN DEL PROBABLE RECEPTOR PARA EL VIRUS DEL DENGUE EN EL MOSQUITO *Aedes aegypti*. Mendoza-Miranda MY¹, Salas-Benito JS¹, Kouri-Flores J¹, Lanz-Mendoza H². Del Angel Rosa Ma¹. Depto. de Patología Experimental, CINVESTAV-IPN¹. Instituto Nacional de Salud Pública², Cuernavaca, Morelos.

La Fiebre del dengue, enfermedad ocasionada por cualquiera de los 4 serotipos del virus, es transmitida al hombre por la picadura del mosquito *Aedes aegypti*. El mosquito adquiere al virus de un individuo infectado y se convierte en transmisor por el resto de su vida. Ya que no todos los tejidos de mosquito presentan la misma susceptibilidad a la infección, es posible que ésta pueda estar relacionada con la presencia de un receptor. A este respecto Juan Salas-Benito describe que el virus del dengue se une de manera específica a dos glicoproteínas de 40 y 45 kDa presentes en la membrana de las células C6/36 (*Aedes albopictus*). Por tanto, decidimos analizar la presencia de ambas moléculas en los diferentes estadios del ciclo de vida del mosquito *Aedes aegypti* usando ensayos tipo "Western-Blot". De la misma manera, analizamos por ensayos de "virus overlay binding protein assay" (VOPBA) la molécula(s) a la cual el virus se une. Los anticuerpos dirigidos contra la p45 de C6/36 reconocieron en extractos de proteínas totales de Huevo, Pupa, Larva, Mosquito adulto (cabeza, tórax y abdomen) una molécula de 45 kDa. Una molécula con la misma migración electroforética (45 kDa) fue detectada por el virus del dengue 4 marcado radioactivamente mediante ensayos de VOPBA. Lo anterior sugiere que la molécula de 45kDa puede formar parte del receptor putativo para el virus en el mosquito vector *Aedes aegypti*.

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES NS3 Y NS5 DEL VIRUS DEL DENGUE SEROTIPO 4. Albarrán-Orta PA², De Nova-Ocampo MA¹, Del Angel-Núñez RM². Programa Multidisciplinario de Biomedicina Molecular¹ y Depto. de Patología Experimental² CINVESTAV-IPN. México, D.F.

El virus del Dengue transmitido al humano por la picadura de la hembra del mosquito *Aedes aegypti*, es un virus envuelto. Su genoma (RNA de cadena sencilla) codifica las proteínas estructurales (C, M, y E), así como las proteínas no estructurales (NS1 a NS5) dentro de las cuales se encuentran NS3 y NS5. La proteína NS3 (68 kDa) está altamente conservada entre los flavivirus y es una proteína trifuncional, ya que tiene función de proteasa y cuenta con dominios de unión a nucleótidos trifosfato y de helicasa. La NS5 (103 kDa) tiene secuencias conservadas de RNA polimerasa dependientes de RNA sugiriendo que se trata de la replicasa viral. Ambas proteínas al parecer participan en la replicación viral, y se ha sugerido que interactúan con las regiones no traducidas de los miembros de esta familia. Por todo lo anterior decidimos clonar ambas proteínas en el vector de expresión pGEX-4T con la finalidad de obtener las proteínas recombinantes GST-NS3 y GST-NS5. Para ello amplificamos las secuencias que codifican para

I Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Virus.

las proteínas NS3 y NS5 a partir del CDNA de Dengue 4. Los productos obtenidos NS3 (1.8 kb) y NS5 (2.7 kb) fueron secuenciados y la secuencia se comparó con la ya reportada para ambas proteínas. Posteriormente clonamos ambas en el vector pCR II T, con la finalidad de poder subclonar en el vector de expresión utilizando los sitios de restricción que franquean a cada uno de los productos de PCR. Después se llevó a cabo la subclonación en el vector de expresión antes mencionado obteniendo así las proteínas recombinantes GST-NS3 y GSTNS5. Estas proteínas serán usadas para producir anticuerpos y para analizar su interacción con la RNT 3' de Dengue 4.

INTERACCIONES RNA-PROTEÍNAS EN LA REGIÓN NO TRADUCIDA 3' NEGATIVA DEL RNA DEL VIRUS DEL DENGUE 4. Yocupicio-Monroy RME, Del Angel-NUÑEZ RM. Depto. de Patología Experimental, CINVESTAV-IPN, México, D.F.

En las regiones no traducidas (RNTs) de los virus de la familia de los flavivirus, se han encontrado elementos conservados en secuencia y en estructura. Estos elementos al parecer participan en procesos claves en el crecimiento viral, como son traducción y replicación. Se ha visto que la interacción de las RNTs de virus de RNA con proteínas virales y celulares tiene gran relevancia en la función de estas regiones.

En el presente trabajo analizamos la capacidad de la RNT 3' de polaridad negativa (RNT 3'-) del virus del serotipo 4 (DEN4) para interactuar con factores proteicos presentes en extractos de dos líneas celulares: C6/36 (de larvas de *Aedes albopictus*) y U937 (línea celular promonocítica). Esta última se empleó en forma promonocítica (sin diferenciar) y como macrófago (diferenciada). Las interacciones RNA-proteínas fueron reveladas mediante ensayos de retardamiento. El RNA de la RNT 3'- de DEN4 de 101 bases se obtuvo después de amplificar a partir del CDNA completo de DEN4 y transcribir in vitro en presencia de UTP a³²P. La RNT 3'- fue capaz de formar 4 complejos en presencia de extractos de células C6/36. Para el caso de las células U937, se encontró que se formaban 3 complejos tanto con extractos de células diferenciadas como no diferenciadas. Los 3 complejos resultaron estables por su resistencia a sal, sin embargo sólo dos de ellos fueron específicos. Mediante los ensayos de entrecruzamiento con luz UV encontramos que la RNT 3'- se une a 7 proteínas provenientes de C6/36 y a 6 de células U937 tanto diferenciadas como no diferenciadas.

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA E DEL VIRUS DEL DENGUE-2 MEXICANO. Sánchez I, Monroy V, Juárez K, Fuentes I, Ruiz B. Depto. Biología Molecular. Instituto de Investigaciones Biomédicas,

U.N.A.M., México, D.F.

El dengue es causado por un virus de la familia *Flaviviridae*, del cual se conocen 4 serotipos, transmitido al hombre por la picadura del mosquito *Aedes aegypti*. Es un virus RNA de cadena sencilla (aprox. 11 Kb), que codifica para un precursor poliproteínico (495 aa), que por cambios postraduccionales genera 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales (5'-C-prM-M-E-NS1-NS2-NS3-NS4-NS5-3'). La proteína E del virus del dengue contiene la mayoría de los determinantes involucrados en el reconocimiento y penetración de la célula huésped, así como los epítopes involucrados en la neutralización. A pesar de la importancia de esta proteína en la biología del virus, su estructura aún no está claramente definida, particularmente en relación a la infección. Por esta razón, nosotros tratamos de expresar la proteína E completa (incluyendo la región transmembranal), para su caracterización estructural. Con este fin, se utilizó el sistema QIA-gen express, el cual permite expresar proteínas con una cola de 6xHis. Para llevar a cabo la expresión, se amplificó el gen completo que codifica para esta proteína (1495 pb) por RT-PCR. Una vez obtenido, se clonó en el vector PQE-30. Se obtuvieron 6 clonas, las cuales expresaron una proteína del peso molecular esperado. La proteína E se obtuvo en forma insoluble (cuerpos de inclusión), por lo que se extrajo con detergentes y se purificó a través de una columna de Ni⁺. El eluido se paso por una columna de Sepharosa- Heparina.

AISLAMIENTO DE UNA MOLECULA DE 65 kDa Y pI ACIDO, QUE UNE AL VIRUS DEL DENGUE 2, DE MEMBRANAS DE CELULAS N1E-115. Imbert, P.JL. CICM-IC/BUAP; EM-ICSA/UAEH.

Las células de neuroblastoma N1E-115 se crecieron en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino. Una vez establecidas las monocapas, se continuaron creciendo en medio libre de suero y dimetilsulfóxido (DMSO) al 1%. Después de 24 horas, se eliminó el medio y se lavaron los cultivos con PBS estéril (phosphate buffered saline). Para la extracción de las moléculas de superficie, las monocapas de las células diferenciadas se trataron por 5 min con butanol al 2.5% en PBS. El fluido sobrenadante se colectó, después se centrifugo y se almacenó a -70°C. Para realizar el isoelectroenfoco en el sistema Rotofor (Bio-Rad), este sobrenadante se descongeló, en seguida se diluyó con agua y las soluciones de amfolitos Bio-Lyte al 1%. Después se agregaron a la celda para realizar la corrida sin ningún tratamiento posterior. El enfoque requirió menos de 2 horas y refrigeración. Las condiciones iniciales fueron 12W/200V/60mA. En el equilibrio, los valores fueron 10W/300V/40mA. Se colectaron 20 fracciones, a las cuales se les midió el pH, y después se les agrego NaCl 2.5 M para

A García-Carrancá, RM del Angel, R Rivera-Torres.

que la concentración final de sal en cada fracción quedara en 0.5 M. Las fracciones se analizaron con PAGE-SDS al 8%, isoelectroenfoque en 2D, ELISA y con el ensayo de VOPBA (virus overlay protein binding assay). En el material extraído, se enfocaron en algunas fracciones, bandas densas de proteínas teñidas con Coomassie y plata. Se encontró por VOPBA, que en las fracciones con pH 4.0 a 6.5, una banda única de aproximadamente 65 kDa, la cual fue reconocida por el virus del dengue 2. El ensayo de ELISA con el virus conteína E recombinante fue positivo solo en esas fracciones. El punto isoeléctrico de esta banda fue de 4.6. La purificación y la concentración de este material extraído en esta manera es relativamente rápido y simple. La siguiente etapa es obtener la secuencia de aa.

CORRELACIÓN DE LA INFECCIÓN POR VIH-1 CON LA PRESENCIA DE IgG ESPECÍFICA EN SOBRENADANTES DE COCULTIVO DE NIÑOS NACIDOS DE MADRES SEROPOSITIVAS. Alcántara P, Basualdo MC, Soler C, IIBM, UNAM. SSA, México, D.F.

La transmisión perinatal por VIH-1 en niños es de aprox. 30%. Debido al paso de anticuerpos IgG maternos anti-VIH a través de la placenta, el diagnóstico no puede ser empleado hasta después de los 18 meses. Dada la importancia del diagnóstico temprano que permita una mejor calidad de vida a los niños infectados, se requiere de nuevos métodos que acorten el tiempo de diagnóstico. El objetivo de este trabajo, fue el de correlacionar la infección en niños nacidos de madres seropositivas con la presencia de IgG anti-VIH en el sobrenadante de cocultivo (SN). Tomando como referencia de infección el aislamiento viral, 9130 niños y 10110 mujeres evaluados estaban infectados; 2 niños tuvieron un diagnóstico indeterminado y 19 no están infectados. Cuando estos resultados de diagnóstico perinatal integral se compararon con la presencia de anticuerpos IgG en SN, se encontró que el 78% (719) de los niños infectados y el 80% (8/10) de las mujeres presentaron IgG específica para VIH-1. Por otro lado, el 100% (212) de los niños con diagnóstico indeterminado y el 100% de los niños no infectados no presentaron anticuerpos IgG in vitro, sugiriendo que los anticuerpos presentes en el plasma de estos niños son de origen materno. Es importante resaltar que 6 de los niños infectados que presentaron anticuerpos IgG in vitro también presentaron anticuerpos IgA en plasma en tanto que los otros 3 niños infectados y los 2 con diagnóstico indeterminado, fueron negativos para ambos. Con estos resultados preliminares, inferimos que la detección de anticuerpos IgG in vitro podría ser otro marcador temprano de infección.

NUEVO FACTOR QUE AFECTA LA NEUTRALIZA-

Revista Biomédica

CIÓN Y AUMENTO DE LA INFECTIVIDAD DEL VIH MEDIADA POR ANTICUERPOS: LAS CÉLULAS DEL HOSPEDERO. Adalid L, Díaz O, Gómez R, Sevilla E, Soler C. Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos. I.I.B.-UNAM/Secretaría de Salud, México, D.F.

Los anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana producidos durante la infección pueden tener un efecto neutralizante o de aumento de la infección.

En el fenómeno de neutralización/aumento (N/A). Primero hay una interacción del virus con el anticuerpo y posteriormente el complejo virus anticuerpo interacciona con la célula huésped.

El virus y el anticuerpo son factores que tienen un papel importante en el fenómeno de A/N. Sin embargo aún se desconoce el papel de las células hospederas. Para conocer cuál es el papel de las células huésped en los ensayos de A/N para VIH, se realizaron ensayos empleando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de 12 individuos VIH negativo, el virus prototipo III B y los sueros de tres pacientes VIH positivos.

Se encontró que las células huésped de once individuos favorecen la neutralización viral con los tres sueros, mientras que las células de un individuo favorecen el aumento de la infectividad viral con los mismos sueros. Los resultados obtenidos sugieren que las células huésped cambian el efecto del anticuerpo en la infectividad viral.

Las diferencias observadas entre las células huésped se podrían atribuir a cambios en la expresión de receptores y correceptores virales o bien a la expresión de los receptores para Fc que podrían facilitar el aumento de la infectividad mediada por anticuerpos.

PATOGENICIDAD DE AISLADOS DE VIH-1 EN EL MODELO hu-PBL SCID MOUSE. Vázquez J, Gómez R, Sevilla E, Basualdo M del C, Soler C. Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos, I.I.B.-UNAM/Secretaría de Salud, México, D.F.

Para estudiar la patogenicidad de los virus aislados de pacientes infectados con el VIH-1, utilizamos el modelo de ratón genéticamente inmunodeficiente transplantado con células mononucleares de sangre periférica humana (hu-PBL SCID Mouse). Ratones SCID se transplantaron con 20×10^6 de células humanas (PBL), 15 días después se inocularon con virus proveniente de los aislados primarios de los pacientes 10, 11, 14 y control positivo. La mitad de los ratones se sacrificaron a los 15 días y el resto a los 30 días postinfección. Se cuantificaron los linfocitos T CD4 y CD8 humanos en cavidad peritoneal, se aislaron los virus en cultivo en los tiempos mencionados y se detectó genoma

I Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Virus.

viral por PCR y antígeno viral p24 en el cultivo. Los virus evaluados se diferenciaron en su capacidad de destruir LT CD4. En la muestra 10 encontramos valores similares al control no infectado a los 1,5 días 19-23%, que disminuyeron a los 30 días a 8-15%. La 14 presentó una disminución intermedia (14-16%), que se mantuvo a los 30 días, mientras que la muestra 11 fue equivalente al control positivo (4-8% y 3-12%). Los valores de p24 producidos en los cultivos correlacionan con la destrucción de LT CD4. Por medio de PCR se amplificaron dos regiones específicas del VIH-1 (SK y LTR) en las células de cultivo, demostrándose integración viral en la mayoría de los casos. Se cuenta con secuencias de la región reguladora del VIH-1 (LTR) de los virus de estos pacientes, encontrándose diversas modificaciones genéticas. Estas modificaciones parecen no correlacionar con el efecto patogénico mostrado en este modelo y no mostraron cambios significativos en esta secuencia entre el virus inoculado y el virus recuperado en los ratones.

MODIFICACIONES AL WESTERN BLOT PARA RESOLVER RESULTADOS INDETERMINADOS EN EL DIAGNÓSTICO DEL VIH. Puente-Silva JA, Soler Claudín C. Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos I.I.B. UNAM/Secretaría de Salud, México, D.F.

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente etiológico de una de las enfermedades más terribles y devastadoras de nuestro tiempo: el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Millones de personas en el Mundo se encuentran infectadas con el VIH, y a nivel nacional, son miles las personas portadoras del virus. El diagnóstico de la infección con el VIH está basado en la detección de anticuerpos contra proteínas virales en ensayos de tamizaje y en la prueba con la que generalmente es confirmada la infección: el Western blot (Wb), que aunque proporciona resultados negativos y positivos, también otorga resultados indeterminados o inconclusos que provocan confusión y ansiedad a médicos y pacientes. Debido a esto, implementamos modificaciones al Wb convencional para evitar la pérdida total de la estructura nativa de algunas proteínas virales, no incluyendo un agente altamente desnaturante de las proteínas del virus, el ditiotretol (DTT), y tampoco hirviendo tales muestras de antígeno; con lo que logramos resolver el diagnóstico hasta en un 71%, según el criterio de interpretación de la OMS, en 260 muestras de sueros con resultados indeterminados. Esto lo obtuvimos efectuando la corrida simultánea de este WB modificado y el WB tradicional empleando en ambos casos las mismas muestras de suero. Observamos también, que el Wb modificado aumenta la sensibilidad para la detección de proteínas que son "clave" en el diagnóstico sin alterar la obtenida para proteínas igualmente importantes; ade-

más disminuye en un 45% los resultados cruzados. Sugerimos la aplicación de esas sencillas modificaciones para obtener un mejor diagnóstico confirmatorio de la infección con el VIH.

VARIANTES DE PAPILOMA VIRUS HUMANO Y ALTERACIONES DE b-CATENINA EN CÁNCER CÉRVICO UTERINO. Pereira AL^{1,2}, Lizano M³, Olivera P^{3,4}, García-Carrancá A^{2,3}. ¹CINVESTAV-IPN, ²Instituto de Inv. Biomédicas-UNAM, ³Instituto Nacional de Cancerología-SS, ⁴CICATA-IPN, México, D.F.

El cáncer cérvico uterino ocupa el primer lugar como causa de defunción por tumores malignos entre las mujeres mexicanas. Si bien las infecciones persistentes por algunos Papiloma Virus Humanos (HPV) constituyen el principal componente de esta enfermedad, existen alteraciones a nivel celular necesarias para la transformación completa. Se ha propuesto que algunas variantes moleculares de los HPV tipo 16 y 18 pueden tener un comportamiento biológico distinto y diferentes grados de patogenicidad. La proteína P-catenina es un importante activador transcripcional, su acumulación en el citoplasma y su posterior traslocación al núcleo se deben, principalmente, a mutaciones en este gen o en el gen APC. Se han encontrado mutaciones en la P-catenina en muchos tipos diferentes de tumores, tales como colon, melanoma, próstata, hígado, etc. El objetivo de este trabajo fue analizar la expresión y localización de P-catenina en tumores del cuello uterino, así como determinar el tipo de HPV y de sus variantes, en este grupo de tumores. Esto con la finalidad de establecer una posible correlación entre las variantes del tipo viral, con alteraciones de P-cat y la agresividad del tumor. En aquellos casos que presentaron niveles incrementados de P-cat por Western blot, la proteína se localizó generalmente en citoplasma y núcleo. No encontramos mutaciones en el exon 3, en estos tumores. Por el contrario, en aquellos que presentan una expresión normal, la P-cat se observó en la membrana celular. Estos resultados sugieren que las alteraciones de P-catenina que cambian su estabilidad o localización, podrían tener un rol importante en el desarrollo de este tipo de tumores. Finalmente, identificamos los tipos virales y sus variantes en estas muestras, mediante amplificación de una región del gen L1 y secuenciación directa de los productos de PCR, para conocer el papel que algunas variantes pueden tener en el desarrollo de esta enfermedad.

Apoyado parcialmente por CONACYT y PAPIIT-UNAM.

ALTERACIÓN DE LOS NIVELES DE p53, pRb y MYC EN TUMORES INDUCIDOS EN RATONES TRANSGENICOS PARA LAS PROTEÍNAS E6 Y E7 DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 16. Ocadiz-Delgado R¹, Marroquín-Chavira A¹, Covarrubias

A García-Carrancá, RM del Angel, R Rivera-Torres.

L², García Villa E³, Gariglio P^{1,3}. PiBioM, CICATA-IPN; ²IBT-UNAM, ³Depto. de Genética y Biol. Mol., CINVESTAV-IPN, México, D.F.

El cáncer cérvico-uterino es la segunda causa de muerte de mujeres mexicanas por lo que constituye un grave problema de salud. Datos epidemiológicos y de biología molecular indican que la infección por el virus del papiloma humano (HPV) tipos 16 y 18 constituye un factor de riesgo importante. Las oncoproteínas E6 y E7 producidas por estos virus se expresan constitutivamente en células de tumores cervicales; esta expresión es requerida para mantener a las células en un estado transformado. La proteína E6 induce la degradación de p53, un anti-oncogén, mientras que la proteína E7 se une e inhibe a la proteína Rb (anti-oncogén). Con el objetivo de desarrollar un modelo experimental, hemos desarrollado ratones transgénicos mediante inyección pronuclear los cuales expresan las proteínas E6 y E7 del HPV16. Mediante ensayos de biología molecular e inmunohistoquímica hemos detectado claramente la expresión de las proteínas E6 y E7, sin embargo estos ratones no desarrollan procesos tumorales *per se*. En este trabajo presentamos la inducción de tumores mediante el uso de un agente cancerígeno promotor (Benzo[a]pireno) y un agente inductor (TPA). Consistentemente, los ratones transgénicos tratados desarrollaron carcinomas de ovario. Por ensayos de inmunohistoquímica hemos detectado la expresión de las proteínas E6 y E7 del HPV-16 acompañada de una disminución en la expresión de las proteínas p53 y Rb previamente reportado en ratones transgénicos no tratados. Por otro lado, se ha detectado la sobre-expresión de la proteína MYC, el producto de uno de los oncogenes frecuentemente alterado en tumores cervicales. Estos resultados sugieren que estos ratones transgénicos E6/E7HPV16 representan un modelo experimental valioso para el estudio del desarrollo del cáncer en pasos múltiples.

PARTICIPACIÓN DE LA ONCOPROTEINA C-MYC EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR TEMPRANO DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO TIPO 18 (HPV 18). García-Hernández M de la L¹, García-Villa E², Gariglio P¹. ¹PMBM, CINVESTAV-IPN; ²Depto. de Genética y Biol. Mol., CINVESTAV-IPN, México, D.F.

Los virus del papiloma humano (HPV) poseen una doble cadena circular de DNA de unas 8,500 pb de longitud y se caracterizan por infectar epitelios. Algunos tipos son considerados de alto riesgo, por su relación que tienen con el desarrollo de cáncer cérvico uterino. Estos HPVs tienen tres secuencias oncogénicas que son E5, E6 y E7 cuya expresión depende del promotor temprano. En el HPV 18 este promotor se le conoce como. P 105 y contiene mu-

chos elementos de respuesta para varios factores de transcripción celulares. En este trabajo se muestra que P105 tiene elementos de respuesta a Myc-Max y que por medio de estos sitios Myc activa la transcripción del promotor P105 de HPV 18; también se muestra que Myc, Fos y Jun cada uno por separado activan a dicho promotor, sin embargo la combinación Myc-Fos y Myc-Jun da una activación mínima que se convierte en represión cuando están presentes de manera simultánea Myc-Fos-Jun, pudiendo ser un mecanismo de esto, la posible internación proteína proteína de Myc y Jun.

INHIBICIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE p53 y pRb EN RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN LAS PROTEÍNAS E6 y E7 DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 16. Marroquín-Chavira A¹, Ocadiz-Delgado R¹, Covarrubias L², García Villa E², Gariglio P^{1,3}. PiBioM, CICATA-IPN; ²IBT-UNAM; ³Depto. de Genética y Biol. Mol., CINVESTAV-IPN, México, D.F.

El cáncer representa un serio problema de salud, ocupando el segundo lugar como causa de muerte de la población. En particular, el cáncer cérvico-uterino. Datos epidemiológicos y de biología molecular indican que la infección por el virus del papiloma humano (HPV) tipos 16 y 18 constituye un factor de riesgo importante. Con base en lo anterior, y en el intento por obtener un modelo experimental que ayude a explicar las bases moleculares del cáncer, hemos desarrollado mediante métodos de ingeniería genética y biología molecular, ratones transgénicos capaces de expresar las proteínas oncogénicas E6 y E7 del Virus del Papiloma Humano tipo 16 (HPV16), las cuales tienen la propiedad de alterar a las proteínas p53 y pRb, respectivamente. En este trabajo reportamos, mediante ensayos de inmunohistoquímica, la alteración de la expresión de las proteínas p53 y pRb en ratones transgénicos E6/E7-HPV16. Los resultados indican que la expresión de ambas proteínas está disminuida en estos ratones, lo que concuerda con los mecanismos de acción de las proteínas E6 y E7. Estudios histológicos demuestran el desarrollo de procesos neoplásicos en diferentes órganos del ratón, sin embargo, no se ha detectado el desarrollo espontáneo de tumores lo que sugiere la necesidad de inducir un segundo paso en la transformación celular (p.ej. el empleo de carcinógenos). Estos datos muestran que estos ratones constituyen un valioso modelo para el estudio del desarrollo de tumores en etapas múltiples asociados con la infección por un virus.

CLONACIÓN, SECUENCIACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ONCOGENES E6 Y E7 DE VARIANTES DE HPV TIPOS 16 Y 18 ENCONTRADAS EN LA POBLACIÓN MEXICANA. Castellanos U, Carrillo AL,

I Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Virus.

Lizano M. División de Investigación Básica. Instituto Nacional de Cancerología, SS, México, D.F.

Los estudios epidemiológicos ubican al cáncer cérvico-uterino como la principal causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas. Los virus del papiloma humano y especialmente los tipos de alto riesgo se consideran los agentes principales en la etiología de este cáncer. A nivel mundial se conoce que el tipo de HPV que más frecuentemente se encuentra en los tumores invasores del cérvix es el 16, seguido por el 18. Las proteínas E6 y E7 de los HPV de alto riesgo son oncoproteínas que contribuyen de manera decisiva en la transformación mediante su efecto sobre proteínas que son críticas en la regulación del ciclo celular, particularmente p53 y pRb.

Los estudios de heterogeneidad genómica de HPV16 y HPV18 muestran la presencia de múltiples variantes en todas las poblaciones estudiadas con lo que surge un gran interés en la posibilidad de que existan diferencias en las características biológicas de estas variantes. Algunos autores proponen que la variabilidad genética de los HPV16 y 18 puede ser responsable del amplio espectro de patologías asociadas a estos tipos virales. En nuestro grupo se han aislado variantes de HPV16 y 18 en muestras de cáncer cérvico uterino de mujeres mexicanas. En particular, de acuerdo con las asociaciones que encontramos para las clonas de HPV18 y el tipo histológico de los tumores, sugerimos que ciertas variantes pudieran conferir diferentes riesgos a la enfermedad. Nuestro interés en este trabajo fue determinar si la secuencia de los oncogenes E6 y E7 de estas variantes pudiera predecir cambios en sitios importantes para la función biológica de las respectivas proteínas. Para ello hemos clonado los genes E6 y E7 en vectores de expresión tanto eucariote como procariote, mediante técnicas de DNA recombinante. La secuencia nucleotídica de los genes variantes mostró cambios con respecto a las secuencias de referencia, que pudieran repercutir en cambios funcionales de proteínas.

Estos plásmidos serán utilizados para la expresión de las proteínas *in vitro* e *in vivo* en estudios posteriores dirigidos al análisis funcional de las proteínas virales.

CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES DE HPV-16 Y HPV-18 EN LESIONES PREMALIGNAS Y MALIGNAS DEL CERVIX EN MUESTRAS DE MUJERES MEXICANAS. Gutiérrez JM, Carrillo AL, Solano JD, Lizano M. División de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, SS, México, D.F.

El cáncer cérvico uterino constituye la primera causa de mortalidad por neoplasias entre las mujeres mexicanas. Estudios epidemiológicos apuntan hacia un agente infeccioso como el factor de riesgo más importante para el desa-

rollo de la carcinogénesis genital: el papilomavirus humano (HPV). Un estudio internacional de cáncer cervical (IBSCC) reporta que DNA de HPV es detectable en más del 93% de cáncer cervical invasivo a nivel mundial. El HPV16 es el tipo viral más frecuentemente encontrado en cáncer de cérvix, apareciendo en 50% de los casos, en tanto que la presencia de HPV18 varía entre el 10% y el 20% de los casos.

Estudios recientes en distintas partes del mundo han mostrado la existencia de variantes moleculares de los tipos HPV16 y HPV18. Se piensa que dichas variantes pueden producir diferentes grados de patogenicidad, provocando una infección persistente o la progresión hacia una enfermedad cervical invasiva. En nuestro proyecto estamos identificando las variantes de HPV16 y HPV18 en biopsias de CaCu de mujeres mexicanas positivas a estos virus, así como en biopsias de lesiones premalignas. En estas últimas no se tiene un claro antecedente en cuanto al tipo de variantes de HPV16 y HPV18 presentes. Hasta el momento se han analizado un total de 30 muestras positivas a HPV16 y 6 muestras positivas a HPV18, utilizando la técnica de PCR con primers específicos. A su vez, en estas muestras se aplicó la técnica de PCR-SSCP; en este caso con los primers GP5/GP6 para amplificar una región del gen L1 del virus. Esta técnica permite identificar variantes del virus comparando su patrón electroforético con respecto al tipo considerado de referencia. De esta manera ha sido posible encontrar variantes en 16 de los 30 casos de HPV16 y en uno de los 6 casos de HPV18. Próximamente se hará la identificación de estas variantes mediante la técnica de secuenciación, del mismo modo se trabajarán las biopsias de lesiones premalignas. El conocimiento de las variaciones intratipo permitirá establecer la participación de las variantes de HPV en la historia natural del cáncer cérvico uterino, así como ayudar a predecir la evolución de las lesiones premalignas.

**PAPEL DE LOS ONCOGENES RAS Y E7 EN EL CONTROL CELULAR DE LA TRANSCRIPCIÓN TEMPRANA DEL HPV18. Zepeda H¹, García Carrancá A^{1,2}.
¹Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, ²Instituto Nacional de Cancerología-SS. México, D.F.**

Los papilomavirus humanos tipo 16 y 18 (HPV16 y 18) se encuentran con alta frecuencia en las lesiones malignas del cuello uterino. Los oncogenes virales, E6 y E7 son responsables de la inmortalización de las células, por su capacidad para inhibir a las proteínas supresores de tumores p53 y Rb, respectivamente. Es bien conocido, que se requiere de la cooperación de genes *ras* activados para la transformación completa de células que expresan E6 y E7. También se sabe, que existe un mecanismo celular que mantiene bajo estricto control la transcripción de E6 y E7. La expresión de estos oncogenes es regulada, por factores de

transcripción de la familia AP-1 (Jun y Fos), principalmente. Uno de los electores más conocidos de las vías de Ras es c-Jun, el cual es estimulado a través de la vía de las MAPcinasas y JNK. Por su parte E7, además de unirse a Rb, tiene la capacidad de unirse a c-Jun y activarlo. Reportes recientes han mostrado que en ciertas condiciones Fra-1, miembro de la familia Fos, forma complejos con Jun y actúa como represor de la transcripción. Lo anterior sugiere que mutaciones en los genes *ras* podrían alterar la regulación celular de la expresión de los oncogenes de HPV, a través de un mecanismo de retroalimentación que incluye E7. Para estudiar esto, hemos analizado la actividad transcripcional de genes reporteros que dependen de AP-1, en células transfectadas con *ras* y/o el oncogén E7. Nuestros resultados muestran que existe mayor actividad transcripcional cuando utilizamos E7 y *ras*, que la observada con solo uno de ellos, o ninguno. Por otro lado, utilizamos fibroblastos de ratón NIH-3T3 para obtener clonas que expresan de manera estable el oncogen *ras* y/o el oncogen E7 y, por medio de ensayos de Western-Blot, evaluamos la expresión de los componentes del complejo AP-1. Resultados preliminares nos indican que existen cambios importantes en la expresión de los componentes de este complejo, los cuales pueden ser relevantes para la regulación celular de la transcripción temprana del HPV.

Apoiado parcialmente por CONACYT.

POLIMORFISMO EN p53 Y VARIANTES DE HPV EN MUESTRAS DE CANCER CERVICOUTERINO. Ortiz-Gutiérrez F, Alonso-A JA, Reyes-L JR, Gariglio VP. Virología Molecular, CIBIOR-IMSS, CICATA-IPN, UPAEP, HGP.

El análisis de la diversidad molecular de los aislamientos virales de HPV16 ha sugerido que existen subtipos y variantes intratipo cuya diversidad genómica se puede correlacionar con sus propiedades biológicas. Se ha observado que algunas variantes de HPV16 son más prevalentes en diversas poblaciones humanas de distintas regiones del mundo lo que podría deberse a un efecto de selección por parte de la constitución genética de ese grupo étnico. Por otro lado, Storey ha sugerido que la presencia de un polimorfismo en el codón 72 del exón 4 de p53 (cambio de Pro por Arg) puede incrementar hasta en siete veces la susceptibilidad al desarrollo del CaCu sobre todo si se encuentra asociado con la presencia de algún tipo de virus HPV de alto riesgo. Por lo tanto, como algunos estudios sugieren que existen variantes propias de la población mexicana con mayor o menor potencial oncogénico (Lizano y col.), en este trabajo decidimos identificar los principales linajes de HPV16 asociados a muestras neoplásicas del cuello uterino así como analizar la relación entre el polimorfismo en el exón 4 de p53 con la presencia de HPV de alto riesgo

y la susceptibilidad al cáncer cervicouterino en pacientes mexicanas. En un lote de 30 muestras de CaCu embebidas en parafina identificamos HPV16 mediante PCR utilizando primers específicos. Se amplificaron y secuenciaron (secuenciación directa) los genes E6, E7 y una región del gen L1. Asimismo, identificamos en estas mismas muestras el polimorfismo en el exón 4 de p53. Nuestros resultados preliminares indican que la mayoría de los HPV16 pertenecen al linaje E-350G (Yamada, 1997) y hemos detectado también algunas mutaciones aún no reportadas en el gen E6. Más aún debido a que el promedio de edad de las pacientes fue de 33 años sugerimos que efectivamente existen variantes más oncogénicas de HPV16 que están infectando a las mujeres mexicanas. Finalmente, debido a que la mayoría de las muestras fueron heterocigotas para el polimorfismo 72 del exón 4 de p53, sugerimos que no existe correlación entre este polimorfismo con una mayor susceptibilidad al CaCu.

RESPUESTA HUMORAL CONTRA LAS PROTEINAS L1 Y E2 DEL HPV16 EN MUJERES CON LESIONES PRECURSORAS Y CÁNCER CÉRVICO UTERINO. Pereira AL^{1,2}, Rocha L², Alejandro J², Cruz Talonia F³, García-Carrancá A^{2,4,1}. CINVESTAV-IPN, ² Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, ³ Hospital General de México-SS, ⁴ Instituto Nacional de Cancerología-SS, México, D.F.

Las infecciones persistentes por virus del papiloma humano (HPV), son consideradas como el evento crítico para el desarrollo del cáncer cérvico-uterino. El genoma del HPV tipo 16 se encuentra en cerca de la mitad de todos los tumores de esta región. La proteína L1 es el componente mayoritario de la cápside viral y es utilizada, junto con L2, en protocolos de vacunación. La proteína E2 es un regulador transcripcional que regula de manera negativa la expresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7. El propósito del presente trabajo fue estudiar los niveles de anticuerpos contra las proteínas L1 y E2 del HPV16, en mujeres con distintas lesiones del cuello uterino y, tratar de correlacionarlos con la presencia del virus. Se examinaron un total de 63 pacientes, las cuales fueron diagnosticadas por colposcopia como: infección por HPV (n=21), NICI/IFIII (n=26), o cáncer cervical (n=16). Además, como controles se utilizaron 10 muestras del personal del laboratorio. La presencia de anticuerpos IgA e IgG contra las proteínas L1 y E2 del HPV16, fue analizado por ELISA utilizando proteínas recombinantes derivadas de baculovirus. La presencia de secuencias virales fue establecida mediante PCR, utilizando los primers universales GP5-GP6 ó MY09-MY11. Nuestros resultados muestran que no existe asociación entre presencia de HPV y los anticuerpos circulantes contra L1 y E2. Por otro lado, mientras que los niveles de

I Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Virus.

anticuerpos a-E2 correlacionan con las lesiones más avanzadas, los anticuerpos de clase IgA secretoria están muy elevados en pacientes con infección por HPV. A diferencia de los anticuerpos a-E2, los anticuerpos a-L1 no muestran ninguna asociación con el grado de las lesiones. Es interesante resaltar, que se encontraron niveles altos de anticuerpos contra la proteína E2, y en particular contra L1, en los controles normales, lo cual sugiere que puede existir una elevada incidencia de infección en la población sana. Apoyado parcialmente por PAPIIT-UNAM.

UN ADENOVIRUS RECOMBINANTE CON EL GEN E2 DEL HPV18 PARA LA TERAPIA DEL CÁNCER CÉRVICO-UTERINO EN MÉXICO. León-Ramírez Ma de JE¹, Yaniv M², Thierry F², García-Carranca A^{1,3}. Instituto Nacional de Cancerología, SSA.,² Institut Pasteur,³ Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Los HPV16 y 18 están muy relacionados con el desarrollo del cáncer cérvico uterino pues en casi todos los tumores se encuentra DNA de estos virus integrado al genoma celular y con pérdida del gen E2. Los oncogenes E6 y E7 inducen la proliferación, mientras que E2 reprime su transcripción al unirse al DNA viral. La expresión del gen E2 en células HeLa, donde se expresan E6 y E7, reprime su transcripción, incremento los niveles de p53, produce un arresto en la fase G1 del ciclo celular e induce apoptosis. En el laboratorio hemos mostrado que la inyección del gen E2, en tumores de células HeLa generados en ratones atímicos, reduce el crecimiento tumoral. Para hacer más eficiente este sistema, se construyó un adenovirus recombinante (Rad) que carece de los genes E1A y E1B y expresa el gen E2. Esto se logró mediante la recombinación de secuencias homólogas en bacterias, utilizando un plásmido con el gen E2 del HPV18 flanqueado por secuencias del adenovirus tipo 5 (Ad5) y otro plásmido que posee el genoma de éste, clonado como un fragmento PacI. Se generaron stocks virales y con ellos se obtuvieron preparaciones con altos títulos, con las cuales se evaluó mediante ensayos de Western blot y "binding", la expresión de E2 en tumores y células en cultivo. Se utilizaron Rad con los genes GFP y Bgal, como control. Pretendemos evaluar la utilidad de este sistema como terapia complementaria al tratamiento del CACU en México.

Este trabajo cuenta con apoyo parcial de la SSA, el CONACYT y el PAPIIT, UNAM.

EXPRESIÓN CONTINUA DEL GEN DE LA INTERLEUCINA 8 COMO CONSECUENCIA DE LA PRESENCIA DE VARIANTES VIRALES DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO. Tirado R¹, Ortega-Soto A², Gómez-García B¹. Depto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.² Depto.

Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN, México, D.F.

La fisiopatología del virus sincicial respiratorio (RSV) puede asociarse a la replicación y propagación preferencial de RSV en el epitelio respiratorio, además del efecto de mediadores solubles de la respuesta inmune e inflamatoria. La magnitud de la respuesta inflamatoria en el tracto respiratorio parece estar regulada principalmente por citocinas y quimocinas producidas por células epiteliales, lo que tiene como resultado la migración y activación de subpoblaciones leucocitarias responsables de los procesos inflamatorios en el tracto respiratorio. Tal es el caso de la quimocina IL-8, la cual se ha encontrado en concentraciones elevadas durante la infección del epitelio respiratorio por RSV. La persistencia de RSV en esta estirpe celular puede contribuir a la fisiopatología de los padecimientos crónicos pulmonares, como consecuencia de alteraciones funcionales y a la presencia de células inflamatorias. Actualmente se desconoce el efecto de la persistencia del RSV en la inducción de la síntesis de IL-8 y su posible asociación con procesos inflamatorios crónicos. Por lo anterior se propone un modelo *in vitro* de infección persistente en células del epitelio respiratorio (A549), a través del cual se pueda explicar la asociación entre la persistencia de RSV y la inducción de la síntesis de IL-8 con procesos inflamatorios crónicos. Los resultados de la inducción de IL-8 a partir de cultivos A549per sugieren que la persistencia viral puede inducir de manera continua la expresión de IL8. La inducción continua puede ser consecuencia de la presencia de variantes virales, por lo que se analizó su participación en este proceso en células A549norm infectadas con los sobrenadantes de los cultivos A549per, previamente inactivados con luz UV y calor. Los resultados demostraron la inducción de IL-8, lo que sugiere que la sola interacción de la partícula viral con su receptor puede desencadenar la señal para la síntesis de IL-8.

PRESENCIA DE VARIANTES VIRALES DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO EN UN CULTIVO DE MACRÓFAGOS PERSISTENTEMENTE INFECTADO. Sarmiento RE, Gómez-García B. Depto. de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, UNAM, México, D.F.

Las infecciones virales se caracterizan por presentarse en forma aguda o persistente. En la infección aguda el sistema inmune del hospedero es capaz de eliminar al virus. En una infección persistente, la desaparición de los síntomas no va acompañada de la eliminación del virus, a pesar de que el sistema inmunológico del huésped responde a la infección y generalmente la respuesta inmune es permanente. El mecanismo por el cual un virus de RNA

citólítico puede establecer y mantener una infección persistente no está completamente entendido, pero probablemente involucra cambios tanto en la célula hospedera como en el virus. En el laboratorio se estableció un cultivo infectado persistentemente con el virus sincitial respiratorio (RSV), el cual se ha cultivado por más de dos años. La persistencia viral se ha comprobado por presencia de virus intra y extracelular (TCID50), RT-PCR, superinfección, análisis de las proteínas virales por inmunoblot, presencia de antígeno viral en las células infectadas por inmunofluorescencia y por ensayo de Facs. Es importante señalar el comportamiento de los sobrenadantes del cultivo *per* en las células VERO, producen focos de infección, no producen sincitio pero, sí originan muerte celular, lo que sugiere que el virus se une a la célula, la infecta y se expresa el genoma viral. Una posible explicación son cambios en la proteína F, puesto que es la responsable de la formación de sincitio. El papel de la proteína Fl en la patogénesis se ha sugerido porque en células que carecen de proteasas que cortan F0 los virus producidos no pueden completar su ciclo de replicación viral. Con base en los resultados anteriores hemos decidido estudiar los cambios en la proteína F responsable de la posible variante no formadora de sincitio, se determinará si el genoma viral expresado en células VERO puede producir sincitios en células H358. Lo que indicaría cambios en el genoma viral.

ESTUDIO ETIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS VIRALES EN MÉXICO DURANTE EL PERIODO 1995-1999. Flores-León R, Iguala-Vidales M, Hernández-Hernández E, López-Martínez I. INDRE, México, D.F.

Las Infecciones Respiratorias Agudas (IRA's) pueden ser de etiología viral o bacteriana. Su impacto socioeconómico y de salud pública es considerable; en general, casi una cuarta parte de las consultas médicas se relacionan con enfermedades de las vías respiratorias. En México, la información epidemiológica acerca de las IRAs virales es limitada e imprecisa, por ello es necesario establecer programas de vigilancia que aporten datos reales y objetivos sobre el panorama epidemiológico nacional de éstas.

El objetivo fue identificar a los diferentes agentes virales causantes de IRA's en la población mexicana durante el período 1995-1999.

Se obtuvieron 3180 muestras clínicas de pacientes con IRA's provenientes de centros de salud y hospitales de varios estados de la República Mexicana y del DF; se colectaron gargarismos, exudados faríngeos y sueros pareados. Los virus se aislaron en embrión de pollo y cultivo celular; fueron identificados por inmunofluorescencia indirecta, inhibición de la hemaglutinación y por pruebas

inmunoenzimáticas.

De las muestras colectadas, 286 fueron positivas a alguno de los virus estudiados, que corresponden al 9.0% del total: influenza 130 (4.1%); adenovirus 97 (3.0%); virus sincitial respiratorio (VSR) 41 (1.3%) y parainfluenza 18 (0.6%).

AISLAMIENTO Y SECUENCIACIÓN DE UNA CEPA DE ASTROVIRUS HUMANO SEROTIPO 8. Romero Guido P, Méndez M, Munguía ME, López S, Arias C, Méndez E. Depto. de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología-UNAM, Cuernavaca, Morelos.

En diversos estudios se ha encontrado que los astrovirus son el segundo agente viral causante de diarreas en infantes. A la fecha se han identificado 8 serotipos en humanos (H-Ast1-8), siendo H-Ast1 el de mayor prevalencia. Los astrovirus son partículas no envueltas con apariencia tipo estrella al microscopio electrónico y un genoma de RNA de cadena sencilla de polaridad positiva. En nuestro laboratorio demostramos la presencia de astrovirus en muestras de heces recolectadas en distintas regiones de México durante el periodo de 1994-95. Con el objetivo de realizar estudios moleculares con una cepa de astrovirus nativa de México, decidimos aislar una cepa y adaptarla a crecer en cultivos celulares (denominada H-AstM). Después de siete pases en cultivo, aislamos RNA viral a partir de células infectadas y lo secuenciamos por RT-PCR. H-AstM contiene un genoma de 6779 nucleótidos (nt) iniciando con una región no traducida (RNT) de 83 nt en el extremo 5', seguido por tres marcos abiertos de lectura (ORF 1a, 1b y 2), y finalizando con una RNT de 85 nt y un fragmento de poli(A) en el extremo 3'. Los ORF1a y 1b codifican para proteínas de 920 y 518 aminoácidos (aa), respectivamente. Al comparar estas regiones con las secuencias completas reportadas en el banco de genes (H-Ast 1, 2 y 3), observamos que son muy conservadas entre los distintos serotipos (93-98% de identidad a nivel de aa), conservando los motivos previamente reportados (hélices transmembranales, serin proteasa, señal de localización nuclear, señal para cambio de marco de lectura en la traducción y el de RNA polimerasa). Por otro lado, el ORF2 codifica para una proteína de 783 aa que constituye el precursor de las proteínas de la cápside del virus. La secuencia del ORF2 de H-AstM presenta una identidad del 94.8 % a nivel de aa con cepas de serotipo 8, seguida del 73.3 % con cepas de serotipo 5. Así, la cepa que hemos aislado corresponde a serotipo 8 y de esta manera, representa la primera secuencia completa de un astrovirus de humano de serotipo 8 reportada.

DIVERSIDAD DE SEROTIPOS DE ASTROVIRUS DE HUMANO EN MEXICO. Méndez-Toss M, Griffin DD, Contreras JF, Guiscafré H, Cedillo R, Puerto F, Herrera

I Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Virus.

I, Mota F, Muñoz O, López S, Arias CF y el Grupo Mexicano para el Estudio de las Enfermedades Gastrointestinales. Depto. de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM Cuernavaca, Morelos.

Los agentes etiológicos más importante de las gastroenteritis virales infantiles son los rotavirus, seguidos por los astrovirus (H-Ast). De estos últimos se han identificado ocho serotipos (1-8). Hasta ahora no han habido estudios sobre los serotipos de astrovirus circulantes en México. De Octubre de 1994 a Marzo de 1995 se colectaron muestras de heces de niños menores de dos años, con y sin gastroenteritis, en cinco diferentes ciudades del país (Mérida, México D.F., Monterrey, San Luis Potosí, y Tlaxcala). Encontramos que 24 de 523 muestras diarreicas (4.6%) y 11 de 427 muestras control (2.6%), resultaron positivas para astrovirus. De estas 35 muestras, 7 (20%) resultaron también positivas para rotavirus. Se determinó el serotipo de 26 de las cepas de astrovirus colectadas, a través de secuenciar la región 3'-terminal del genoma (últimos 210 nt del ORF2). De estas 26 muestras, 9 (35%) fueron serotipo 1; 6 (23%) serotipo 2; 4 (15%) serotipo 3; 3 (12%) serotipo 4; 1 (4%) serotipo 6; y 3 (12%) serotipo 8, lo cual indica que en nuestro país circulan al menos seis de los ocho serotipos de H-Ast reportados. No hubo una asociación clara entre ninguno de los serotipos y la presencia o ausencia de síntomas. Es interesante notar que los virus de serotipo 8 se encontraron únicamente en la Cd. de Mérida.

PREVALENCIA DE LOS VIRUS DE EPSTEIN BARR (VEB) HUMANO-6 (HHV-6) EN CASOS DE ENFERMEDAD DE HODGKIN. Rojo J, Romero M, Cruz H, Inzunza G, Hütter ML, Krueger GRF. Banco de Sangre. U. De Patología, Hospital General de México/Fac. De Medicina, UNAM. Lab. De Inmunopatología, Universidad de Colonia, Alemania.

La EH constituye un grupo heterogéneo de enfermedades en el término clínico de inmunofenotipo y en el de asociación viral. Estudios con técnicas de biología molecular han mostrado los genomas del VEB y del HHV-6. La EH ocupa en el Hospital General de México los primeros lugares de morbimortalidad en el grupo de tumores malignos. **Objetivo:** conocer la frecuencia en un grupo de 44 pacientes con EH de la presencia de Acs. VEB y HHV-6 con la técnica de coexpresión de proteína latente de membrana (LMP) e hibridación in situ en tejido ganglionar de parafina. De los archivos de patología de 1990 con EH (clasificación de Rye) se tomaron 44 casos al azar y se enviaron a Alemania en donde se empleó la técnica de APAAP (fosfatasa alcalina-anti-f. alcalina) y de LMP para determinar VEB y HHV-6. Se descartaron 3 casos por insuficien-

tes. De los 41 restantes, se encontraron: 19 (46%) con esclerosis nodular, 16 (39%) con celularidad mixta y 3 (7.5%) con predominio linfocitario. Con respecto a la LMP de VEB fueron positivos 12/19 con esclerosis nodular, 13/16 con c. mixta, 2/3 con predominio linfocitario y 1/3 con disminución linfocitaria; un total de 28 casos positivos (68%). El genoma del VEB se encontró en el núcleo de las cels. de Reed-Sternberg y células de Hodgkin. Trece casos fueron positivos al HHV-6 (29.5%). Aunque no es claro el papel de los virus en la linfomagénesis, ni es posible establecer el grado de su interacción, la infección persistente podría jugar un papel en la patogénesis de la EH alterando el control del circuito entre apoptosis y proliferación celular como se ha visto in vitro. Sin embargo in vivo no existe evidencia de su asociación, ya que su positividad es independiente, sobretodo en lo referente a HHV-6. El VEB se encontró con mayor asociación a la variedad c. mixta como es referido por otros autores.

EXPRESION DEL GENOMA DEL VIRUS EPSTEIN-BARR EN CASOS DE ADENOCARCINOMA GASTRICO EN MEXICO. Henaine-Breton R¹, Herrera-Goepfert R¹, Gómez-Ruiz C¹, Trejo-Avila LM^{1,2}. Instituto Nacional de Cancerología, S.S., México, D.F. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Monterrey, N.L.

El virus Epstein Barr (VEB) se ha asociado en linfoma de Burkitt, enfermedad de Hodgkin y no-Hodgkin y carcinoma de tipo linfoepitelioma (especialmente de nasofaringe). Recientemente varios autores han informado asociación de VEB en carcinoma gástrico. En México se ha reportado una alta frecuencia de asociación con VEB en linfomas Hodgkin y no Hodgkin.

Objetivo. Demostrar la asociación de VEB en adenocarcinomas gástricos mediante la detección de productos de expresión del virus (RNA EBERs).

Métodos. Se estudiaron biopsias de 87 pacientes con cáncer gástrico obtenidas por endoscopia alta con fibrogastroscopio y/o videogastroscopio, las muestras fueron incluidas en parafina, se realizaron cortes de 2-3 micras de espesor. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina para establecer el diagnóstico morfológico e histológico. La detección de VEB se realizó por hibridación "in situ" con una sonda para los RNA de pequeño tamaño (EBERs) del VEB.

Resultados. Las 88 muestras de tumores fueron clasificadas como adenocarcinomas tipos difuso y/o intestinal, 55 poco diferenciados, 14 moderadamente diferenciados, 2 indiferenciado, 1 bien diferenciado y en 16 no se reportó grado de diferenciación, la expresión de secuencias EBER de VEB fue demostrada en los núcleos de las células de tumor en dos adenocarcinomas gástricos típicos uno poco diferenciado y uno moderadamente diferenciado, y en células linfoides infiltradas en un adenocarcinoma gástrico poco

A García-Carrancá, RM del Angel, R Rivera-Torres.

diferenciado.

Conclusiones: Los resultados confirman la asociación de VEB con carcinomas gástricos típicos en el país, sin embargo la prevalencia es más baja que la encontrada en Estados Unidos.

BUSQUEDA DE MINIGENES TOXICOS EN EL GENOMA DEL BACTERIOFAGO LAMBDA. Oviedo, N, Guarneros G. Depto. de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN, México, D.F.

Existen dos minigenes *bar* en el bacteriófago lambda que al ser sobreexpresados en plásmidos, inhiben la síntesis de proteínas y provocan la muerte de la bacteria. Esto se debe al secuestro del tRNA en peptidil-tRNA (producto de la traducción de los minigenes), el cual no es hidrolizado eficientemente en una mutante deficiente en peptidil TRNA hidrolasa (Pth). El presente trabajo busca identificar nuevos minígenes tóxicos provenientes del genoma del bacteriófago lambda para conocer el número, distribución y posible papel como reguladores de la traducción. La búsqueda de minigenes por computadora en la secuencia de ambas cadenas del DNA genómico de lambda, identificó 153 candidatos. Se creó una biblioteca con pequeños fragmentos del DNA genómico de lambda (<100 pb) en el plásmido pDH520 bajo el promotor pL, reprimido por el represor termosensible cI857 presente en la cepa, lo que permite la expresión de los minigenes tóxicos solamente a 42°C. Se seleccionaron candidatos con plásmidos tóxicos que fueron secuenciados para identificar posibles minigenes y su localización en el genoma de lambda. Se han encontrado cinco minigenes tóxicos de los cuales algunos corresponden a candidatos previamente identificados en la búsqueda. Se clonó también un fragmento que contiene un minigen en el extremo 5' del mRNA del gen *cro* bajo el control de su propio promotor (pR), la sobreexpresión de éste a 42°C tuvo un efecto letal. Los 5 minigenes son tóxicos en cepas mutantes y 3 de ellos son tóxicos aún en la cepa silvestre para pth. La localización de minigenes río arriba o en el extremo 3' de genes sugiere la participación de los minigenes como moduladores de la traducción.

EL MINIGEN *barII* REGULA LA EXPRESION DEL GENE *cIII* DEL BACTERIOFAGO LAMBDA. Magos-Castro MA, Hernández-Sánchez J, Guarneros-Peña G. Depto. de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN, México, D.F.

Se han descrito en el genoma del bacteriófago lambda dos minígenes denominados *barI* y *barII*. Al ser sobreexpresados en un sistema plasmídico, estos minígenes provocan una inhibición generalizada en la síntesis de proteínas del huésped. El efecto de las regiones *bar* es más

dramático si la célula es deficiente en la peptidil-tRNA hidrolasa (Pth), una enzima esencial para la bacteria. El minigen *barII*, precede al gene *CIII*, el cual es necesario para que el desarrollo del fago se dirija a la vía lisogénica. Ya que el papel fisiológico de *bar* se desconoce, estudiamos la posibilidad de que *barII* estuviera afectando la expresión de *CIII*. Se ha reportado que la sobreproducción de la proteína CIII provoca letalidad celular, por lo que seguimos la expresión de *CIII* por inhibición del crecimiento de cultivos. Los resultados indicaron que el minigen silvestre *barII* inhibió la expresión de *CIII*. Este resultado fue confirmado en un ensayo de transcripción-traducción *in vitro* usando las mismas construcciones plasmídicas empleadas en los experimentos *in vivo* para dirigir la síntesis. La proteína CIII se produjo cuando *bar205*, un minigen mutante *barII*, antecede al gen *CIII* o cuando se eliminó *barII* por completo. Los niveles reducidos de la proteína CIII correlacionaron con niveles bajos *in vivo* de RNA específico para *CIII* en presencia de *barII* silvestre. Por lo contrario, el minigen mutante o la ausencia del minigen determinaron mayores niveles de RNA CIII. Igualmente la presencia del transcrito específico de la región *barII* dependió de la mutación *bar205*. De estos resultados concluimos que *barII* inhibe la expresión del gene *CIII*.

ANALISIS DE LOS COMPLEJOS RIBONUCLEOPROTEICOS ENTRE EL RNA DE POLIOVIRUS Y LAS PROTEINAS DE TEJIDOS PERMISIVOS Y NO PERMISIVOS. Escobar, H.J., Gutiérrez-E AL, Del Angel RM. Depto. de Patología Experimental, CINVESTAV-IPN, México, D.F.

El genoma de poliovirus (PV) es un RNA de cadena sencilla y polaridad positiva que no posee la estructura 'cap' por lo que la formación del complejo de iniciación de la traducción ocurre mediante la unión de los ribosomas a una secuencia interna la región no traducida 5' denominada IRES. Este proceso requiere de la participación de los factores canónicos y de otras proteínas celulares como las proteínas La, PTB y PCBP2. Estudiando las interacciones entre el IRES de poliovirus con proteínas presentes en tejidos de ratón permisivos (cerebro y músculo) y no permisivos (timo y riñón) a la infección por poliovirus encontramos una correlación entre la unión con una proteína de 97 kDa (p97) y la permisividad a la infección. El peso molecular de esta proteína es semejante al de la proteína unr, indispensable para la traducción de rinovirus. Mediante ensayos de transferencia tipo "western blot" detectamos que la unr se encuentra presente en extractos de células HeLa, cerebro, músculo y timo de ratón, y ausente en los de riñón. La unr presente en extractos de células HeLa y de cerebro forman parte del complejo ribonucleoproteico con el IRES de poliovirus. Su adición como proteína recombinante en en-

I Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Virus.

sayos de entrecruzamiento con extractos de células HeLa, cerebro, músculo y timo es responsable del aumento en la interacción de ella misma así como de la de PTB. Sin embargo cuando se añade a extractos de riñón no modifica la interacción con alguna proteína, por lo que pensamos que este tejido carece de algunos de los elementos necesarios para que ésta pueda unirse.

IDENTIFICACION DE UNA PROTEINA DE 97 kDa PRESENTE EN TEJIDOS SUSCEPTIBLES A LA INFECCION POR POLIOVIRUS. García-Cruz J, del Angel RM. Departamento de Patología Experimental del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México D.F.

El tropismo de Poliovirus no está limitado a la expresión del receptor viral (PVR) y puede estar controlado en procesos posteriores a su entrada a la célula, como en traducción, replicación o ensamblaje del virión. La traducción del RNA de Poliovirus, que ocurre por un mecanismo independiente del reconocimiento del cap, requiere de la interacción de la región no traducida 5' (RNT 5') con factores celulares. Se ha encontrado que las proteínas que se unen a la RNT5' presentan un patrón característico en diferentes células y tejidos como en HeLa, cultivo primario de riñón, músculo, cerebro, timo y riñón de ratón. A pesar de las diferencias en la unión de proteínas se encontró una correlación entre la unión de una proteína de 97 kDa (p97) y la permisividad a la infección por poliovirus. Así, la p97 sólo se encontró entrecruzada con la RNT5' de Poliovirus cuando se usaron extractos de células HeLa y de tejidos permisivos, (músculo, cerebro, y cultivo primario de riñón), mientras que no se observó su interacción en presencia de los extractos de tejidos no permisivos (Timo y Riñón) (Gutiérrez-Escolano, 1997). Esto sugiere que esta p97 puede no expresarse o expresarse en cantidades mínimas en aquellos tejidos no permisivos, o bien, su unión requiere de factores que no están presentes en los tejidos no permisivos. Para abordar esta hipótesis realizamos ensayos de entrecruzamiento bidimensionales y unidimensionales de los diferentes tejidos (permisivos y no permisivos) adicionados con la p97 de células HeLa. Los resultados de entrecruzamiento bidimensional muestran que las cuatro proteínas de 97 kDa provenientes de células HeLa, cultivo primario de riñón, músculo y cerebro de ratón presentan un punto isoeléctrico de aproximadamente 6.75 (pH). La proteína de 97 kDa de células HeLa, previamente electroeluida, no entrecruza con la RNT5' de poliovirus (PV), sin embargo, extractos S10 de células HeLa, cerebro y músculo de ratón, a los que fue adicionada esta proteína electroeluida, muestran un incremento en la intersección con la RNT5' en ensayos de entrecruzamiento unidimensional. Cuando se adiciona esta p97 electroeluida a extractos de timo y cere-

bro de ratón, no se detecta entrecruzamiento de la p97. Estos resultados sugieren que es necesaria la presencia de proteínas diferentes a P97 que se encuentran presentes en los tejidos permisivos y que ayudan a ésta a unirse a la RNT5' de PV. Los ensayos de resistencia a sal mostraron que la intersección de la p97 de células HeLa y de músculo y cerebro de ratón con el IRES de PV es estable, ya que resiste concentraciones de 300 mM de KCl.

EFFECTO DE LA COADMINISTRACION DE LA PROTOXINA CRY CON EL ANTIGENO DE SUPERFICIE DE LA HEPATITIS B POR LAS VIAS INTRANASAL Y RECTAL EN LA RESPUESTA INMUNE MUCOSA Y SISTEMICA EN RATON. Esquivel-Pérez MR, Moreno-Fierros L. Unidad de Morfología y Función, ENEP Iztacala-UNAM, México, D.F.

Los virus de la Hepatitis B, del papiloma humano, *cándida*, *clamidia* y el virus de la inmunodeficiencia humano (VIH) afectan a través del tracto genital y además el VIH por la mucosa rectal, por lo que se requiere desarrollar estrategias de vacunación capaces de estimular la respuesta inmune en las mucosas. En las estrategias de vacunación existentes para la inducción de respuesta en mucosas se tienen desventajas como su toxicidad, inestabilidad y su alto costo de producción limitando su aplicación en humanos, por lo que se requiere desarrollar adyuvantes no tóxicos, efectivos y de bajo costo. La vacuna disponible contra el virus de Hepatitis B es segura y efectiva en individuos jóvenes y sanos, sin embargo la persistencia de Ab anti HbsA declina rápidamente por lo que no es confiable para la población en general. Previamente demostramos que Cry es un potente inmunógeno sistémico y mucoso cuando se administra por las vías intraperitoneal y oral, para caracterizar mejor en la respuesta inmune en mucosas y sistémica contra proteínas no relacionadas se coadministró (en ratones Balb/c) Cry o la Toxina de Cólera por las vías intranasal (IN) y rectal (R) con el antígeno de superficie de la hepatitis B (HbsA) y se evaluó por ELISA la respuesta de anticuerpos (Ab) de diferentes isotipos en suero, líquidos intestinales y de tracto respiratorio, Cry y la Toxina de Cólera tuvieron efectos (positivos, negativos y nulos) en la respuesta de Ab anti HbsA. La coadministración de Cry con HbsA por la vía IN incrementó la respuesta de IgM en suero, de IgA en intestino delgado y de IgM en tráquea, mientras que por la ruta R incremento la respuesta de IgA en intestino delgado. Nuestros resultados indican que los efectos adyuvantes de Cry y de la Toxina de Cólera varían dependiendo de la ruta de inmunización, del isotipo y de la región donde se analiza la respuesta, el HbsA puede ser administrado intranasalmente, Cry puede ser útil como vector vacunal y adyuvante debido a su inmunogenicidad en mucosas, su inocuidad y su bajo costo de producción.

USO DE FILTROS MICRO KLEAN PARA CONCENTRACIÓN DE ENTEROVIRUS. Suárez CH, Ramírez AV. Subcoordinación de Calidad del Agua, Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA).

Los virus entéricos humanos son excretados en las heces de individuos infectados y pueden contaminar directa o indirectamente agua destinada para consumo humano. Estos virus son excretados en grandes cantidades (10^8 a 10^{10} partículas virales por g de heces) por individuos infectados. Los enterovirus (poliovirus, coxsackie A y B y ecovirus) pueden causar una variedad de enfermedades que van desde gastroenteritis a miocarditis y meningitis aséptica. Se han documentado numerosos estudios de la presencia de enterovirus en agua con y sin tratamientos de potabilización. Los métodos de concentración de virus por adsorción-elución en filtros son los más frecuentemente utilizados en el monitoreo de virus en grandes volúmenes de agua. Hay dos tipos de filtros usados para concentración de virus de agua: los cargados positivamente y los que usan carga negativa. Los filtros electropositivos permanecen cargados positivamente hasta un pH cercano al 8 y pueden absorber el 99% de los poliovirus de la mayoría de las aguas a pH 7.5 sin adición de cationes. Los filtros electronegativos requieren acondicionamiento del agua mediante el ajuste del pH y adición de cationes ($MgCl_2$ o $AlCl_3$) para optimizar la absorción. En este trabajo resumimos los resultados de la aplicación de dos tipos de filtros electropositivos disponibles comercialmente, el MK y el Micro Klean III en la concentración de virus atenuados de la polio agregados a muestras de agua de la llave. La efectividad de los filtros MK para captación de virus ha sido demostrada en trabajos previos cuando se compara con el IMDS, pero no se tienen antecedentes de análisis con filtros Micro Klean III. Los resultados obtenidos indican que la captación de virus del filtro Micro Klean III con respecto al MK en igualdad de condiciones de filtrado es equivalente o superior, y el costo del Micro Klean III es de aproximadamente la mitad del MK, cuestión importante en función a que uno de los obstáculos para desarrollar procesos de detección de virus es su alto costo de aplicación.

CONJUNTIVITIS HEMORRÁGICA AGUDA ASOCIADA A ADENOVIRUS DURANTE 1998 EN LA REPÚBLICA MEXICANA. López-Martínez I, Barrera-Badillo G, Florez-León R, Iguala-Vidales M. INDRE, México, D.F.

Desde 1953 se han descubierto aproximadamente, 100 serotipos de adenovirus y al menos 42 de éstos infectan al ser humano. Se han subdividido por sus características en siete grupos (A-G), de los cuales el grupo D (tipos: 8, 10, 13, 15, 17-20, 22-30, 32, 33 y 36-39) se ha asociado

con conjuntivitis y fiebre faringoconjuntival.

La conjuntivitis viral es un problema de salud pública por ser altamente transmisible, perturbando la vida cotidiana de los individuos afectados.

El objetivo del presente estudio fue determinar el comportamiento epidemiológico que tuvo la conjuntivitis hemorrágica aguda asociada a adenovirus durante el brote producido en distintos estados de la República Mexicana en el período comprendido entre agosto y noviembre de 1998.

Las muestras clínicas fueron 567 raspados conjuntivales de pacientes que presentaron conjuntivitis hemorrágica aguda. El aislamiento se hizo a través de cultivo celular y la confirmación por inmunofluorescencia indirecta.

Se obtuvieron 204 muestras positivas para adenovirus, los grupos de edad más afectados fueron de 15 a 24 y de 25 a 44 años, siendo el sexo femenino el más afectado la sintomatología más común presentada fue fotofobia, secreción, prurito, hiperemia, cefalea, dolor ocular, derrame vascular y fiebre.

ESTUDIO DE LA SELECTIVIDAD CATALÍTICA DE LA NEURAMINIDASA DEL RUBULAVIRUS PORCINO. Santos López G^{1,2,3}, Flores RE¹, Herrera-C IP², Reyes-L J¹. Lab. Virología CIBIOR-IMSS, Puebla, Centro de Química ICUAP; ² CICM-ICUAP.

La familia *Paramyxoviridae* agrupa virus de gran importancia como el del sarampión, el sincitial respiratorio, los parainfluenza y el de la parotiditis humana. Al igual que el virus de la parotiditis, el rubulavirus porcino (RVP) es causante de meningoencefalitis (en cerdos neonatos) y de daños reproductivos (en cerdos adultos), posee en su envoltura dos glicoproteínas, la proteína de fusión (F) y la hemaglutinina-neuraminidasa (HN). La HN es la proteína más antigénica y expuesta del vírion, y es responsable del reconocimiento de las estructuras celulares que actúan como receptores virales. Nuestro grupo ha demostrado que la HN del RVP reconoce la molécula sialil(a2,3)gal y que su expresión es determinante de la infección. Se ha postulado que la HN es un importante factor de virulencia debido a que presenta actividad de neuraminidasa (NA), aunque aún no se conoce bien el mecanismo.

El objetivo de este trabajo fue la purificación parcial de la glicoproteína HN para estudiar su selectividad catalítica hacia diferentes sialoglicoconjugados. El uso de un amortiguador de acetatos 0.1 M permitió identificar que la máxima actividad se presenta a pH de 3 a 3.5 a 37°C. Por isoelectroenfoco se observó un p.I. de la HN entre 4.5-5, donde se identificaron proteínas de 66 kDa. Por gradiente de sacarosa se logró purificar el virus con un factor de 100 veces y con tratamiento con triton X-114 se liberó la HN de

I Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Virus.

las membranas. Los estudios cinéticos nos muestran que la enzima presenta actividad con los sustratos fetuína y sialil(a2,3)lactosa, Km de 1.55 mg/ml y de 0.29 mg/ml (442 mM) y Vmax de 5.5 y 14.3 nmoles de ac. siálico liberado/min, respectivamente. La purificación de la HN nos permitirá estudiar el papel de la NA en la virulencia de los paramixovirus.

ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES VIRALES QUE CONSTITUYEN LA CEPA VACUNAL URABE AM9 DEL VIRUS DE LA PAROTIDITIS. Pazos-Salazar N G^{1,2}, Tapia-Ramírez J², Reyes-Leyva J^{3,1}. **Biomedicina Molecular CINVESTAV-IPN,** ²Genética y Biología Molecular CINVESTAV-IPN, ³Virología del Centro de Investigaciones Biomédicas de Oriente, IMSS, Puebla, Puebla.

Existen antecedentes de que la cepa vacunal Urabe AM9 del virus de la parotiditis se constituye de una mezcla de poblaciones que difieren en el nucleótido 1081 del gen HN pudiendo ser A o G, el cambio de G por A en la cepa vacunal resulta en la sustitución del ácido glutámico por lisina en el aminoácido 335 de la glicoproteína. La presencia de A se describió como una forma asociada con la enfermedad, puesto que en pacientes con meningitis postvacunal, el análisis de los aislamientos virales en células Vero, reveló la presencia de A1081. Las poblaciones se reconocen por un perfil de restricción diferencial con Mse I debido a que la población viral con A conserva el sitio de restricción mientras que la población que contiene G lo pierde, debido a un cambio en la secuencia de TTAA a TTGA. Sin embargo en contraste con estos resultados, nuestro grupo ha encontrado que la cepa vacunal pareciera constituirse únicamente por la población que contiene A1081, esto debido a que en la restricción con Mse I sobre un cDNA de 428 bp obtenido por RT-PCR, se produjo una digestión total con 2 fragmentos de 133 y 295 pb, lo cual lleva a pensar que el nucleótido A en la posición 1081 no tiene influencia alguna en la neurovirulencia de la cepa vacunal Urabe AM 9.

SURVEY FOR ANTIBODIES AGAINST CAPRINE ARTHRITIS-ENCEPHALITIS VIRUS (CAEV) USING RECOMBINANT GAG PROTEINS: STUDIES AMONG SMALL RUMINANT POPULATIONS IN NIGERIA. Baba SS, Fotabe AI, Baba MM, Rimstad E. **Virology Lab., Dept. of Experimental Pathology, CINVESTAV-I.P.N., México City, México.**

A total of 1000 serum samples were obtained from small ruminants in Nigeria and tested for presence of antibodies against caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) using enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA) based on p17 and p28 recombinant gag proteins. The distribution of the sera tested was as follows: 900 serum samples collected at slaughter from 700 goats and 200 sheep in the municipal abattoir as well as 100 sera obtained from 50 each of goats and sheep in four different flocks under the semi-intensive system of animal husbandry. All the animals sampled were aged ³ 2 years and had no history of vaccination against CAEV infection or previous contact with imported stocks. It was observed that none of the sera had antibody against CAEV. The possibility of geographic differences in the genetic of CAEV strains affecting the results of the tests is emphasized.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS Y OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS CON POSIBLE RESISTENCIA. Herrera L^{1,2}, Juárez-Ayala JC¹, Pérez Molphe-Balch E³, Rivera Bustamante R¹, Martínez Soriano JP¹. **CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato;** ²Centro de Bioplasmas, Ciego de Avila, Cuba.; ³UAA, Ags. México;

El Virus de la tristeza de los cítricos (CTV) es el causante de una de las enfermedades más importantes de este cultivo. Pertenece al grupo de los closterovirus y puede ser diseminado por varias especies de áfidos. Esta enfermedad ha causado la muerte de millones de árboles provocando grandes pérdidas económicas en los países afectados. Las cepas del CTV se diferencian por la intensidad de los síntomas que producen en las especies de cítricos. Aislados del CTV de México y Cuba se analizaron a través del aislamiento, clonación y secuenciación nucleotídica del gen de la proteína de la cápside (CP) y de la proteína p27. Los productos clonados se analizaron además mediante RFLP con la enzima de restricción Hinf I, demostrando la existencia de subpoblaciones virales. Las relaciones filogenéticas obtenidas de las comparaciones de secuencias de nucleótidos y aminoácidos permitieron agruparlas según su sintomatología y procedencia. Paralelamente se transformaron explantes de toronja (*Citrus paradisi* Cv. Duncan) por cocultivo con *Agrobacterium rhizogenes*. Utilizando tres construcciones, conteniendo los genes de CP, p20 y p27, además del gen de selección *npt II* y el gen reportero *uid A*. Las raíces transgénicas se analizaron mediante la prueba histoquímica de GUS y PCR.

EL VIRUS CALICO DE PHYSALIS: UNA NUEVA ENFERMEDAD VIRAL EN TOMATILLO (*Physalis ixocarpa* Brot.) EN MÉXICO. De La Torre-Amaraz R, Monsalvo-Reyes A, Rivera Bustamante RF. **UBRIPO-UNAM. ENEP-Iztacala. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Dep. de Ingeniería Genética, CINVESTAV IPN, U. Irapuato.**

A García-Carrancá, RM del Angel, R Rivera-Torres.

Se aisló un virus transmitido de plantas de tomatillo, presentando una sintomatología tipo cálico (manchas irregulares de amarillo brillante con márgenes definidos). Esta enfermedad se encuentra comúnmente afectando tomatillo en campos comerciales en el Estado de México, Morelos, Puebla, Tlaxcala e Hidalgo.

El agente causal del cálico fue caracterizado por reacción del hospedero en plantas infectadas artificialmente por transmisión mecánica, insecto o injerto. Para caracterización molecular del virus se realizaron pruebas serológicas (DAS-ELISA), análisis de RNA de doble cadena, PCR y Southern blot.

La enfermedad del cálico en tomatillo fue identificado como un virus de RNA que es transmitido mecánicamente y por injerto a especies de la familia *Solanaceae* (*P. ixocarpa*, *Datura stramonium* y *Nicotiana rustica*). Análisis de las plantas infectadas al microscopio electrónico muestran la partícula viral en forma de varilla flexible de un tamaño aproximado de 470 a 580nm.

Los resultados indican que el virus aislado de tomatillo es un miembro de la familia potyvirus que no ha sido reportado previamente en México.

ENFERMEDADES VIRALES DE OKRA (*Abelmoschus (L) Moench*) EN LOS ESTADOS DE GUERRERO Y MORELOS. De La Torre-A R, Monsalvo-R A, Salazar-S M, Méndez-L J, Rivera-B RF. UBRIPO-UNAM. ENEP-Iztacala. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Dep. de Ingeniería Genética, CINVESTAV IPN, U. Irapuato.

La okra que también conocida como bombó, quimbombó o angú, es una especie vegetal anual, perteneciente a la familia Malvaceae, nativa de Africa tropical. En México los estados de Tamaulipas, Guerrero y Morelos son las áreas más importantes para la producción de Okra, principalmente para el mercado de exportación. Recientemente síntomas virales (amarillamientos, mosaicos, enanismos y deformaciones foliares, florales y frutales) han sido observados en los campos de cultivo, principalmente en Guerrero y Morelos. Por tal motivo, se están desarrollando estudios para determinar la identidad del complejo viral en okra. Como primera instancia una combinación de metodologías como rango de hospederos, injertos, transmisión mecánica, pruebas serológicas (DAS-ELISA), análisis de RNA de doble cadena, microscopía electrónica y análisis moleculares (PCR, Southern Blot) han permitido detectar y caracterizar parcialmente varios virus. Los resultados indican la presencia de infecciones mixtas entre virus de RNA y DNA. En el primer caso se detectó una cepa del virus del mosaico del pepino, el virus del mosaico de la alfalfa, cepas del virus del enanismo arbustivo del tomate (tombusvirus), el virus del jaspeado del tabaco

(potyvirus) y un tospovirus, algunos de ellos no reportados en México. Finalmente, se detectó por primera vez la presencia de un posible nuevo geminivirus perteneciente al género Begomovirus. Estudios moleculares están en curso para caracterizar completamente estos virus y su posible interacción en infecciones mixtas.

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA MOLÉCULA DE SUPERFICIE DE CÉLULAS VERO QUE INTERACCIONA CON EL VIRUS DEL DENGUE TIPO 4. Martínez-Barragán JJ, del Angel Nuñez de Cáceres RM. Laboratorio 8 de Virología, Departamento de Patología Experimental, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México, D.F., México.

El primer paso en la infección por el virus del dengue, es la unión del virus al receptor viral a través de la glicoproteína de la envoltura viral E. Una molécula altamente sulfatada, el heparán sulfato (HS), que ha sido identificada en células Vero y en células BHK como el posible receptor para el virus del dengue. Sin embargo, se han descrito moléculas diferentes al HS en células de mosco, C6/36 y en células de mamífero como las HL60 y BM. El HS también se ha propuesto como posible receptor viral para otros tipos de virus, sin embargo muchos de estos necesitan la participación de moléculas adicionales al HS para que pueda ocurrir la penetración viral.

El objetivo de este trabajo es determinar si el virus del dengue 4 utiliza alguna molécula diferente al HS en el proceso de infección en células Vero, mediante ensayos de interacción virus-célula (Binding) y de interacción virus-proteína (Overlay) con virus marcado radioactivamente. En ensayos de tipo overlay encontramos que el virus dengue se une a 2 moléculas de 72 y 45 kDa de peso molecular. La interacción con la molécula de 72 kDa es susceptible al tratamiento con proteasas y al periodato de sodio, mientras que no es susceptible a los tratamientos con clorato de sodio y con Heparinasas I y III. Las lectinas Concanavalina A (Con A) y la lectina de germen de trigo (WGA) impiden la interacción virus-proteína, mientras que con ensayos de RT-PCR observamos que la Con A reduce significativamente la infección por dengue en las células Vero. Los resultados sugieren que la molécula de 72 kDa es de naturaleza glicoproteica mientras que los residuos de alfa manosa presentes en ésta participan en la interacción virus-receptor. Proponemos que la función del HS es de receptor primario, concentrando las partículas virales en la superficie celular y posteriormente éstas interaccionen con otra molécula, como la glicoproteína de 72 kDa, que permitirán la penetración viral. Pensamos que la glicoproteína de 72 kDa forma parte del complejo receptor viral para el virus del Dengue.

I Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Virus.

LA INTERACCION VIRUS DENGUE 2-RECEPTOR NEURONAL ACTIVA LA UNION A DNA DE AP-1. García-Flores M^{1,2}, Ortega A.¹ Depto de Genética y Biología Molecular CINVESTAV-IPN.² Lab. Clínico del Hospital de Infectología CMR-IMSS, México, D.F.

Los cuatro serotipos del Virus Dengue (DEN 1, DEN 2, DEN 3 y DEN 4) son los causantes de la fiebre del dengue (DF) y de la fiebre hemorrágica del dengue (DFH/DSS) que se han convertido en un problema de salud pública. En brotes epidémicos de estos padecimientos se han reportado pacientes con alteraciones del SNC y se ha recuperado al Virus Dengue a partir de líquido cefalorraquídeo. Hasta ahora la patología del SNC y la patogénesis de las encefalitis por dengue en humano no han sido elucidadas. Infecciones experimentales con ratones y cultivos de tejido cerebral han mostrado que DEN 2 y 4 sólo replican en neuronas. También se ha mostrado que el DEN 2 infecta cultivos primarios de neuronas así como células de neuroblastoma de ratón N1E 115 y de humano SK-N-SH, en estas últimas la infección parece estar mediada por un receptor proteico de 65 kDa. Nuestro grupo ha establecido que la interacción DEN 2-receptor de las células N1E 115 activa a la cinasa dependiente de Ca²⁺/Diacilglicerol, a la Fosfolipasa A₂ e induce un incremento en la unión a DNA del factor de transcripción AP-1. Asimismo hemos determinado la ontogenia de receptor proteico de 65 kDa en neuronas de ratón. En el presente trabajo se determina la actividad de unión a DNA del factor de transcripción AP-1 provocada por la interacción DEN 2-receptor neuronal mediante: ensayos de retardo de entrada al gel (EMSA) con extractos nucleares obtenidos de suspensiones celulares de cerebro de ratón infectados con DEN 2. Los resultados muestran una correspondencia en la expresión del receptor neuronal y la capacidad del DEN 2 de inducir incrementos en la unión al DNA de AP-1, sugiriendo que el receptor neuronal es capaz de transducir señales hasta el núcleo una vez que el DEN 2 interactúa con el receptor neuronal.

LOCALIZACIÓN DE UN DOMINIO DE LA PROTEÍNA N DEL FAGO LAMBDA REQUERIDO PARA LA INTERACCIÓN ESPECÍFICA CON EL FACTOR TRANSCRIPCIONAL NusA. García-Mena J¹, Das AK².¹ Departamento de Genética y Biología Molecular. CINVESTAV-IPN. México D.F. ² Department of Microbiology, UCONN Health Center, Farmington, CT USA.

En el fago lambda, la antiterminación de la transcripción es crítica para la expresión de genes tardíos necesarios para completar su ciclo de vida. Aunque *in vivo* la proteína NI requiere del RNA *nut* junto con los factores transcripcionales Nus BEG para una antiterminación ópti-

ma, *in vitro* en ausencia de ellos es posible observar antiterminación en sitios proximales en exceso del factor NI. Esta observación sugiere que si la proteína NI sola es capaz de modificar el *core* de la RNA polimerasa (RNAP) a un modo de antiterminación, entonces en sus 107 aminoácidos deben de existir dominios que interaccionen funcionalmente con alguna de las subunidades del Core o el factor NusA. En condiciones apropiadas *in vitro*, la antiterminación distal inducida por NI (107aa) es dependiente del RNA *nut* y el factor NusA. No sucede lo mismo cuando se ensayan los péptidos. 1-52 aa 1-33aa de NI silvestre. En estos casos la antiterminación por 52 aa depende de NusA y *nut*, mientras que 33aa es inactivo en antiterminación. Ambos péptidos unen específicamente el RNA de *boxB in vitro*. Estos datos sugieren que si ambos péptidos son unidos por *nut* y ligados al core de la RNAP, entonces la eliminación de los aminoácidos 34-52 en 1-33aa de NI, está afectado el siguiente paso en el mecanismo de antiterminación. En reportes previos se ha podido demostrar que NI interacciona específicamente con el factor NusA sin investigar el dominio de NI responsable de la interacción. Debido a que NusA es un factor importante del proceso de alargamiento transcripcional, nosotros hemos comenzado a estudiar esta interacción. Con este objetivo hemos diseñado un ensayo de afinidad tipo trampa en el cual la proteína NI o cualquier otra mutante son incubados con GST-NusA. Posteriormente los complejos son atrapados en columnas de glutation-sefaraosa. Nuestros resultados sugieren que al menos uno de los dominios involucrados en la interacción específica NI-NusA podría estar localizado en una región que incluye los aminoácidos 34-52 de NI.

UNA NUEVA FUNCIÓN PARA EL RNA EN LA ANTITERMINACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN MEDIADA POR LA PROTEÍNA N DEL BACTERIOFAGO LAMBDA. García-Mena J¹, Das AK².¹ Departamento de Genética y Biología Molecular. CINVESTAV-IPN. México DF México. ² Department of Microbiology, UCONN Health Center. Farmington CT USA.

El sitio *nut* o sitio utilizador de la proteína N de lambda, es un elemento transcripcional que actúa en *cis* y es codificado por el genoma del virus. El sitio *nut* funciona como RNA en la antiterminación de la transcripción y contiene dos secuencias funcionales. La secuencia *boxA* que interactúa con los actores transcripcionales NusB y S10 de *Escherichia coli* y la secuencia *boxB* que interactúa con el dominio rico en residuos de arginina (ARM) de la proteína antiterminadora N del fago. El RNA de *boxB* une a la proteína N y la dirige a la RNA polimerasa (RNAP) que alarga la cadena de RNA durante la transcripción. Como consecuencia de esta interacción, la antiterminación ocurre

A García-Carrancá, RM del Angel, R Rivera-Torres.

en sitios terminadores localizados a miles de bases del sitio *nut*. Bajo condiciones fisiológicas normales, las secuencias *boxA*, *boxB* y el dominio ARM son indispensables para una antiterminación eficiente. Sin embargo aunque es claro que la interacción entre el RNA de *boxB* y la proteína N permite que *nut* ligue a la RNAP, existen evidencias de que no es sólo este el papel del RNA de *boxB* en antiterminación. En este trabajo se presenta la hipótesis de que la estructura tallo-burbuja del sitio *nut* podría contactar al *core* de la RNAP. Esta hipótesis está basada en la observación de que aunque *in vivo* la antiterminación es inhibida por ausencia de una interacción N-*boxB* aun con sobreexpresión de N, puede existir antiterminación cuando se usa la secuencia *boxA* presente en otros fagos lambdoides en las mismas condiciones. En este estudio se midió la antiterminación usando diferentes secuencias *boxB* y factor de antiterminación NI y DARM-NI. Los resultados muestran y permiten concluir que aunque NI puede funcionar sin unir *boxB*, la antiterminación depende de este RNA. El tallo-burbuja de *boxB* es necesario independientemente de su unión a NI. Nosotros proponemos que *boxB* puede ocupar un sitio de la RNAP que interacciona con los terminadores Rho-independientes, produciendo un complejo transcripcional resistente a la terminación.