



XII Congreso Argentino de Virología

**V Simposio de Virología Clínica
III Simposio de Virología Veterinaria**

Libro de resúmenes

**26 al 28 de septiembre de 2017
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina**

Centro de Convenciones Palais Rouge
Jerónimo Salguero 1443/49
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

ATV 14

EFFECTO DE UN EXTRACTO ETANOLICO DE RAÍZ DE DIENTE DE LEÓN, SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y SUPERVIVENCIA DE CÉLULAS INFECTADAS CON HPVVenezuela R F¹, Mugas L², Kiguen A X¹, Mosmann J P¹, Monetti M¹, Nuñez Montoya S², Konigheim B¹, Cuffini C G¹¹Instituto de Virología Dr. J. M. Vanella, Fac. Cs Médicas, Univ. Nac. Córdoba. ²IMBIV-CONICET, Dpto. Farmacia, Fac. Cs. Químicas, Univ. Nac. Córdoba.

Introducción: La infección por los virus del papiloma humano (HPV), está estrechamente relacionada con la generación de cáncer de cuello de útero (CCU). El curso prolongado de esta infección, sumado a la escasa variedad quimioterapéutica, hace necesario la búsqueda de nuevos compuestos que permitan tratar lesiones de diferente severidad. Los compuestos naturales son la base de los tratamientos farmacológicos y más del 50% de todos los fármacos contra el cáncer son de origen natural o al menos derivados de compuestos presentes en la naturaleza. *Taraxacum officinale* G. Weber, ex F.H. Wigg (TO), conocido popularmente como "diente de león" ha demostrado ejercer diversas actividades biológicas, en líneas celulares de leucemia y melanoma.

Objetivo: Investigar la citotoxicidad *in vitro* y las acciones antiproliferativas de un extracto etanólico de raíz de TO, en líneas celulares de CCU.

Métodos: Se obtuvo un extracto etanólico a partir de raíces de TO (R-EtOH), el cual se llevó a sequedad y luego se disolvió en DMSO (100 mg/ml). El estudio se llevó a cabo en líneas celulares de CCU persistentemente infectadas con HPV (Caski y Hela) y una línea de células de queratinocitos inmortalizados (HaCaT). Todas las líneas celulares se incubaron con 15 concentraciones diferentes de R-EtOH (10-1000 µg/ml) por triplicado. Después de 72 hs de incubación, se evaluó la citotoxicidad usando el colorante MTT. La viabilidad celular se evaluó utilizando el colorante azul tripán, luego de la exposición a 24, 48 y 72 hs, con una concentración constante de R-EtOH. Los efectos sobre la morfología celular fueron observados mediante tinción con Hoechst. El ensayo clonogénico se utilizó para comprobar la capacidad de la célula para crecer y formar una colonia luego de su exposición a R-EtOH. Se cuantificó la respuesta apoptótica de R-EtOH por citometría de flujo utilizando la tinción con Anexina V y 7-AAD.

Resultados: R-EtOH evidenció efecto citotóxico dosis-dependiente en todas las líneas celulares, mostrando mayor efecto, en células Caski y Hela, que en las HaCaT. Se observó que la reducción de la viabilidad celular, fue dependiente del tiempo de exposición. La microscopía de fluorescencia permitió observar cambios morfológicos característicos de apoptosis, tales como fragmentación y condensación de cromatina, en células Hela y Caski tratadas. En el ensayo clonogénico, diferentes concentraciones del R-EtOH disminuyeron el número y tamaño de colonias en comparación con el control en todas las líneas celulares. La citometría, mostró un aumento de células positivas a Anexina V en las líneas de CCU (principalmente en Caski) y no hubo diferencias en las células HaCaT.

Conclusiones. Nuestros resultados sugieren que R-EtOH contiene componentes bioactivos que inducen apoptosis en células infectadas con HPV; por lo tanto, debe ser explorado en profundidad ya que su potencial como antitumoral, podría ser una alternativa a las quimioterapias actualmente disponibles.

ATV 15

ROTAVIRUS: ESTUDIO IN VITRO DEL EFECTO ANTIVIRAL DEL ÁCIDO URSÓLICOTohmé M J^{1,2}, Gimenez M C^{2,3}, Peralta A⁴, Colombo M I², Delgui L R²¹Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Juan Agustín Maza, Mendoza, Argentina. ²IHEM-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza, Argentina. ³Facultad de Veterinaria y Ciencias Ambientales. Universidad Juan Agustín Maza, Mendoza, Argentina. ⁴INTA-CONICET, Buenos Aires, Argentina.

Rotavirus (RV) es uno de los principales agentes etiológicos de gastroenteritis aguda en niños. En los casos más severos puede producir la muerte por deshidratación, siendo los países en vías de desarrollo los más afectados. En Argentina se ha incorporado la vacuna anti-RV al Calendario Nacional de Vacunación a partir del año 2015. Sin embargo,

hasta la actualidad no existe un tratamiento específico para las infecciones por RV que colabore en disminuir el impacto de tales afecciones. El ácido ursólico (AU) es un compuesto triterpénico pentacíclico presente en diversas familias de vegetales que posee efectos biológicos como antiinflamatorio, anticancerígeno y antimicrobiano. Basándonos en esto nos hemos propuesto evaluar la actividad antiviral del AU en infecciones *in vitro* por RV.

Nuestro modelo de estudio consta de la línea celular MA104 y la cepa de RV de simio, SA-11. Incubamos las células con 10 µM y 20 µM de AU durante 8, 12 y 24 h, y determinamos la viabilidad celular mediante la evaluación cuantitativa de la actividad enzimática mitocondrial. Observamos un alto grado de viabilidad incluso tras 24 h de incubación con 10 µM de AU. Luego, para descartar un efecto directo del AU en las partículas virales, pre-incubamos los viriones de RV con 15 µM AU y posteriormente infectamos monocapas celulares. La progenie viral fue titulada y comparada con preparaciones de virus control. Así, hemos descartado el efecto virucida del compuesto y procedido a evaluar su capacidad de interferir con el ciclo replicativo del virus. Para tal fin realizamos infecciones virales en células pre-tratadas, y en continua presencia de AU 10 µM durante 15 h. Luego, titulamos la progenie viral intra- y extra-celular y observamos una disminución significativa del título viral en presencia de AU. Por otra parte, las monocapas infectadas fueron analizadas para cuantificar la acumulación de las proteínas mayoritarias del virus, VP6 y VP7, que fue menor en las células tratadas, reforzando el resultado del efecto antiviral de AU. Finalmente, hemos llevado a cabo experimentos orientados a determinar la/s etapa/s del ciclo replicativo interferidas por el AU. Para ello, incubamos las células antes y durante la adsorción e internalización viral ("etapas iniciales") o durante las 15 h de infección ("etapas replicativas"). Evaluamos el resultado mediante titulación de viriones infectivos intra- y extra-celulares. Hemos observado que el AU presenta actividad interferente tanto en la internalización como en la replicación de RV y que ambos colaboran en la acción antiviral demostrada por nuestro grupo. Por último, hemos comenzado el estudio del mecanismo por el que el tratamiento de las células con AU interrumpe el ciclo replicativo de RV. Hasta la actualidad, nuestros resultados indican una drástica afectación de la arquitectura del complejo de Golgi, hecho que nos ha motivado a estudiar, en detalle, el papel de dicha organela en el ciclo infectivo de RV, desconocido hasta la actualidad.

ATV 16

ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE UNA ANTRAQUINONA NATURAL DE LA FLORA AUTÓCTONA Y DE SU DERIVADO SEMI-SINTÉTICOMugas M L^{1,2*}, Konigheim B S^{1,2}, Rojas L³, Aguilar J J^{1,2}, Joseau M J³, Contigiani M S², Fusteris M⁴, Nuñez Montoya S C^{1,2}¹IMBIV, CONICET. Farmacognosia, Dpto. de Ciencias Farmacéuticas, Fac. Cs. Químicas, UNC. Córdoba, Argentina. ²Instituto de Virología "Dr. J M Vanella", Fac. Cs. Médicas, UNC. Córdoba, Argentina. ³Silvicultura, Fac. Cs. Agropecuarias, UNC. Córdoba, Argentina. ⁴Laboratory of Medicinal Chemistry, Department of Pharmacy, University of Patras. Patras, Greece.

Frente a las escasas alternativas terapéuticas para las virosis, nuestro grupo se aboca a la búsqueda de potenciales compuestos antivirales a partir de especies vegetales nativas de Argentina. *Galium latoramosum* Clos. (Rubiáceae) es una especie herbácea conocida como "raíz de teñir", utilizada popularmente por sus efectos tintóreos, antibacterianos y antifúngicos. A partir del estudio fitoquímico de esta especie vegetal, demostramos que la antraquinona (AQ) más abundante es lucidina primeverosido (Lp). Esta AQ natural podría ser un importante precursor para la obtención de derivados semi-sintéticos con potenciales bioactividades. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue obtener Lp y su derivado semi-sintético, nordamnacantal (Nd), y evaluar la actividad antiviral *in vitro* de ambos para ampliar la búsqueda de compuestos con actividad antiviral.

Las raíces de *G. latoramosum* (119,98 g) fueron maceradas en etanol; y el extracto etanólico obtenido fue recrystalizado en el mismo solvente para obtener Lp (198,90 mg). La identidad de esta AQ fue confirmada por espectrometría de masa de alta resolución. El derivado semi-sintético fue obtenido mediante dos reacciones: primero una hidrólisis ácida para obtener lucidina (AQ aglicón) y por último, la oxidación del grupo alcohol primario de lucidina con clorocromato de piridinio. El

producto final fue purificado a través de extracciones líquido-líquido y cromatografía en columna. La identidad del derivado semi-sintético fue confirmada por espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

Para evaluar la actividad antiviral, 15 concentraciones de Lp y Nd, preparadas en MEM + 1% DMSO, fueron agregadas sobre monocapas de células Vero, previamente infectadas con 100 unidades formadoras de placa (UFP) de cada virus (HSV-1; West Nile y Encefalitis Equina Venezolana). Fueron añadidos en este ensayo controles de citotoxicidad de las AQ, controles virales, controles celulares y control positivo respecto al HSV-1.

El derivado semi-sintético obtenido fue nordamnacantal, con un rendimiento de reacción de 14%. Los resultados de actividad antiviral demostraron que Lp no fue activa sobre ninguno de los modelos virales, en tanto que Nd fue capaz de inhibir aproximadamente en un 70 % sólo el HSV-1 a una concentración subtóxica (74,57 µM) y con un índice de selectividad de 5,96.

Nuestros resultados demuestran que la semi-síntesis resultó ser una importante herramienta para la obtención de derivados con actividad antiviral. Por lo tanto, es importante tener en cuenta esta herramienta para obtener compuestos potencialmente bioactivos. Estos resultados nos motivan continuar investigando en este campo para el desarrollo de nuevos fármacos antivirales.

ATV 17

PREVALENCIA DE SUSTITUCIONES ASOCIADAS A RESISTENCIA CONTRA LA NSSA DEL HCV EN PACIENTES NAÍVES INFECTADOS POR GENOTIPO 1 EN ARGENTINA

Martínez A¹, García G², Culasso A^{2,3}, Pérez P^{2,3}, Ridruejo E¹, Neukam K^{2,4}, Di Lello F^{2,3}

¹Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas Norberto Quirno "CEMIC". ²Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. ³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina. ⁴Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Sevilla, España.

Introducción: La incorporación de antivirales de acción directa (DAA) en el tratamiento del virus de la hepatitis C (HCV) aumentó significativamente las tasas de respuesta virológica sostenida. Sin embargo, a pesar de la mayor potencia ofrecida por estos antivirales, la resistencia a los fármacos juega un papel clave en los pacientes con fracaso de DAA. En particular, las sustituciones asociadas a resistencia (RAS) en la NSSA son las que cobran mayor importancia en las guías de tratamiento nacionales. Sin embargo, no hay información sobre la prevalencia de RAS en Argentina.

Objetivo: El objetivo de este estudio fue analizar las RAS a la NSSA en pacientes infectados por el HCV genotipo 1 (HCV-1), naíves para DAA que asistieron a la Unidad de Hepatología de un centro terciario de Buenos Aires, Argentina.

Métodos: En este estudio transversal retrospectivo, se incluyeron 51 pacientes, 9 (17,6%) infectados por HCV-1a y 42 (82,4%) por HCV-1b. En particular, se analizaron 7 posiciones relacionadas con la resistencia al tratamiento en este trabajo: 28, 30, 31, 32, 58, 92 y 93.

Resultados: Las RAS analizadas se detectaron en 11 de 51 pacientes (21,6%) infectados por HCV-1. Los pacientes infectados por HCV-1b tuvieron una mayor prevalencia de RAS basales que los pacientes infectados por HCV-1a (23,8% vs. 11%, respectivamente), sin embargo debido al bajo número muestral no se alcanzó significancia estadística. La RAS observada en mayor frecuencia fue L31M que se detectó en 11,7% de las muestras y en valores similares para ambos subtipos (11,1% vs. 11,9% para HCV-1a y HCV-1b, respectivamente). Adicionalmente, se detectaron las RAS Q30L (2,4%) e Y93H (2,4%), ambas en HCV-1b. De este modo, la prevalencia de la RAS L31M en nuestras muestras fue el doble de la detectada en Japón, USA y Europa mientras que las prevalencias de las RAS Q30L e Y93H fueron significativamente menores, 2 y 4 veces menos, respectivamente. No se observaron mutantes dobles para la región analizada.

Conclusiones: En este estudio preliminar, las RAS a los inhibidores de la NSSA se detectaron en una frecuencia similar a la detectada en otros estudios realizados en pacientes naíves al tratamiento con DAA. Sin embargo, la prevalencia de cada RAS en particular varía notoriamente dependiendo de la región geográfica analizada. Este trabajo apoya la necesidad de más estudios de epidemiología molecular de RAS en

pacientes que van a iniciar el tratamiento con DAA en nuestro país. Así se podrán mejorar las guías locales de tratamiento con la incorporación de un mayor número de datos locales.

ATV 18

EFFECTO DEL INTERFERÓN A PEGILADO SOBRE LA EXPRESIÓN DE DIFERENTES PROTEÍNAS DE TRANSPORTE ATP BINDING CASSETTE (ABC) EN UN MODELO DE REPLICACIÓN *IN VITRO* DEL VIRUS HEPATITIS C

Bernardi A, Gentile E A, Castillo A I, Delfino C M, Mathet V L, Oubiña J R

Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM), Universidad de Buenos Aires, CONICET, Facultad de Medicina, Paraguay 2155, Ciudad Autónoma De Buenos Aires, Argentina.

Introducción: la terapéutica para la infección por el virus hepatitis C (HCV) ha experimentado significativos avances en los últimos años debido al surgimiento de los antivirales de acción directa (AADs). Sin embargo, existen aún serias limitaciones respecto al acceso al tratamiento con dichas drogas, principalmente en países en vías de desarrollo. Es por ello, que la combinación de interferón α pegilado (PEG-IFN α) y ribavirina todavía sigue siendo utilizada para el tratamiento de la infección por el HCV.

Se ha documentado que la sobre-expresión de diferentes proteínas de la superfamilia de las ATP *binding cassette* (ABC) se encuentra asociada a fallas en las terapéuticas antivirales y/o anticancerosas. Además, debido a su rol fisiológico, alteraciones en la expresión de algunas ABC podrían contribuir al proceso patogénico en la infección por el HCV.

Objetivo: estudiar el efecto del PEG-IFN α sobre la expresión de ARN mensajeros (ARNm) de diferentes proteínas ABC (MDR1, BCRP, MRP1 y MRP4) en un sistema de replicación sub-genómico del HCV.

Metodología: se trataron cultivos celulares de estirpe hepatocitaria Huh7.5 transfectados establemente con un replicón sub-genómico del HCV genotipo 1b (SG) con diferentes concentraciones de PEG-IFN α (0,0003; 0,003; 0,03 ng/ μ L). Se determinó la carga viral del HCV en los sobrenadantes del cultivo y la expresión relativa de los ARNm de las ABC antes mencionadas, en los sedimentos celulares mediante RT-*qPCR*.

Resultados: se evidenció una disminución de la carga viral del HCV en los sobrenadantes de los cultivos tratados con PEG-IFN α . Se observó un aumento en la expresión relativa de los ARNm de MDR1, BCRP, MRP1 y MRP4 en las células tratadas con PEG-IFN α . Dicho efecto mostró un comportamiento dosis-dependiente.

| | Concentración IFN [ng/ μ L] | | |
|--------------------|---------------------------------|--------------------|--------------------|
| | 0.0003 | 0.003 | 0.03 |
| MDR1 [VA \pm SD] | 1.06 \pm 0.0041 | 1.76 \pm 0.0002* | 2.23 \pm 0.0004* |
| BCRP [VA \pm SD] | 1.17 \pm 0.0050 | 1.27 \pm 0.0061* | 1.49 \pm 0.0002* |
| MRP1 [VA \pm SD] | 1.75 \pm 0.0061* | 3.12 \pm 0.0061* | 3.12 \pm 0.0882* |
| MRP4 [VA \pm SD] | 1.45 \pm 0.0001* | 1.71 \pm 0.0018* | 1.88 \pm 0.0338* |

VA: veces de amplificación respecto al control (*n=2; p<0,05).

Conclusiones: el aumento en los niveles de expresión de las ABC en las células tratadas, se correlaciona con la disminución de la carga viral del HCV. Estudios complementarios son necesarios para determinar si dicho aumento es debido a la acción directa del PEG-IFN α , o a un efecto indirecto, por la disminución de la carga viral.

Es importante evaluar este posible efecto del PEG-IFN α sobre las ABC, ya que esta droga no solo es utilizada para otros tratamientos, sino también por el importante rol fisiológico que cumplen dicha familia de transportadores.