

SEMINARIO DE DIFUSIÓN EN CALIDAD DE TRANSFERENCIA DE CONOCIMIENTO

Estancia realizada desde el 17-10- 2016 al 05-01-2017

**Esta estancia ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC)
con la financiación del Programa de PROCIENCIA-CONACYT**



MICROSCOPIA EN EL ESTUDIO DE LAS FACTORIAS VIRALES

Ma. Odilia Benitez Cabañas







CNB



CNBito

BIOLOGÍA DE SISTEMAS

INMUNOLOGÍA Y ONCOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE ESTRUCTURA DE MACROMOLÉCULAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MOLECULAR DE PLANTAS

Cell Structure Laboratory. Cristina Risco
Structural and physical determinants of viral assembly. Carmen San Martín



DEPARTAMENTO DE ESTRUCTURAS MACROMOLECULARES

- La actividad de los miembros de este Departamento se centra en torno a los diferentes aspectos de la Biología Estructural, cubriendo desde enfoques experimentales a *in silico*. Varios grupos del Departamento están involucrados en servicios en el Centro, tales como **Proteómica, Microscopía Electrónica y Cristalografía de Rayos X**.



Jefe: José María Valpuesta. PhD.

Cell Structure Lab

Investiga la biogénesis de organelos y complejos macromoleculares funcionales en las células. Específicamente, el ensamblaje y la arquitectura de las **fábricas de virus**, complejos de replicación y vías morfogénicas de varios virus de ARN que son patógenos humanos importantes como **Bunyavirus, Reovirus y Virus de la Influenza**.



Jefa: Cristina Risco. PhD

Structural and physical determinants of adenovirus assembly

Investiga los principios **estructurales y físicos** que gobiernan el montaje y la estabilización de virus complejos. Usan **adenovirus** como modelo, un espécimen desafiante de interés tanto en virología básica como en nanobiomedicina. Combinan las técnicas de biofísica, computacional, estructural y biología molecular. El conocimiento exacto de la **estructura del adenovirus y la biología es fundamental** tanto para el descubrimiento de fármacos anti-adenovirus como para el diseño de nuevas y eficaces herramientas terapéuticas adenovirales.



Jefa: Carmen San Martín. PhD



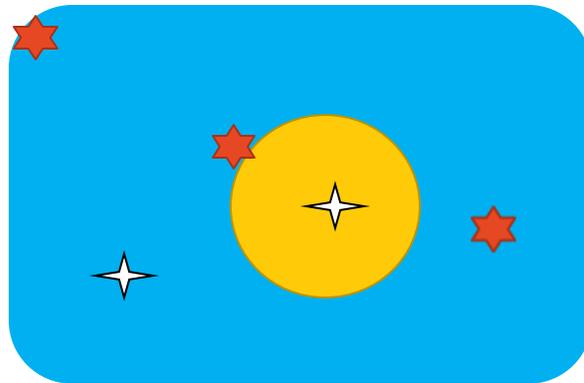
1. VIRUS



parásitos intracelulares obligados

PATÓGENOS

plantas,
animales,
hongos,
levaduras,
bacterias,
humanos y
virus



FACTORIA VIRAL

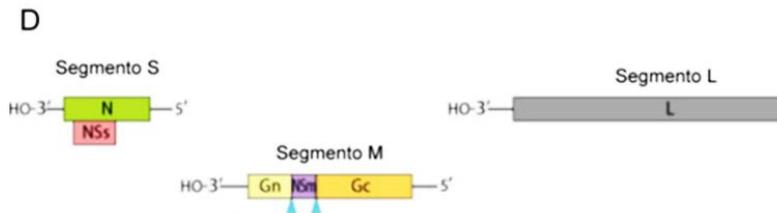
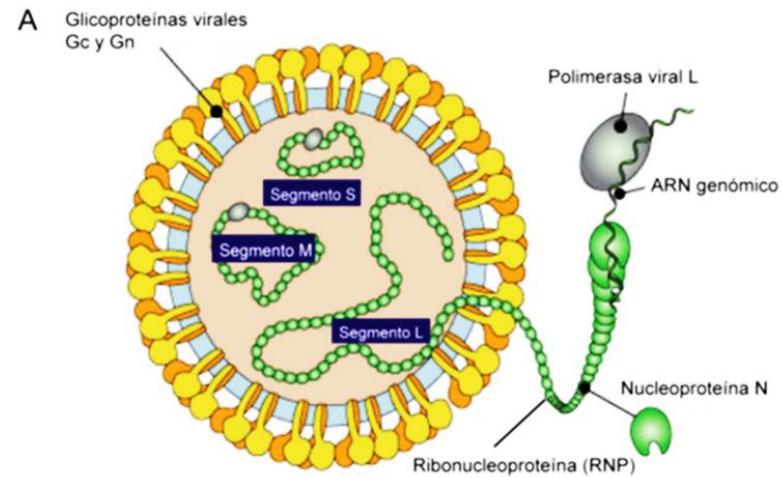


2. Virus BUNYAMWERA

- La familia ***Bunyaviridae***
- 350 virus ARN,
- 5 géneros: ***Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* y *Tospovirus*.**
- animales – plantas - **fiebres hemorrágicas**
- patógenos emergentes (Walter and Barr, 2011).
- *Orthobunyavirus* **arbovirus** - *Culicidae* - *Aedes*, *Culex*, *Anopheles*.
- *Orthobunyavirus* - **virus Bunyamwera (VBUN)** - prototipo dentro de los bunyavirus.



Morfología y genoma viral



http://viralzone.expasy.org/all_by_species/82.html



Tabla 1-1: Generos de la familia *Bunyaviridae* que infectan a animales y humanos. El genero *Tospovirus*, que infecta a plantas, no se recoge en la Tabla.

Genero	Virus	Enfermedad	Vector	Hospedador	Sintomas
<i>Orthobunyavirus</i>	Virus Bunyamwera (VBUN)	Enfermedad febril	Mosquitos (<i>Aedes</i>)	Roedores y humanos	Leves febriculas.
	Virus de La Crosse (VLAC)	Encefalitis de La Crosse		Humanos	Fiebre, vomitos, letargo y fuertes dolores de cabeza.
	Virus del cañon de Jamestown (VJC)	Encefalitis del cañon de Jamestown		Humanos y roedores	Fiebre, vomitos, letargo, fuertes dolores de cabeza y rigidez de nuca.
	Virus Akabane (VAKA)	Infección viral Akabane		Vaca, oveja y cabra	Viremia plasmatica, necrosis, muerte neuronal y exantema febril.
	Virus de Valle del Cache (VVC)	Fiebre del valle del Cache		Ruminantes domesticos, ciervos y caballos	Rigidez articular, hipoplasia del musculo esqueletico. Artrogriposis e hidranencefalia.
	Virus Oropouche (VOPO)	Fiebre del Oropouche		Humanos	Fiebre elevada y mialgias.
<i>Phlebovirus</i>	Virus de la Fiebre del Valle del Rift (VFVR)	Infeccion del Valle del Rift	Mosquitos y moscas flebotomas	Humanos	Desde leves febriculas a fiebres hemorragicas, rigidez de nuca, sensibilidad a la luz, perdida de apetito y vomito, conjuntivitis, miositis, y encefalitis. Complicaciones neurologicas.
	Virus de la Toscana (VTOS)	Infecciones de la Toscana		Humanos	Meningitis, fiebre elevada, dolores musculares.
	Virus Unkuniemi (VUU)	Infecciones Unkuniemi		Humanos y pajaros	No conocida.



<i>Nairovirus</i>	Virus hemorrágico de Congo-Crimea (VHCC)	Fiebre hemorrágica de Congo-Crimea	Garrapatas e insectos del género <i>Culicoides</i>	Humanos	Fiebres hemorrágicas severas, mialgia y fuertes dolores de cabeza.
	Virus de la enfermedad de la oveja de Nairobi (VNSD)	Infección de la oveja de Nairobi			Cabras y ovejas
<i>Hantavirus</i>	Virus Hantaan (VTHN)	Síndrome de distres Respiratorio del adulto	Ratas y ratones	Humanos	Fiebres hemorrágicas con fallo renal, edema pulmonar y aumento de capilaridad en los pulmones.
	Virus Dobrava	Enfermedad renal			Dolores musculares, fiebre, migraña, tos, náusea o vómito, diarrea, dolor abdominal.
	Virus Sin Nombre (VSN)	Enfermedades cardiopulmonares			Fiebre, dolores musculares, tos y dolor de cabeza. Pulmones con líquido.
	Virus Seul (VSEO)	Enfermedad renal			Nefritis, fiebre, sangre en orina y heces.



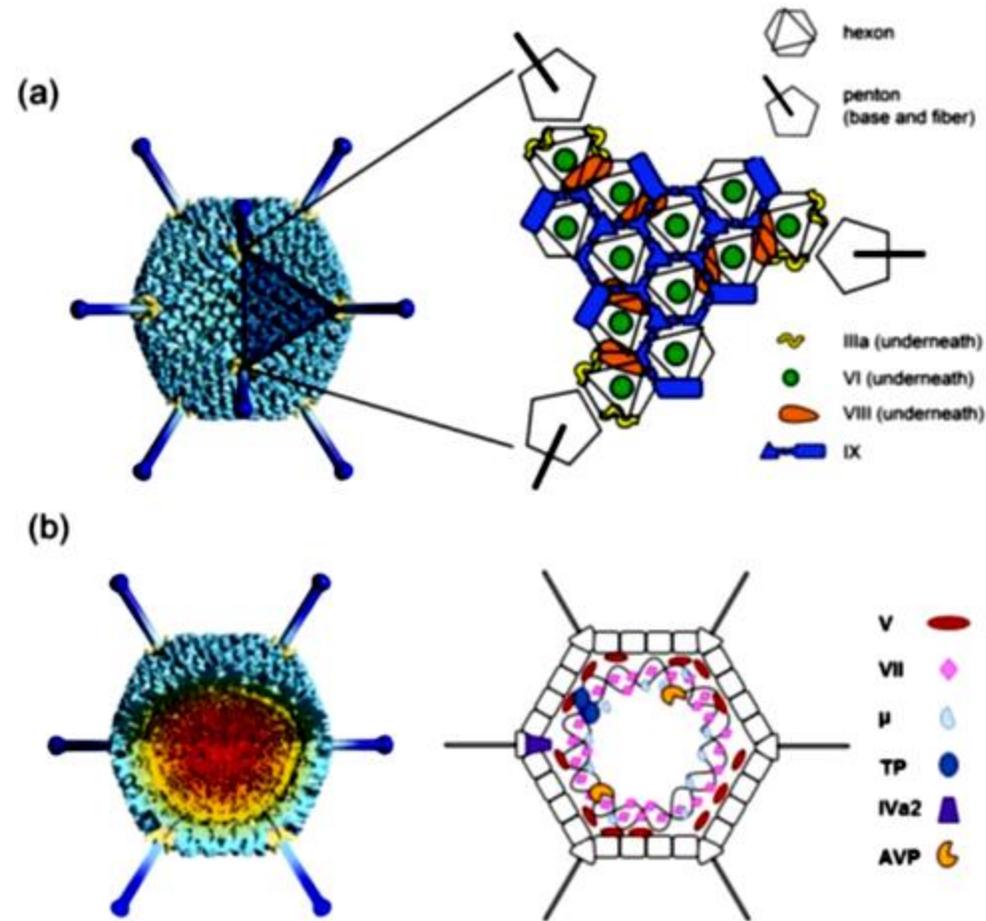
4. ADENOVIRUS

INTRODUCCIÓN

- Tejido adenoide humano, mediados del siglo XX (Rowe et al., 1953)
- **patógenos** (del ser humano y de animales con interés económico y ambiental) - **herramientas para terapia génica y desarrollo de vacunas.**
- **cinco géneros diferentes:**
 - *Mastadenovirus* (infectan a mamíferos),
 - *Aviadenovirus* (infectan aves),
 - *Atadenovirus* (infectan reptiles, aves, marsupiales y mamíferos),
 - *Siadenovirus* (infectan anfibios y aves)
 - *Ichtadenovirus* (infectan peces).
- Su genoma **dsDNA** - grandes cantidades de proteínas positivamente cargadas
- Núcleo - **cápside icosaédrica** - múltiples copias de siete proteínas virales.
- Etapa final de la morfogénesis: procesamiento proteolítico de varias proteínas de la cápside y del núcleo.
- El virus inmaduro - todas las proteínas precursoras – no infeccioso: defecto de endurecimiento.
- Más de 200 AdV han sido aislados de una variedad de vertebrados.



4. ADENOVIRUS. ESTRUCTURA



(San Martin, 2012).



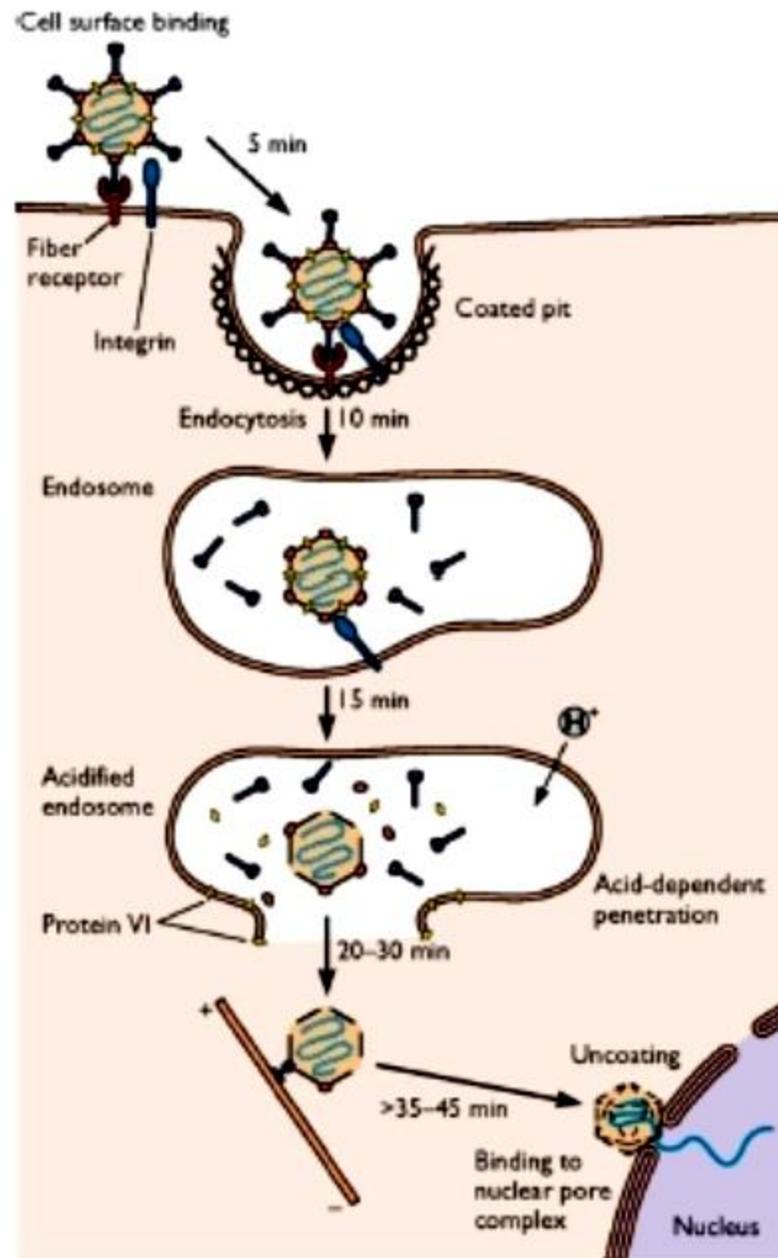


Figure 4.- Adenovirus infection pathway (Flint, 2009).



OBJETIVOS DE LA ESTANCIA

- ✓ **Adquirir conocimientos sobre los métodos experimentales basados en microscopía para el estudio de las interacciones virus-célula.**
- ✓ Entrenamiento en el protocolo de infección de células en cultivo con arbovirus de la **familia Bunyaviridae** en laboratorios de bioseguridad BSL-2.
- ✓ Adquirir habilidades en el protocolo de preparación de muestras para uso del microscopio de fluorescencia y de preparación de muestras para el uso del microscopio electrónico.
- ✓ Entrenamiento en el protocolo de infección de células en cultivo con adenovirus en laboratorios de bioseguridad BSL-2.
- ✓ Entrenamiento en el protocolo de Purificación de adenovirus.



ACTIVIDADES DESARROLLADAS

PRIMERA PARTE: RiscoLab

MATERIALES

- **Células Vero:** células epiteliales de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*).
- **Medio Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM;** suplementado, 1% aminoácidos no esenciales, 4mM glutamina, antibióticos, 50ng/ml gentamicina, 10U/ml penicilina/estreptomicina y suero fetal bovino (fetal bovine serum), FBS; al 10%.
- **Virus Bunyamwera** wild type cepa Maguari (ATCC VR-87).
- **Anticuerpos y sondas.** Para detección de proteínas del VBUN se utilizaron distintos anticuerpos:
 - El anticuerpo policlonal generado en conejo contra el VBUN (**anti-VBUN**)
 - El anticuerpo monoclonal contra la **glicoproteína Gc del VBUN (anti-Gc)** generado en ratón.

Para marcar el aparato de Golgi, se utilizó un anticuerpo que reconoce **gigantina** (proteína estructural del aparato de Golgi).

La sonda para el **marcaje de núcleos diclorato de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)**.

Otros reactivos: Se usó **saponina al 4%** como permeabilizante celular y el medio de montaje usado para inmunofluorescencias fue **ProLong**.



ACTIVIDADES DESARROLLADAS PRIMERA PARTE: RiscoLab

1. Infección de células en cultivo con arbovirus de la familia Bunyaviridae en laboratorios de bioseguridad BSL-2.

1. Cultivo de células de mamífero

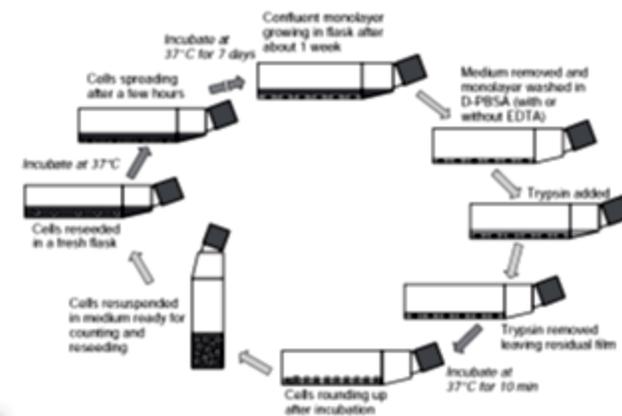
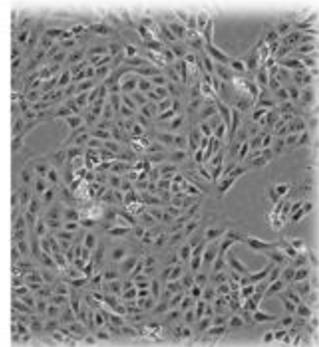
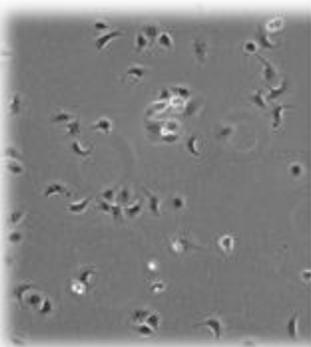


Fig. 12.3. Subculture of Monolayer. Stages in the subculture and growth cycle of monolayer cells after trypsinization (see also Plates 4, 5).



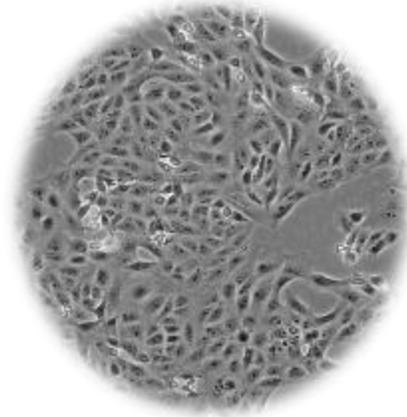
(Imágenes ilustrativas)



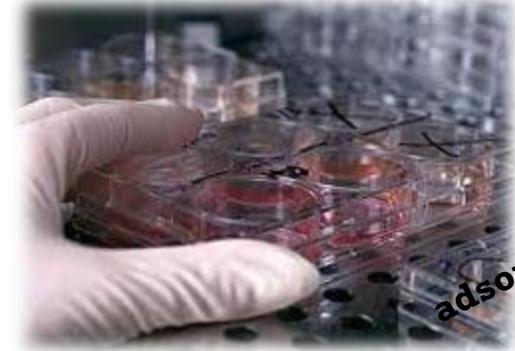
2. Infección de células Vero con VBUN



Células Vero en placas p100 con medio DMEM-FBS 10% a 37°C



Confluencia 70%



se infectó el cultivo celular con VBUN a una **multiplicidad de Infección (M.O.I) de 1 pfu/célula**.
1h, 37°C con agitación c/15'



se retira el inóculo viral



se añade medio de cultivo fresco con un porcentaje de FBS al 2%



Se incubó a 37°C 14 horas post infección (hpi).

(Imágenes ilustrativas)



3. Estudio de las infecciones mediante visualización de los cultivos.

Microscopía óptica: Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

FIJACIÓN
De cél. Inf. PFA 4 %
1ml/pocillo

Se retira PFA

3 LAVADOS 5' PBS

✓ Se almacenó en PBS (1ml/pocillo) y a 4°C hasta su utilización

RT 20'

Al día siguiente....

MONTAJE DE CUBREOBJETOS

Permeabilización 10'
SAPONINA 4% en PBS

Bloqueo 40'
Saponina 4%, PBS, Suero
de Cabra 2%

RT 20'

Anticuerpos Primarios
Mo (Anti-Gc, dil 1:200 -virus)
Rb (Anti-Gigantina), dil 1:200 - Golgi

1h RT y oscuridad

3 Lavados
con PBS 5'

Anticuerpos Secundarios
Anti-mo 594 rojo, dil 1:500 -virus
Anti-Rb 488 verde, dil 1:500 -verde

45 RT y oscuridad

Transcurridos los 45'
3 Lavados con PBS 5'

NÚCLEOS se marcaron con
sonda DAPI dil 1:200

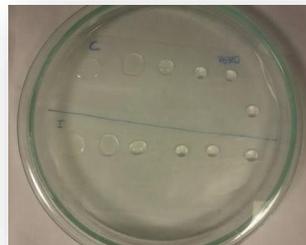
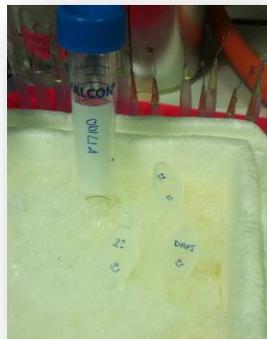
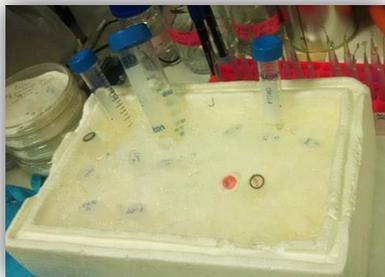
20' RT y oscuridad

3 Lavados con PBS 5'

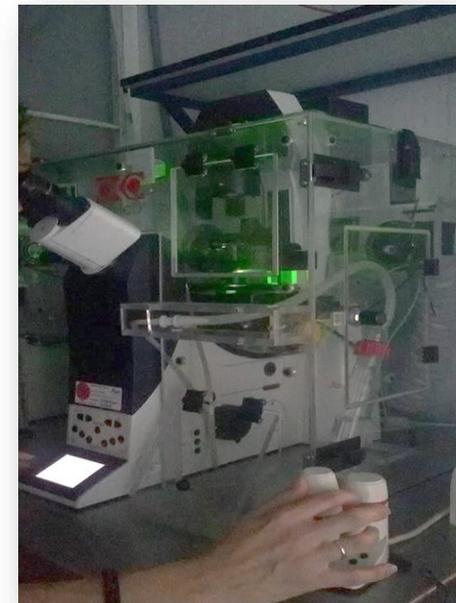
Se montaron los cubres con
ProLong (5ul/cubre-objeto)

Se dejó secando en oscuridad a RT por 24h

Antes de la siembra, introducimos los cubre-objetos en la placa multipocillo (control e Inf). Así las células quedaron adheridas a estos cubre-objetos que, más tarde, se pueden extraer de la placa y usar para su marcaje mediante IFA



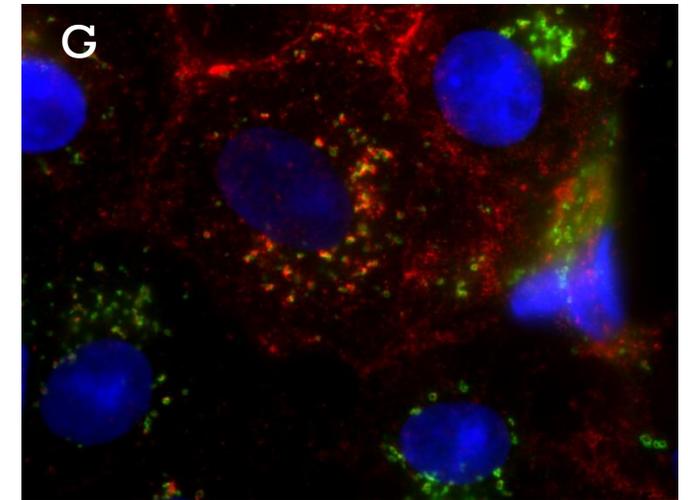
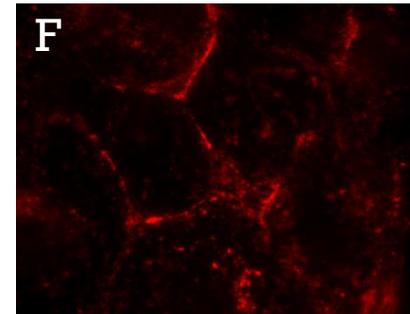
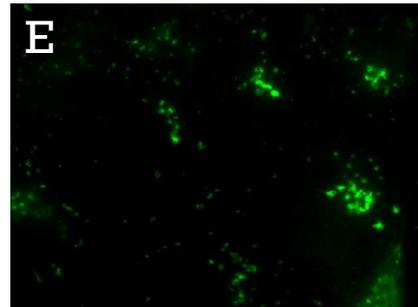
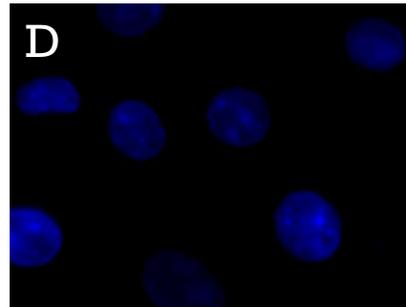
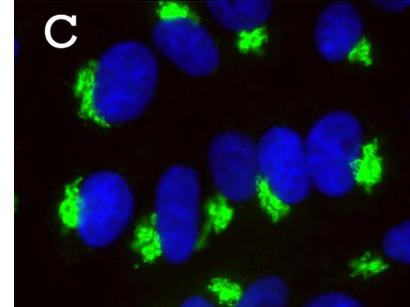
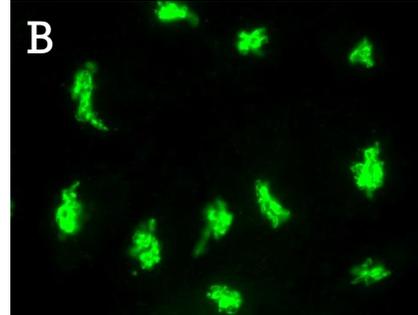
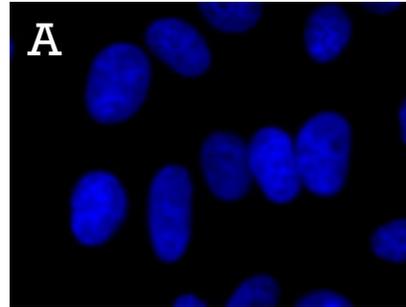
Los análisis de las muestras por microscopía óptica se realizaron en el microscopio de fluorescencia Leica DMI6000B con cámara digital CCD Hamamatsu Orca R2,



RESULTADOS

PRIMERA PARTE: RiscoLab

1. Microscopía de fluorescencia de Células Vero no infectadas (control) e infectadas con VBUN.



A,B,C: control.

A) Los núcleos se marcaron con DAPI (azul).

B) Concentración de señal Gc (verde) en zona perinuclear.

C) Control

D, E, F, G: Cél. Infectadas con VBUN (14hs pi).

D) Los núcleos se marcaron con DAPI (azul).

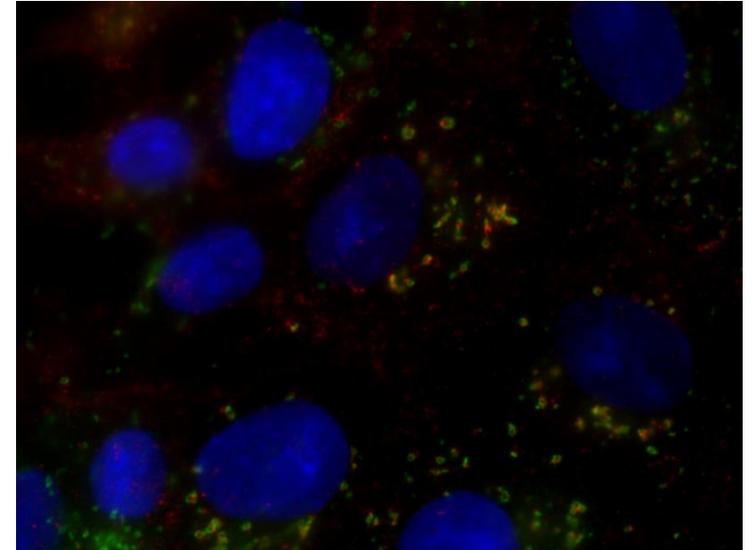
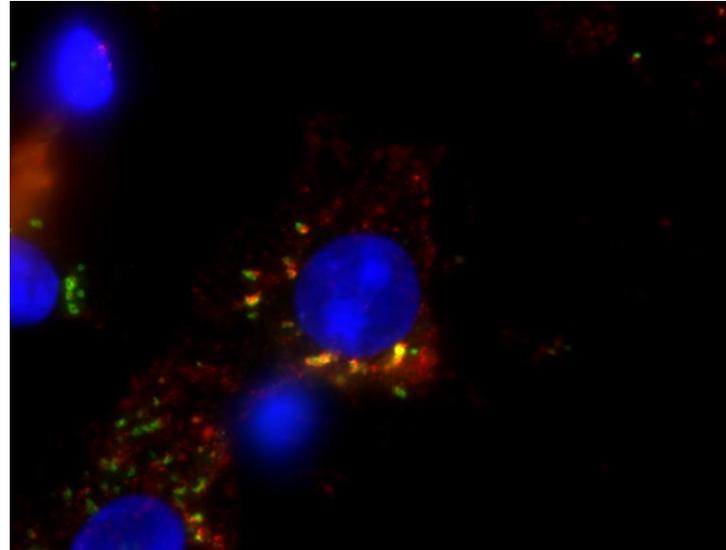
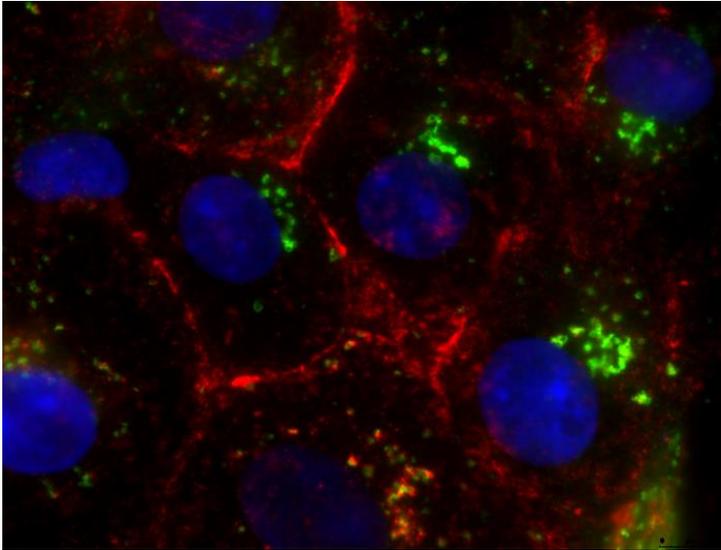
E) Señal Gc (verde), marcando la factoría viral. Se observa Complejo de Golgi fragmentado por infección del virus.

F) Proteínas Virales (señal roja).

G) Célula infectada con VBUN



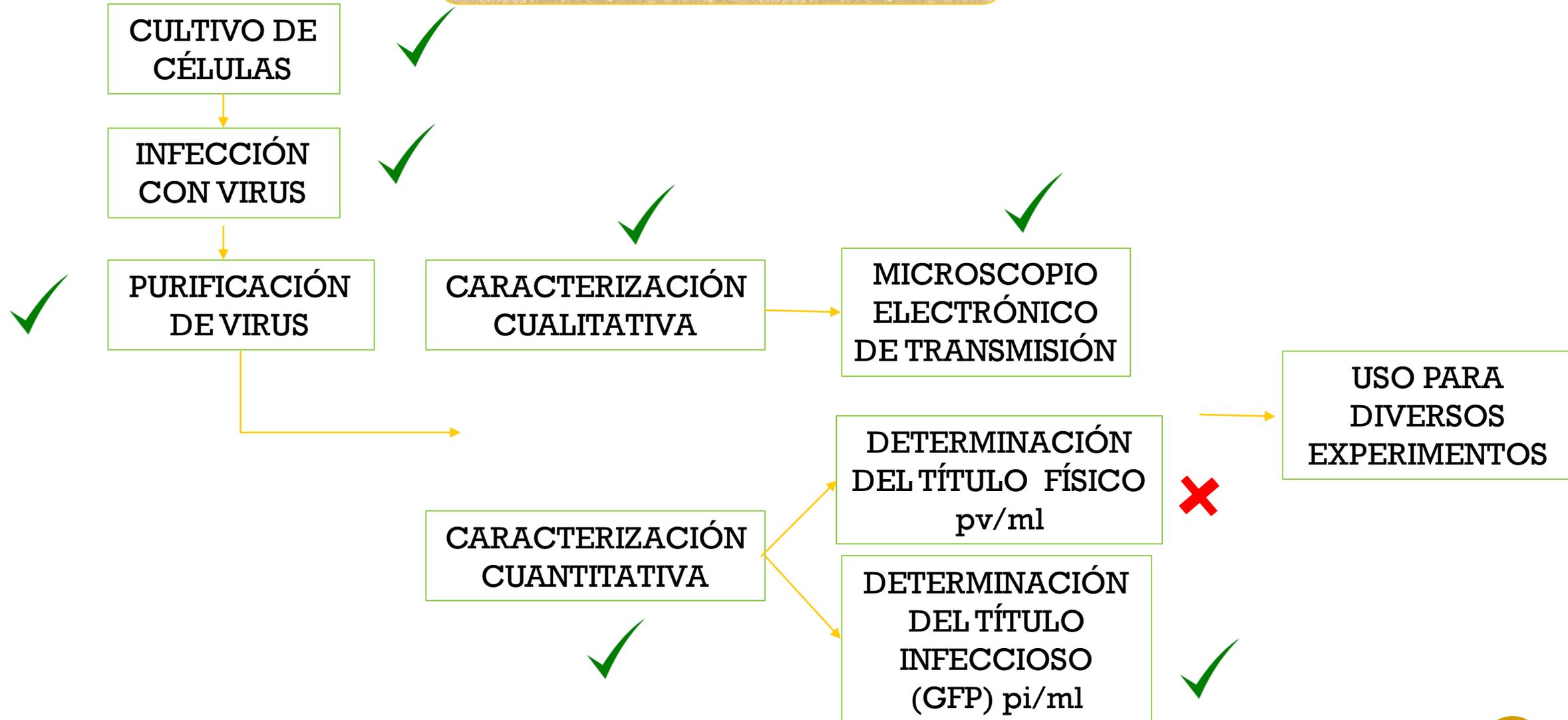
RESULTADOS
PRIMERA PARTE: RiscoLab



El hecho de trabajar y entender como el virus se desarrolla (formación de factorías virales, qué recursos celulares usa) en las células de mamífero, nos permite encontrar dianas para futuros tratamientos contra esas enfermedades causadas por este virus, ya que tienen un valor incalculable en el ámbito sanitario.

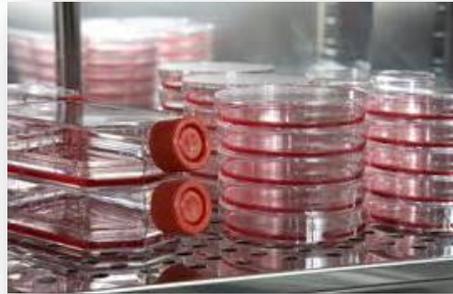
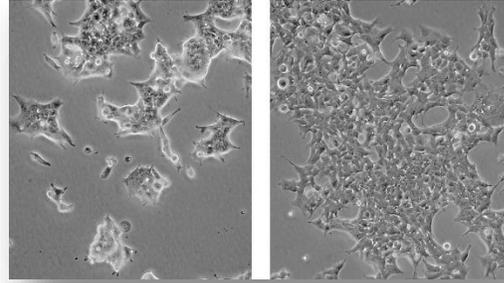


ACTIVIDADES DESARROLLADAS
SEGUNDA PARTE: CSanMartin Lab



ACTIVIDADES DESARROLLADAS

SEGUNDA PARTE: CSanMartín Lab



(Imágenes ilustrativas)

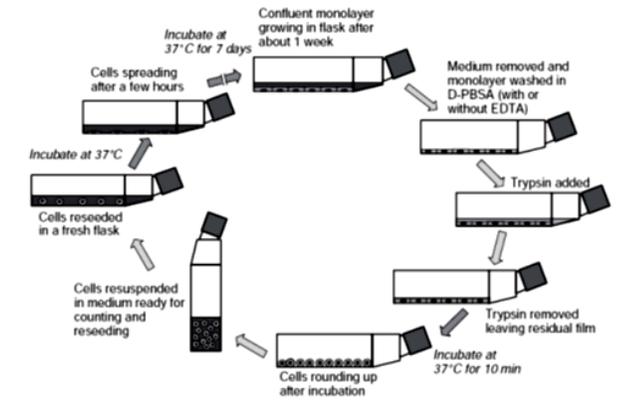


Fig. 12.3. *Subculture of Monolayer*. Stages in the subculture and growth cycle of monolayer cells after trypsinization (see also Plates 4, 5).

1. Cultivos de Células y Pases celulares.

- Células **HEK293**.
- **medio (DMEM) 10% (FBS), penicilina-estreptomina, gentamicina, Glutamina y aminoácidos no esenciales**
- **37 ° C 5% de CO₂**.
- **70% de confluencia**, pase.
- Lavados con PBS



2. Infección y Purificación de AdG15

- ✓ **70% de confluencia** - infección con el virus.
 - ✓ **FBS al 2%**
 - ✓ **MOI de 5 pi/cél.**
-
- ✓ **48 hs postinfección.**
 - ✓ Se recogieron células infectadas de **67 placas de cultivo p100**
 - ✓ **40 min a 4000 rpm y 4°C.**
 - ✓ **42 ml de medio de infección**
 - ✓ lisadas por **cuatro ciclos de congelación-descongelación.**

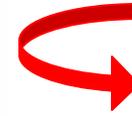


3. Purificación de Virus

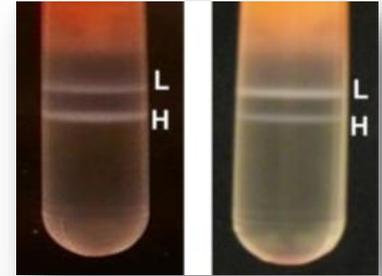
1,25g/m CsCl



1,40 g/m CsCl



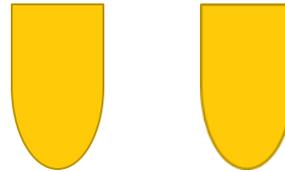
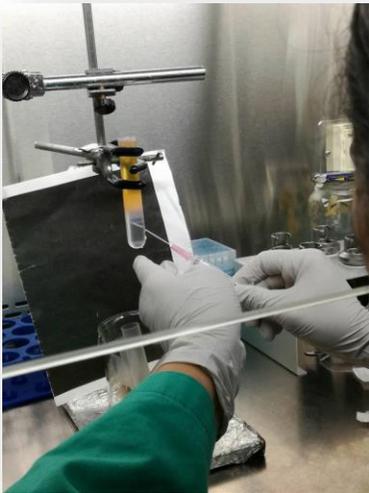
35600 rpm durante
90 minutos a 18 ° C



(Imágenes ilustrativas)

(Imágenes ilustrativas)

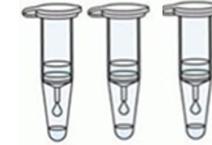
El resultado es un gradiente en el cual en la parte superior se encuentran los desechos celulares, se observa una banda de virus de cápsides vacías y otra banda de partículas virales integras .



Segundo gradiente
CsCl 1,31 g/ml



35600 rpm durante
18 hs a 18 ° C



(Imágenes ilustrativas)

Abs 260 y 280



Concentración

Almacenados con glicerol 10% a -80

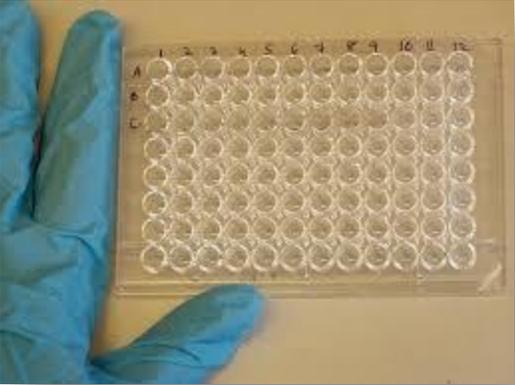


(Imágenes ilustrativas)



4. Titulación Viral

1/10¹ 1/10¹²



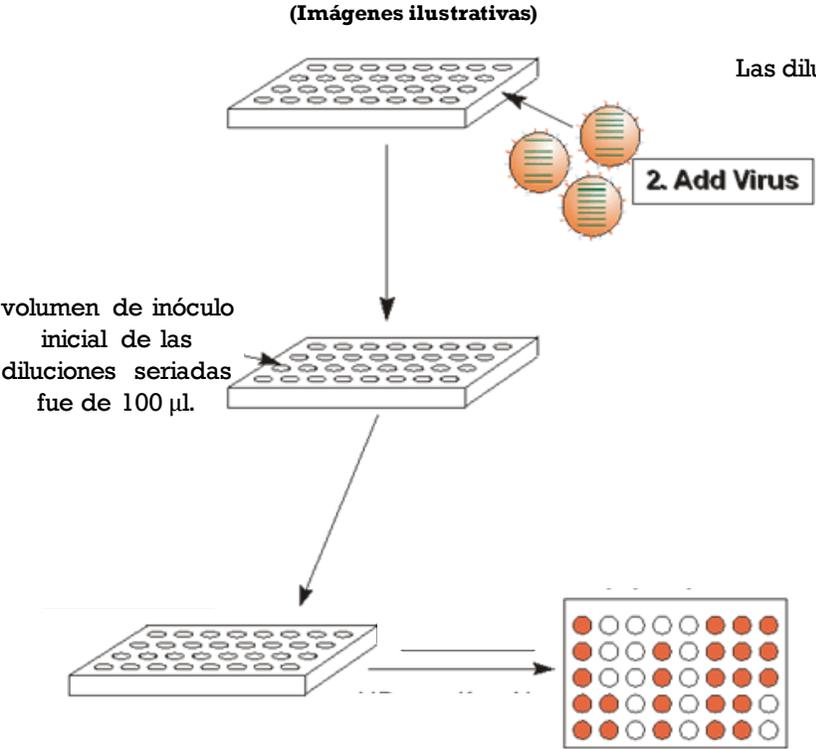
3 filas completas

control

La titulación se realizó por diluciones seriadas placas de plástico de 96 pocillos fondo U

(Imágenes ilustrativas)

(Imágenes ilustrativas)



Las diluciones seriadas del virus purificado fueron preparadas y se inocularon en cultivos de células

Se usaron diluciones seriadas 1/10¹ a 1/10¹²

Se incubaron 36 horas

Las células con GFP se contaron después de 36 hpi

El título infeccioso final se determinó calculando el promedio de los títulos de las tres últimas diluciones que muestran la señal GFP, utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ Calvas. FD}}{\text{Inóculo Volumen}} = \frac{\text{Cells GFP. FD}}{0,1\text{ml}}$$

Se obtuvo un título infeccioso de 8,575x10¹⁰ pi/ml



Cuantificaciones:

- (1) células infectadas **con señal GFP** y eso nos permite determinar el **título viral** que denominamos **partículas infecciosas por ml (pi/ml)**, que son aquellas que son competentes, capaces de provocar infección en células
- (2) el **título físico** que se determina en el **fluorímetro**, y que es superior, porque son **todas las partículas físicas totales (partículas virales por ml pv/ml)**.

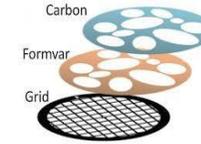


5. Tinción con Acetato de Uranilo para Microscopía electrónica

Se filtró Acetato de Uranilo



Se preparó caja de Petri con Parafilm y papel de filtro



Esta radiación iónica carga la superficie del carbón aumentando su carácter hidrófilo y haciéndolo así capaz de adsorber la proteína. El carbón permanece cargado aproximadamente 30 minutos.

Se realizó el Glow Discharge (descarga iónica) de las rejillas



Se incubó una gota de 5 μ l de la muestra sobre rejillas durante 5 min para permitir la adsorción de la muestra



La rejilla se incubó sobre gotas de 10 μ l de acetato de uranilo durante 30 segundos



Las rejillas se dejaron secando en un papel de filtro en una placa de Petri



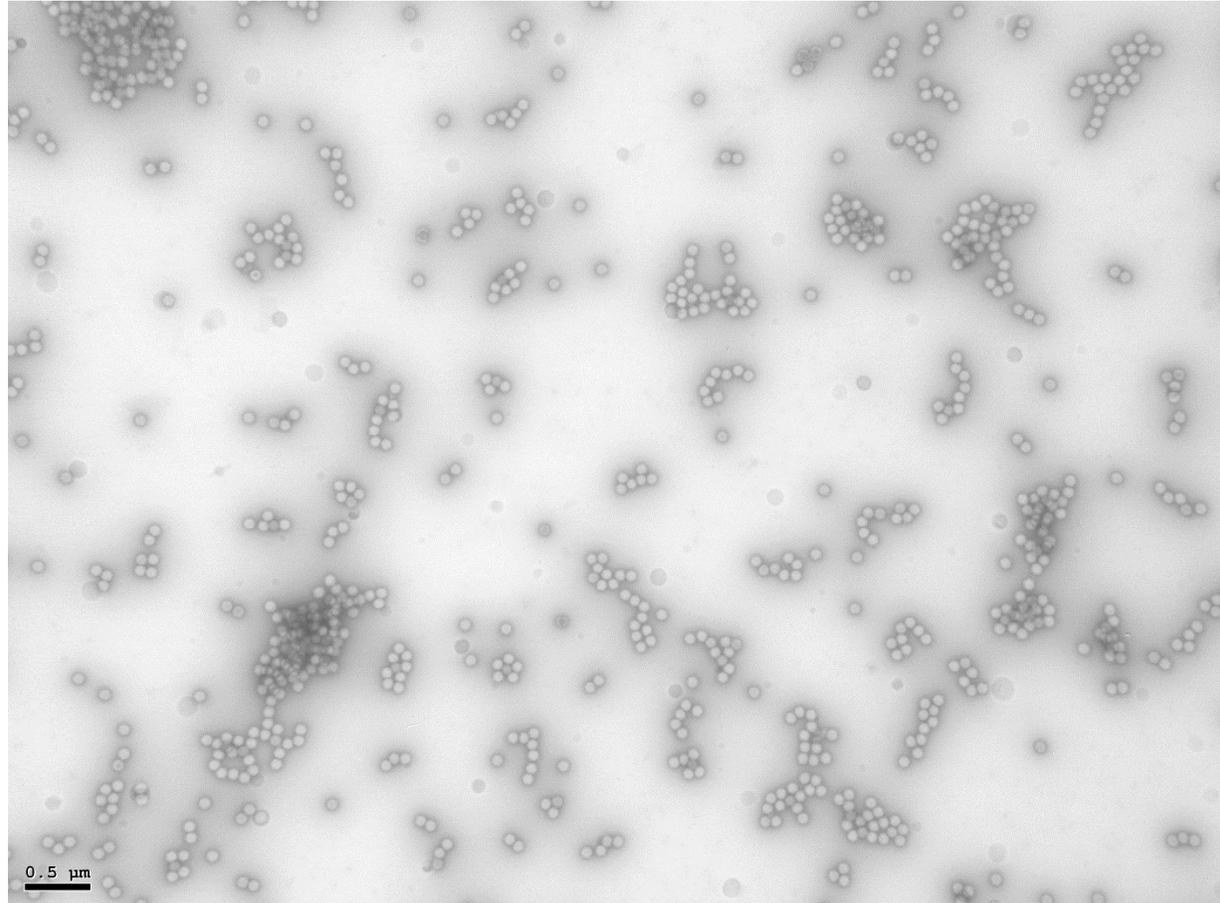
Las rejillas estaban listas para ser examinadas en el microscopio electrónico de transmisión.



RESULTADOS

4. Microscopía electrónica. Adenovirus purificados por gradiente de CsCl.

Ad5GL Full AC x 20,000

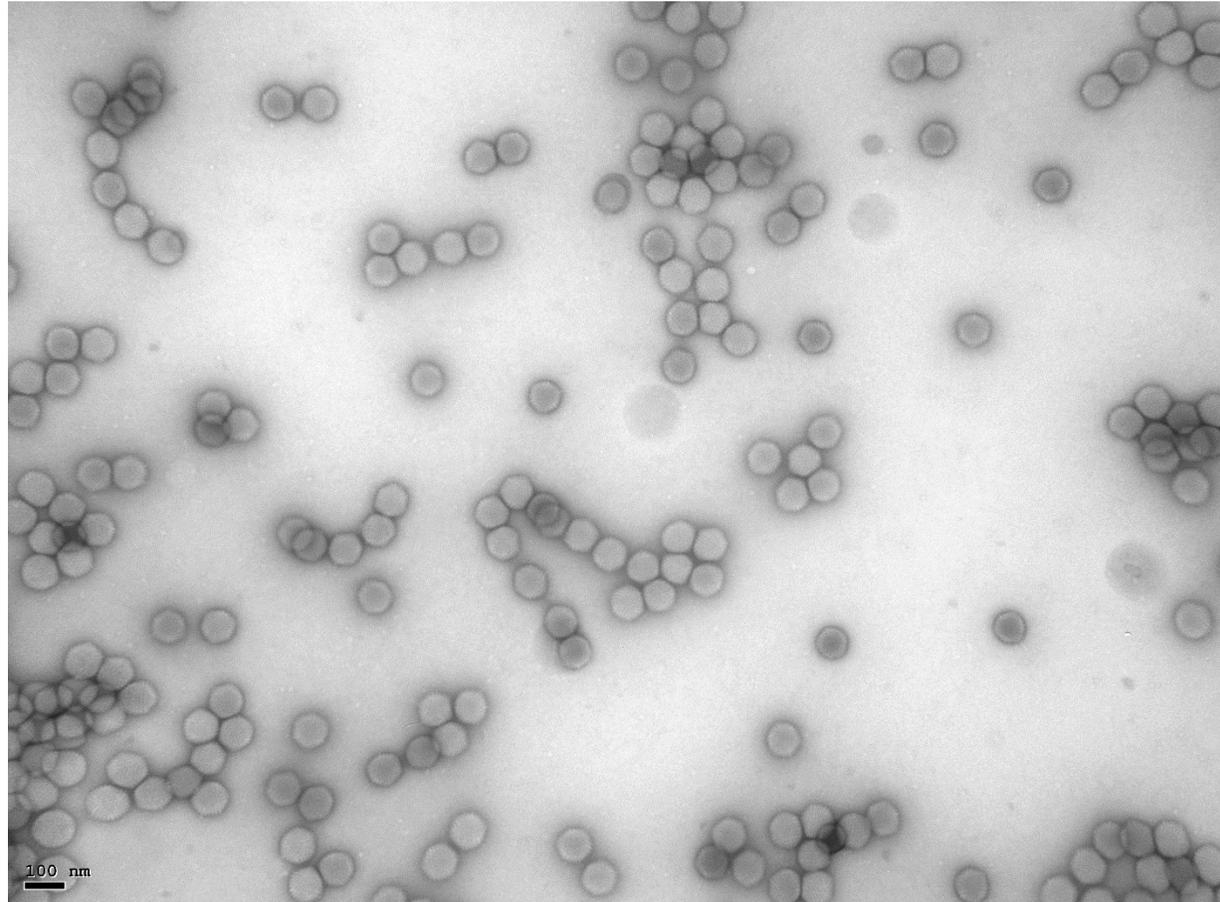


En esta magnitud de TEM lo que se observa es simplemente el campo en términos generales, si hay mucha concentración o no.

Se observa más concentración de partículas en baja densidad, (porque en la rejilla no están todos los virus distribuidos igual en todas las zonas). Es variable



Ad5GL Full AC x 60,000



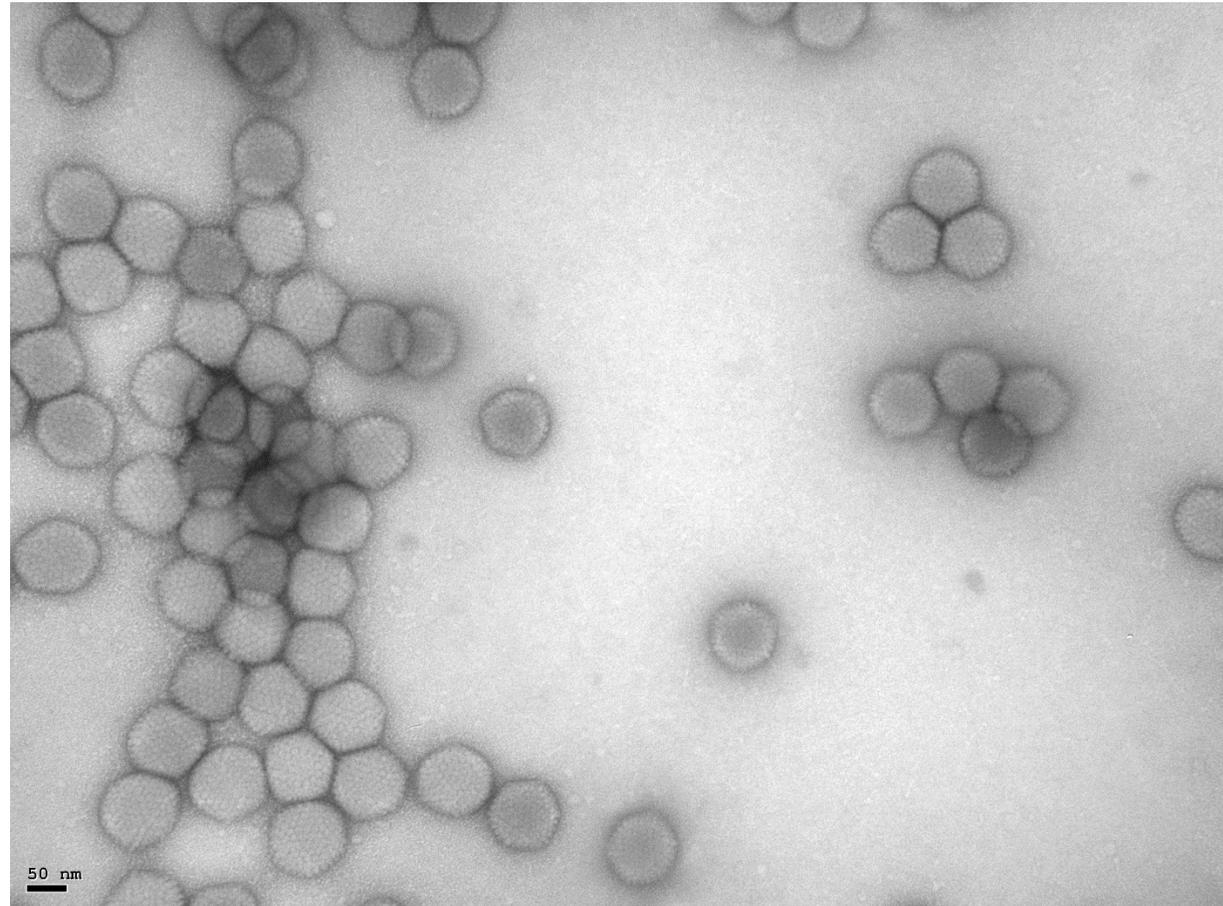
A esta magnitud se observa **la integridad de las partículas**.

Están cerradas la mayoría (lo esperado, cápsides no están rotas), se ven de **color claro**.

Las **cápsides negras**, indican que la cápside se ha tocado porque la tinción de acetato de uranilo ha entrado en el interior y se ve negro.



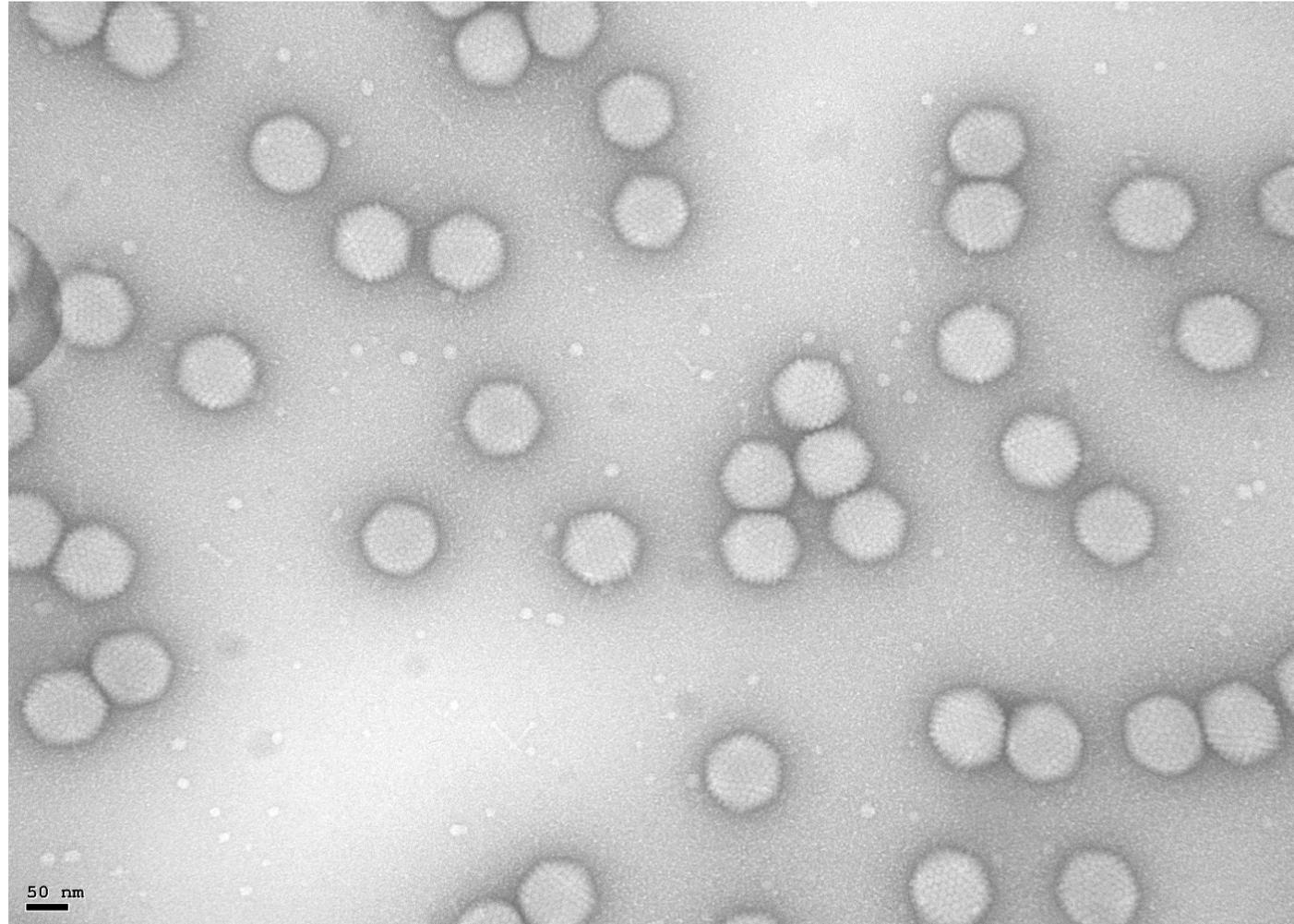
Ad5GL Full AC x 120,000



En esta amplificación se observa el fondo de la muestra, es decir si hay pentones o fibras libres (que se habrían perdido de las cápsidas a lo largo de la purificación)

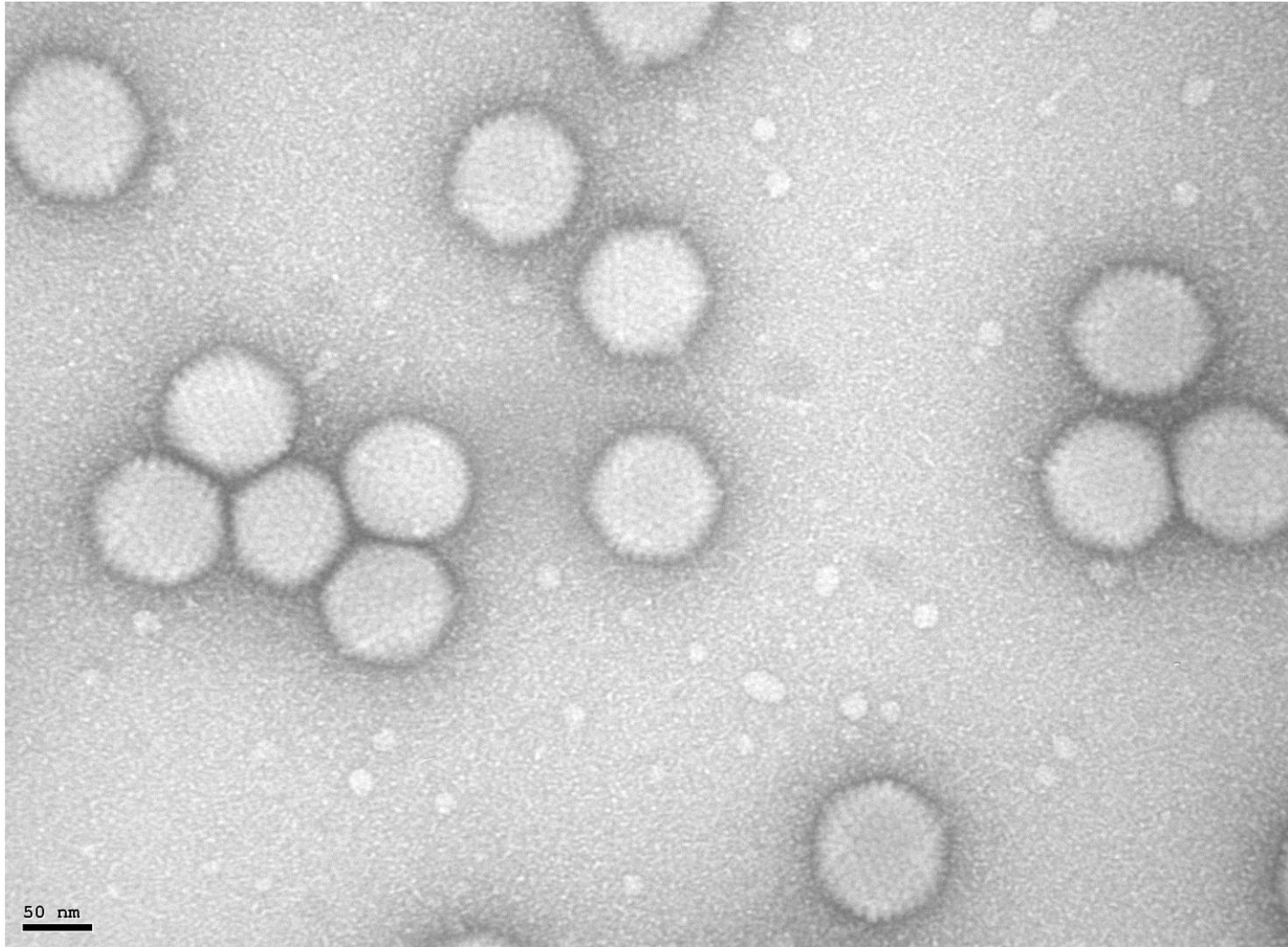


Ad5GL Full AC x 120,000



En este fondo se observan pentones y fibras claramente





Estos resultados sirven para posteriores ensayos, para el **estudio del montaje de AdV**, tales como:

- *cómo el genoma viral se envasa en la cápside;*
- *cómo se produce la maduración;*
- *cuáles son los elementos clave que modulan la estabilidad del virión y las propiedades mecánicas;*
- *cuál es la organización de los componentes del virión,*
- *explorar la estructura y el montaje de AdV pertenecientes a especies y géneros poco caracterizados*



CONCLUSIONES

Durante la estancia he logrado a nivel técnico experimental:

- ✓ Comprender la importancia del estudio de la factoría del VBUN en células de mamíferos. VBUN tiene la capacidad de desestructurar el aparato de Golgi, lo que indica que el virus necesita de este orgánulo para generar sus factorías.
- ✓ Entender que conocer qué factores virales interaccionan con los organelos celulares, nos indican posibles dianas para el desarrollo de fármacos antivirales.
- ✓ El desarrollo, (bajo supervisión), de una purificación de virus humano (Purificación n° 30 de Ad5GL).
- ✓ Participé activamente en la caracterización tanto **cuantitativa** (cuantificación de partículas infecciosas por señal de GFP en células, y **cualitativa** (preparación de rejillas con tinción negativa con Acetato de Uranilo, para observación al microscopio electrónico de transmisión).

A nivel personal:

Intercambio de experiencias científicas y de aprendizaje.



AGRADECIMIENTOS



- Departamento de Biología
- Departamento de Biotecnología
- Lic. Biotec. Samuel Gabaglio.
- Lic. Biól. Patricia Mendoza.
- Lic. Biotec. Lourdes Martínez

- A todos los funcionarios y colegas.

- **Y ESPECIALMENTE A MIS ALUMNOS/AS!!!**





- **Cristina Risco, PhD.**
- **Isabel Fernández de Castro, PhD.**
- **Raquel Tenorio, PhD.**
- **Beatriz Pacheco, PhD.**
- **Predoc. Paula Ortega.**
- **Predoc. Moisés García**

- **Carmen San Martín, PhD.**
- **Gabriela Condezo, PhD.**
- **Mercedes Hernando Pérez, PhD.**
- **Predoc: Marta Pérez Illana.**
- **Predoc. Natalia Martín González.**

¡GRACIAS POR SU ATENCIÓN!

