

Virología

Objetivos:

1. Introducir términos y enfermedades causadas por los virus.
2. Enseñar de forma introductoria la forma en que se replica los virus en sus células hospederas.
3. Realizar un ensayo de placa para demostrar visualmente la replicación lítica.

I. ¿Qué es un virus?

Los virus son partículas que no tienen orgánulos, citoplasma ni estructuras que usualmente se encuentran en la célula. Son pequeños en comparación a una bacteria (tabla 1). Estos se replican o multiplican dentro de la célula hospedera siendo parásitos obligados. Para su replicación necesitan infectar una célula que la manipula para producir y multiplicar sus estructuras que son ensambladas dentro de la misma. Los virus se componen de un **cápsido**, estructura proteica que cubre **núcleo de ácido nucleico**. Los cápsidos le dan la forma al virus, protege el material genético y le permite la adhesión a la célula hospedera. El cápsido se compone de subunidades proteicas llamadas **cápsomeros** y es usado en la identificación del virus ya que el número de cápsomeros y su arreglo es específico para el virus. Hay diferentes tipos de cápsidos: 1) **helical** que forma un espiral alrededor del material genético, 2) **icosahedral** que se compone de varias caras triangulares, 3) **complejo** es una combinación de helical e icosahedral. Los bacteriófagos (virus afecta bacterias) tiende a tener cápsidos más elaborados que le ayuda adherirse a la bacteria hospedera. El núcleo de ácido nucleico es el material genético pero solo uno de ellos, ADN o ARN. Este puede ser de hebra doble o sencilla arreglado en forma linear, circular o fragmentos de hebras. Los de hebra sencilla se identifican como ssRNA o ssDNA por “single strand”. Los virus con doble hebra son dsRNA o dsDNA por “double strand”. Algunos virus tienen una cubierta adicional externa compuesta de membrana de bicapa lípidos que se conoce como **envoltura vírica**. Esta envoltura es adquirida por el virus mientras se ensambla en la célula hospedera. Algunas envolturas tienen proyecciones que sobresalen de la misma llamadas espina compuestas de glicoproteínas. Estas ayudan al virus en adherirse a la célula hospedero por sitios específicos y le da una forma esférica al virus. La envoltura vírica le da más susceptibilidad a condiciones ambientales en comparación a virus desnudo.

Tabla 1. Ejemplos de virus y sus tamaños.

Virus	Tamaño
ortopoxvirus	240-300 nm
bacteriofagos	65-200nm
enterovirus	Menor 30nm

Los virus pueden afectar bacterias, hongos, vertebrados, invertebrados, plantas, algas, protistas y hasta virus. Pero tienden afectar de forma específica a un hospedero y hasta limitarse a un tipo de célula en el hospedero. En su clasificación taxonómica se usa familia y género, pero

en algunos casos el nombre del virus consiste del nombre del grupo a que pertenece (tabla 2). En esta práctica vamos a discutir virus de importancia clínica para el humano.

Tabla 2. Ejemplo de virus causantes de enfermedad en humanos

Familia	Virus	Enfermedad
Picornaviridae	<i>Enterovirus</i>	Polio
Picornaviridae	<i>Rhinovirus</i>	Resfriado común
Reoviridae	<i>Rotavirus</i>	Infecciones gastrointestinales y respiratoria
Herpesviridae	<i>Simplexvirus</i>	Herpes oral y genital
Poxviridae	<i>Orthopoxvirus</i>	viruela

Información tomada de: Clinical and pathogenic microbiology, Howard et. al, 1987.

1. *Enterovirus* es un virus desnudo con ARN como material genético. Es el virus que ocasiona polio. Es un virus resistente a varios químicos y puede pasar el sistema digestivo sin ser afectado. Puede invadir la sangre y el fluido linfático diseminándose por todo el cuerpo. Los síntomas son como los del catarro y puede ocasionar parálisis.
2. *Rhinovirus* es causante del catarro común. Invade en el cuerpo por las mucosas nasales y se replica en las células epiteliales del tracto respiratorio superior.
3. *Rotavirus* es un virus desnudo que contiene ARN de doble hebra (dsRNA). Es causante de diarrea en infantes y niños pequeños. También ocasiona infecciones gastrointestinales y respiratorias en adultos.
4. *Simplexvirus* es un virus con envoltura y con ADN de doble hebra (dsDNA). Ocasiona herpes simplex tipo 1 y tipo 2. El herpes tipo 1 es el oral y el tipo 2 es el herpes genital y neonatal. Esta bajo la familia de los herpesvirus que incluye la varicela, exantema súbita (fiebre de los tres días), mononucleosis, linfoma de Burkitt, la enfermedad de Hodgkin.
5. *Orthopoxvirus* es un virus de ADN de doble hebra (dsDNA) grande que tiende a replicarse en una zona específica del citoplasma. Causa la viruela que son lesiones en la piel.

II. Replicación de los virus

La replicación de los virus ocurre en varios pasos:

1. absorción: Ocurre cuando el virus se adhiere a la célula hospedera. La célula hospedera tiene receptores por donde se une el virus.
2. penetración: Cuando entra el virus a la célula y es seguido a la absorción. Puede ser por fusión de los virus con envoltura o por inserción del material genético.
3. síntesis: Producción de los componentes del virus a través de la célula hospedera. Depende del tipo de material genético es el modo en que el virus se replica usando la célula hospedera.
4. maduración: Cuando se arma el virus dentro de la célula.
5. liberación: Cuando los virus salen de la célula hospedera.

A. Replicación lítica (virulenta): Bacteriófagos T

La absorción del bacteriófago ocurre por el reconocimiento de unas proteínas encontradas en la cola del fago y se unen a receptores que tiene la célula hospedera. Luego, las lisozimas que contiene el fago en su cola ayudan a romper la pared celular de la bacteria permitiendo que el fago tenga contacto con la membrana celular. El fago penetra su material genético dentro de la bacteria. El material genético toma control de la célula y rompe el ADN de la bacteria para usarlo como materia prima para la síntesis de su material genético. El material genético del fago usa la bacteria para sintetizar sus componentes. Los componentes del fago se ensamblan en el citoplasma de la bacteria, el material genético se empaqueta dentro del capsido y la cola se une al mismo. Cuando el fago está completamente ensamblado se le conoce como la fase madura e infecciosa. Las enzimas lisozimas producidas por el fago hacen que se rompa la pared celular de la bacteria y se liberan los nuevos fagos. Esta replicación se conoce como lítica o virulenta. El bacteriófago T4 puede producir de 50-200 nuevos fagos cada vez que se rompe una bacteria infectada.

B. Replicación lisogénica: Fagos temperados, el bacteriofago lambda (λ)

Hay fagos que se replican y al liberarse de la célula hospedera no causan lisis de la misma. Usualmente, estos fagos se quedan un periodo largo en la célula hospedera e incorporan material genético del mismo en el material genético de su hospedero. Ejemplo de fagos temperados es el bacteriófago Lambda que afecta a *E. coli* que se absorbe a la bacteria e incorpora su material genético al citoplasma de la célula. Ya en el citoplasma, el ADN del fago se integra al ADN de la bacteria en un lugar específico. El ADN del virus unido al ADN de la bacteria se conoce como profago y la combinación de ambos se conoce como lisogeno. El fago lambda tiene ADN que codifica para proteínas que evitan la replicación del ADN del fago y la infección por otros fagos lambda a la bacteria. El virus queda en estado de dormancia replicando su ADN cada vez que la bacteria se replica. El virus se activa ya sea de forma espontánea o por respuesta a cambios, haciendo que tome control de la bacteria, se replique y ocasione lisis como ocurre en el ciclo lítico. A veces el profago, ADN del fago insertado en el ADN bacteria, ocasiona mayor virulencia en la bacteria.

C. Ensayo de placa

El método conocido como ensayo de placa permite ver presencia de fagos en bacterias. Esta técnica se hace suspensiones de diluciones seriadas de los bacteriófagos que luego son inoculados en bacterias. Se incuban por un periodo de tiempo para promover la infección de las bacterias por el virus y cuando se replican ocasionan lisis de la bacteria para liberarse al ambiente. Se inoculan las bacterias infectadas en medio sólido y así se observan zonas claras

conocidas como **placas** por la lisis celular (fig. 1). Las placas son áreas donde ocurrió lisis en el hospedero entre crecimiento bacteriano de las bacterias no infectadas. Se entiende que cada placa representa la progenie de un fago así que contando las placas y multiplicándola por el factor de dilución se estima el número de fagos en un volumen de suspensión. Esto se reporta como pfu (“plaque forming units”).

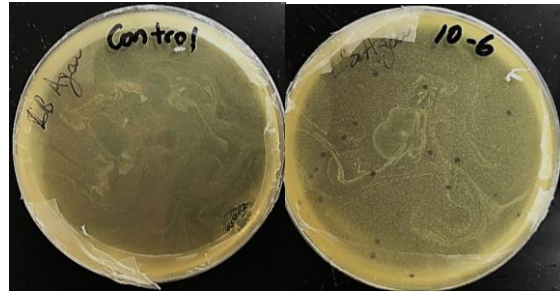


Figura 1. Comparación de *E. coli* B sin ser infectada con *E. coli* B infectada con el bacteriófago T4; A) plato de LB agar control tiene crecimiento de *E. coli* B; B) plato de LB

D. Replicación en célula animal

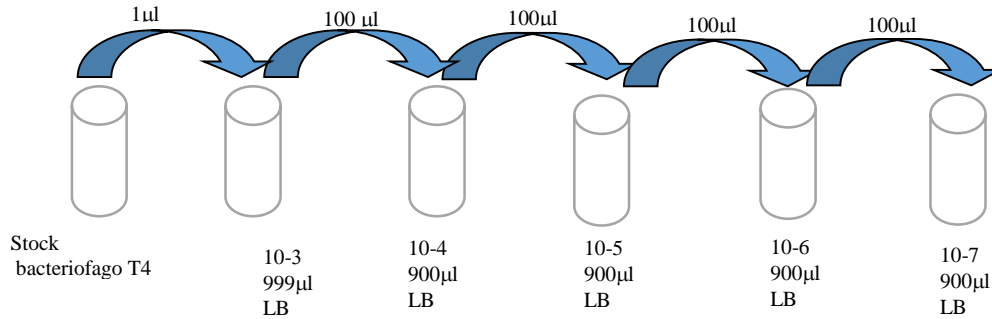
En la etapa de absorción puede ser reconocimiento de sitios específicos entre la célula animal y los virus ya sean interacción entre capsómeros en virus desnudos o proteínas virales en la membrana de los virus con envoltura vírica. Luego ocurre la penetración de todo el virus a la célula animal por endocitosis para los virus desnudos y por fusión de membranas que compone la envoltura viral con la membrana celular. Ya en el citoplasma el material genético del virus se separa del resto del virus. Virus con ADN se replica primero el material que codifica para las proteínas y enzimas necesarias para la replicación del ADN viral. Luego se replica el ADN que codifica producción de las partes del virus. En el caso de los virus con ARN es diferente su replicación dentro de la célula animal y varía dependiendo del tipo de ARN. También la etapa de maduración del virus depende del tipo de virus. Hay virus que se ensamblan dentro del núcleo de la célula animal, otros cerca de la membrana celular y otros en el citoplasma. En los virus de célula animal, algunos componentes son sintetizados por proteínas codificadas por el virus y otros componentes son sintetizados por proteínas de la misma célula hospedera. Cuando el virus se libera este puede ocasionar lisis a su hospedero y en otros casos no.

IV. Práctica:

Importante: Poner a derretir el LB-top agar en agua caliente y luego mantenerlos en agua tibia (45°C) hasta que lo utilice.

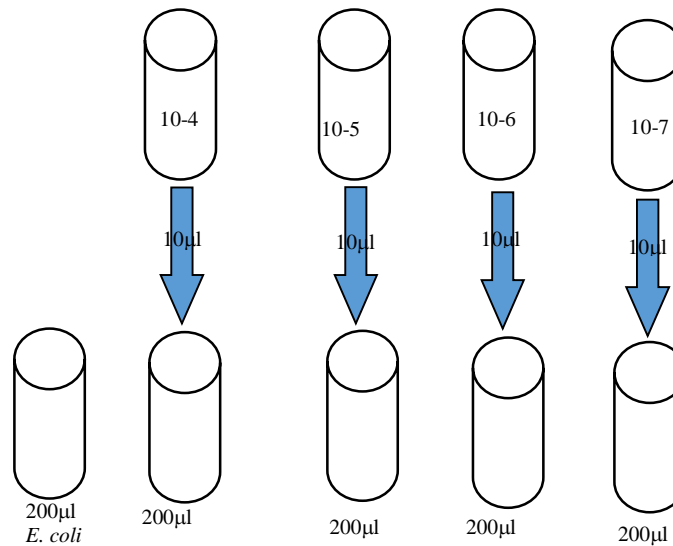
A. Dilución del bacteriófago T4

1. Llevando técnicas asépticas, saque 5 microtubos esteriles del envase, los tapa y los marca en la tapa como en el costado con: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}
2. Usando una micropipeta de un máximo de 200 μ l, añada 999 μ l de caldo de LB al microtubo rotulado 10^{-3} , y 900 μ l al resto de los microtubos.
3. Añada 1 μ l del “stock” de bacteriófago T4 al microtubo 10^{-3} , mezcle bien y saque 100 μ l que añadirá al microtubo 10^{-4} . Mezcle bien el contenido del microtubo 10^{-4} y continúe haciendo una dilución seriada de 100 μ l hasta el microtubo 10^{-7} .



B. Inoculación del bacteriófago T4 en *E. coli* B

1. Llevando técnicas asépticas, saque 5 microtubos estériles del envase, los tapa y los marca en la tapa como en el costado con: control, 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} .
2. A cada microtubo añada 200µl de *E. coli* B usando una micropipeta de un máximo de 200µl.
3. Añada 10µl de sus respectivas diluciones del bacteriófago preparadas en la parte A, en los microtubos con la bacteria. **El tubo control no se le añade bacteriófago.**
4. Tape bien los microtubos y mezcle moviendo suavemente.



C. Inoculación en los platos de LB agar

1. Rotule por el anverso del plato Petri sus iniciales, Biol 4375L, sección y la dilución: control, 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} .
2. Transfiera el contenido del microtubo de *E. coli* B control a un tubo con “Top agar-LB” derretido, homogenice frotando entre las manos y vuelta en el plato de LB agar Control. Mueva

el plato sobre la superficie como si dibujara un número ocho para que se distribuya. Deje el plato a un lado hasta que se solidifique.

3. Importante es que busque uno a uno los tubos derretidos de “Top agar-LB” porque se solidifican rápido si los deja fuera del agua caliente.

4. Haga el mismo paso #2 con los diferentes tubos que contienen *E. coli* B + bacteriófago diluido (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}).

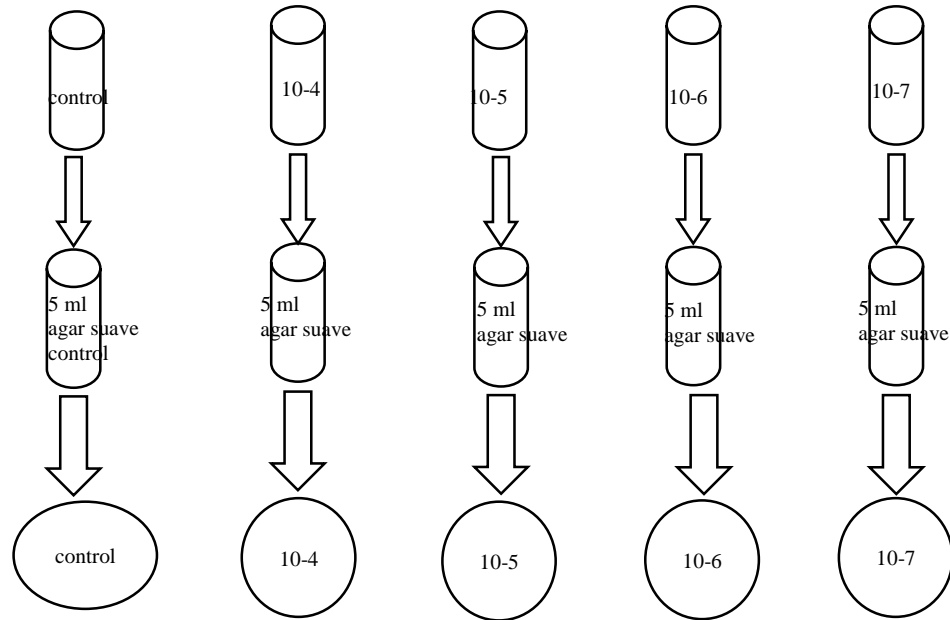
5. Coloque parafina a los platos Petri luego que este solidificado el “Top agar-LB”. Incube a 37°C boca arriba para que no se dañe el inóculo del “Top agar-LB”.

6. Observar a las 24 y 48hrs. de incubado. Cuenten las placas formadas en cada plato y calculen la unidad formadora de placas (PFU, siglas en inglés). Retrate los platos para la libreta. Los platos con menos de 30 placas se categorizan como TFTC (“to few to count”) y los platos que tengan más de 300 placas se denominan TMTC (“to much to count”).

Se calcula la unidad formadora de placa (PFU) dividiendo el número de placas observadas por el factor de dilución de donde proviene.

Ejemplo: Conté 150 placas en el plato a la 10^{-6}

$$\text{PFU} = 150 / 1 \times 10^{-6} \rightarrow 150 / 0.000001 \rightarrow 150 \times 10^6 \text{ PFU/ml} \rightarrow 150,000,000 \text{ PFU/ml}$$



# placas					
Factor dilución					
PFU					

Referencia:

Black, J.G. (2012). Viruses. In: *Microbiology: Principles and explorations* (8^{va} ed., pp. 270-307). E.U.: John Wiley & Sons.

Cappuccino, J.G. & Sherman, N. (1996). *Microbiology: a laboratory manual* (4^{ta} ed.). Menlo Park, California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.