

Algunos aportes de la Biología Molecular a la Virología

*Prof. Dr. José Raúl Oubiña
Facultad de Medicina, UBA*

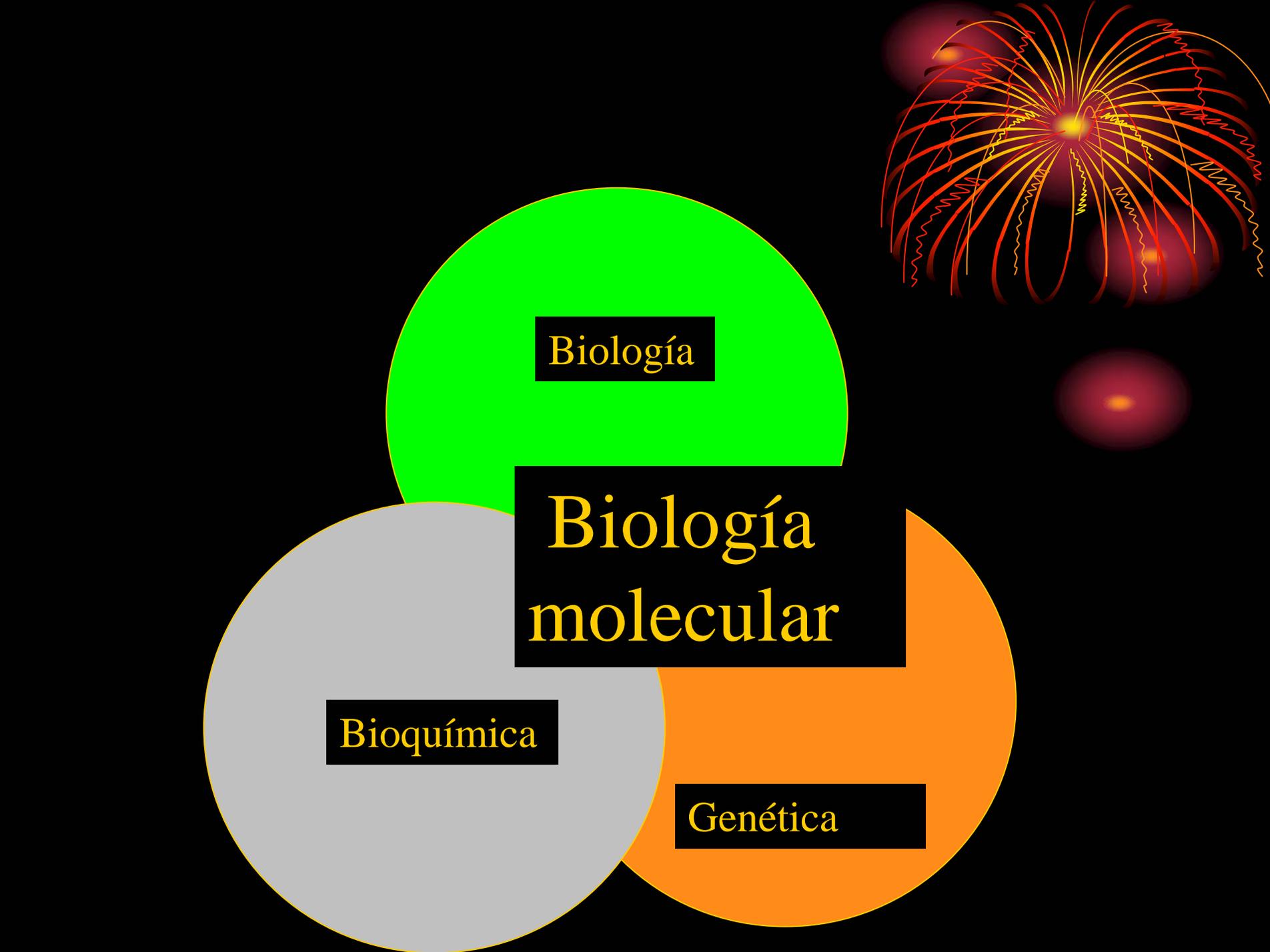
Biología
molecular

Elementos
de
Infectología

Virología

Epidemiología

Inmunología



Biología

Biología
molecular

Bioquímica

Genética

La Virología y la Biología molecular



- ✓ Descubrimiento de virus
- ✓ Diagnóstico virológico
- ✓ Monitoreo de terapéutica
- ✓ Patogénesis viral
- ✓ Epidemiología molecular
- ✓ Producción de vacunas por ingeniería genética
- ✓ Desarrollo de terapéuticas específicas (siRNAs)

James D. Watson y Francis Crick



Marzo de 1953

I. Descubrimiento de virus

- Historia: la transmisión de las propiedades de un virus es posible merced a sus ácidos nucleicos: experimentos con bacteriófagos.
- Secuenciamiento nucleotídico del bacteriófago Phi X 174.

Descubrimiento de virus mediante Biología molecular

- ✓ Virus Hepatitis C
- ✓ Virus Hepatitis E
- ✓ Herpes virus humano tipo 8
- ✓ West Nile (Virus del Nilo Occidental)
- ✓ GBV-C
- ✓ Coronavirus asociado al SARS
- ✓ Virus Borna
- ✓ Bocavirus
- ✓ Polyomavirus (Wu, RI)
- ✓ Arenavirus LCM (Linfocoriomeningitis linfocitaria) – símil
(¿o una variante del mismo LCM?)

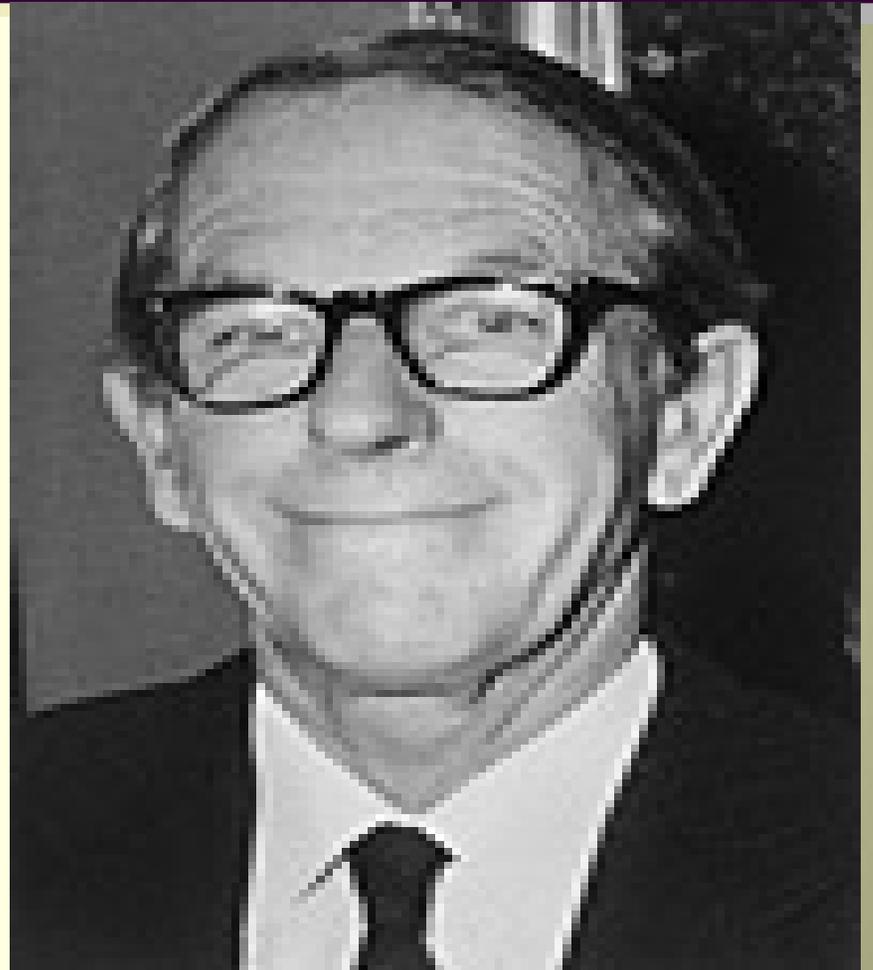
Frederick Sanger

- **1977.**

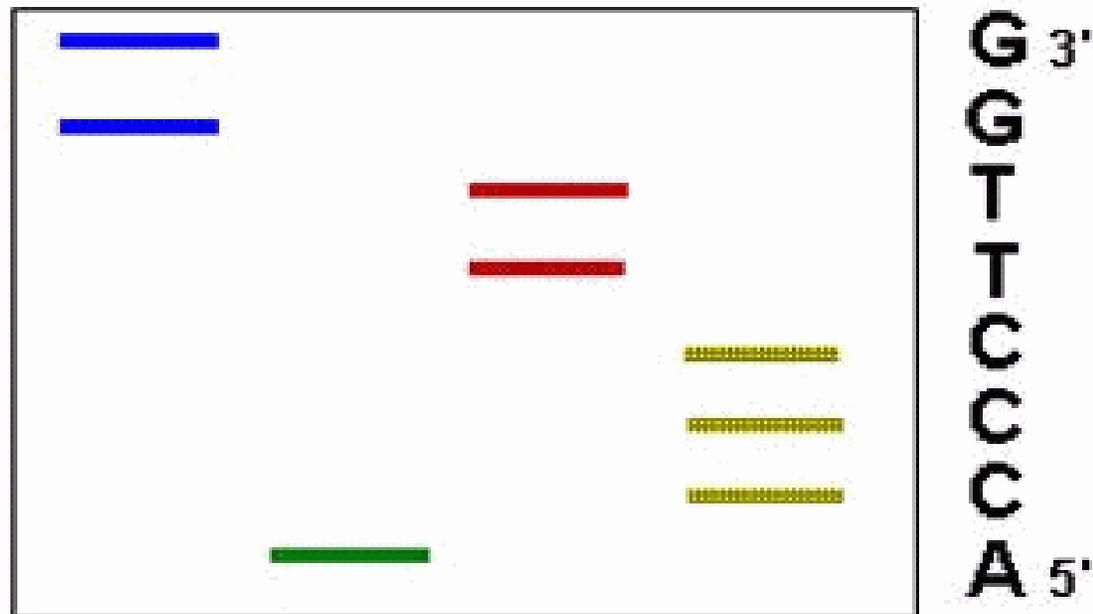
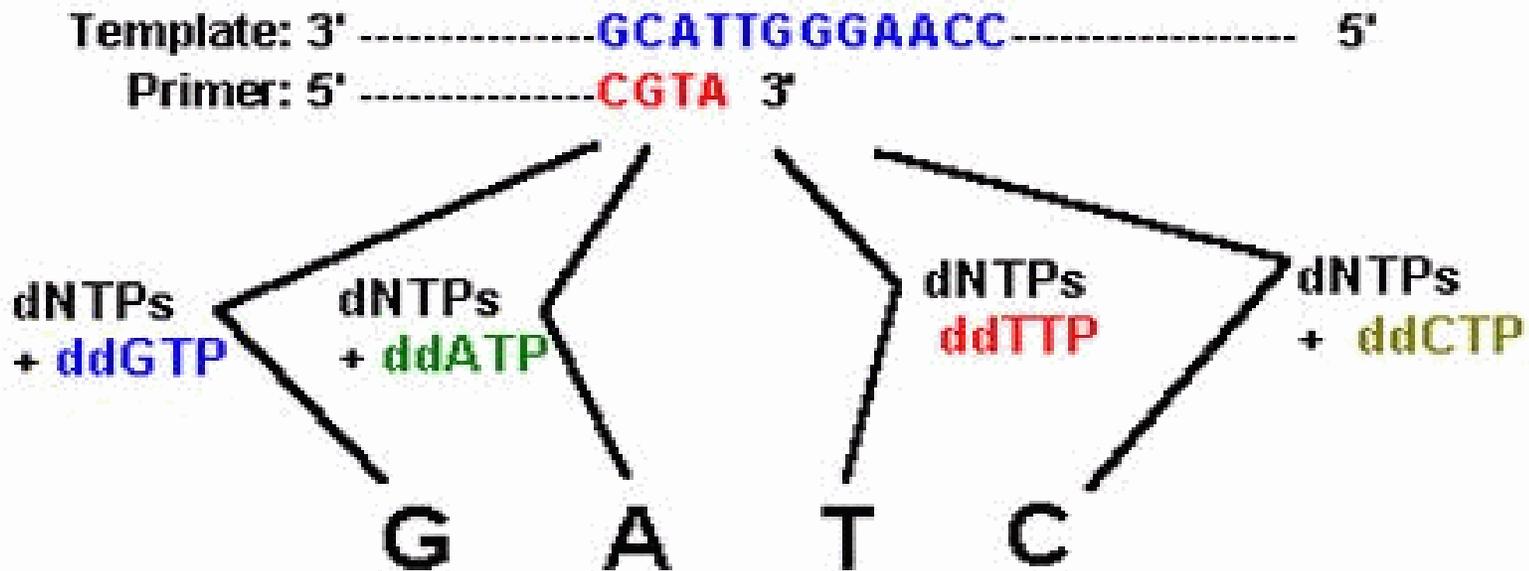
Habiendo obtenido el Premio Nobel por descubrir la secuencia aa. de la insulina, determina la secuencia nucleotídica completa del bacteriófago Phi X 174.

Este fue el **primer genoma completo secuenciado** de algún organismo determinado.

ES HONRADO CON UN SEGUNDO PREMIO NOBEL



Secuenciación nucleotídica de Sanger mediante ddNTPs



Métodos de marcación del DNA polimerizado

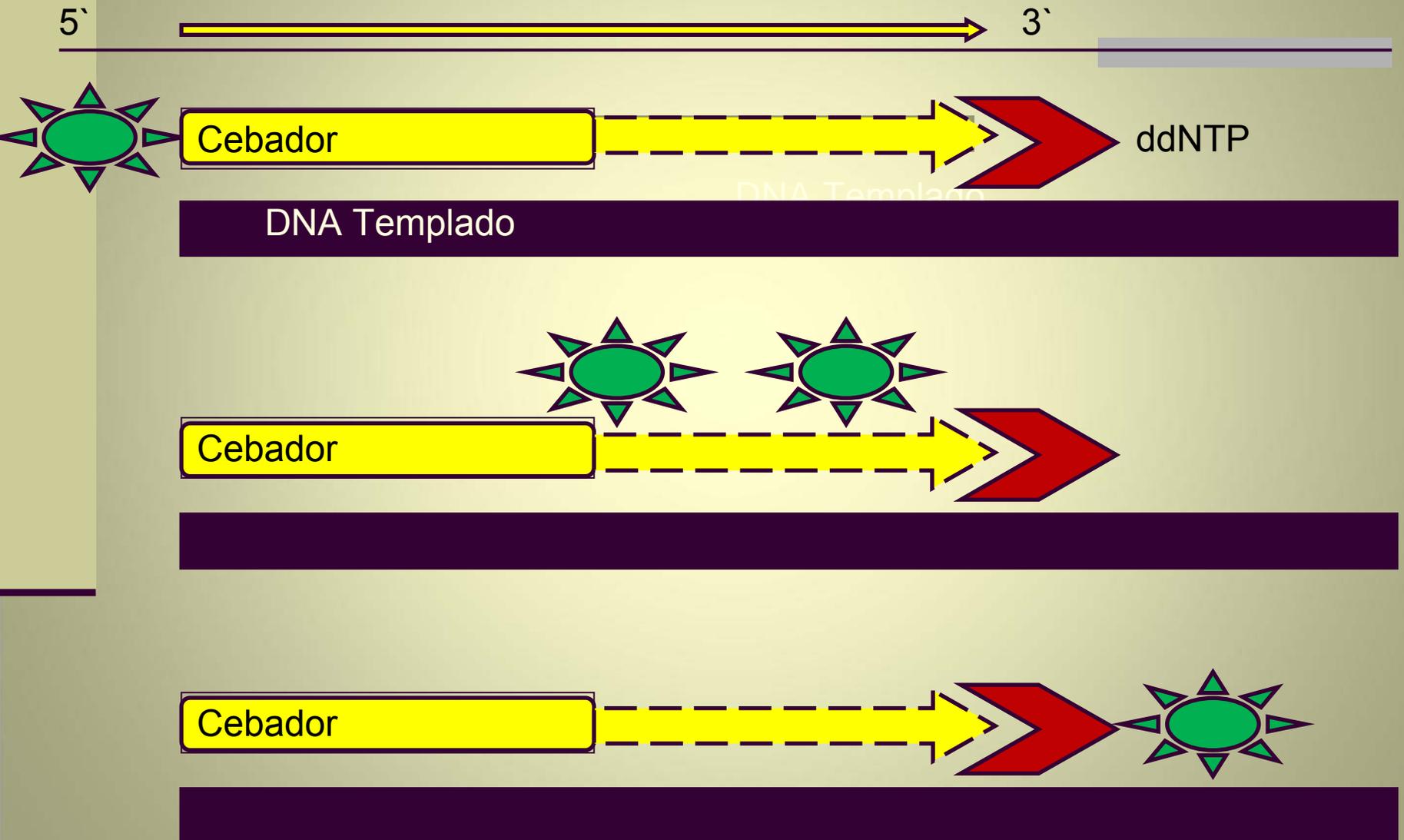




Photo: John J. Cardamone, Jr.

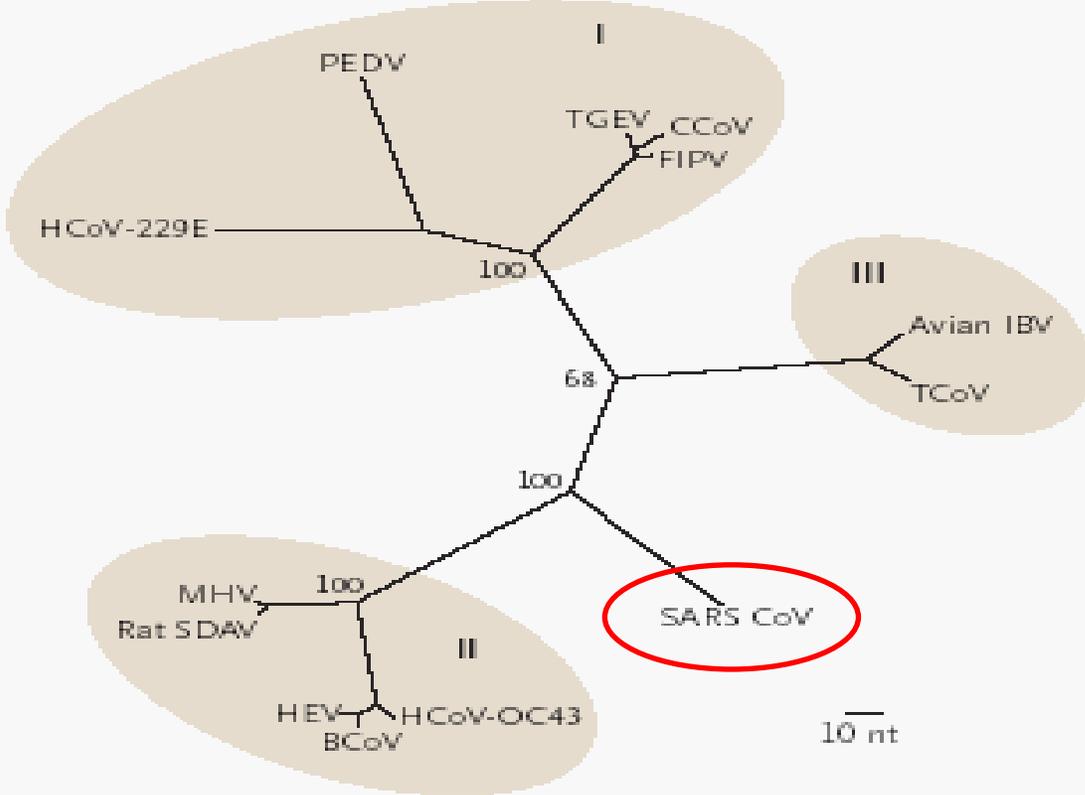


Figure 3. Estimated Maximum-Parsimony Tree Based on the Sequence Alignment of 405 Nucleotides of the Coronavirus Polymerase Gene Open Reading Frame 1b (Nucleotide Numbers 15173 to 15578 Based on Bovine Coronavirus Complete Genome Accession Number NC_003045) Comparing SARS Coronavirus with Other Human and Animal Coronaviruses.

The three major coronavirus antigenic groups (I, II, and III), represented by human coronavirus 229E (HCoV-229E), canine coronavirus (CCoV), feline infectious peritonitis virus (FIPV), porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV), porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), human coronavirus OC43 (HCoV-OC43), bovine coronavirus (BCoV), porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV), rat sialodacryoadenitis virus (SDAV), mouse hepatitis virus (MHV), turkey coronavirus (TCoV), and avian infectious bronchitis virus (avian IBV), are shown shaded. Bootstrap values (from 100 replicates) obtained from a 50 percent majority rule consensus tree are plotted at the main internal branches of the phylogram. Branch lengths are proportionate to nucleotide differences.

Un hito en la historia de la Microbiología

■ 1989

- *Se descubre el primer virus al margen de su morfología y estructura antigénica: el virus Hepatitis C*



M. Houghton

Q-L Choo

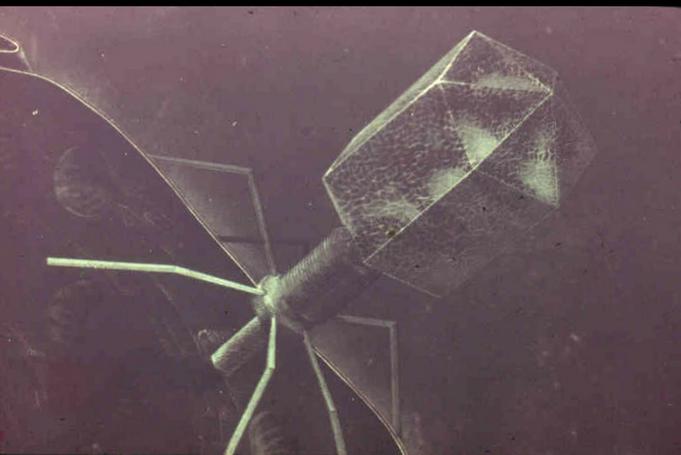
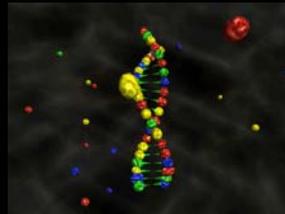
G. Kuo

D. Bradley

HEPATITIS C: SOY CLONADO, LUEGO EXISTO

Por medio de la biología molecular se pudo detectar la existencia de este virus, que ya había sido muy bien identificado por la investigación clínica.

¿Cómo se descubrió el HCV?



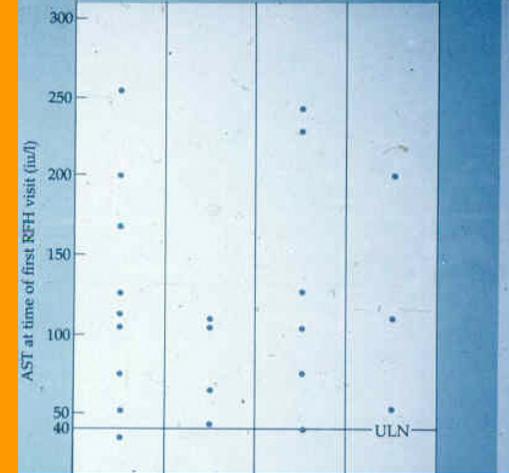
Clonado en vector λ gt11

850.000 clones analizados con... Acs de un paciente con Hepatitis NoA NoB

ABBOTT HCV EIA 2ND GENERATION ANTIGEN COMPOSITION PUTATIVE HCV GENOME



Relación del HCV con hepatitis T leves (HL), crónicas activas (CA), CA con cirrosis (CAC) y cirrosis inactivas (CI)



HL CA CAC CI

LIA PARA HEPATITIS C

Control Positivo	Bandas	Corresponde a:
	a-d	core
	e	NS5 Epítopes específicos del HCV
	f	NS4
	1	Ig G humana nivel III (positiva intensa)
	2	Ig G humana nivel Ia (bajo corte)
	3	Ig G humana nivel Ib (alto corte)
	4	Ig G humana nivel II (positiva moderada)

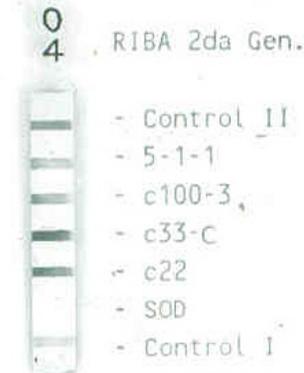
Diagram showing bands for Control Positivo and Paciente T.M. with labels 1, 2, 3, 4, a, b, c, d, e, f, NS4, NS5.

Nota: Un ensayo se considera reactivo para anti-HCV, cuando se cumple una de las siguientes condiciones:

*Por lo menos una banda perteneciente a antígenos del HCV muestra una intensidad = 0 > a 2 +

*Por lo menos dos bandas pertenecientes a antígenos del HCV muestran una intensidad = 0 > a 1 +

RIBA PARA HEPATITIS C



Prueba de ELISA (*Enzyme linked-immunosorbent assay*)

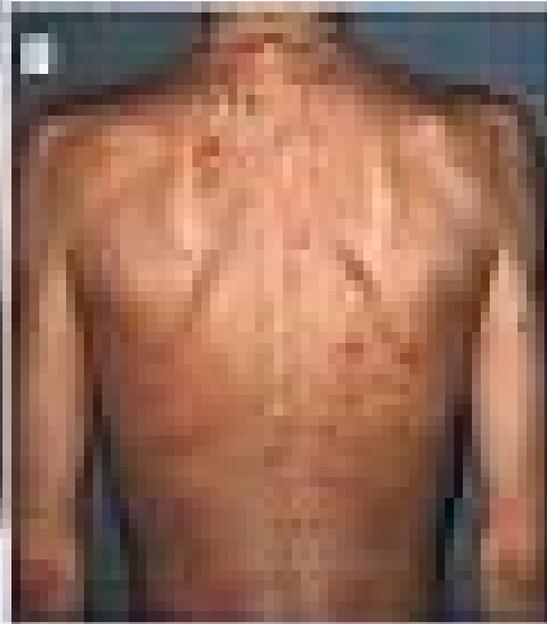
Para detectar anticuerpos





carcinoma de Kaposi

Mauritz Kohn
(Kaposi)



Descubrimiento del DNA de HHV-8

Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma.

Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS.

- *Analysis was used to isolate unique sequences present in more than 90 percent of Kaposi's sarcoma (KS) tissues obtained from patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). These sequences were not present in tissue DNA from non-AIDS patients, but were present in 15 percent of non-KS tissue DNA samples from AIDS patients. The sequences are homologous to, but distinct from, capsid and tegument protein genes of the Gammaherpesvirinae, herpesvirus saimiri and Epstein-Barr virus. These KS-associated herpesvirus-like (KSHV) sequences appear to define a new human herpesvirus.*

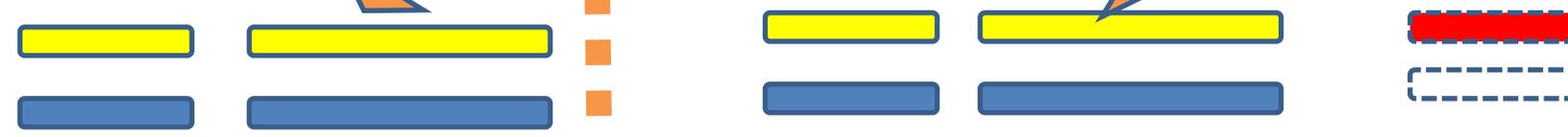
DNA de Tejido normal



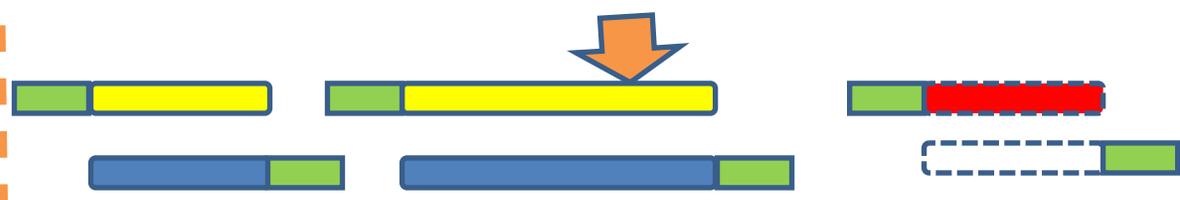
DNA de Tejido tumoral con DNA de HHV-8



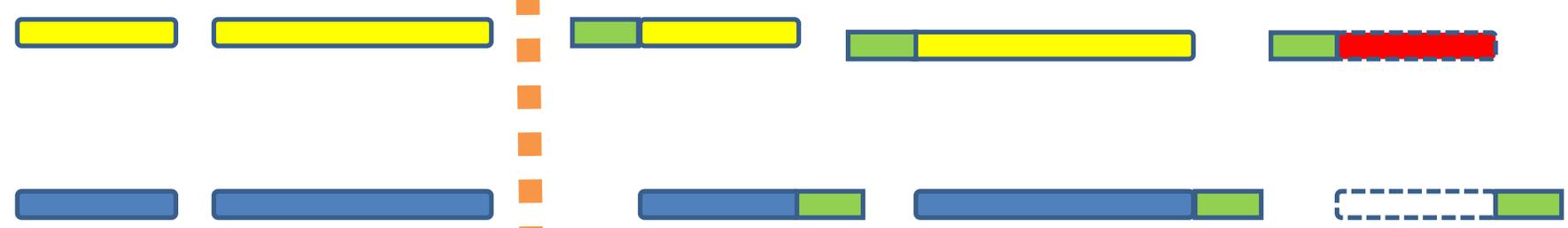
Clivaje con endonucleasas



Ligado con oligonucleótidos adaptadores



Desnaturalización



Hibridación sustractiva del DNA del tejido tumoral con el del tejido normal



Relleno del DNA parcialmente bicatenario y Amplificación por PCR con cebadores complementarios a los adaptado

DNA reasociado del tejido norm



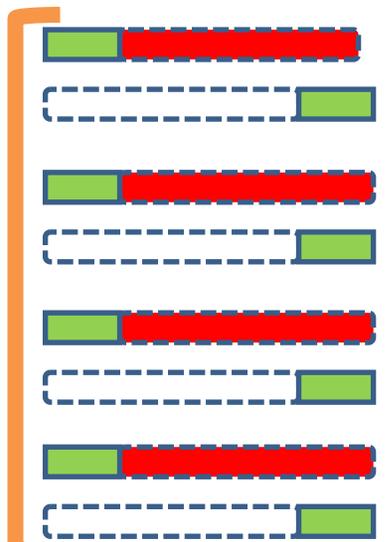
Templado tipo 1. PCR sin amplificación (el DNA no tiene adaptadores)

Híbridos de DNA del tejido normal y del tumoral+



Templado tipo 2. PCR sin amplificación (sólo una cadena de DNA tiene adaptadores)

Templado tipo 3. DNA de HHV- 8 amplificado por PCR



Análisis de diferencias representativas (ARD) de DNA

- Hibridación sustractiva
(*entre DNA de tejido tumoral vs no tumoral*)
+
- Adaptadores oligonucleótidos conocidos ligados a los extremos de DNA no hibridado
- PCR con cebadores complementarios a los adaptadores, secuenciamiento nucleotídico y análisis filogenético

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 M



Figure 1. Example of $KS330_{233}$ PCR Amplifications from the First Batch of Tissue Samples from Patients with Kaposi's Sarcoma and Controls. Amplification products are detectable in DNA samples from an HIV-seronegative homosexual man with Kaposi's sarcoma (lane 1, Patient 18), a patient with classic Kaposi's sarcoma (lane 6, Patient 12), and a patient with AIDS-associated Kaposi's sarcoma (lane 9, Patient 4). One sample from a patient with AIDS-associated Kaposi's sarcoma (lane 4, Patient 3) failed to generate a PCR product detectable by Southern hybridization in repeated blind evaluations. The PCR product was amplifiable in all the remaining 17 samples from the patients with Kaposi's sarcoma (not shown). Samples in lanes 2, 5, and 8 (DNA from uninvolved tissue from patients with Kaposi's sarcoma) and lanes 3 and 7 (control DNA samples from patients without Kaposi's sarcoma) are negative. Lane 10 contains a negative control (no DNA), lane 11 contains a positive control (DNA from a patient with AIDS-associated Kaposi's sarcoma) previously shown to contain Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus sequences,¹⁶ and lane m is a molecular-weight marker.

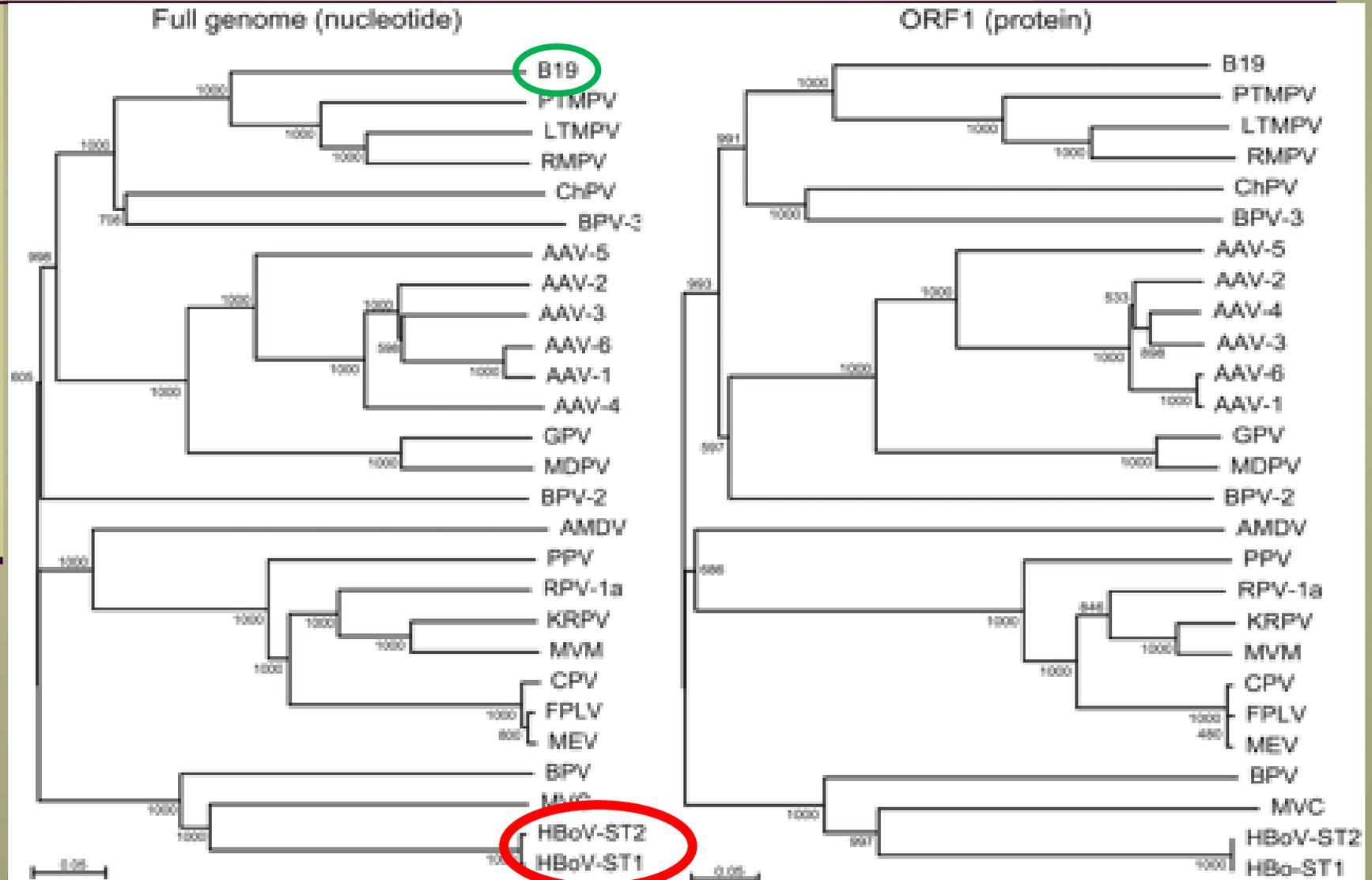
Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples

PNAS September 6, 2005 vol. 102 no. 36 12891–12896

Tobias Allander*†‡, Martti T. Tammi§¶, Margareta Eriksson, Annelie Bjerkner*, Annika Tiveljung-Lindell*, and Björn Andersson§ Karolinska University Laboratory, Stockholm, Sweden,

The identification of new virus species is a key issue for the study of infectious disease but is technically very difficult. We developed a system for large-scale molecular virus screening of clinical samples based on host DNA depletion, random PCR amplification, large-scale sequencing, and bioinformatics. The technology was applied to pooled human respiratory tract samples. The first experiments detected seven human virus species without the use of any specific reagent. Among the detected viruses were one coronavirus and one parvovirus, both of which were at that time uncharacterized. The parvovirus, provisionally named human bocavirus, was in a retrospective clinical study detected in 17 additional patients and associated with lower respiratory tract infections in children. The molecular virus screening procedure provides a general culture-independent solution to the problem of detecting unknown virus species in single or pooled samples. We suggest that a systematic exploration of the viruses that infect humans, “the human virome,” can be initiated.

Descubrimiento del **Bocavirus** humano



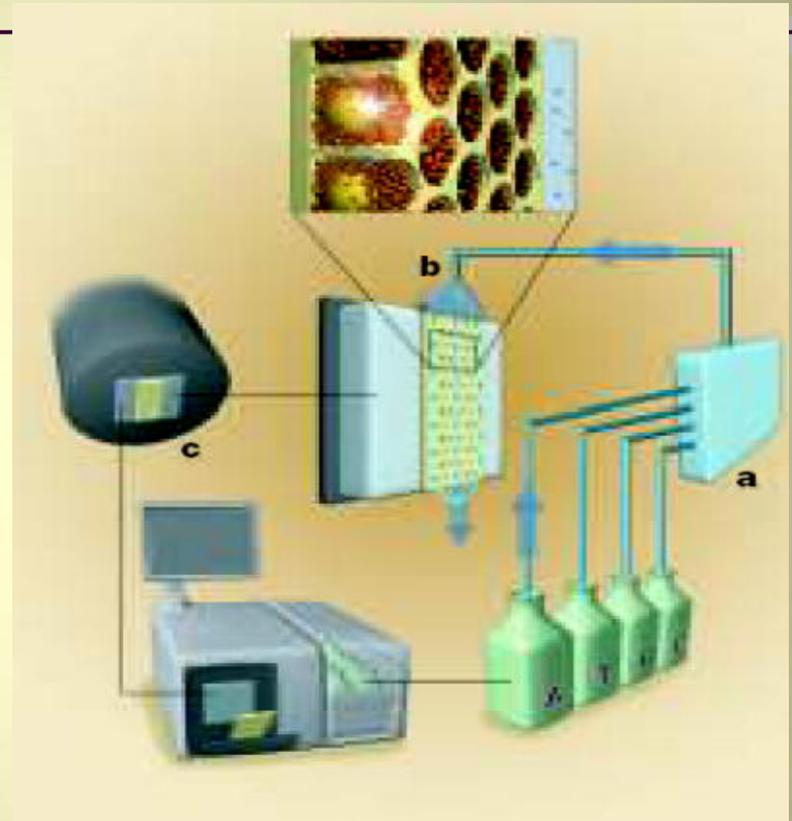
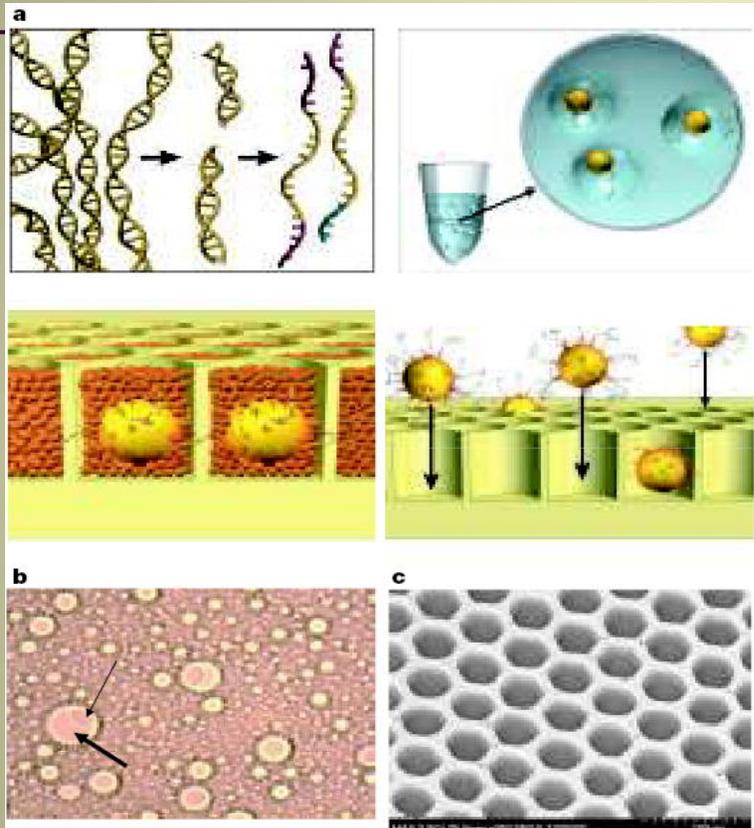
Otras estrategias, nuevos virus...

- SISPA-PCR
- *Random-PCR*
- DNAsa-SISPA PCR

Tamizaje del
“Viroma” humano:
Bocavirus,
Polyomavirus Wu y
KI.

- Pirosecuenciación:
LCM-símil (2008)

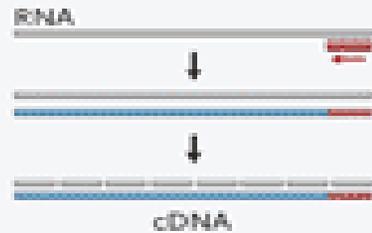
Pirosecuenciación de DNA



RNA extraction,
DNase I digestion



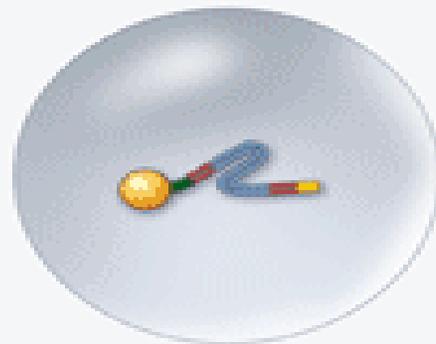
Reverse transcription



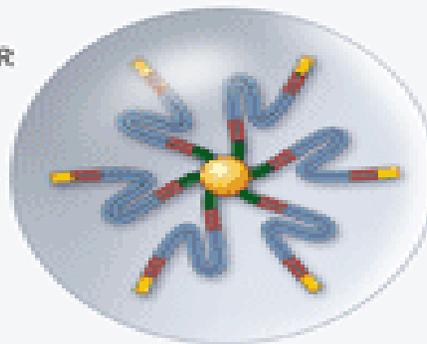
Random-primer PCR
amplification



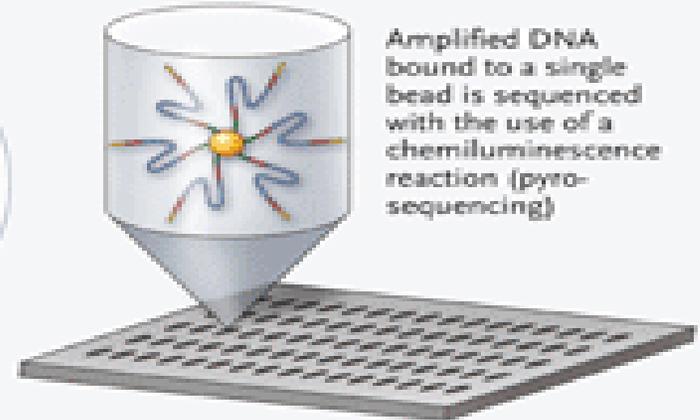
Adapter ligation



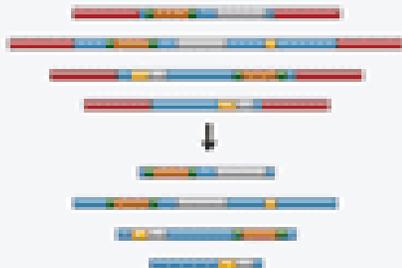
emPCR



PCR in oil-water emulsion (emPCR), resulting in clonal amplification of a single bead-bound target sequence



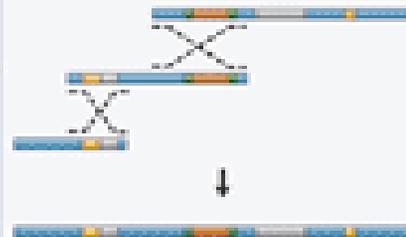
Raw reads trimmed
of primers



Reads clustered into
nonredundant sets



Contiguous sequences
assembled with the CAP3
algorithm



Sequences identified with
BLASTN and BLASTX





CORRESPONDENCE

◀ Previous

Volume 358:2638-2639

June 12, 2008

Number 24

Next ▶

A New Arenavirus in Transplantation

To the Editor: We find the description of a "new arenavirus" by Palacios and colleagues (March 6 issue)¹ interesting, but we consider several of their conclusions to be unjustified or misleading. First, the characterized virus is simply lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV), its nucleotide sequence lying well within the range of variability for the species as defined by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) for this virus. Second, diagnostic tests for LCMV (polymerase chain reaction, serologic tests, or viral isolation) would undoubtedly have detected the agent, had these tests been used on initial screening. The omission of these tests from otherwise comprehensive testing was odd, given the clinical similarities to previously described clusters of post-transplantation LCMV infections.² Although the study correctly shows how ultra-high-throughput sequencing is a powerful tool for microbiology, it appears that the current study is an example of its unnecessary use. Sequence diversity within a species is not the same thing as a "new virus."

Tobias Allander, M.D., Ph.D.
Karolinska Institutet
SE-17177 Stockholm, Sweden
tobias.allander@karolinska.se

Xavier de Lamballerie, M.D., Ph.D.
Medical University of Marseille
13005 Marseille, France

Peter Simmonds, Ph.D.
University of Edinburgh
Edinburgh EH9 1QH, United Kingdom

References

1. Palacios G, Druce J, Du L, et al. A new arenavirus in a cluster of fatal transplant-associated diseases. *N Engl J Med* 2008;358:991-998. [Erratum, *N Engl J Med* 2008;358:1204.] [Free Full Text]
2. Fischer SA, Graham MB, Kuehnert MJ, et al. Transmission of lymphocytic choriomeningitis virus by organ transplantation. *N Engl J Med* 2006;354:2235-2249. [Free Full Text]

The authors reply: We reported the sequence and genetic relationship of this virus to other arenaviruses and described it as being LCMV-like; however, formal classification must rest with the ICTV. There is no pathognomonic presentation for transplant-associated LCMV. Whereas our patients had encephalopathy without seizures, the report on the earlier series described four patients: two with seizures, two with no neurologic disease, and all four with other findings, including diarrhea, abdominal pain, incision tenderness, and pulmonary infiltrates. We investigated an unexplained outbreak, simultaneously screened approximately 100,000 sequences, and pursued a candidate pathogen using culture and electron-microscopical, immunohistochemical, molecular, and serologic methods. We predict that this example will be followed by many others as high-throughput sequencing becomes more affordable and accessible to clinicians and public health agencies.

W. Ian Lipkin, M.D.
Mailman School of Public Health of Columbia University
New York, NY 10032
wil2001@columbia.edu

Mike Catton, M.D.
Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory
North Melbourne, VIC 3053, Australia

- THIS ARTICLE
- ▶ PDF
 - ▶ PDA Full Text
- TOOLS & SERVICES
- ▶ Add to Personal Archive
 - ▶ Add to Citation Manager
 - ▶ Notify a Friend
 - ▶ E-mail When Cited
 - ▶ E-mail When Letters Appear
- MORE INFORMATION
- ▶ Related Article by Palacios, G.
 - ▶ PubMed Citation



Diagnóstico

Detección de Ácidos nucleicos

Técnica

1. In situ o previa extracción

Ej. Hibridación o PCR *in situ* o previa extracción

2. Sin o con amplificación

2.1. Sin amplificación

Hibridación molecular:

Dot blot

Slot blot

Southern blot

Northern blot

Captura de híbridos (con Mab)

2.2. Con amplificación

De la secuencia blanco

PCR / RT-PCR y variantes (anidada o *Nested*; SISPA PCR, etc.)

PCR o RT-PCR competitiva

PCR en tiempo real

TMA (*Transcription mediated amplification*:
amplificación isotérmica)

De la señal de detección:

branched-DNA (DNA ramificado)

3. Cual o cuantitativa

3.1. Estudio cualitativo

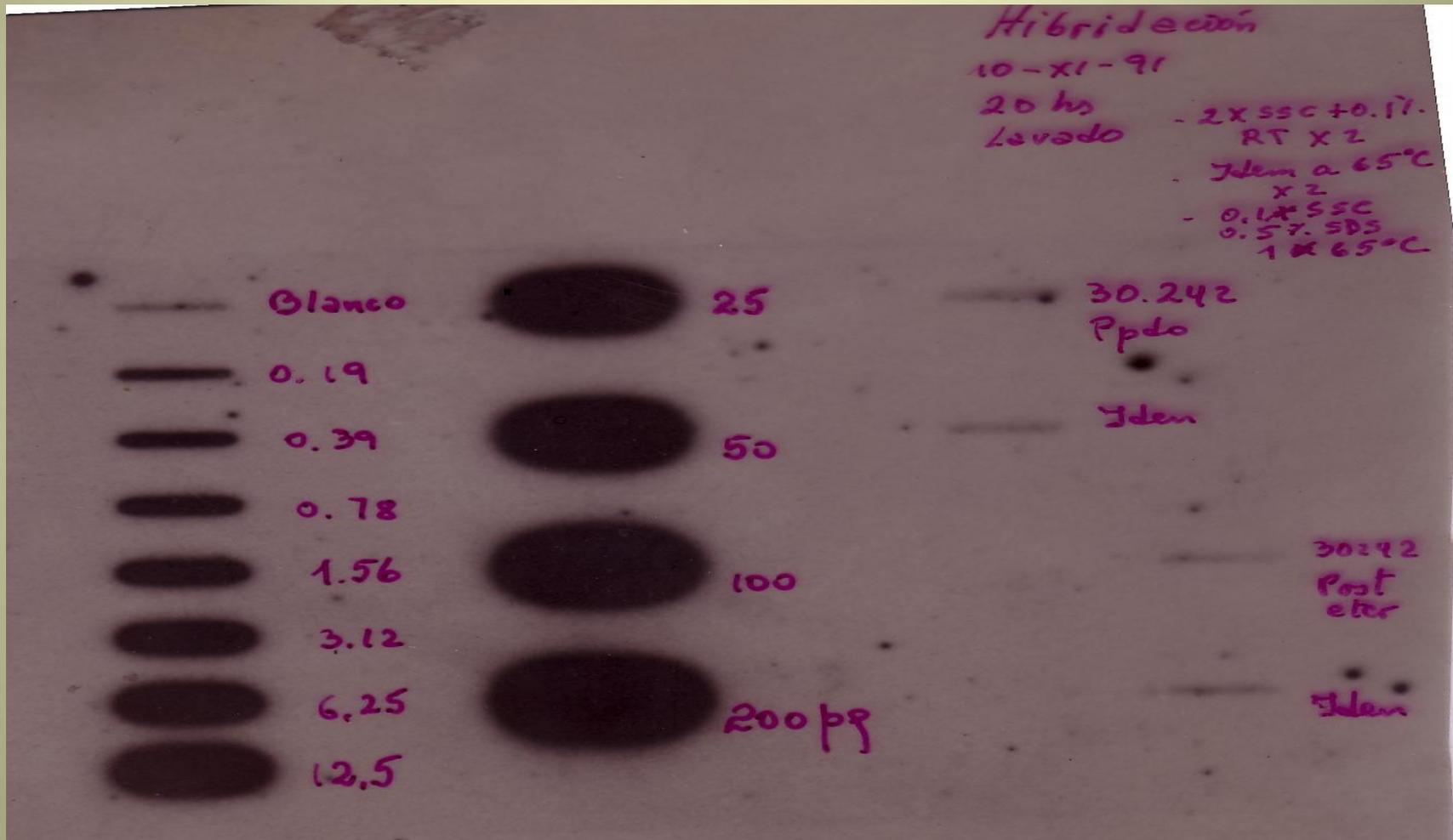
3.2. Estudio cuantitativo

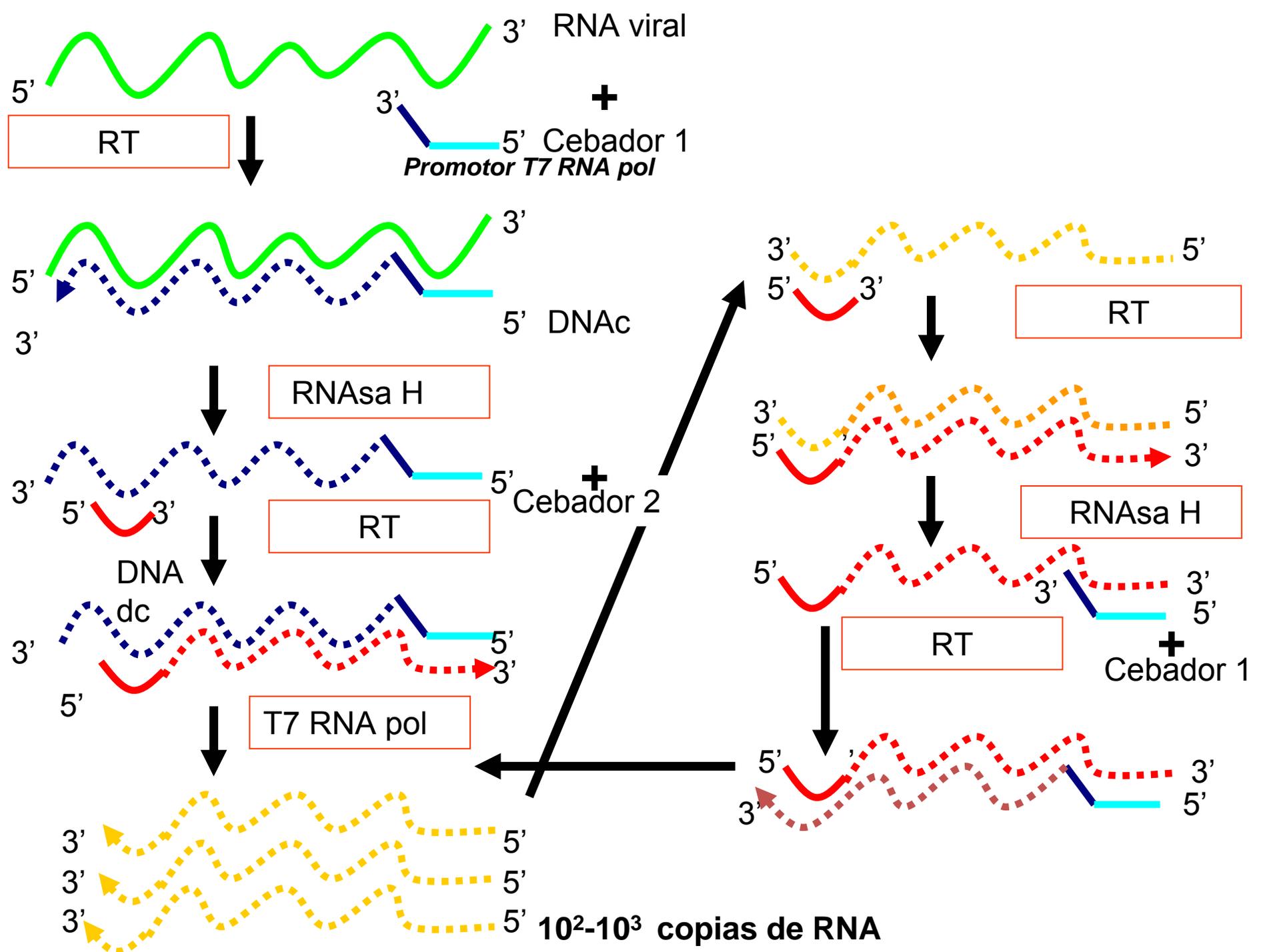
pg de DNA o RNA / ml

ó

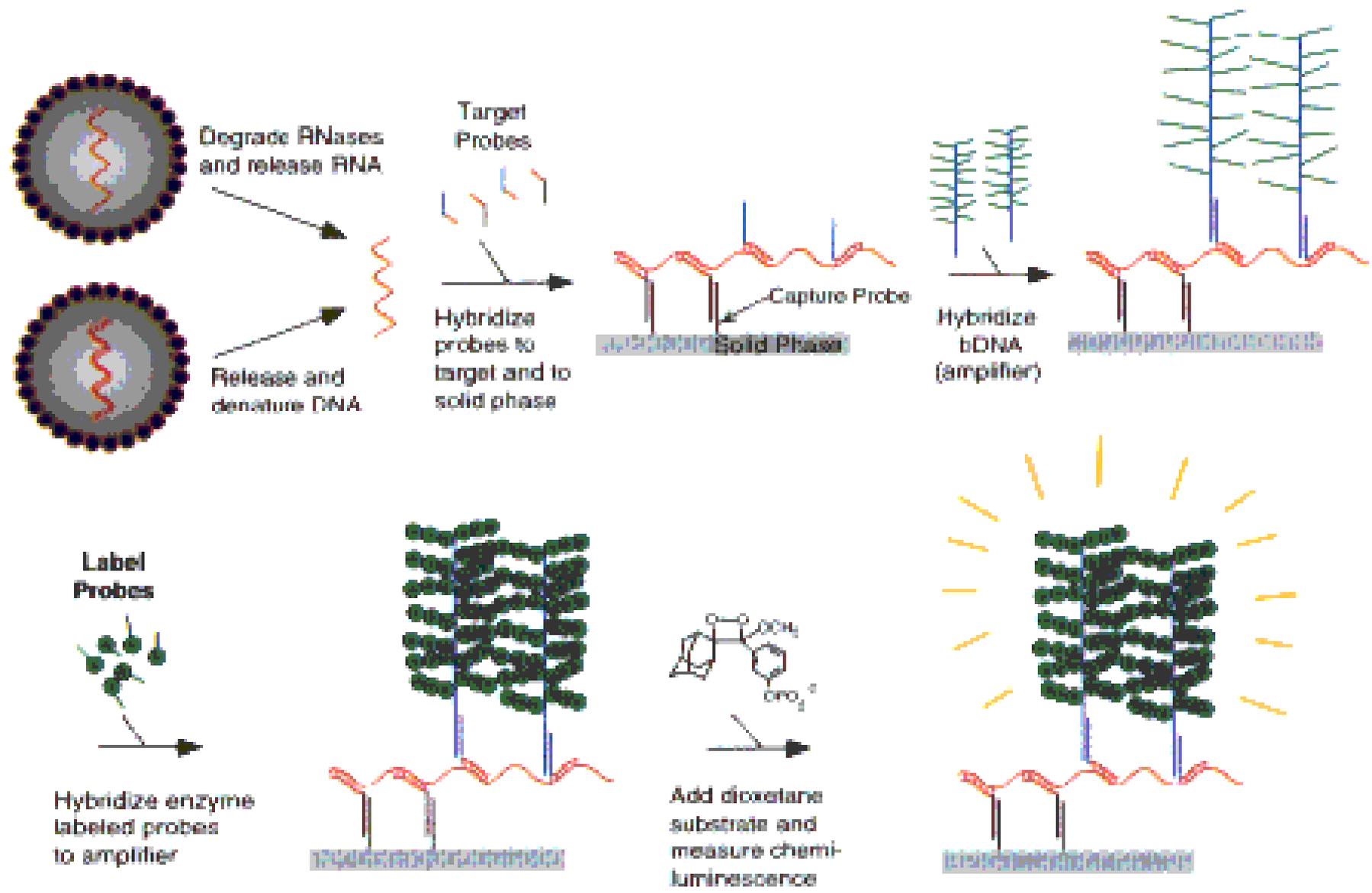
Copias genómicas o UI / ml (carga viral)

Slot blot para cuantificar DNA de HBV





bDNA Signal Amplification Assay



Dancing Naked in the Mind Field



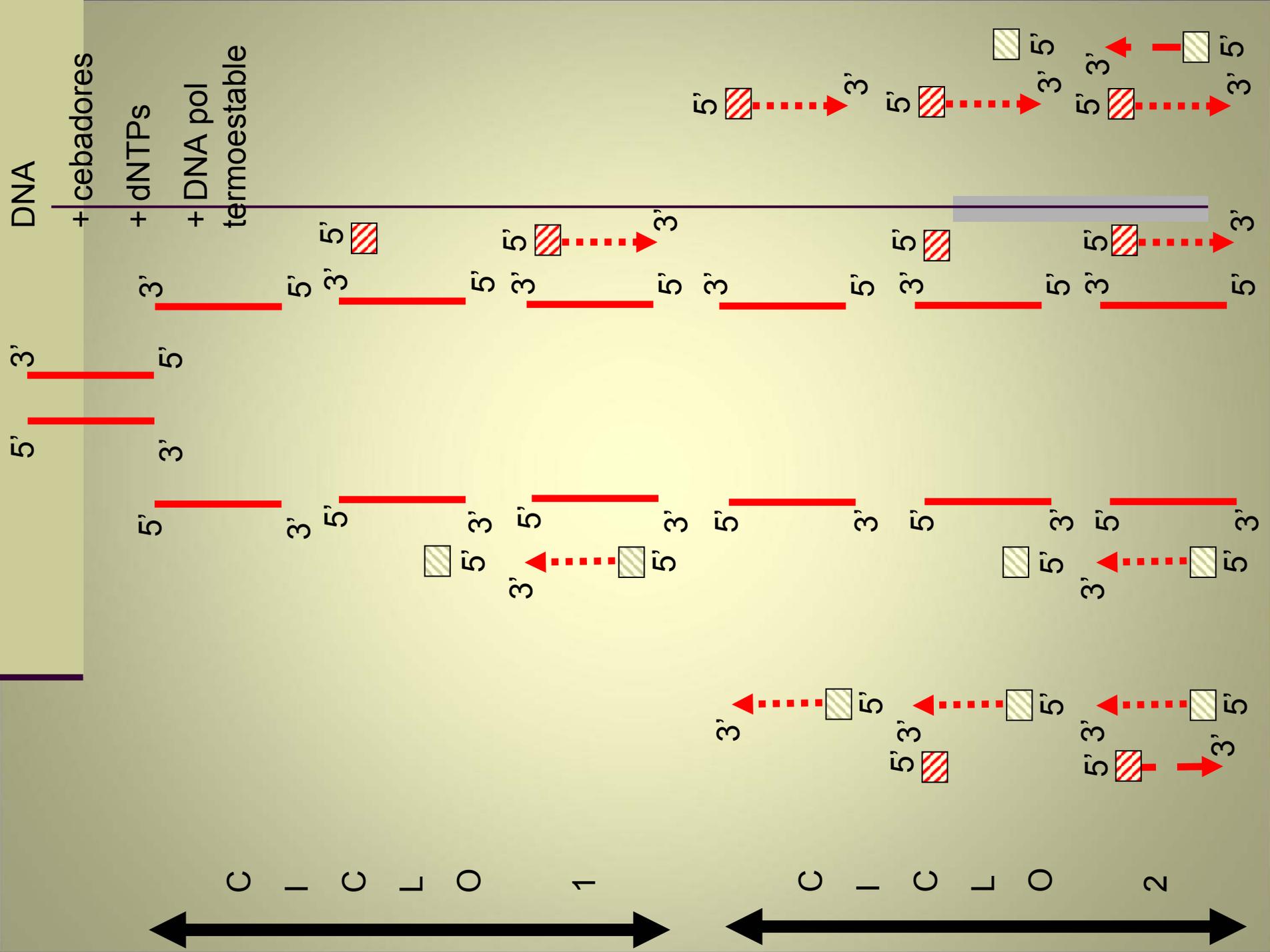
WINNER OF THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY
KARY MULLIS

"Kary Mullis, perhaps the weirdest human ever to win the Nobel Prize in Chemistry, [has written] a chatty, rambling, funny, iconoclastic tour through the wonderland that is [his] mind."
—THE WASHINGTON POST

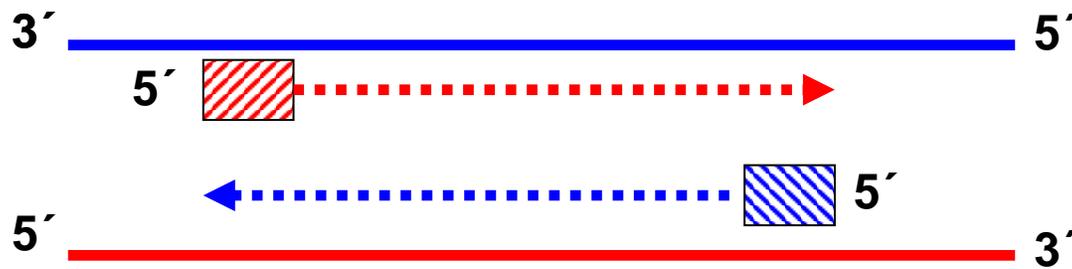
Kary Mullis

Inventor de la PCR

Premio Nobel de Química
de 1996



1ra.
amplificación



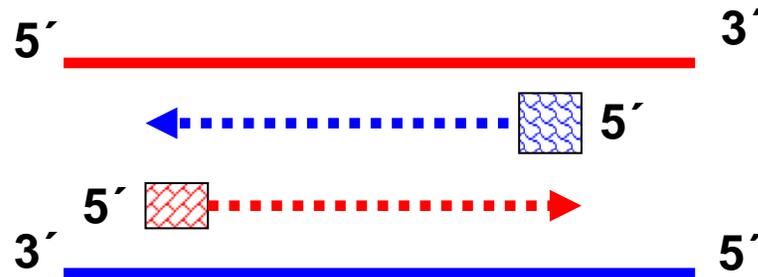
DNA

Productos de la
1ra. PCR



DNA

2da.
amplificación



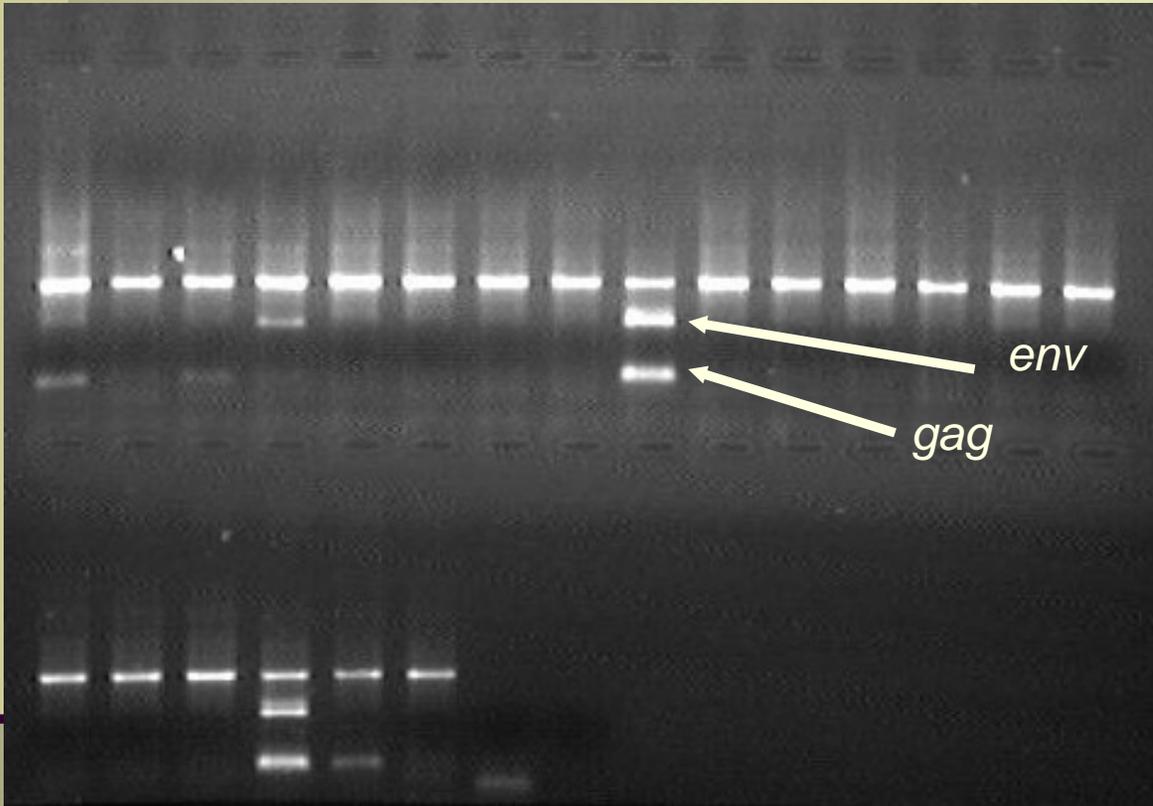
DNA

Productos de
la 2da. PCR



DNA

**PCR para detección de los genes
env y *gag* de HIV en linfo-mononucleares**



← Beta actina

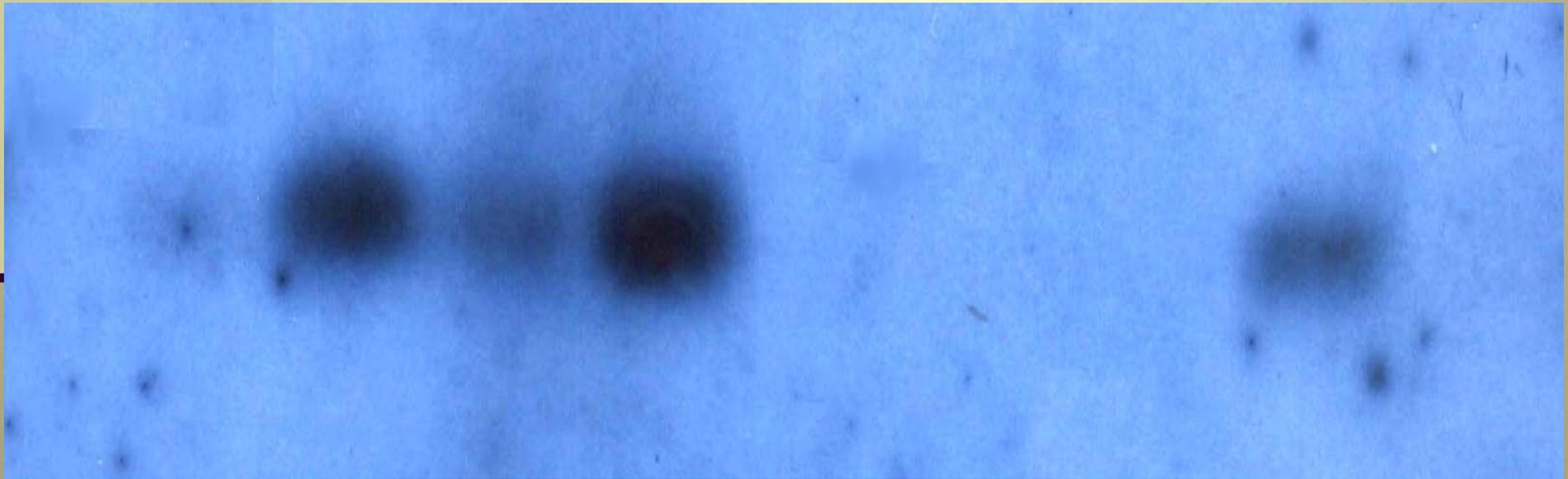
env

gag

Southern blot de una RT-PCR para detectar
RNA

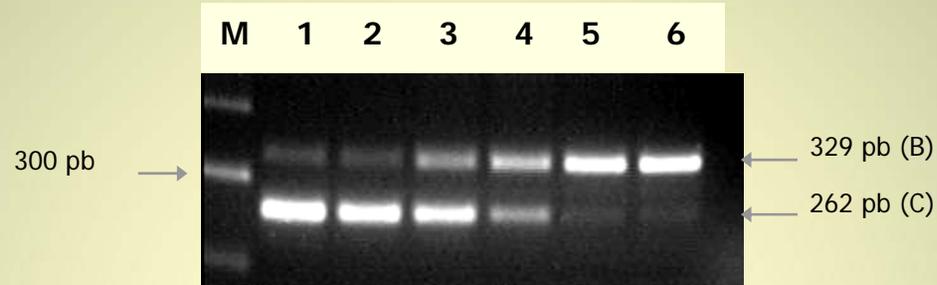
de GBV-C en médula ósea de pacientes con
enfermedades onco-hematológicas

1 2 3 4 5 6 7 8 (+) (-)

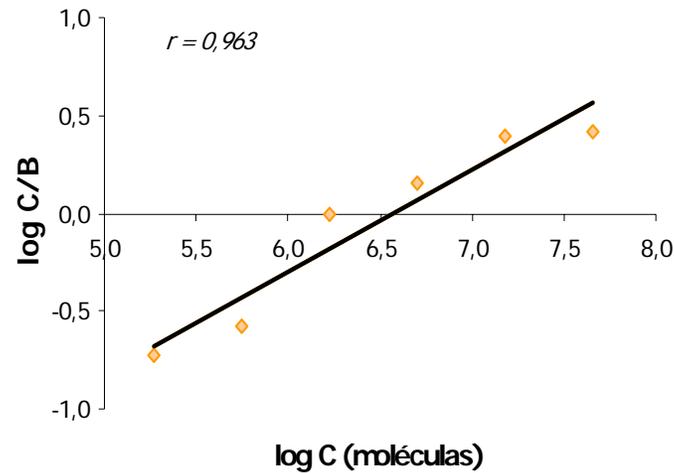


RT-PCR competitiva para cuantificar la carga viral del virus GB tipo C

A



B



PCR a tiempo real

- ¿Por qué es útil?
- ¿Qué es?
- ¿Cómo funciona?
- ¿Para qué sirve?
- ¿A qué virus puede / podría aplicarse?

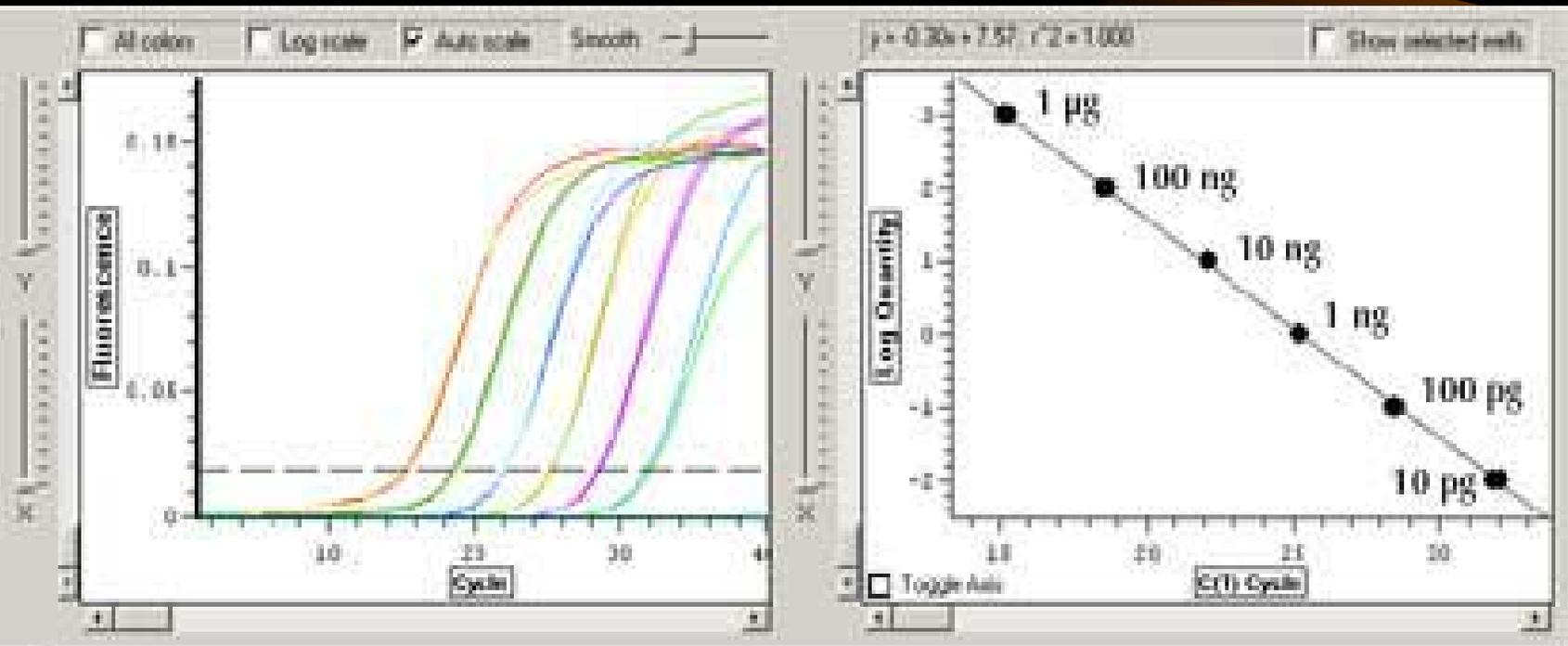
¿Por qué es útil?

- Amplificación y detección simultáneas.
- Mediante fluorescencia se puede cuantificar el ADN durante la amplificación (cinética).

¿Qué es? (I)

- Es una reacción de amplificación mediante **PCR acoplada a un lector de fluorescencia.**
- Utiliza uno de los dos sistemas siguientes:
 1. Agentes intercalantes.
 2. Sondas de hibridación específicas.

PCR en tiempo real



Detección mediante agentes intercalantes (II)

- **SYBR green I**
- El incremento de ADN se traduce en un aumento de la fluorescencia
- Muy fácil y muy económico.
- Baja especificidad (detecta multímeros de cebadores).
- No detecta polimorfismos.
- Utiliza *hot start* para aumentar la especificidad.
- Mediante análisis del T_m de los productos se puede verificar la especificidad (no es absoluto).

Cuantificación genómica

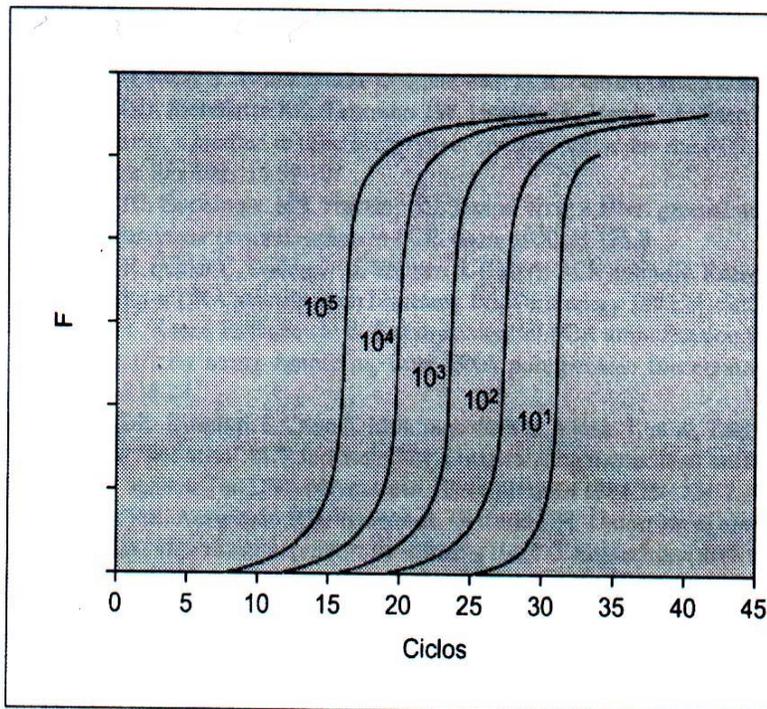


Figura 4. Curva patrón para cuantificación.

- Utilización de un patrón externo de concentraciones conocidas y crecientes.
- Elaboración de una curva patrón .
- Determinación del C_p (*crossing point*: ciclo en el que se detecta aumento de la fluorescencia).

DetECCIÓN DE MUTACIONES

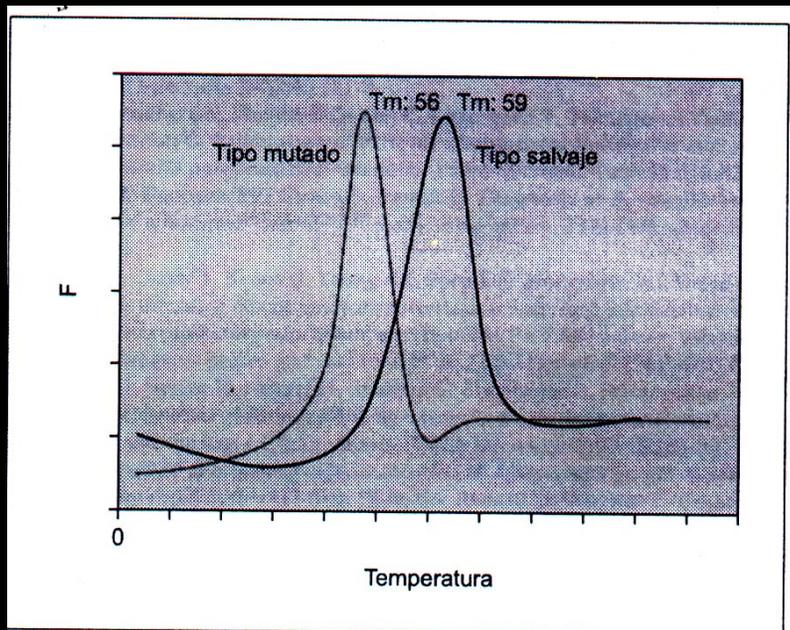


Figura 5. Determinación de mutaciones puntuales mediante análisis de curvas de disociación.

- Mayor estabilidad del híbrido formado entre la sonda y el ADN salvaje vs híbrido sonda y ADN mutado

Aplicaciones actuales y perspectivas

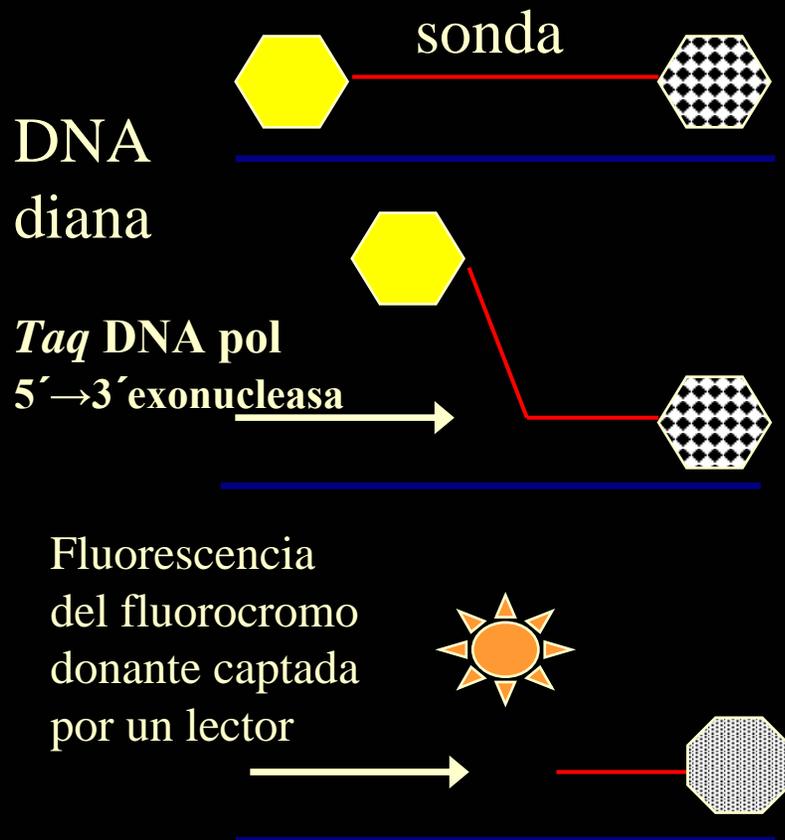
- HBV
- HCV
- HIV
- CMV

Otros: Erithrovirus B19, polyomavirus BK y JC, Adenovirus, etc.

Sondas de hibridación específica (III)

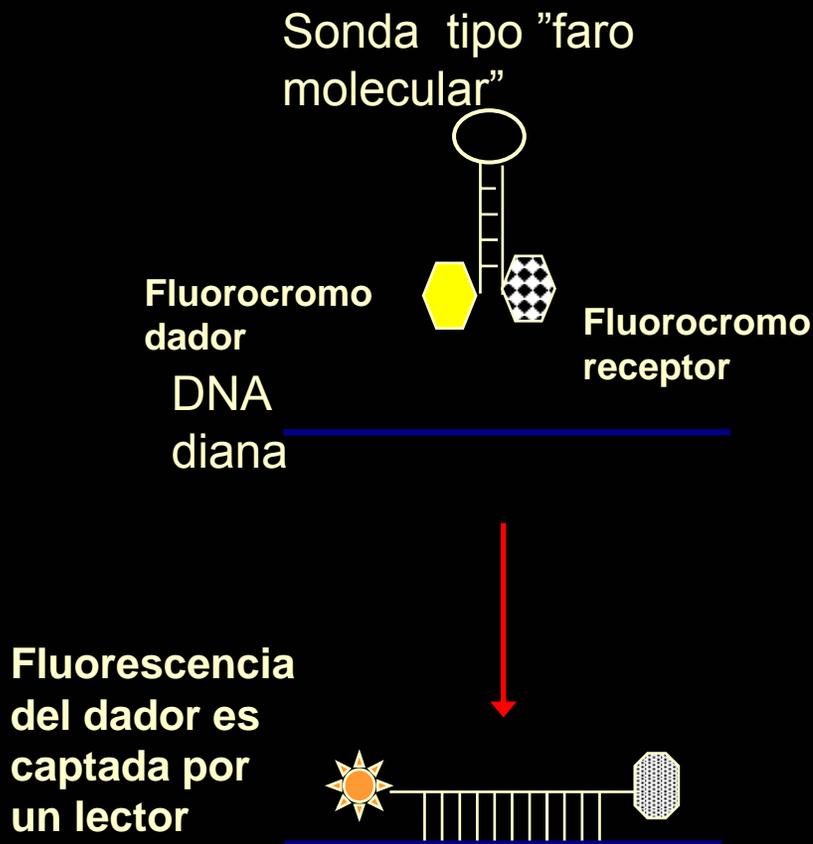
- Sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos : donante y aceptor.
- Fundamento FRET: *transferencia de energía fluorescente mediante resonancia.*
- 3 tipos:
 - Sondas de hidrólisis
 - Sondas Faros moleculares
 - Sondas FRET

Sondas de hidrólisis o TaqMan



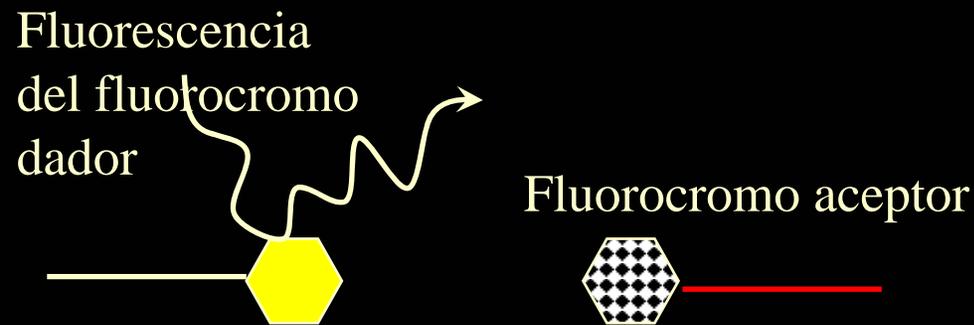
- Oligonucleótidos marcados en el 5' (donante) y el 3' (receptor) que son hidrolizadas por la Taq DNA pol con actividad 5'-3' exonucleasa.
- Captura de la fluorescencia por un lector.

Sondas Faros moleculares

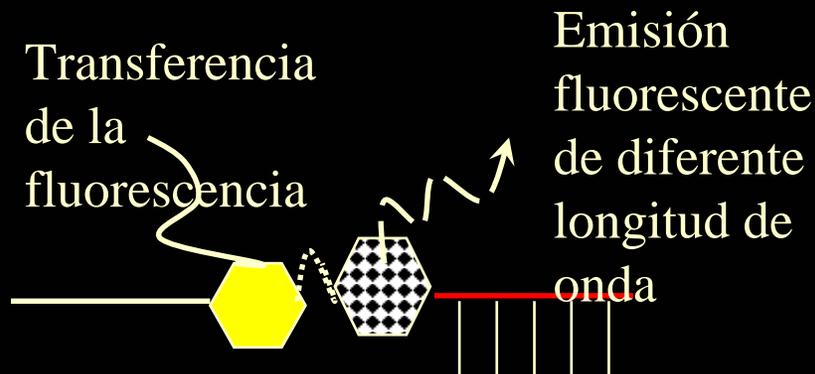


- Parecidas a las TaqMan. con extremos 5' y 3' marcados.
- Estructura secundaria en forma de asa donde está la zona de hibridación a secuencia diana.
- Al hibridarse el asa al ADN, el donador y el aceptor quedan distantes, y la fluorescencia del primero es captada por el lector.

Sondas FRET



- 2 sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN diana.
- Una sonda marcada con el donador en el 5' y la otra con el aceptor en el 3'.
- Al estar próximas, la emisión del donador no es captada por el lector, sino por el aceptor, que a su vez emite fluorescencia en otra longitud de onda.



Opciones de los equipos de PCR a tiempo real

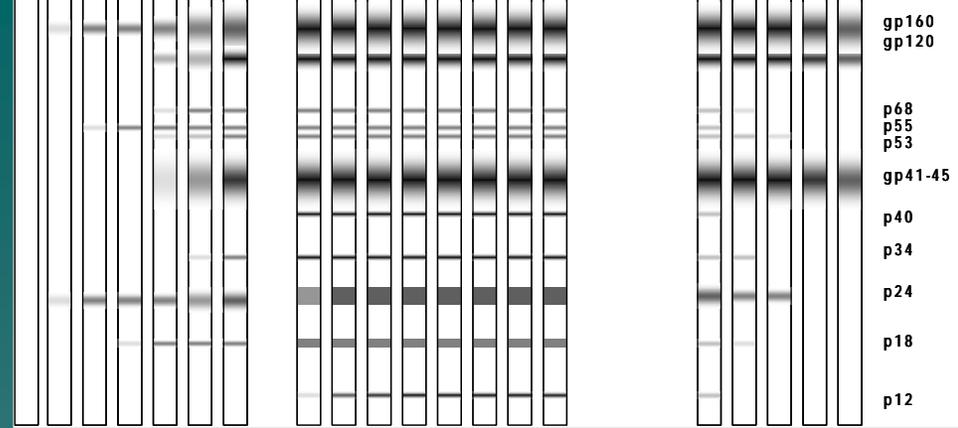
1. Amplificación y detección de ADN o ARN.
2. PCR múltiple
3. Cuantificación del ADN o ARN.
4. Análisis de curvas de disociación.

Ventajas de la PCR a tiempo real

1. Menor tiempo requerido.
2. Utilización de un sistema cerrado, con menor chance de contaminación.
3. Cuantificación con mayor precisión, y mayor rango (10^5 - 10^5 copias).
4. Simultaneidad de ensayos cuali-cuantitativos, múltiples y de detección de mutaciones.

CONFIRMACIÓN

WESTERN BLOT



← temprana → Reciente / establecida → avanzada →
ANTICUERPOS

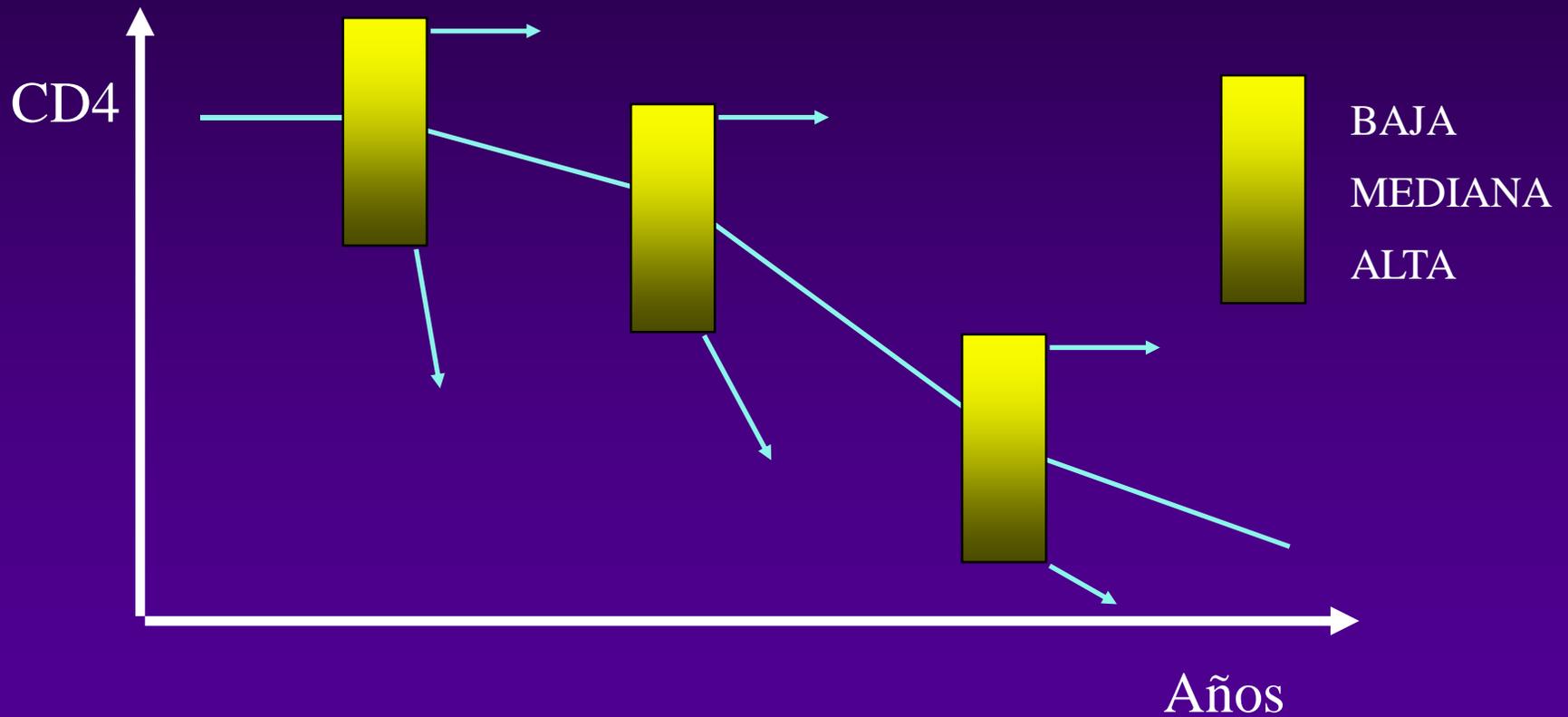


CAIDA DE LA CARGA VIRAL DURANTE EL TRATAMIENTO

Objetivo del tratamiento antiviral



CV en plasma como marcador predictivo del descenso de CD4



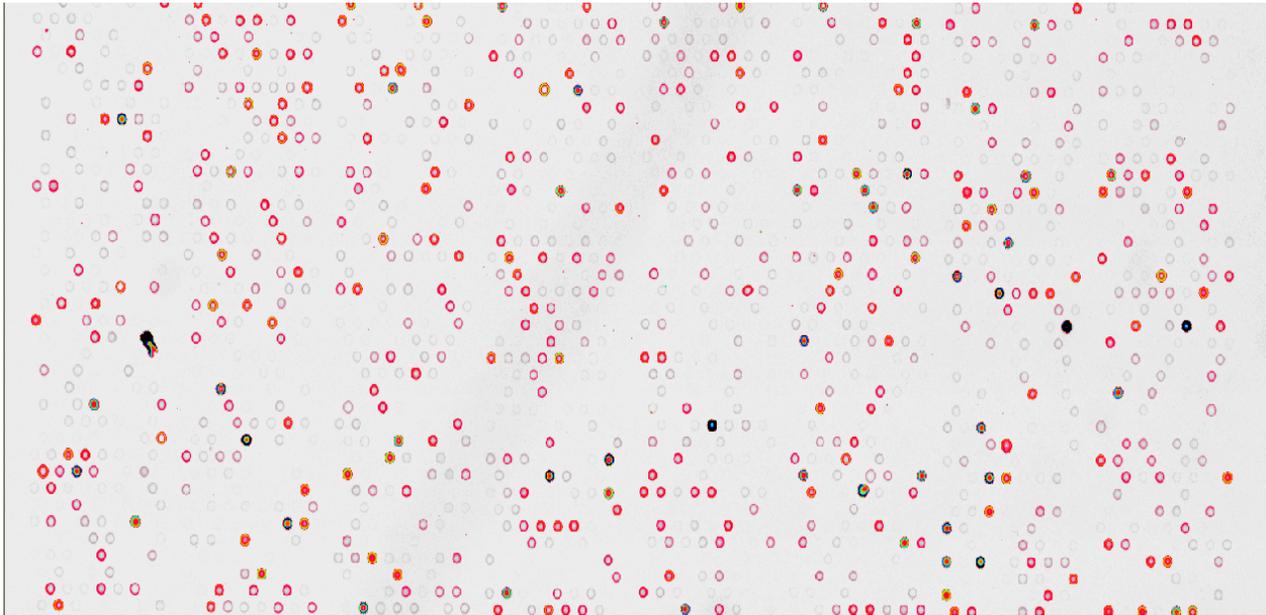
CARGA VIRAL COMO MARCADOR

- ◆ *Reconocimiento del curso de la infección*
- ◆ *Valor pronóstico :*
 - * ENFERMEDAD PROGRESIVA
VERSUS ESTABLE
- ◆ *Monitoreo de la terapia antiviral :*
 - * INICIACIÓN,
MANTENIMIENTO, FALLO



Patogénesis

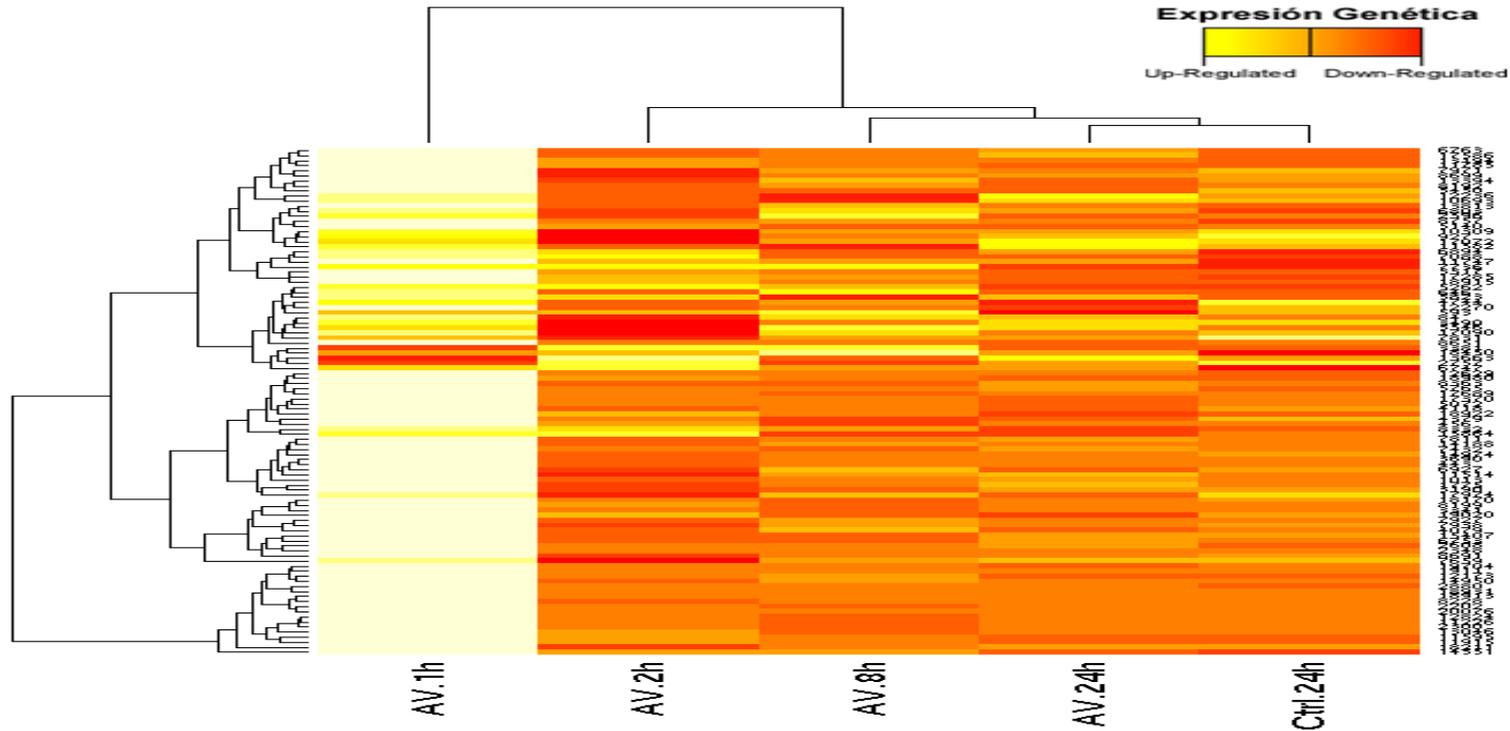
Análisis de la expresión diferencial de genes celulares luego de la infección por Adenovirus 7h mediante *bioarrays*



Detalle de una imagen obtenida para análisis de *bioarrays*. En los estudios de *microarrays* se combinan las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y detección por fluorescencia. De esta manera, sólo en los puntos del portaobjeto donde haya ocurrido hibridación se detectará la fluorescencia, siendo la intensidad de la misma proporcional al nivel de expresión del gen en estudio.

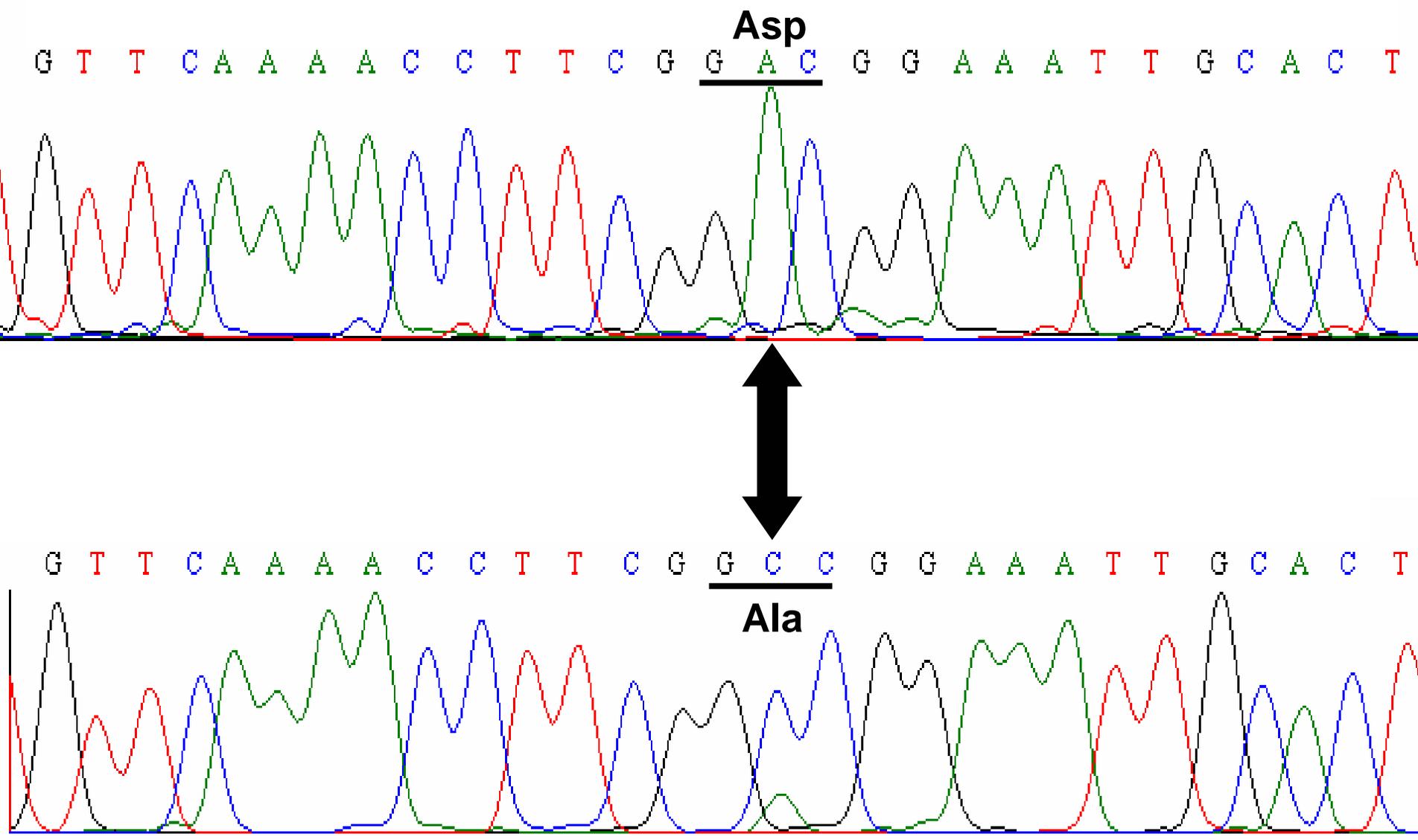
Barrero P, 2008. En prensa.

Microdisposiciones de DNA (*Microarrays*)



- Genes diferencialmente expresados para la serie de tiempo 1, 2, 8 y 24 horas post-infección de Adenovirus 7h analizado *in vitro* en células Hep-2. El gráfico presenta un *heatmap* con dendogramas, calculado por ANOVA (análisis de varianza). Se muestran los 100 primeros genes que surgen del análisis sobre los *bioarrays* CodeLink™ UniSet Human 20K I (GE Healthcare).
- El 50% de los genes celulares afectados por la infección de Av7h está relacionado con la entrada de la célula en fase S del ciclo celular, dando así un entorno ideal para la replicación viral y genes relacionados con mecanismos de defensa antiviral, en particular de la vía del interferon. Este trabajo contribuye con la exploración de los mecanismos implicados en la patogénesis del Adenovirus 7h.
- Barrero P. 2008. En prensa.

Mutante de escape a los anticuerpos neutralizantes anti-HBs (superficie de HBV)



Cuasiespecies

- “Distribuciones complejas de variantes distintas pero íntimamente relacionadas.”
- “No existe un genoma definido de modo preciso, ya que el genoma consenso es un promedio de variantes.”
- “Su dinámica tiene un considerable número de implicancias para entender la adaptabilidad de un virus, su poder patogénico y de persistencia.”

E. Domingo



Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions within a viral population

Marco Vignuzzi¹, Jeffrey K Stone¹, Jamie J. Arnold², Craig E. Cameron², and Raul Andino¹

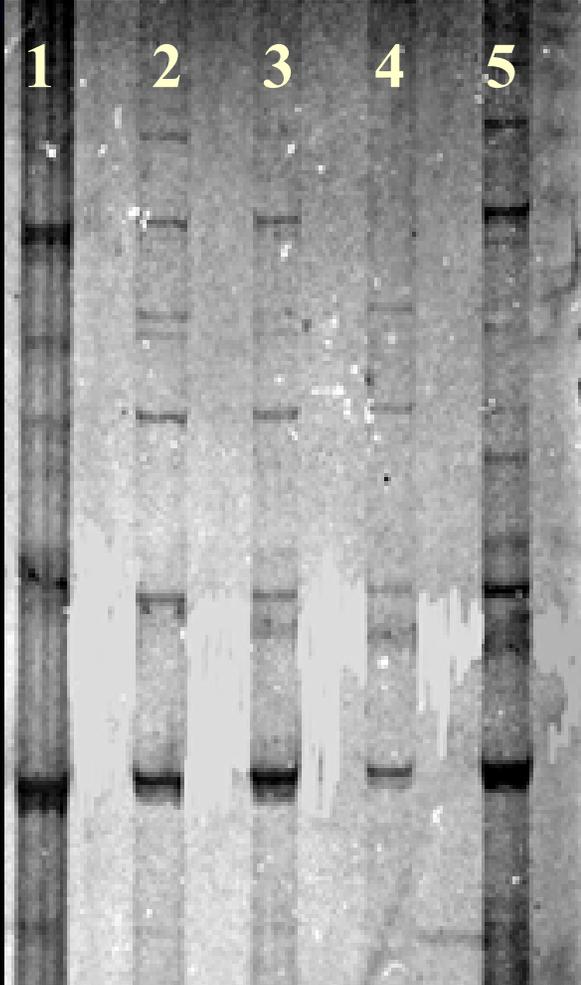
Abstract

- Mathematical modelling predicts that the viral quasispecies is not simply a collection of diverse mutants but a group of interactive variants, which together contribute to the characteristics of the population 4,12. In this view, viral populations, rather than individuals, are the target of evolutionary selection 4,12. To test this hypothesis we examined whether limiting genomic diversity affects viral pathogenesis. We find that poliovirus carrying a high fidelity polymerase replicates at wildtype levels but generates less genomic diversity and is unable to adapt to adverse growth conditions.
- *In infected animals, the reduced viral diversity led to loss of neurotropism and an attenuated pathogenic phenotype. Strikingly, expanding quasispecies diversity of the high fidelity virus by chemical mutagenesis prior to infection restored neurotropism and pathogenesis. Analysis of viruses isolated from brain provides direct evidence for complementation between members within the quasispecies, indicating that selection indeed occurred at the population level rather than on individual mutants. Our study provides direct evidence for a fundamental prediction of the quasispecies theory and establishes a link between mutation rate, population dynamics and pathogenesis*

Cuasiespecies del VHB

Pacientes

SSCP de amplicones del Gen S

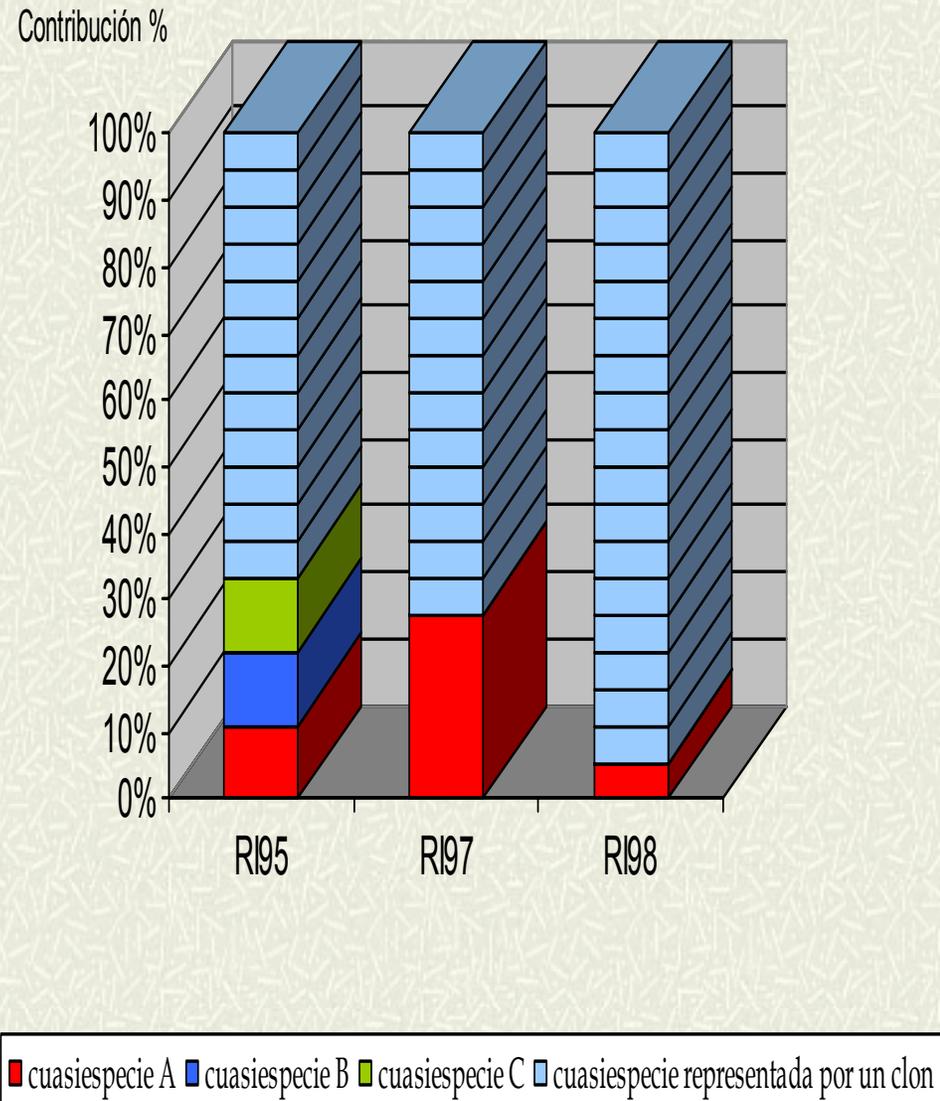


Banda en la SSCP	1	2	3	4	5
1					x
2		x			x
3	x	x	x		x
4					x
5		x	x	x	x
6	x	x	x		x
7	x	x	x	x	x
8					x
9	x		x		x
10	x	x	x	x	x
11			x	x	x
12	x	x	x	x	x

Gen S: Estudio de la heterogeneidad genética

Distribución de cuasiespecies de HBV en las muestras RI95, RI97 y RI98

Parámetro evaluado	RI95 (18 clones)	RI97 (14 clones)	RI98 (18 clones)
Índice de heterogeneidad	0,89	0,64	1
Nº clones de la cuasiespecie predominante	2 (clones 3 y 8) 2 (clones 12 y 13) 2 (clones 1 y 5)	5 (clones 3, 10, 11, 12, 14)	0 (*)
Tasa de sustitución nucleotídica / sitio / año	No corresponde	$3,19 \times 10^{-3}$ ($1,6 \times 10^{-3}$ para RI97 - RI97.1)	$6,4 \times 10^{-3}$

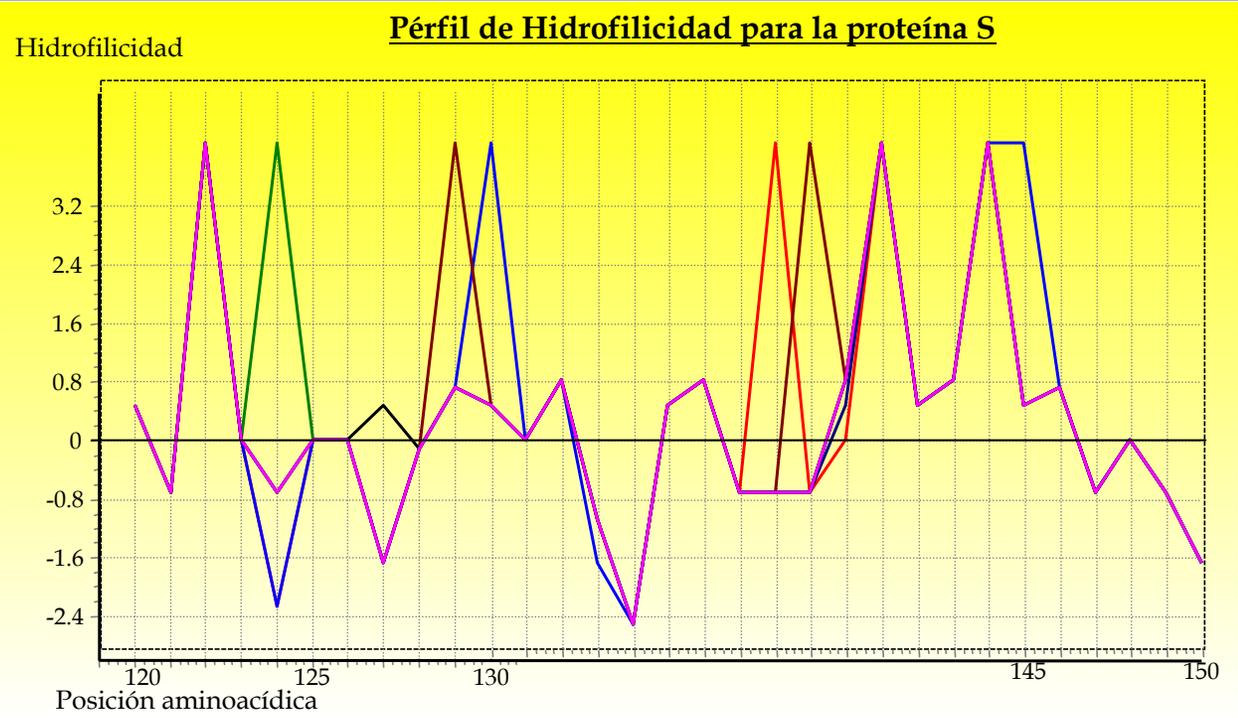


Estudio de la Hidrofilicidad del HBsAg

(aa 120-150) en los 50 clones de las muestras RI95, RI97 y RI98

RI95, RI97 y RI98

Método de Hopp & Woods



	RI95.8
	RI95.6
	RI97.1
	RI98.14
	RI98.6
	RI98.12
	RI98.7

PCKTCTTLAQGTSMFPSCCCSKPSDGNCTCI

.....P.....

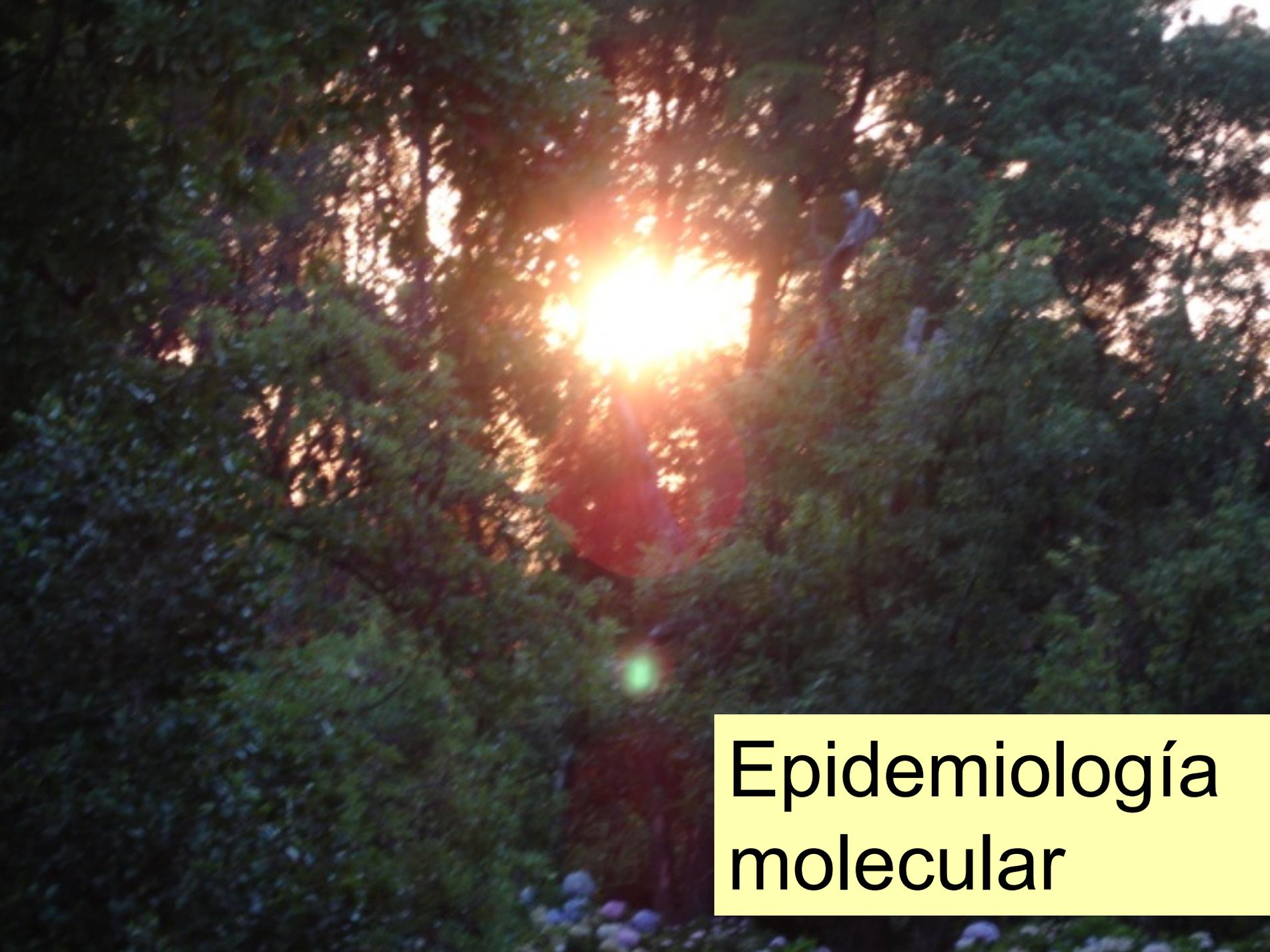
.....Y.....K.....I.....E.....

.....Y.....R.....T.....

.....R.....

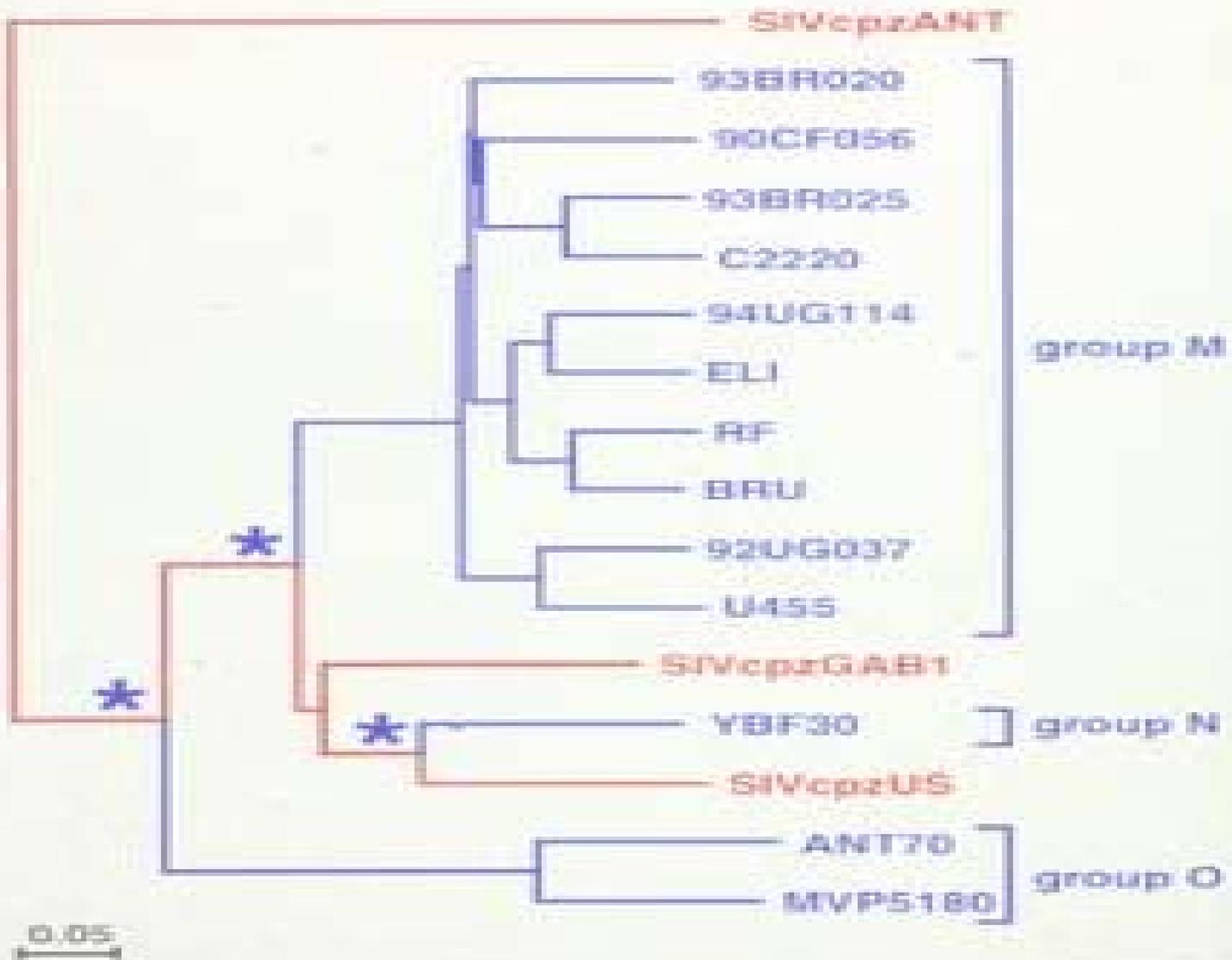
.....R.....R.....

.....P.....

A photograph of a bright sun setting or rising through a dense forest of green trees. The sun is positioned in the upper center, creating a strong lens flare and illuminating the surrounding foliage. The trees are dark green and their branches are silhouetted against the bright light. The overall scene is serene and natural.

Epidemiología molecular

Evidencia filogenética de tres ingresos independientes de SIVcpz al hombre

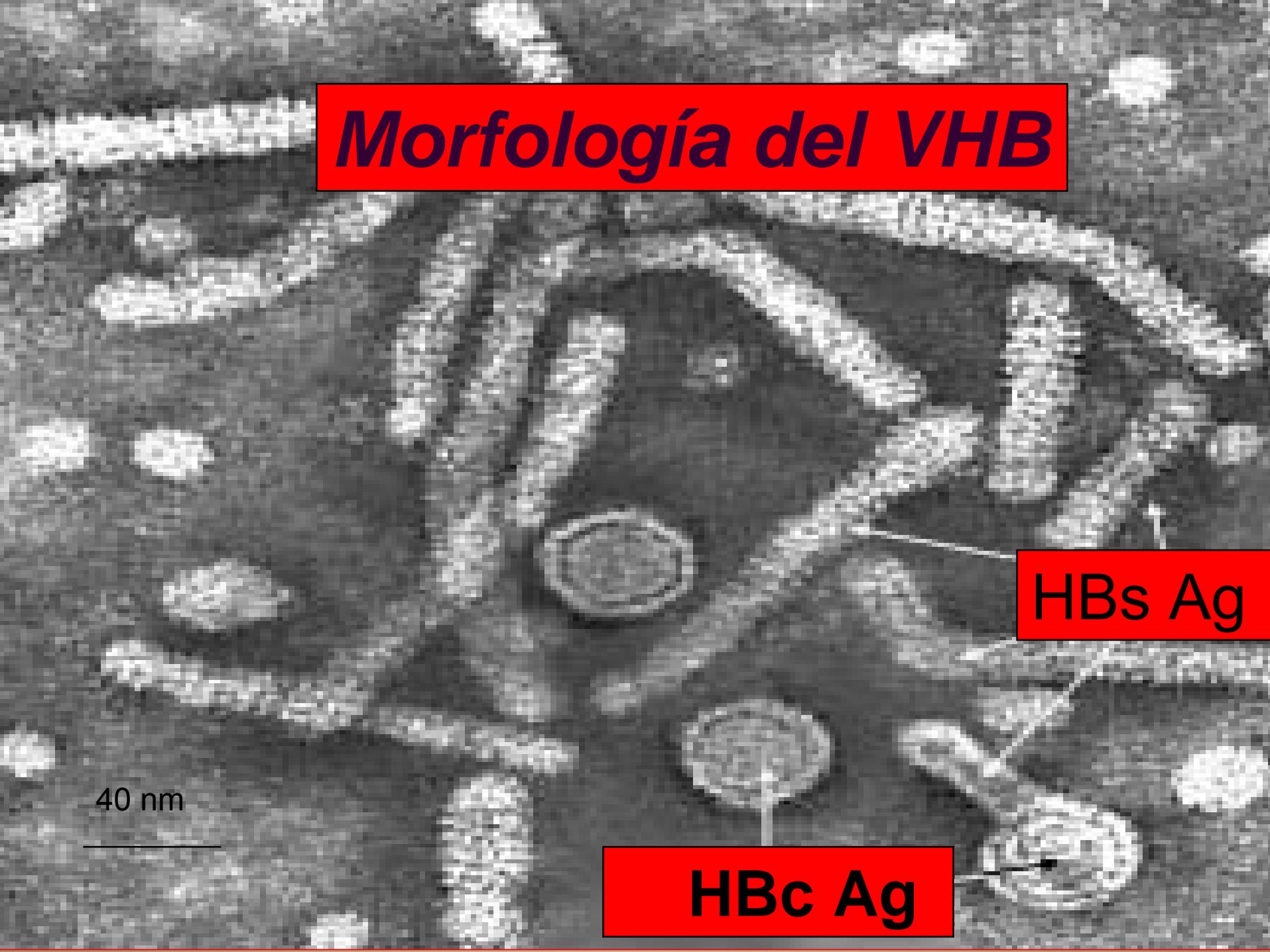


PROFILAXIS

- ◆ Vacunas obtenidas mediante Ingeniería genética:
 - ◆ Anti-hepatitis B
 - ◆ Anti-HPV (*VLPs expresadas en baculovirus*)
 - ◆ Anti-rotavirus (*atenuada mediante reasociación génica*)

Morfología del VHB

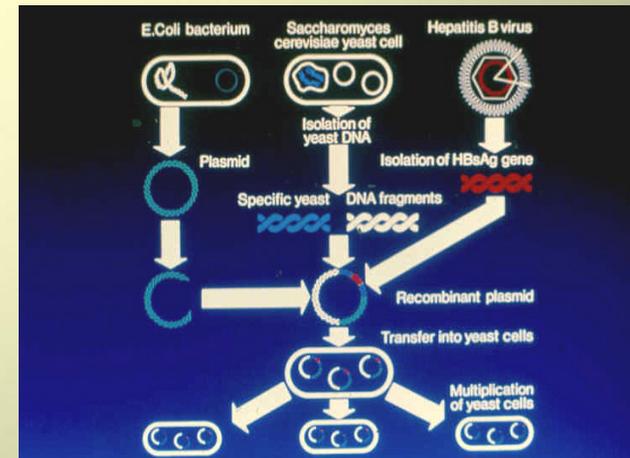
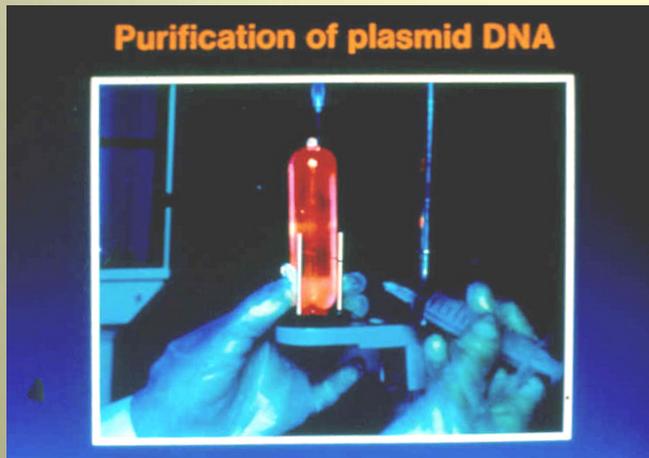
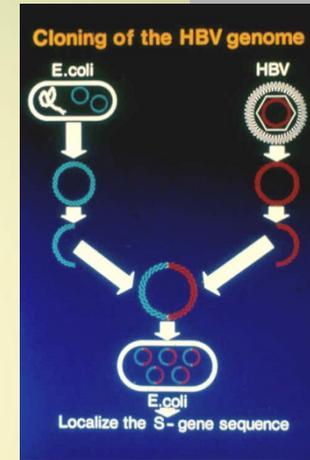
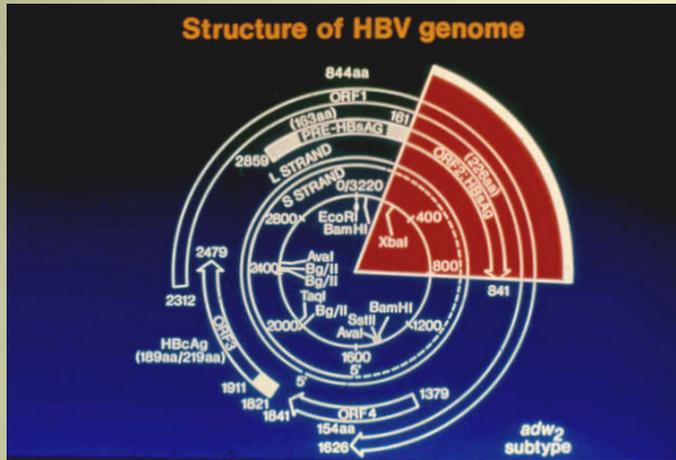
40 nm



HBs Ag

HBc Ag

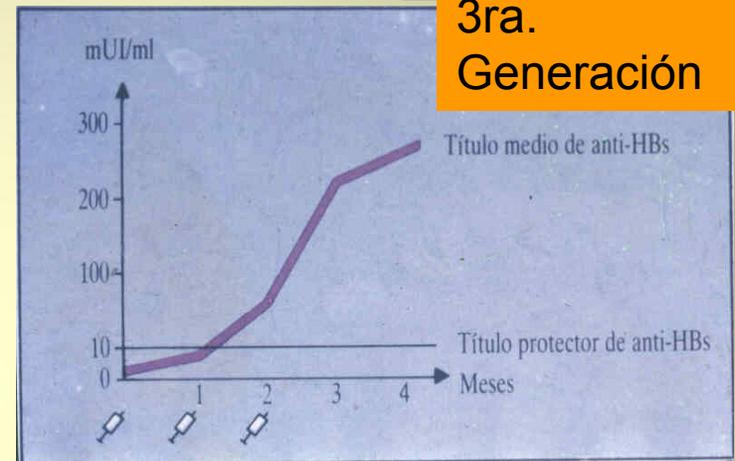
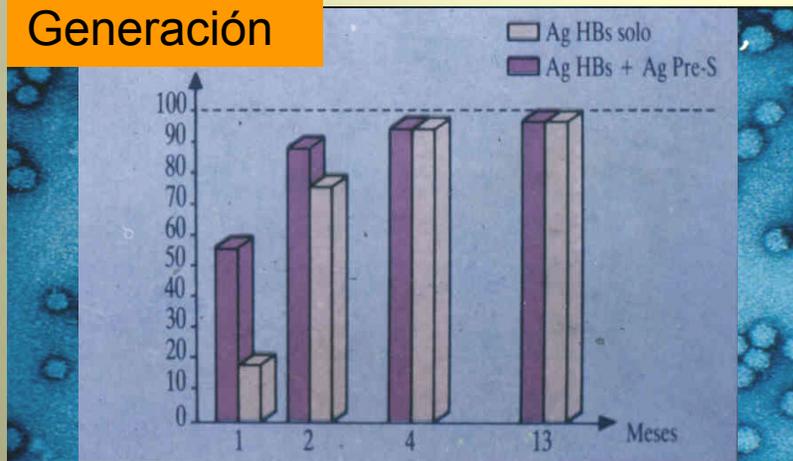
Construcción de la vacuna anti-hepatitis B de segunda generación



Inmunogenicidad de vacunas de 2da. y 3ra. Generación anti-HB V

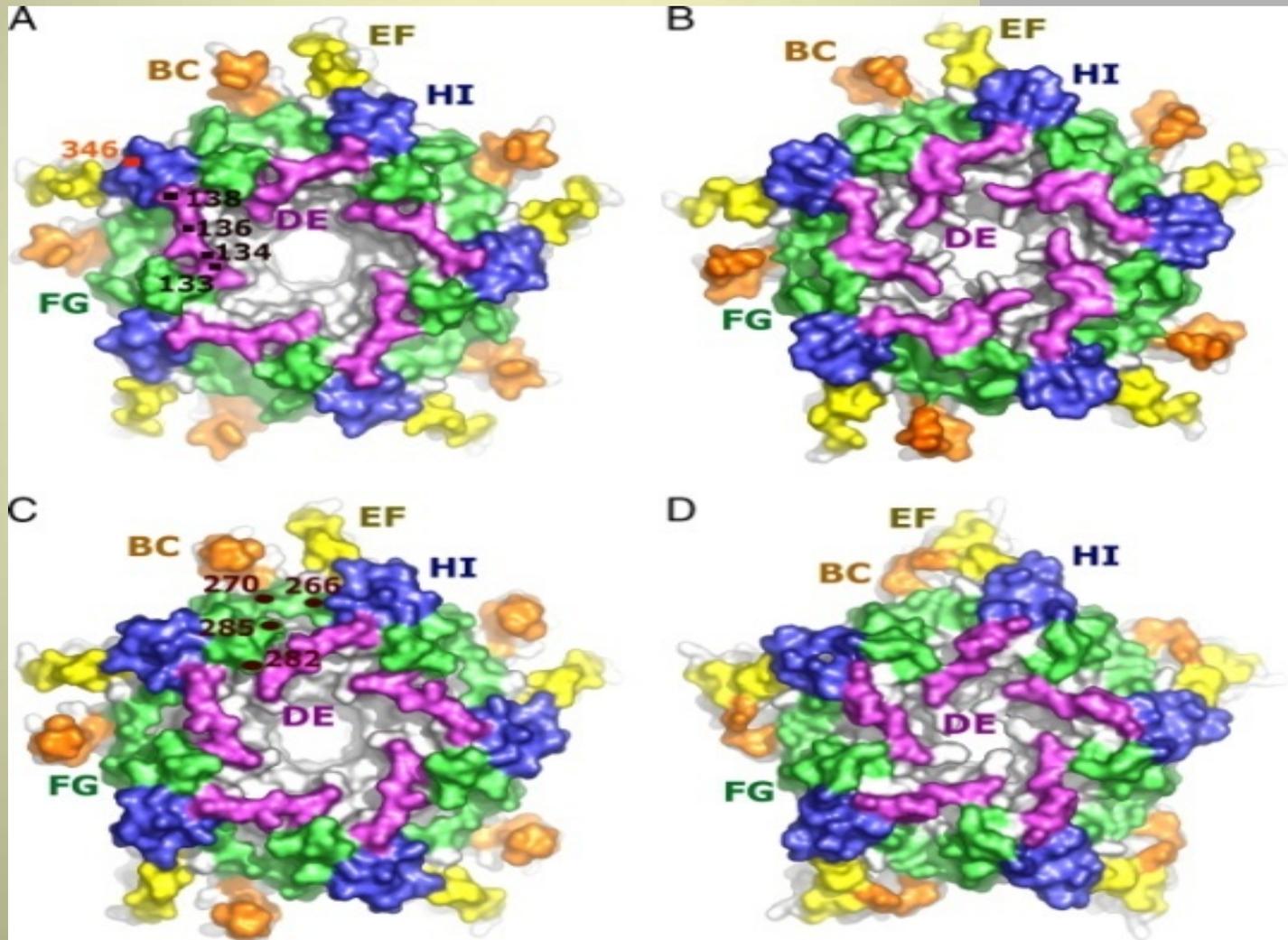


2da.
Generación



2da. y 3ra.
Generación

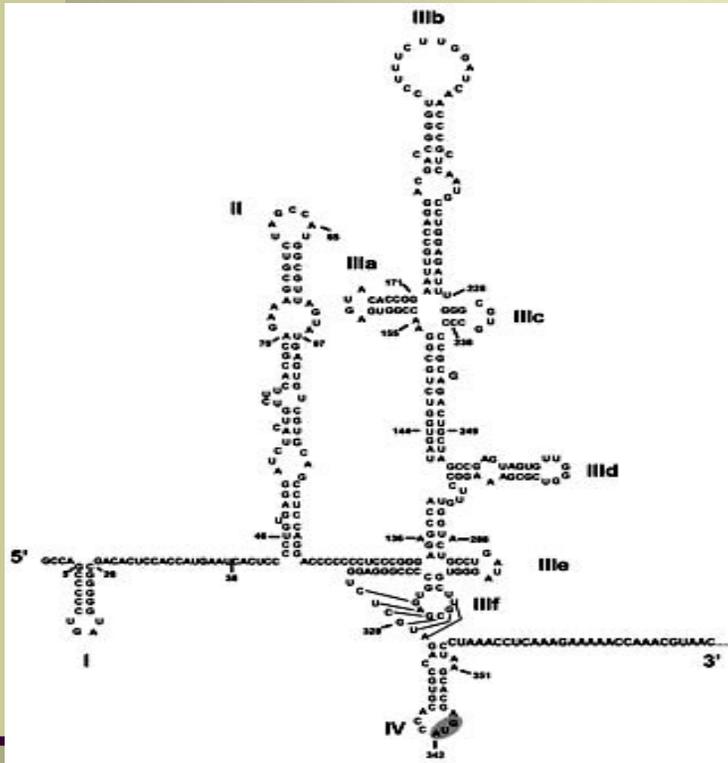
HPV: diferentes epítopes en las VLPs tipo específicas 6, 35, 16 y 18





**Nuevas terapias
antivirales**

Potenciales blancos terapéuticos en la infección por HCV

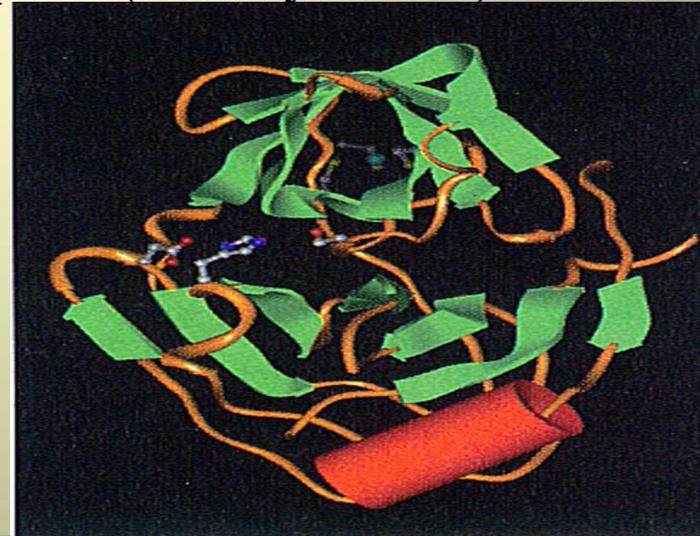


*Acción sobre la región 5' NC (IRES):
oligonucleótidos antisentido, siRNA (en ensayo)*

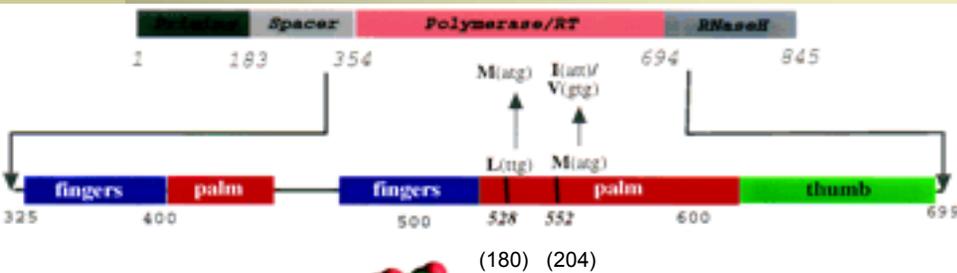


*Inhibidores de la helicasa viral:
(en ensayo)*

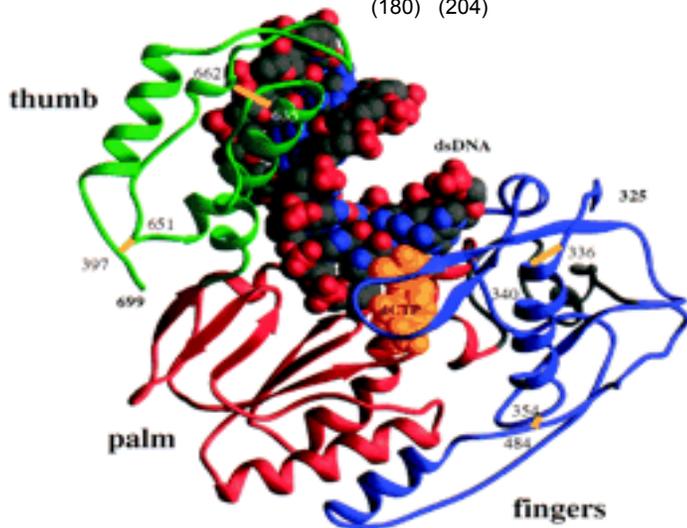
*Inhibidor de la proteasa NS3 /4 viral:
Telaprevir (en ensayo clínico)*



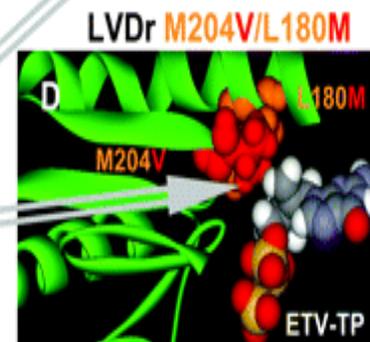
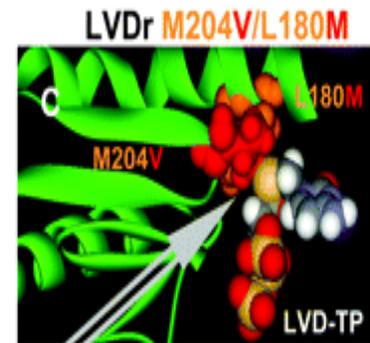
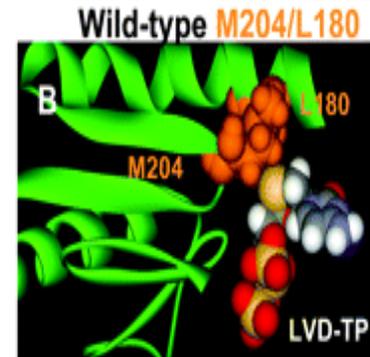
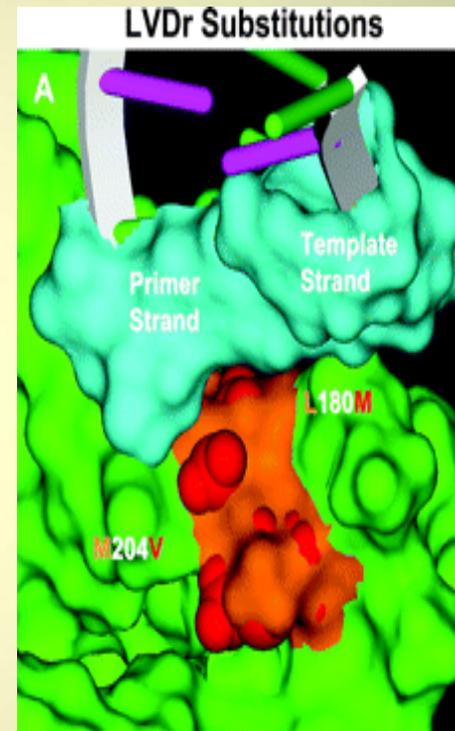
Modelo tridimensional de la Transcriptasa inversa de HIV y HBV



(180) (204)



HIV	325	CWMLQPMKSC	PCREYFLSHL	VNLS	EWGFC	DEEGEHIRI	PWT--PARV	GVFLVIND	HMTAESLV
HIV-1	18	GFVEVQWPLT	EEKIKALWEI	CTH	DEEG--	-----KIS	KIGFSDPVM	PVFAIKSDG	---YDMLL
HIV	393	CSQSPERGIS	KVNGEPAVP	HLQSLTSL	SL	SLHMLDLW	SLAPFHLK	PAAMHLLAS	SGGLSKYAR
HIV-1	74	CSKELAKR--	TQDFKQVL-	GIHFPAK	SLK	K-NVTVLW	SLATTEVLD	-----	-----
HIV	443	LSKNSKINSE	QNTDQSLSD	SCSRQLYSL	HLLYKTYGK	LHLYSEKVL	GFREKIDVQ	LSQFLLAQ-F	
HIV-1	122	-----EDFR	KATAFI--	-----PS	INSETP	SDNY	QYVLSQWK	GSALFQSM	
HIV	532	SAICSFVVR	AKRECLAPF	AGVFLAK-	SVQREKLYT	AVTQSLSL	IRLHPHTEK	WUTSLNWDY	
HIV-1	145	KRLKFFK-	QSDIVYQL	AGLFLVSD	EIQGHTK	SLQGLDQ	LTFEPEK-Q	KEPFLANQY	
HIV	601	IIGSWTLFQ	HLIYKIKK	PKELVWVPT	ENWVQKIVQ	LLGFAAPFQ	QYFALMGLY	ACTIQAQPT	
HIV-1	233	KLEPDK--WT	VUPVLFK-	KEKQVW-	ED	-----QLVQ	KLAKLQI-	YFQIEVQK	ELLRGTR-AL
HIV	671	PSPTFAFLK	QYDSDYVAK	QKQGLQV		699			
HIV-1	390	TKV-IPLTER	AEKLAADK	ILKEPVD		316			



M204V reduces pocket size

Steric clash between LVD and V204

Minimal steric clash between ETV and V204

Ensayo clínico de Terapia génica ante un tumor cerebral utilizando un Herpes virus modificado

