



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES. FACULTAD DE MEDICINA  
II CÁTEDRA DE MICROBIOLOGÍA, PARASITOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**

**MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA I  
CLASE TEÓRICA 8**

***METODOLOGÍA DEL ESTUDIO DE LOS  
VIRUS***

***Profesor Regular Titular: Dr. Norberto Sanjuan***

***Doctor en Medicina (UBA)***

# **ADVERTENCIAS**

- **LOS PROCEDIMIENTOS DESARROLLADOS A CONTINUACIÓN SON SÓLO EJEMPLOS BÁSICOS, PUDIENDO DIFERIR EN EL ESTUDIO DE CADA VIRUS.**
- **PRETENDEN CONTRIBUIR A LA MEJOR COMPRENSIÓN DEL TEMA.**
- **NO TIENEN APLICACIÓN MÉDICA PRÁCTICA, PERO SON ESENCIALES PARA CONOCER LA VIROLOGÍA EN MAYOR PROFUNDIDAD.**
- **PRETENDEN SER ÚTILES EN EL DESARROLLO DEL ESPÍRITU CRÍTICO EN LOS ESTUDIANTES DE MEDICINA DE ESTA UNIVERSIDAD.**

# **VIRUS: PARÁSITO INTRACELULAR OBLIGADO**

- **20-280 nm.**
- **DESNUDOS O ENVUELTOS**
- **SIMETRÍA CÚBICA O HELICOIDAL**
- **ADN O ARN DE CADENA SIMPLE O DOBLE**
- **CRECEN EN CULTIVOS CELULARES, HUEVOS EMBRIONADOS O ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.**
- **PRODUCEN INFECCIONES AGUDAS, PERSISTENTES O TRANSFORMANTES.**
- **LAS PERSISTENTES PUEDEN SER CRÓNICAS, LATENTES O LENTAS**

# **1. ¿CÓMO CARACTERIZAR UN VIRUS NUEVO?**

- **LOGRAR UN SUSTRATO DONDE EL VIRUS REPLIQUE EN ALTOS TÍTULOS (EJ. CULTIVOS CELULARES)**
- **ESTUDIOS ULTRAESTRUCTURALES (MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN)**
- **PURIFICACIÓN VIRAL**
- **DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA O AUSENCIA DE ENVOLTURA**
- **CARACTERIZACIÓN DEL GENOMA VIRAL**
- **SECUENCIACIÓN DEL GENOMA VIRAL**
- **CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS VIRALES ESTRUCTURALES**
- **OBTENCIÓN DE UN SUERO ESPECÍFICO CONTRA EL VIRUS EN UN ANIMAL**

## **2. ¿CÓMO COMPRENDER EL CICLO DE REPLICACIÓN INTRACELULAR?**

- **CARACTERIZAR EL RECEPTOR CELULAR**
- **ESTUDIAR LA PROGRESIÓN INTRACELULAR DEL VIRUS**
- **ESTUDIAR EL TIPO Y EL MOMENTO DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS TEMPRANAS Y TARDÍAS Y LA SÍNTESIS DEL ÁCIDO NUCLEICO (CURVAS «EN UN SOLO PASO»)**
- **ESTUDIAR EL ENSAMBLAJE DE LAS PARTÍCULAS VIRALES Y SU EVENTUAL BROTE.**
- **CARACTERIZAR EL EFECTO CITOPÁTICO VIRAL.**

### **3. ¿CÓMO CONOCER LA PATOGÉNESIS DE UN VIRUS?**

- **DESARROLLAR UN MODELO EXPERIMENTAL EN ANIMALES DE LABORATORIO**
- **EN BASE A LA SECUENCIA DEL ÁCIDO NUCLEICO VIRAL UBICAR LOS GENES ESTRUCTURALES Y LOS REGULATORIOS, LOS EXONES E INTRONES, LOS PROMOTORES Y «ENHANCERS».**
- **HACER EL SEGUIMIENTO DE LA INFECCIÓN EN ANIMALES POR INMUNOCITOQUÍMICA Y MÉTODOS CLÁSICOS DE AISLAMIENTO VIRAL.**
- **DISEÑAR MUTANTES:**
  - **a. POR DELECIÓN**
  - **b. POR SUSTITUCIÓN**
  - **c. POR MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.**
- **COMPARAR EL COMPORTAMIENTO DE LOS MUTANTES CON EL DEL VIRUS SALVAJE.**

**¿CÓMO CARACTERIZAR UN VIRUS NUEVO?**

**1. LOGRAR UN SUSTRATO DONDE EL VIRUS REPLIQUE EN ALTOS TÍTULOS (EJ. CULTIVOS CELULARES)**

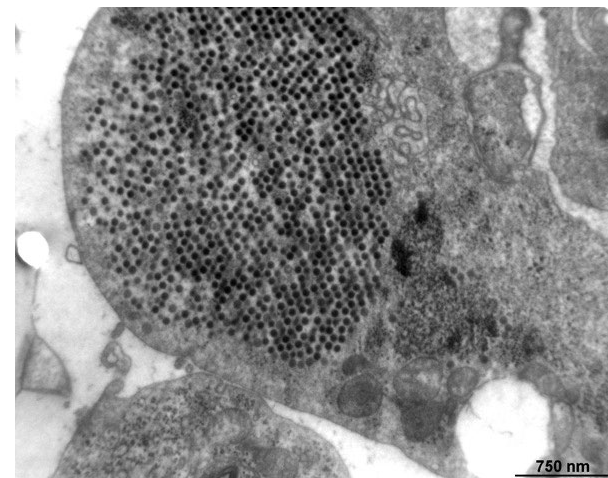
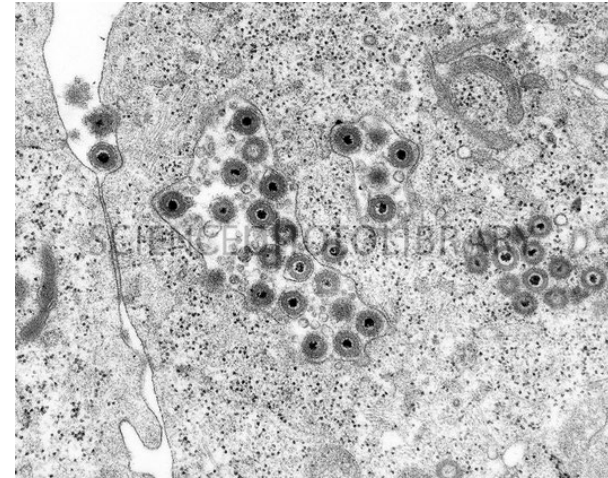
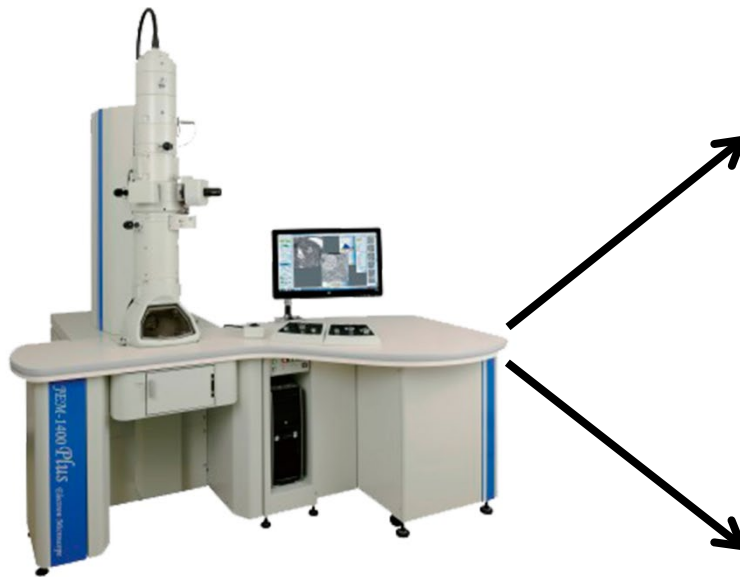


**MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

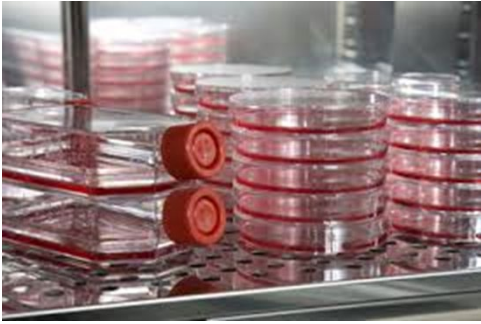
**PURIFICACIÓN DEL VIRUS**



## 2. ESTUDIOS ULTRAESTRUCTURALES (MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN)



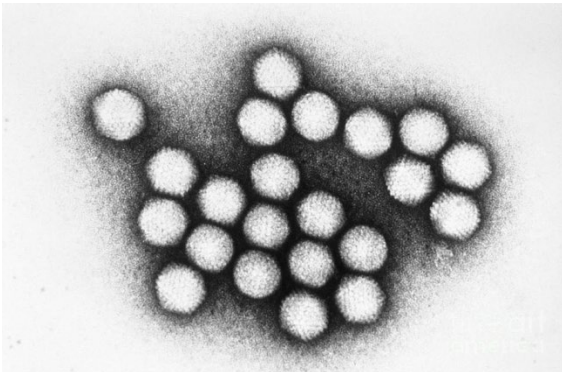
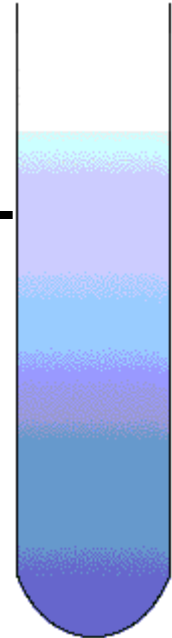
### 3. PURIFICACIÓN VIRAL



ROMPER LAS CÉLULAS



CENTRIFUGAR



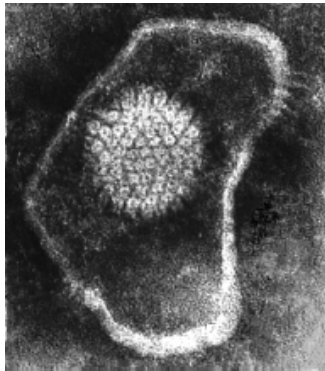
VIRUS PURIFICADO

ULTRACENTRIFUGACIÓN

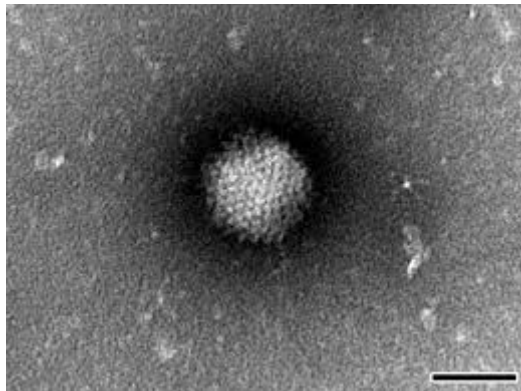
GRADIENTE

## 4. PRESENCIA O AUSENCIA DE ENVOLTURA:

- a. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN
- b. INFECTIVIDAD VIRAL LUEGO DE TRATAMIENTO CON DETERGENTE.
- c. PRESENCIA DE GLICOPROTEÍNAS POR COLUMNAS DE SEFAROSA-CONCANAVALLINA A.

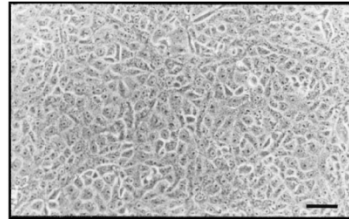


**VIRUS ENVUELTO**

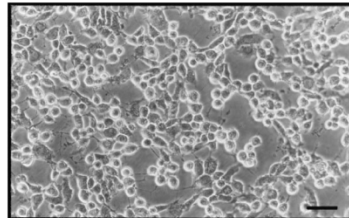


**VIRUS DESNUDO**

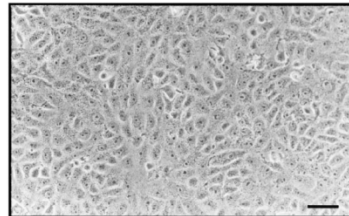
**CELLS**



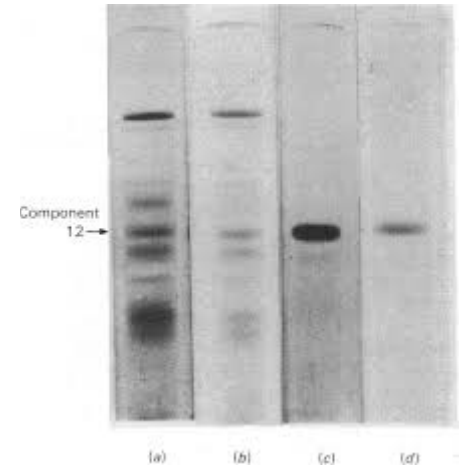
**CELLS  
+HSV-1**



**CELLS  
+HSV-1  
+SAM B**



**SIN O CON DETERGENTE**



**GLICOPROTEÍNA DE 12 KDa**

## 5. CARACTERIZACIÓN DEL GENOMA VIRAL

- a. **DESNATURALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL VIRUS PURIFICADO CON FENOL-CLOROFORMO Y PRECIPITACIÓN DEL ÁCIDO NUCLEICO VIRAL CON ETANOL/ACETATO DE SODIO.**

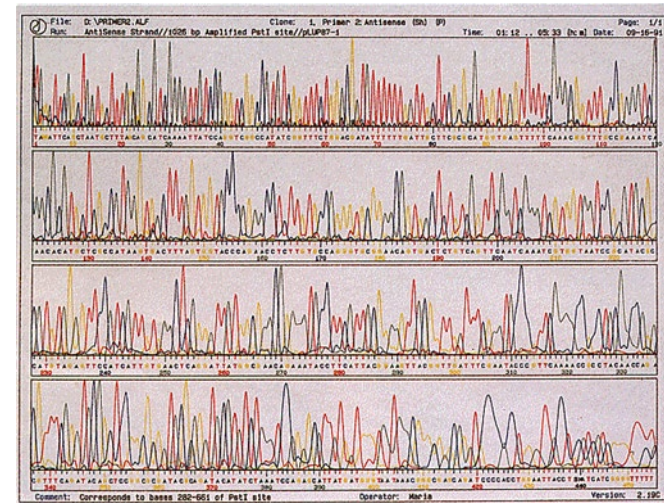
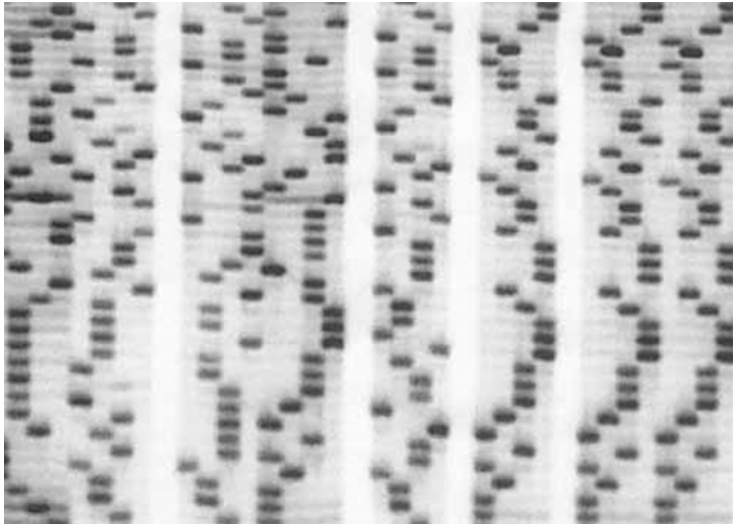


- b. **TRATAMIENTO DEL ÁCIDO NUCLEICO VIRAL CON DNAsa, RNAsa Y ENZIMAS DE RESTRICCIÓN, Y CORRIDA ELECTROFORÉTICA. SE SABRÁ SI EL GENOMA ES RNA O DNA DE CADENA SIMPLE O DOBLE.**



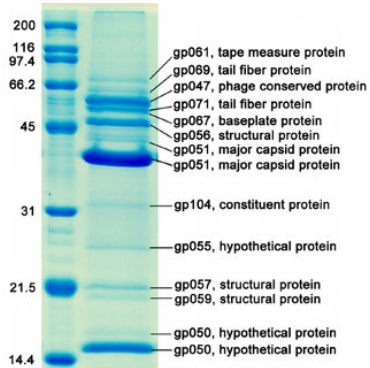
## 6. SECUENCIACIÓN DEL GENOMA VIRAL

- CLONAR EL GENOMA EN LA FORMA REPLICATIVA DEL FAGO M13.**
- OBTENER LA FORMA DE SIMPLE CADENA DEL FAGO CONTENIENDO EL INSERTO DEL GENOMA VIRAL.**
- SECUENCIAR POR EL MÉTODO DE SANGER EN FORMA MANUAL O CON SECUENCIADOR AUTOMÁTICO.**

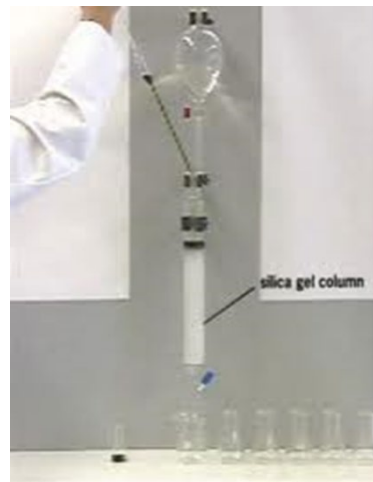


## 7. CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS VIRALES ESTRUCTURALES.

### a. CARACTERIZACIÓN: CON EL VIRUS PURIFICADO, EMPLEANDO UN GEL DESNATURALIZANTE DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)



### b. PURIFICACIÓN: PRECIPITACIONES DIFERENCIALES Y CROMATOGRAFÍA POR COLUMNAS.



## **8. OBTENCIÓN DE SUEROS ESPECÍFICOS POLICLONALES CONTRA PROTEÍNAS VIRALES POR INOCULACIÓN EN ANIMALES**

- a. OBTENER EL SUERO NORMAL PRE-INMUNE**
- b. INOCULAR EL ANTÍGENO (VARIAS DOSIS HASTA OBTENER UN TÍTULO ALTO DE ANTICUERPOS)**
- c. SANGRAR AL ANIMAL, SEPARAR EL SUERO Y COMPROBAR LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS POR WESTERN-BLOT.**



**EL SUERO ESPECÍFICO PERMITIRÁ:**

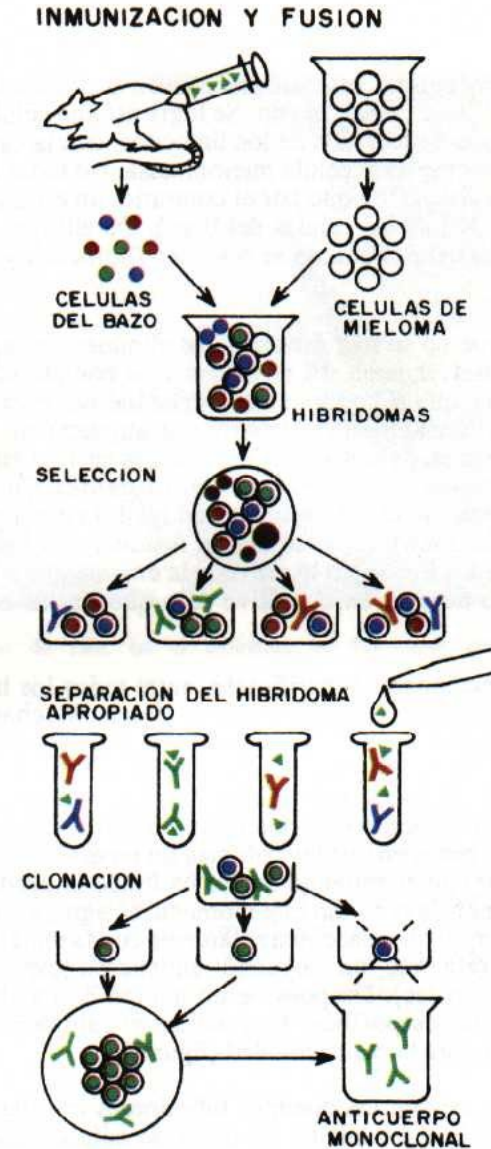
- a. LOCALIZAR POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA O INMUNOPEROXIDASA ANTÍGENOS VIRALES EN CÉLULAS Y TEJIDOS A NIVEL HISTOLÓGICO Y ULTRAESTRUCTURAL.**
- b. ESTUDIAR LAS PROTEÍNAS VIRALES POR WESTERN-BLOT O ELISA.**
- c. INMUNOPRECIPITAR O CO-INMUNOPRECIPITAR LAS PROTEÍNAS VIRALES PARA VER CON QUÉ PROTEÍNAS CELULARES INTERACTÚAN.**

# **¿CÓMO COMPRENDER EL CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL INTRACELULAR?**



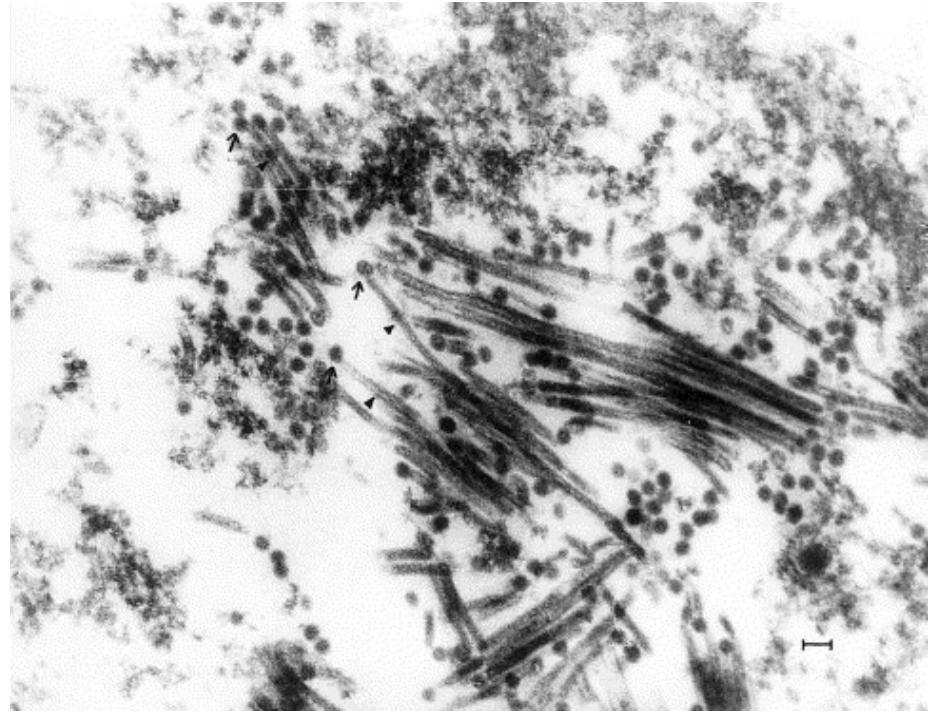
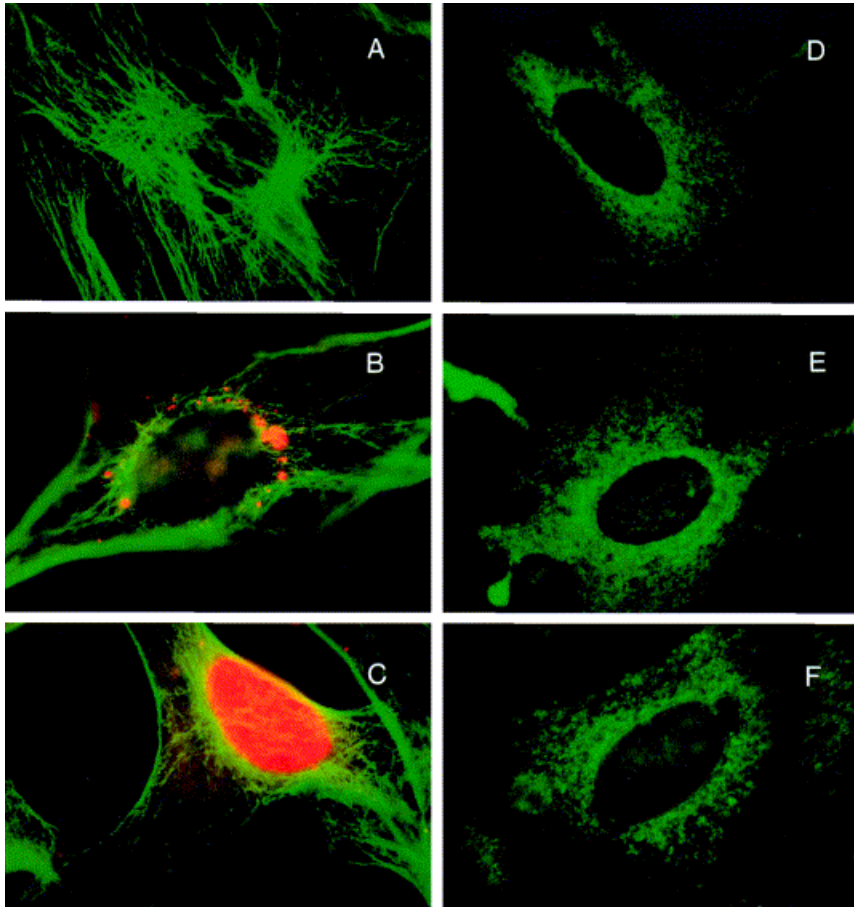
# 1. CARACTERIZAR AL RECEPTOR CELULAR

- a. **EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA CELULAR.**
- b. **PRODUCCIÓN DE HIBRIDOMAS QUE SINTETIZAN ANTICUERPOS MONOCLONALES.**
- c. **DESARROLLO DE CULTIVOS DE CÉLULAS INFECTABLES POR EL VIRUS, AGREGÁNDOLES LOS DISTINTOS ANTICUERPOS MONOCLONALES, EN CONCENTRACIONES CRECIENTES.**
- d. **INFECCIÓN DE LOS CULTIVOS CON IGUAL DOSIS DE VIRUS.**
- e. **SELECCIÓN DEL HIBRIDOMA PRODUCTOR DE MONOCLONALES QUE HUBIERAN INHIBIDO LA INFECCIÓN VIRAL POR INMTERFERENCIA CON EL RECEPTOR CELULAR.**
- f. **COINMUNOPRECIPITAR LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA CON EL MONOCLONAL SELECCIONADO.**
- g. **CARACTERIZAR A ESA PROTEÍNA.**



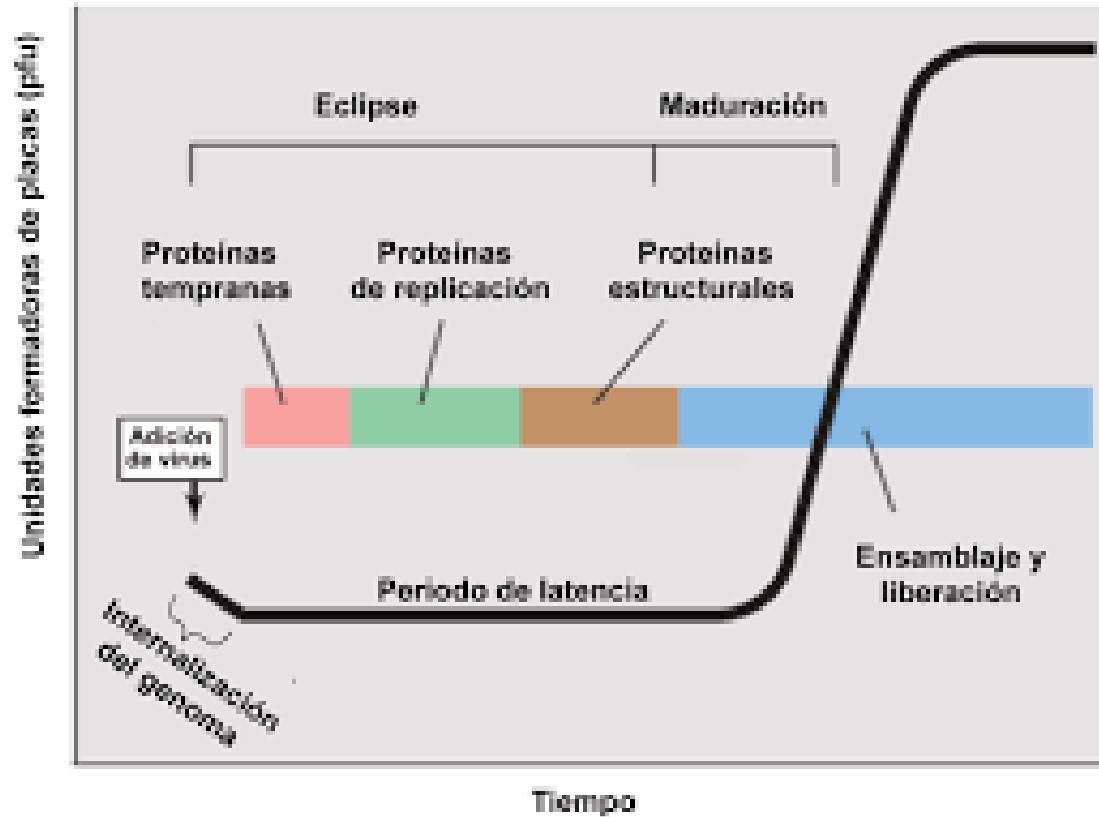
## 2. ESTUDIAR LA PROGRESIÓN INTRACELULAR DEL VIRUS

Se intenta despolimerizar, en forma reversible, a los distintos componentes del citoesqueleto (microtúbulos, fibras de actina, filamentos intermedios, proteínas transportadoras, etc y observar en qué circunstancia el virus no llega al núcleo o al citoplasma.

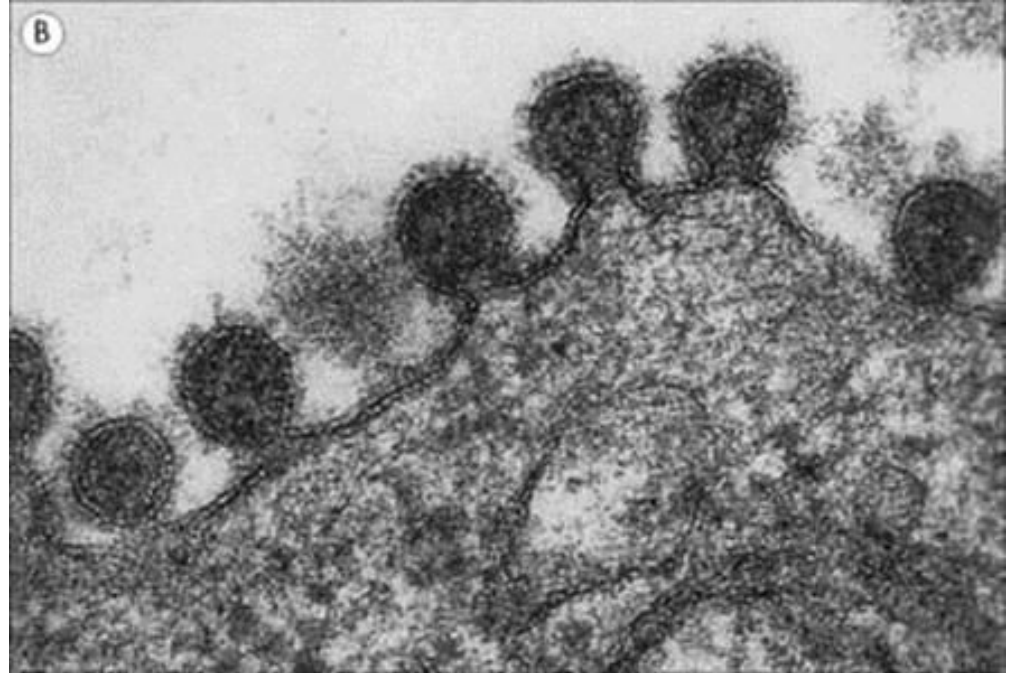
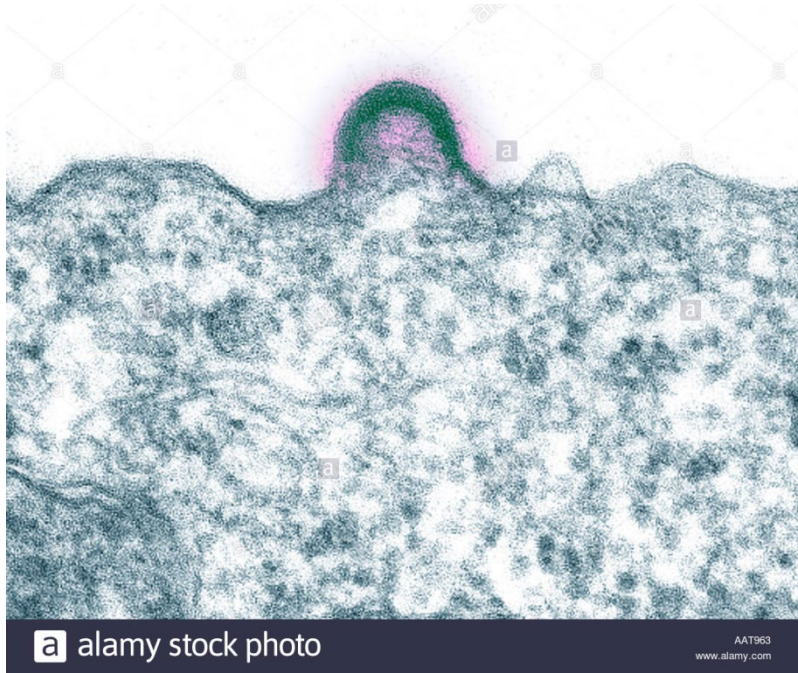


### 3. PROTEÍNAS TEMPRANAS Y TARDÍAS. SÍNTESIS DEL ÁCIDO NUCLEICO VIRAL

Curva «en un solo paso»



## 4. BROTAÇÃO VIRAL (MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISSÃO)



**¿CÓMO CONOCER LA PATOGÉNESIS DE UN VIRUS?**



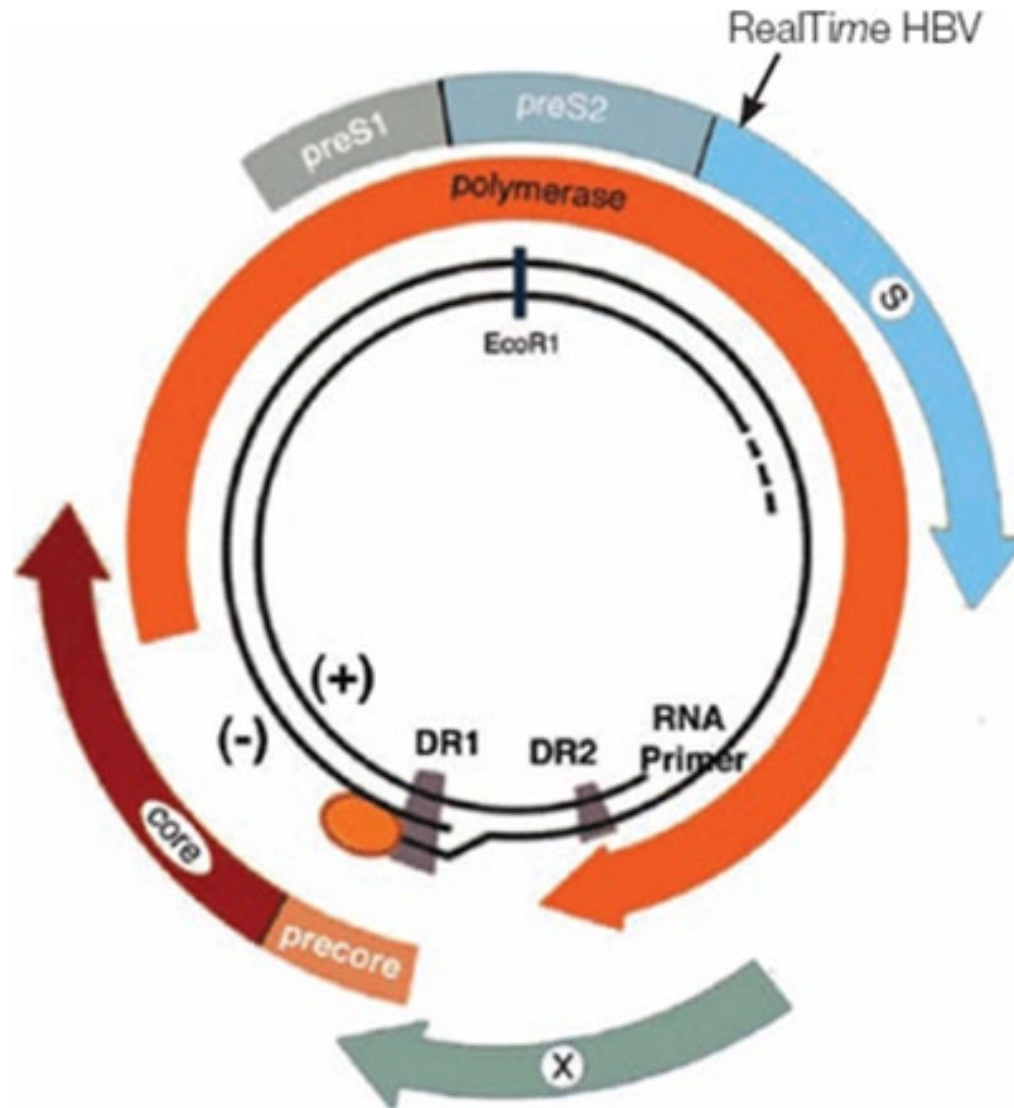
# **1. DESARROLLAR MODELOS EXPERIMENTALES SUSCEPTIBLES A LA INFECCIÓN VIRAL.**

- a. TODO MODELO TENDIENTE A ESTUDIAR LA PATOGENIA DE VIROSIS HUMANAS DEBE SER EN ANIMALES, NO EN CULTIVOS CELULARES.**

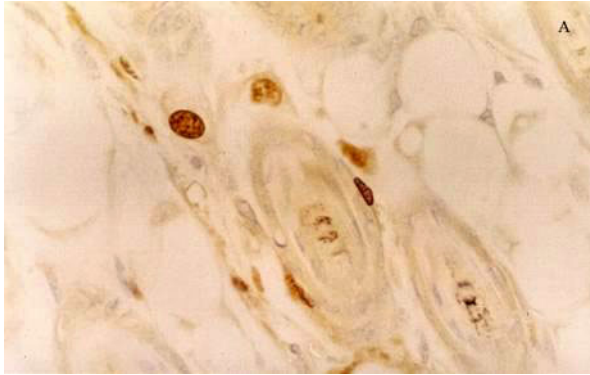


- a. EN LO POSIBLE, CUMPLIR CON LOS POSTULADOS DE KOCH**

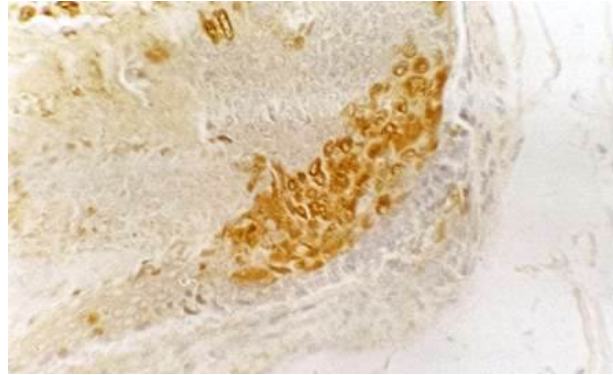
## 2. CONOCER EL MAPA GÉNICO DEL VIRUS



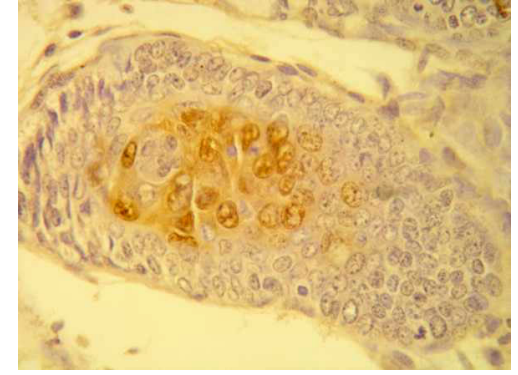
### 3. HACER UN SEGUIMIENTO PASO A PASO DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL



**A**



**B**



**C**



## **4. CONSTRUÍR MUTANTES**

- a. Por delección.**
- b. Por sustitución.**
- c. Por mutagénesis dirigida**

**4. COMPARAR EL COMPORTAMIENTO DE LOS MUTANTES CON EL DEL VIRUS SALVAJE.**

# CONCLUSIONES

- **EL ESTUDIO DE LA PATOGÉNESIS VIRAL FORMA PARTE DE LA «PATOLOGÍA EXPERIMENTAL» EN ANIMALES DE LABORATORIO.**
- **LOS FACTORES DE VIRULENCIA DE CADA VIRUS SE ESTUDIAN A TRAVÉS DE MUTANTES, CON SUS RESPECTIVOS «CONTROLES».**
- **SE INTENTA ESTUDIAR EXPERIMENTALMENTE LO QUE NO PUEDE ESTUDIARSE EN EL HUMANO POR RAZONES ÉTICAS.**
- **SE DEBE INTENTAR EXTRAPOLAR LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ANIMALES AL HUMANO CUANDO SEA POSIBLE**
- **EL 80% DE LA INFORMACIÓN QUE APLICA EL MÉDICO EN SU PRÁCTICA CLÍNICA PROVIENE DE LA INVESTIGACIÓN «BÁSICA» EXPERIMENTAL, NO DE LA CLÍNICA**