



**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 BROTAÇÃO.**
- **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?

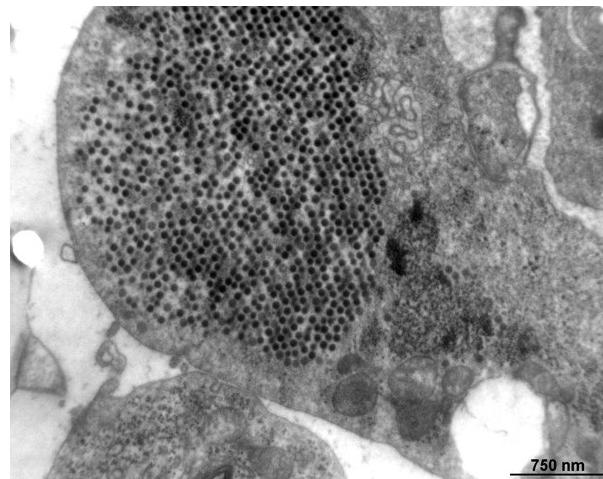
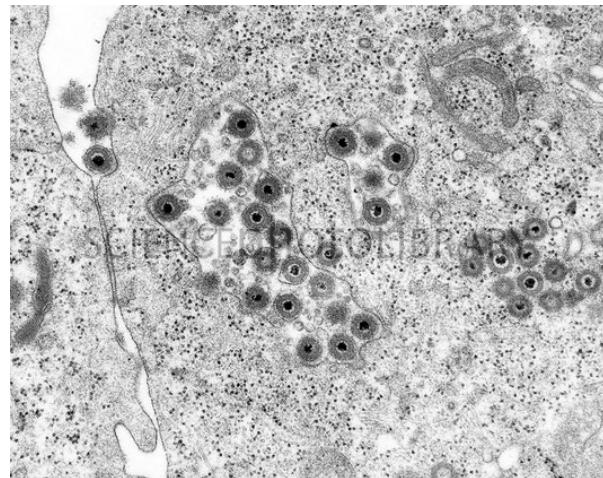
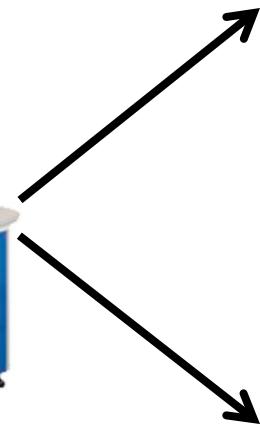
1. LOGRAR UN SUSTRATO DONDE EL VIRUS REPLIQUE EN ALTOS TÍTULOS (EJ. CULTIVOS CELULARES)



MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA

PURIFICACIÓN DEL VIRUS

2. ESTUDIOS ULTRAESTRUCTURALES (MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN)



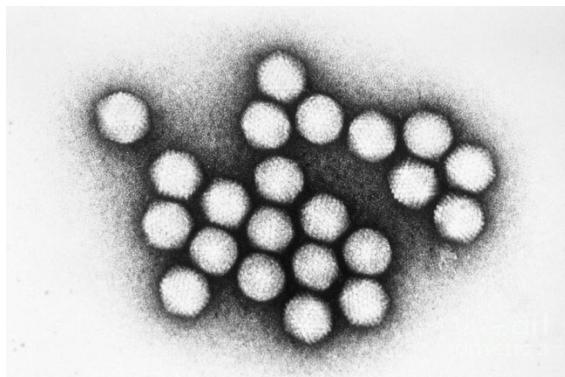
3. PURIFICACIÓN VIRAL



→ ROMPER LAS CÉLULAS



CENTRIFUGAR



VIRUS PURIFICADO

ULTRACENTRIFUGACIÓN



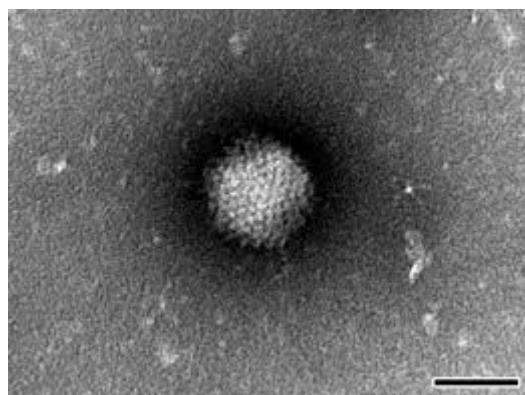
GRADIENTE

4. PRESENCIA O AUSENCIA DE ENVOLTURA:

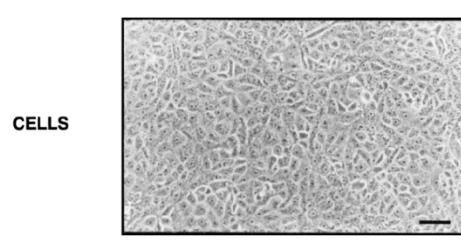
- a. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN
- b. INFECTIVIDAD VIRAL LUEGO DE TRATAMIENTO CON DETERGENTE.
- c. PRESENCIA DE GLICOPROTEÍNAS POR COLUMNAS DE SEFAROSA-CONCANAVALINA A.



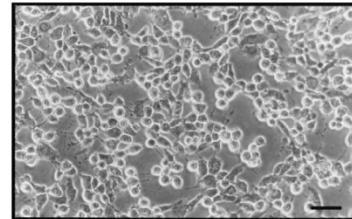
VIRUS ENVUELTO



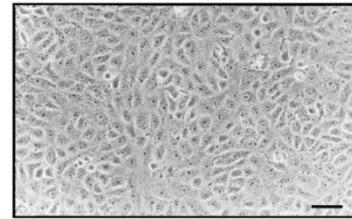
VIRUS DESNUDO



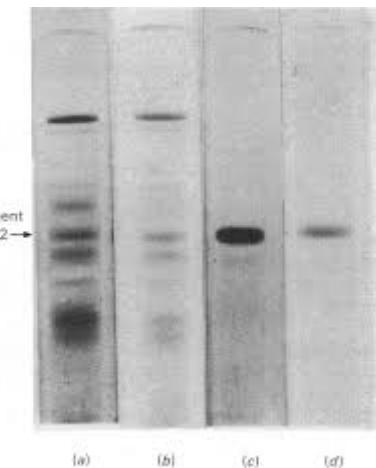
CELLS
+HSV-1



CELLS
+HSV-1



SIN O CON DETERGENTE



GLICOPROTEÍNA DE 12 KDa

5. CARACTERIZACIÓN DEL GENOMA VIRAL

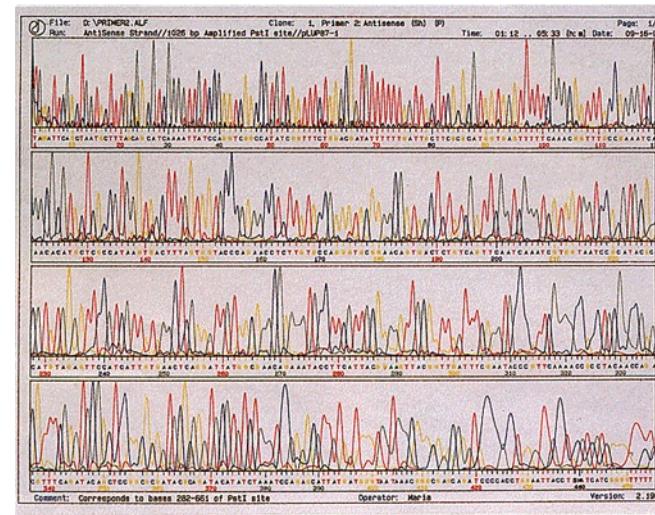
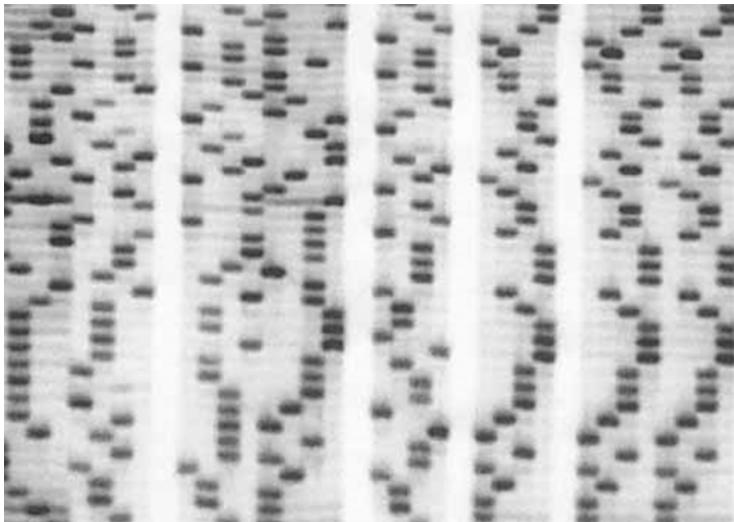
- a. DESNATURALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL VIRUS PURIFICADO CON FENOL-CLOROFORMO Y PRECIPITACIÓN DEL ÁCIDO NUCLEICO VIRAL CON ETANOL/ACETATO DE SODIO.



- 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.

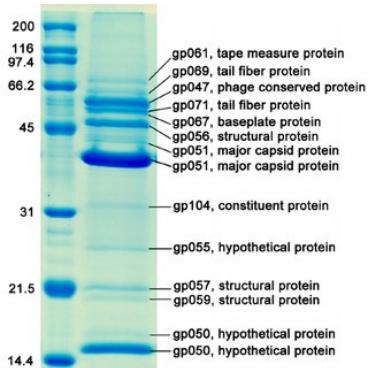
6. SECUENCIACIÓN DEL GENOMA VIRAL

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

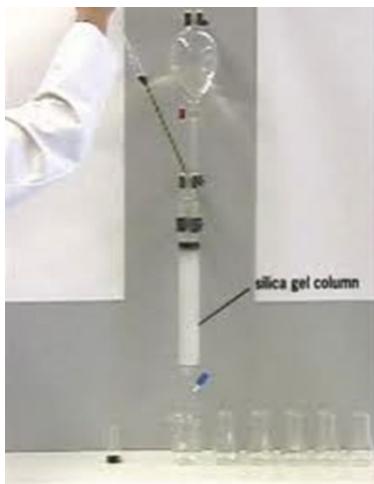


7. CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS VIRALES ESTRUCTURALES.

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.**



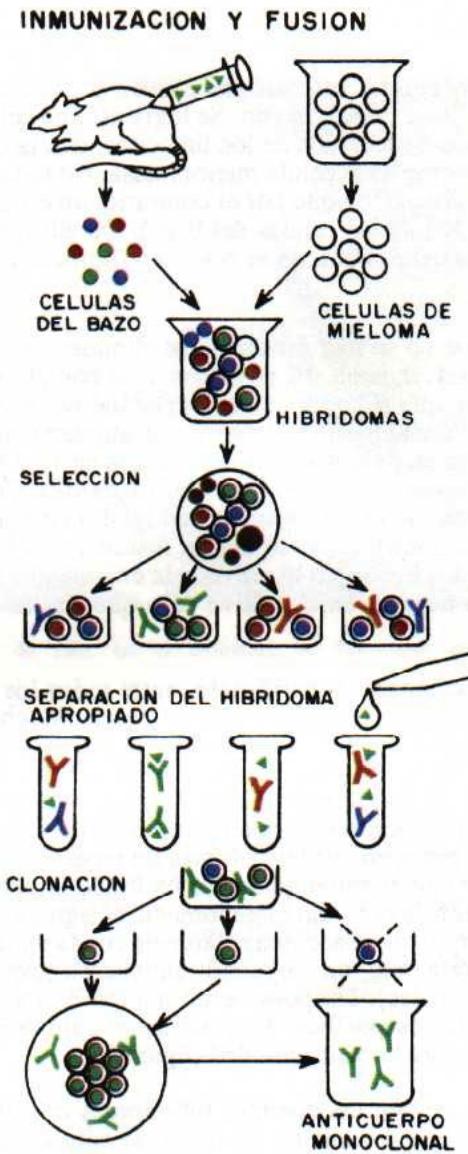
EL SUERO ESPECÍCICO PERMITIRÁ:

- 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?

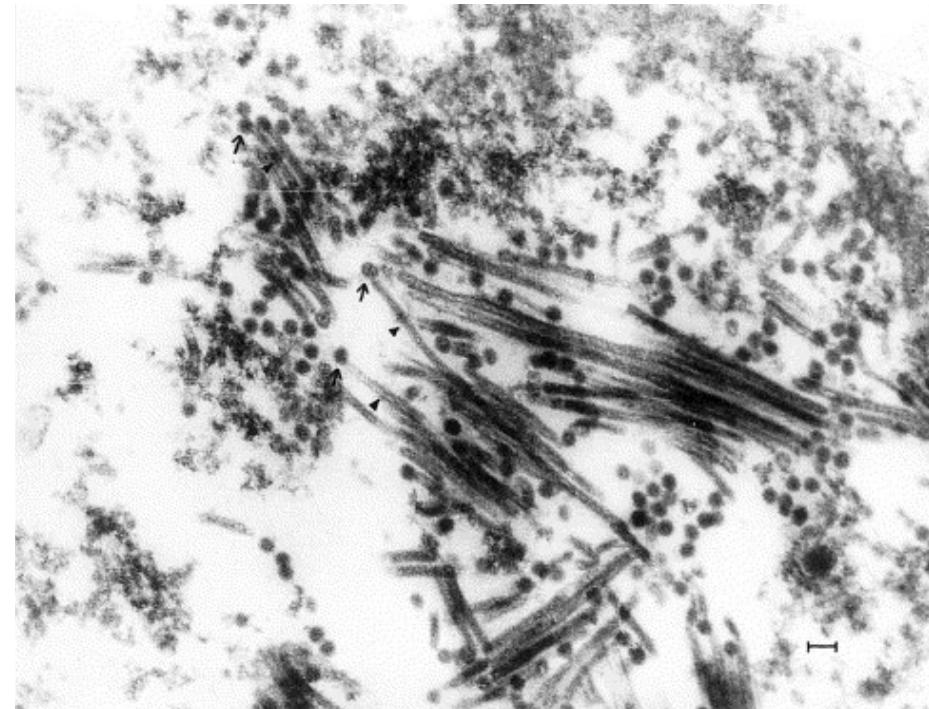
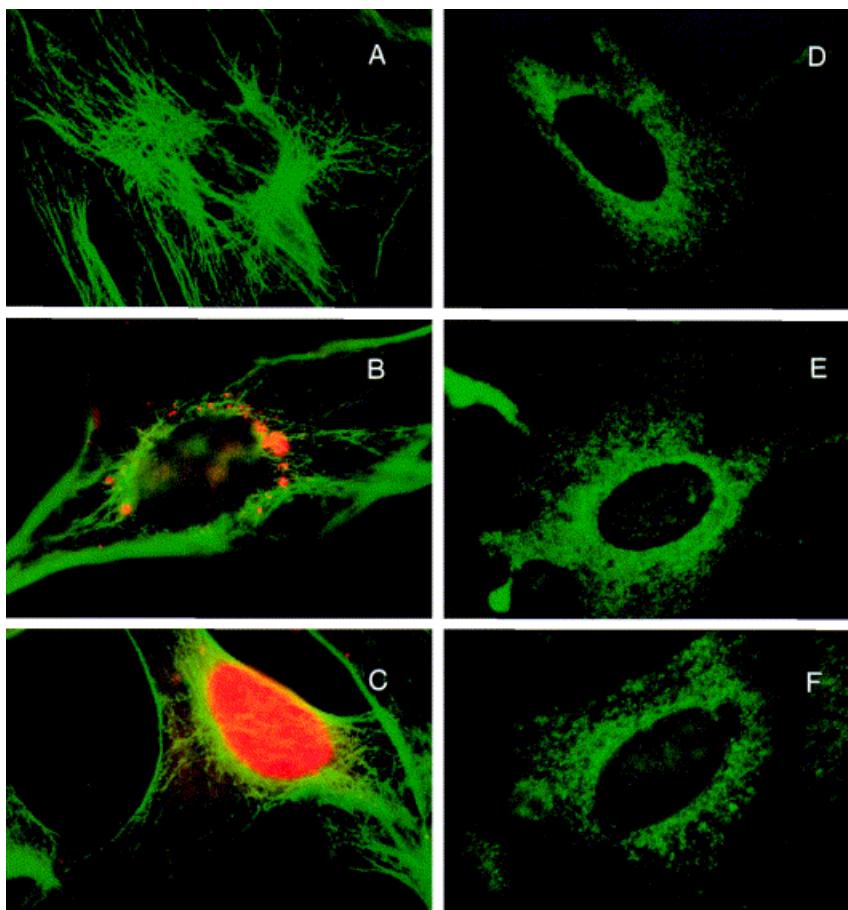
1. CARACTERIZAR AL RECEPTOR CELULAR

- 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 INTERFERENCIA CON EL RECEPTOR CELULAR.
- f. COINMUNOPRECIPITAR LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA CON EL MONOCLONAL SELECCIONADO.
- g. CARACTERIZAR A ESA PROTEÍNA.



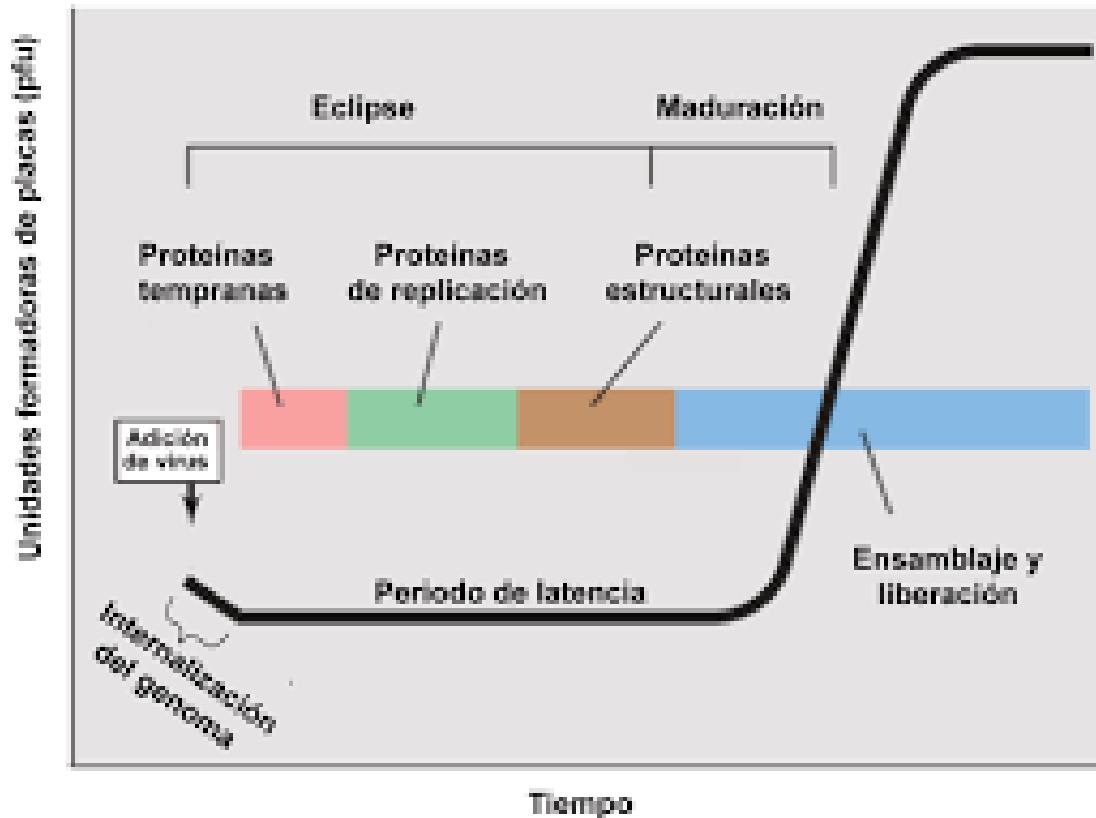
2. ESTUDIAR LA PROGRESIÓN INTRACELULAR DEL VIRUS

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.

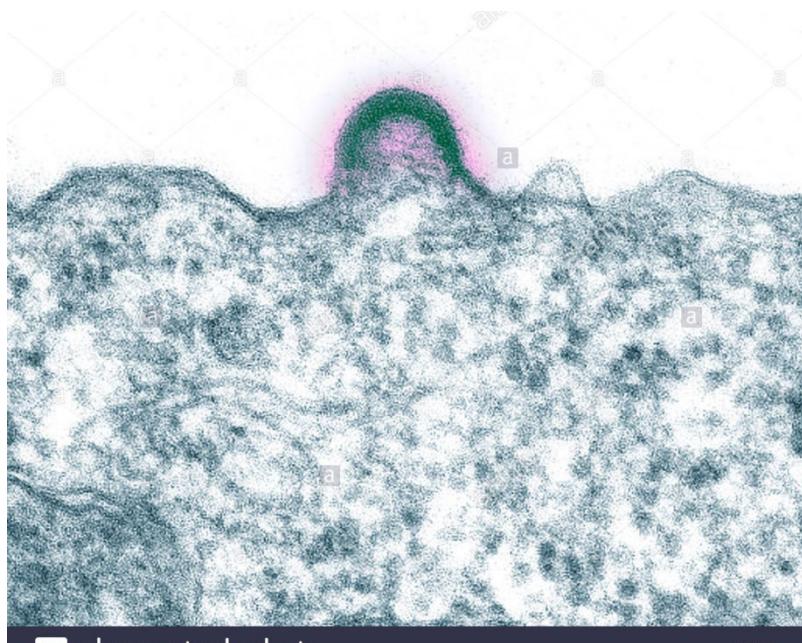


3. PROTEÍNAS TEMPRANAS Y TARDÍAS. SÍNTESIS DEL ÁCIDO NUCLEICO VIRAL

Curva «en un solo paso»

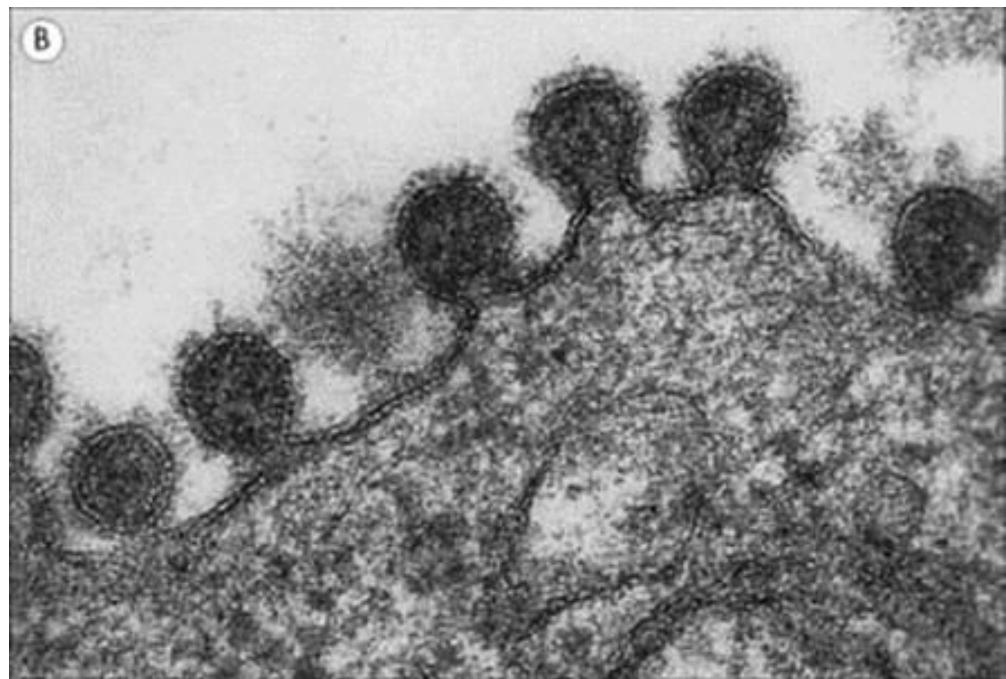


4. BROTACIÓN VIRAL (MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN)



a alamy stock photo

AAT963
www.alamy.com



¿CÓMO CONOCER LA PATOGÉNESIS DE UN VIRUS?

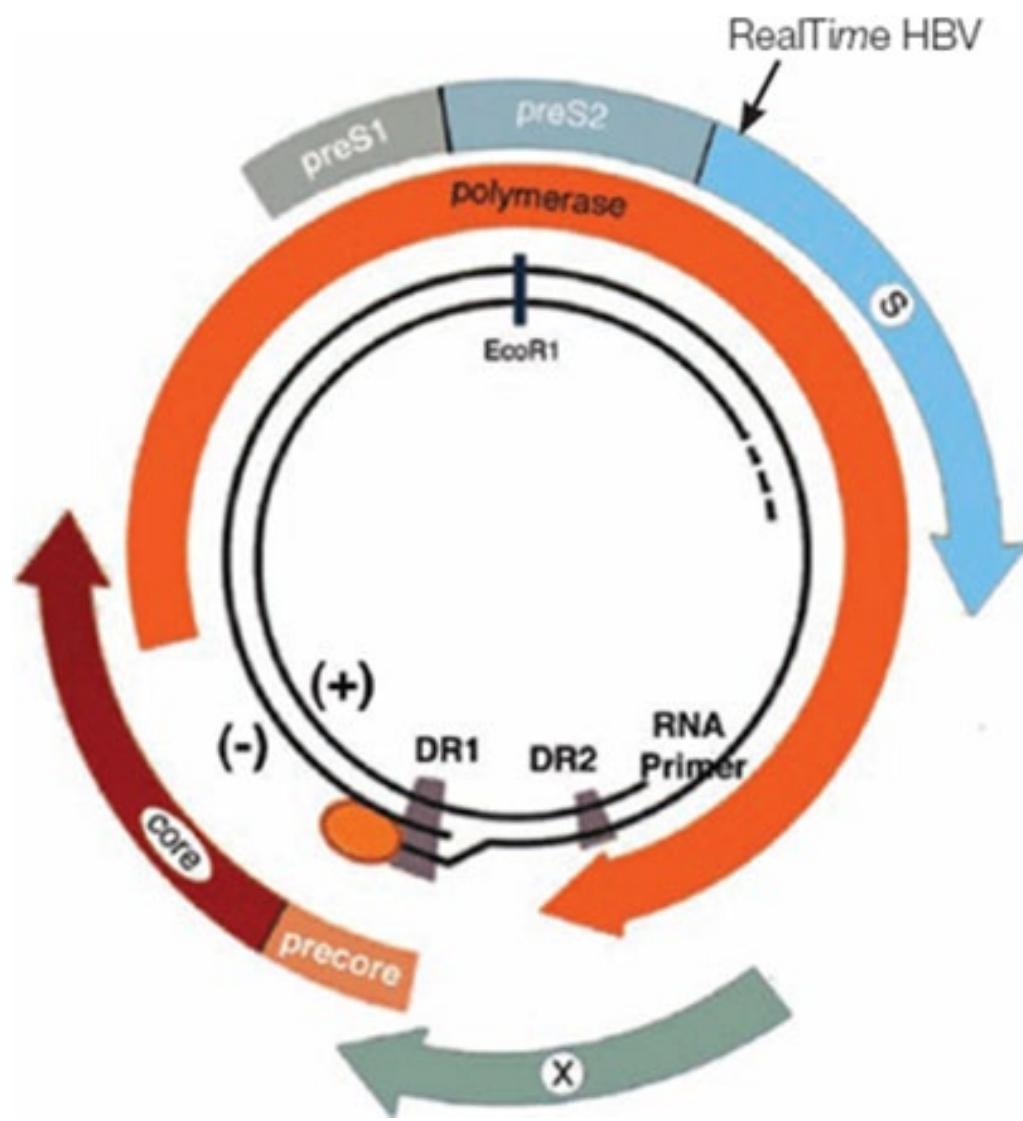
1. DESARROLLAR MODELOS EXPERIMENTALES SUSCEPTIBLES A LA INFECCIÓN VIRAL.

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

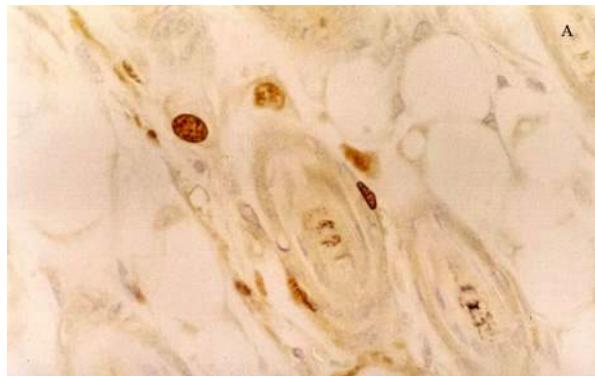


- a. EN LO POSIBLE, CUMPLIR CON LOS POSTULADOS DE KOCH**

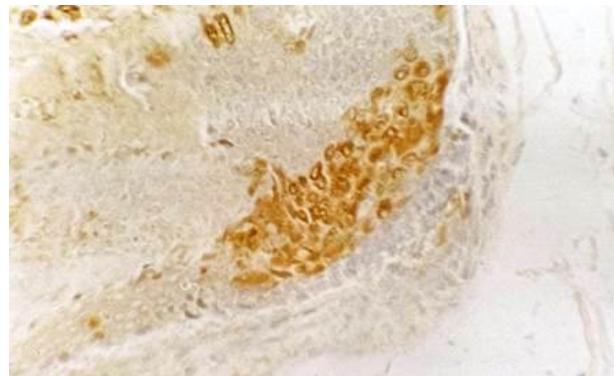
2. CONOCER EL MAPA GÉNICO DEL VIRUS



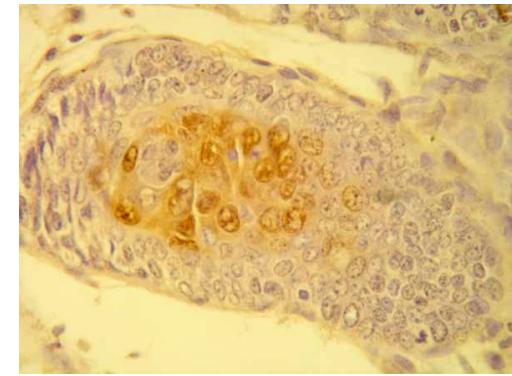
3. HACER UN SEGUIMIENTO PASO A PASO DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL



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**