

REPLICACIÓN VIRAL

Norman Balcázar M.

Ya hemos mencionado que los virus requieren un sustrato de células vivas para su multiplicación; que ningún virus tiene organelas y por lo tanto carecen de capacidad metabólica (excepto algunos virus que tienen enzimas para iniciar la infección), y que, por lo tanto, todos ellos son obligatoriamente intracelulares. Para entender cómo los virus infectan las células, expresan su información genética, se multiplican y finalmente producen alteración, se requiere de un conjunto de conceptos y definiciones que son, en parte, el objeto de este capítulo.

Para que un virus se replique, este debe primero infectar una célula; pero un virus determinado no infecta células de todas las especies, ni a todos los individuos de una especie, ni a todas las células en un individuo. Cada virus tiene un rango, más o menos estrecho, de especies que puede infectar, en forma natural, accidental o experimental, y tiene también un tropismo, más o menos estrecho, de células a las cuales infecta dentro de un individuo. La susceptibilidad se refiere a la condición que tiene una especie, o un individuo o una célula para infectarse con un agente determinado. Pero también debemos tener en cuenta que la infección de una célula susceptible no garantiza, automáticamente, que la replicación viral se lleve a cabo; como tampoco el hecho de que un individuo se infecte, garantiza que sufra la enfermedad.

La infección de células susceptibles puede ser productiva, restrictiva, abortiva o latente. La infección productiva ocurre solo en células donde la disponibilidad de enzimas y de señales celulares sean las más indicadas, para que el virus se replique y produzca una progenie, a este tipo de células se les conoce como permisivas. La infección abortiva no sostiene la producción de progenie viral y puede darse principalmente por dos razones; aunque la célula pueda ser susceptible, esta no posee el soporte enzimático necesario para que el virus produzca nuevas partículas virales, en este tipo de infección solo unos cuantos genes virales pueden expresarse. También puede resultar de la infección de

células permisivas o no permisivas con virus defectivos, los cuales carecen de una información genética completa.

Las células pueden ser transitoriamente permisivas, y las consecuencias es que el virus permanece en la célula ya sea hasta que esta se vuelva permisiva o a que solo unas pocas células en una población produzcan progenie viral en algún momento. Este tipo de infección se ha definido como restrictiva por algunos investigadores y restringente por otros. La marca de la infección latente es la persistencia de los genomas virales, sin la concomitante producción de partículas infecciosas, en células no-permisivas transitoriamente sin que el virus destruya de la célula infectada.

El ciclo replicativo, de todos los virus, exhibe varias características en común (figura 1). Primero, por varias horas después de la exposición de las células al virus, no se detecta el virus infeccioso. Este intervalo es conocido como la fase de Eclipse, y señala el hecho de que los genomas virales han sido expuestos a la maquinaria enzimática del hospedero, que implica la destrucción de la integridad de la partícula viral. Esta fase es seguida por un intervalo en el cual la progenie viral se acumula en la célula o en el ambiente extracelular a velocidades exponenciales. Este intervalo es conocido como la fase de maduración.

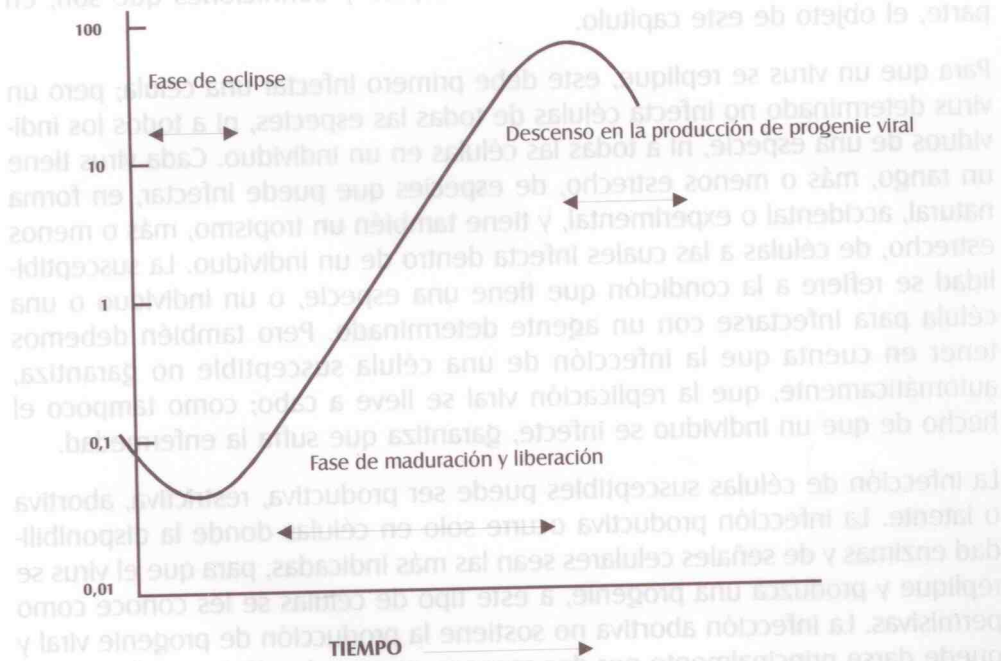


Figura 1. Ciclo replicativo de virus que infectan células eucarióticas. La escala de tiempo varía para diferentes virus; estos pueden variar desde 8 horas (poliovirus) hasta más de 40 horas (citomegalovirus). Adaptado de Fields Virology. 1996

Después de varias horas las células infectadas con virus líticos cesan toda actividad metabólica y pierden su integridad estructural. Células infectadas con otro tipo de virus pueden continuar sintetizando viriones indefinidamente. Los ciclos replicativos de los virus varían de 6-8 horas (picornavirus) a más de 40 horas (algunos herpesvirus).

La forma más sencilla como podemos resumir los eventos de la replicación viral es la siguiente, (ver figura 2).

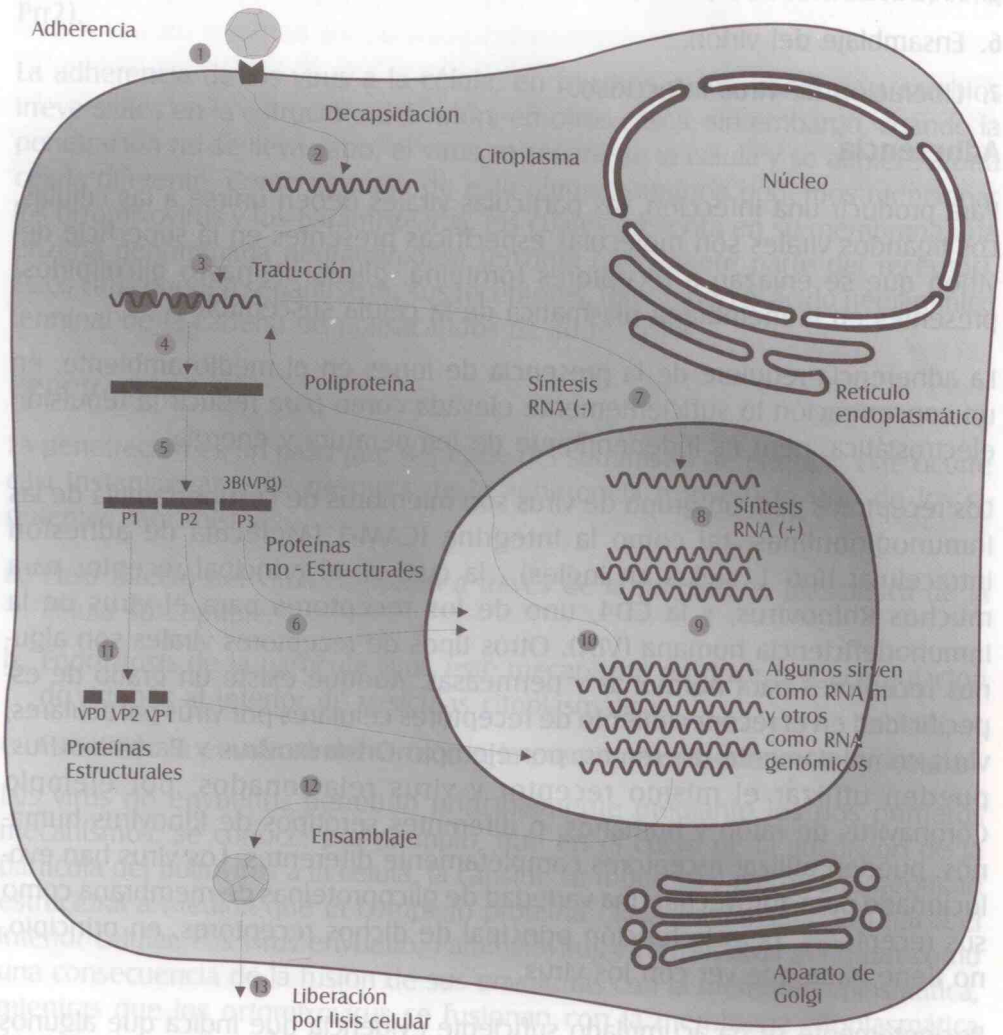


Figura 2. Ciclo de replicación de un virus desnudo (poliovirus)

Pasos en la replicación viral:

1. Adherencia de los viriones a la célula.
2. Penetración; entrada del material genético del virus al interior de la célula, con o sin otros componentes del virión.
3. Decapsidación o desnudamiento; exposición del material genético del virus a la maquinaria enzimática de la célula.
4. Expresión de genes virales.
5. Producción de componentes del virión, incluyendo el material genético
6. Ensamblaje del virión.
7. Liberación de virus infeccioso.

Adherencia

Para producir una infección, las partículas virales deben unirse a las células. Los ligandos virales son moléculas específicas presentes en la superficie del virión que se enlazan a receptores (proteína, glicoproteínas o glicolípidos) presentes en la membrana plasmática de la célula susceptible.

La adherencia requiere de la presencia de iones en el medio ambiente, en una concentración lo suficientemente elevada como para reducir la repulsión electrostática, pero es independiente de temperatura y energía.

Los receptores para un grupo de virus son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, tal como la integrina ICAM-1 (Molécula de adhesión intracelular tipo 1, siglas en inglés), la cual es el principal receptor para muchos Rhinovirus, y la CD4, uno de los receptores para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Otros tipos de receptores virales son algunos receptores para hormonas y permeasas. Aunque existe un grado de especificidad en el reconocimiento de receptores celulares por virus particulares, virus completamente diferentes, por ejemplo Ortomixovirus y Paramixovirus, pueden utilizar el mismo receptor y virus relacionados, por ejemplo Coronavirus de ratón y humanos, o diferentes serotipos de Rinovirus humanos, pueden utilizar receptores completamente diferentes. Los virus han evolucionado para aprovechar una variedad de glicoproteínas de membrana como sus receptores, pero la función principal de dichos receptores, en principio, no tiene nada que ver con los virus.

Recientemente se ha acumulado suficiente evidencia que indica que algunos virus emplean más de un receptor celular. Si estos están situados en diferentes tipos celulares, explicarían en parte la ampliación del tropismo del virus. Existe, igualmente, evidencia que sugiere la presencia de receptores secuenciales en

el mismo tipo de célula, es decir; un receptor de "rango-amplio", con el cual es virus establece un primer contacto, y receptores de "rango-estrecho", el cual está más íntimamente asociado con la membrana, facilitando la entrada del virión por fusión. Un ejemplo del empleo de receptores secuenciales, lo tenemos con algunos virus de la familia Herpesviridae; se ha propuesto que el heparan sulfato, presente en muchos tipos celulares, sirve como receptor de "rango-amplio", para establecer un primer contacto virus-célula; posteriormente se establece un contacto más específico entre proteínas de la envoltura viral y receptores tales como: mediador de la entrada del herpesvirus (HveA, siglas en inglés) y proteínas relacionadas con el receptor del poliovirus (Pvr, Prr1, Prr2).

La adherencia de los virus a la célula, en muchos casos, conduce a cambios irreversibles en la estructura del virión; en otros casos, sin embargo, cuando la penetración no se lleva cabo, el virus se separa de la célula y se adhiere a otra célula diferente. Como ejemplo de esta última categoría podemos mencionar los ortomixovirus y los paramixovirus, los cuales presentan en su membrana una enzima denominada neuraminidasa (enzima que digiere parte del receptor). Estos virus pueden separarse de sus receptores, rompiendo el ácido neuráminico terminal de la cadena de polisacáridos de su receptor.

Penetración

La penetración es un paso que depende del suministro de energía. Este ocurre casi instantáneamente después de la adherencia e involucra uno de los siguientes mecanismos:

- a. Paso directo del virus completo a través de la membrana plasmática de la célula susceptible.
- b. Endocitosis de la partícula viral, este mecanismo produce una acumulación de viriones al interior de vesículas citoplasmáticas
- c. Fusión de la envoltura del virus con la membrana plasmática de la célula.

Los virus no envueltos penetran principalmente mediante los dos primeros mecanismos. Se conoce, por ejemplo, que en el curso de la adsorción de la partícula del poliovirus a la célula, la cápside se modifica y pierde su integridad estructural a medida que el complejo proteína - RNA es transportado hacia el interior celular. Los virus envueltos, Paramixovirus y Herpesvirus penetran como una consecuencia de la fusión de sus envolturas con la membrana plasmática, mientras que los ortomixovirus se fusionan con la membrana citoplasmática después de que ha ocurrido la endocitosis. La fusión requiere de la interacción entre proteínas de "fusión" presentes en el virus con proteínas específicas de la membrana celular.

Desnudamiento

El desnudamiento es un término aplicado a los eventos que ocurren después de la penetración del virus a la célula susceptible. Estos eventos son necesarios para que el genoma viral y las transcriptasas (en aquellos virus que llevan este tipo de enzimas) queden libres para iniciar el proceso de replicación propiamente dicho. Este paso es sumamente delicado (peligroso) para el virus, pues en el citoplasma celular existen nucleasas que podrían destruir la información genética.

Muchos virus (ortomixovirus, paramixovirus, picornavirus) se desprenden de su envoltura o de la cápside, una vez penetran a la célula infectada. En células infectadas con virus pertenecientes a la familia de los herpes y muy probablemente también con los papovavirus y los adenovirus, la cápside es transportada por el citoesqueleto, desde el sitio de entrada hasta los poros nucleares. En el poro nuclear, una función específica del virus activa varios factores celulares, para que sean estos los que liberen el DNA viral o un complejo DNA-proteínas hacia el núcleo, la cápside, finalmente se desintegra.

En células infectadas con reovirus, solo una porción de la cápside es removida, para permitir la entrada de factores celulares, necesarios para la expresión de los genes virales. El genoma del poxvirus es expuesto en dos fases. En la primera fase, la cubierta más externa es removida por enzimas del hospedero, pero la liberación del DNA viral de la cápside parece requerir de la participación de proteínas virales producidas después de establecerse la infección.

Estrategias de replicación

En el curso de la evolución, los virus han desarrollado estrategias relacionadas con a.) la organización de sus genes, b) la expresión, c) la replicación de sus genomas y d) con el ensamblaje y maduración de las nuevas partículas virales. Antes de considerar con cierto detalle cada uno de los anteriores ítems, vale la pena recordar que la síntesis de proteínas virales por parte de la maquinaria enzimática de la célula hospedera es el evento clave en la replicación viral. Independiente del tamaño, composición y organización de su genoma, el virus debe presentar a la célula hospedera un RNA mensajero que la célula pueda reconocer como tal y traducirla (ver figura 3).

En este aspecto la célula impone tres restricciones a los virus. Primero, la célula sintetiza su propio RNAm en el núcleo por transcripción de su DNA seguido de unos procesamientos adicionales. La célula por lo tanto carece de a) Las enzimas necesarias para sintetizar RNAm a partir de un RNA genómico, ya sea en el núcleo o en el citoplasma y b) Enzimas capaces de transcribir DNA viral en el citoplasma. Las consecuencias de estas restricciones es que solo virus cuyo material genético sea DNA y que alcancen el núcleo pueden tomar ven-

taja de las transcriptasas celulares para sintetizar su propio RNAm. Todos los demás virus han desarrollado sus propias enzimas para generar RNAm.

Segundo, la maquinaria de síntesis de proteínas en eucariotes solo puede traducir mensajes monocistronicos (RNAm que tienen un sitio único de iniciación y terminación de la traducción), estas son incapaces de reconocer sitio internos de iniciación de la traducción en los RNAm. Las consecuencias de esta restricción es que los virus deben producir por separado diferentes RNAm o producir grandes polipeptidos que posteriormente, mediante el concurso de enzimas virales o celulares, puedan dar lugar a proteínas únicas ya sean funcionales o estructurales.

Por último, en la célula infectada, la expresión de los genomas virales compiten con la expresión de la gran cantidad de genes celulares. Para alcanzar cantidades abundantes de sus proteínas, los virus han desarrollado estrategias que le confieren ya sea una ventaja competitiva en la expresión de sus RNAm o una capacidad para inhibir la síntesis o traducción de los RNAm celulares.

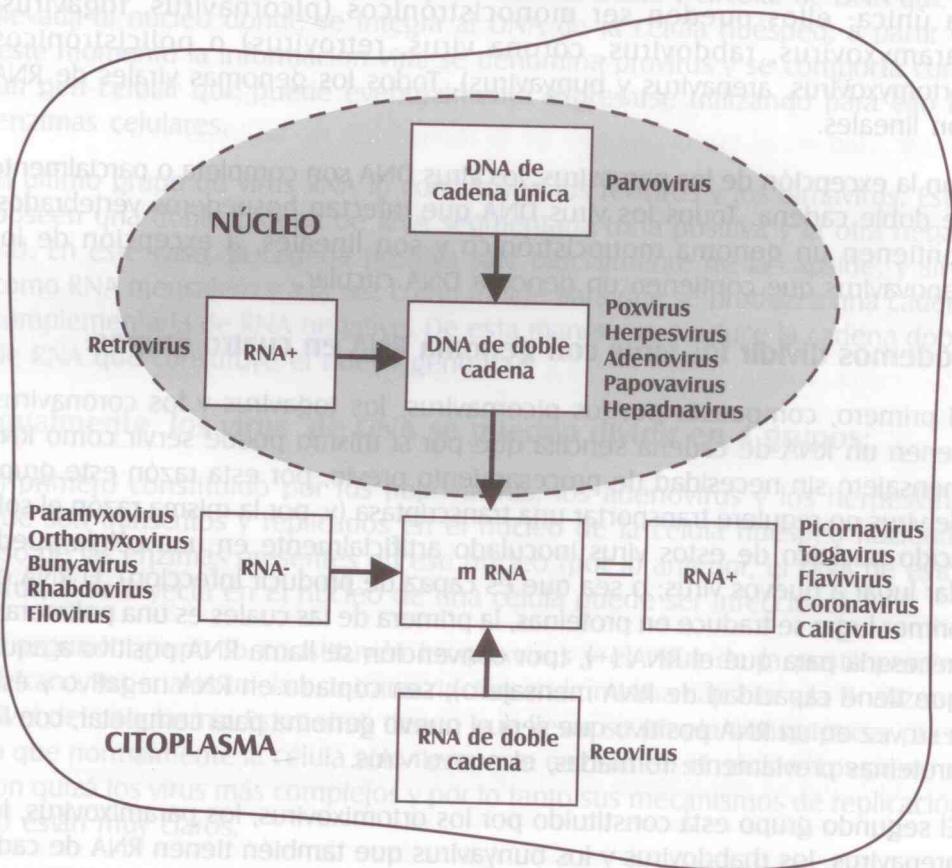


Figura 3. Estrategias utilizados por los diferentes grupos virales, para la producción de RNAm. Adaptado del esquema de D. Baltimore (1971) *Bacteriol. Rev.* 35:235

La replicación, propiamente dicha, tiene por objeto la síntesis de las proteínas necesarias para las nuevas partículas virales y la replicación del nuevo genoma. Este proceso, aparentemente complicado, ha empezado a aclararse en los últimos años, si bien, para el caso de algunos virus no se tiene todavía toda la información.

Los genes virales están codificados en genomas RNA o DNA. Estos genomas pueden ser de cadena única o de cadena doble, además, los virus pueden ser monopartitas, cuando todo el genoma está contenido en una única cápside, o multipartitas cuando el genoma está distribuido en varios segmentos, cada uno en una cápside diferente; en este último caso todas las partículas son necesarias para la infección exitosa. Todos los virus de los animales son monopartitas.

Entre los virus de genoma RNA, únicamente los miembros de la familia de los reovirus contiene un genoma de doble cadena, el cual consta de 10 a 12 segmentos o cromosomas. Los genomas de todos los otros virus RNA son de cadena única; ellos pueden ser monocistrónicos (picornavirus, togavirus, paramyxovirus, rhabdovirus, corona virus, retrovirus) o policistrónicos (ortomyxovirus, arenavirus y bunyavirus). Todos los genomas virales de RNA son lineales.

Con la excepción de los parvovirus, los virus DNA son completa o parcialmente de doble cadena. Todos los virus DNA que infectan hospederos vertebrados, contienen un genoma monocistrónico y son lineales, a excepción de los papovavirus que contienen un genoma DNA circular.

Podemos dividir los virus con genoma RNA en cuatro grupos:

El primero, compuesto por los picornavirus, los togavirus y los coronavirus, tienen un RNA de cadena sencilla que por sí mismo puede servir como RNA mensajero sin necesidad de procesamiento previo, por esta razón este grupo de virus no requiere transportar una transcriptasa (y, por la misma razón el solo ácido nucleico de estos virus inoculado artificialmente en una célula puede dar lugar a nuevos virus; o sea que es capaz de producir infección). El RNA en primer lugar se traduce en proteínas, la primera de las cuales es una polimerasa necesaria para que el RNA (+), (por convención se llama RNA positivo a aquél que tiene capacidad de RNA mensajero), sea copiado en RNA negativo y éste a su vez en un RNA positivo que será el nuevo genoma para completar, con las proteínas previamente formadas, el nuevo virus.

El segundo grupo está constituido por los ortomyxovirus, los paramyxovirus, los arenavirus, los rhabdovirus y los bunyavirus que también tienen RNA de cadena sencilla, pero de polaridad negativa. Estos virus tienen en primer lugar que transcribirse en RNA positivo (o sea RNA mensajero). Puesto que la célula no

tiene la transcriptasa necesaria para que se cumpla esta función, todos los virus de esta categoría tienen que llevar consigo esta enzima a fin de poder sintetizar las proteínas para el nuevo virus. El genoma del virus parental se copia en un RNA positivo y este a su vez en un RNA negativo que servirá de genoma para los nuevos virus (consecuentemente, el ácido nucleico extractado de esta clase de virus no es infeccioso per se).

Un tercer grupo de virus RNA lo constituyen los retrovirus, que se caracterizan por tener un RNA de cadena sencilla de polaridad positiva, pero hacen su replicación mediante transcripción a DNA. Como la célula no tiene una enzima capaz de realizar este proceso, los virus tienen que llevar consigo la famosa transcriptasa reversa (esta enzima encontrada por primera vez en estos virus y no sospechada antes, rompió el dogma de la biología molecular, según el cual la información genética sólo fluía de DNA a RNA y de éste a proteínas). Por acción de la transcriptasa reversa se produce una cadena de DNA complementaria al RNA viral, luego se produce una segunda cadena de DNA complementaria, lo cual da lugar finalmente a una cadena doble y circular de DNA que es llevada al núcleo donde se integra al DNA de la célula huésped; a partir de este momento la información viral se denomina provirus y se comporta como un gen celular que puede eventualmente expresarse utilizando para ello las enzimas celulares.

El último grupo de virus RNA lo constituyen los reovirus y los birnavirus. Estos poseen una doble cadena de RNA segmentada (una positiva y la otra negativa). En este caso, la cadena positiva sale parcialmente de la cápside, y sirve como RNA mensajero y a la vez como molde para que se produzca una cadena complementaria de RNA negativo. De esta manera se produce la cadena doble de RNA que constituye el nuevo genoma.

Igualmente, los virus de DNA se pueden dividir en 4 grupos:

El primero constituido por los papovavirus, los adenovirus y los herpesvirus que son transcritos y replicados en el núcleo de la célula huésped haciendo uso de las enzimas presentes en ese núcleo (por lo anterior, el DNA de estos virus, si se inyecta en el núcleo de una célula puede ser infeccioso).

El segundo grupo lo constituyen los poxvirus y el virus de la peste porcina africana, los cuales inician su transcripción en la misma cápside y la finalizan a nivel del citoplasma. Estos virus tienen que llevar su propia transcriptasa, puesto que normalmente la célula sólo tiene esta enzima en el núcleo. Los poxvirus son quizá los virus más complejos y por lo tanto sus mecanismos de replicación no están muy claros.

En el tercer grupo están los parvovirus, los cuales poseen una cadena sencilla de DNA. En este grupo hay dos variedades, unos que son autónomos y otros

que requieren de la presencia de un adenovirus o de un herpesvirus para poder iniciar su replicación. De la cadena sencilla de DNA, que es de polaridad positiva, se debe producir una cadena complementaria de DNA y a partir de este momento el proceso continúa como si se tratara de un virus de doble cadena de DNA. La replicación de estos virus tiene lugar en el núcleo; hay diferencias importantes en los mecanismos íntimos que utilizan los virus autónomos de los que utilizan los virus defectuosos (aquellos que necesitan de otro para su replicación); pero en esta oportunidad no nos detendremos en más detalles.

El último grupo de virus DNA lo constituyen los Hepadnavirus. Las dos cadenas de DNA que constituyen el genoma del virus son transcritas cada una en RNA que sirven para la traducción en proteínas, en primer lugar y, en segundo lugar, mediante transcriptasa reversa, para dar lugar al DNA para el nuevo virus.

En resumen, la replicación viral implica todo un arsenal de mecanismos genéticos y enzimáticos, dependiendo de la naturaleza del genoma viral. Estos mecanismos son más o menos conocidos, dependiendo también de la complejidad de cada grupo y, por esta razón, todavía quedan soluciones de continuidad en el conocimiento de la replicación de algunos virus.

Ensamblaje y liberación

Finalmente, el ensamblaje y la liberación de los virus son dos pasos que están íntimamente relacionados por lo que serán considerados en conjunto. El proceso tiene lugar en el núcleo, como es el caso de los herpesvirus; en el citoplasma, como ocurre con los picornavirus, los reovirus, los adenovirus, los parvovirus y los poxvirus; o a nivel de membranas celulares como es el caso de todos los virus RNA que tienen envoltura (ortomixovirus, paramixovirus, arenavirus, rhabdovirus, togavirus, retrovirus, Bunyavirus, Flavivirus, Torovirus y coronavirus).

En el caso de los herpesvirus, el ensamblaje de la cápside tiene lugar en la membrana interna de la membrana nuclear y de esta misma membrana mediante gemación, el virus toma la envoltura. Luego los virus son transportados en vesículas hasta el exterior de la célula evitando el contacto con el medio citoplasmático (figura 4).

Los virus que se ensamblan en el citoplasma dependen exclusivamente de la lisis de la célula para ganar su liberación. La lisis o desintegración de la célula ocurre por efecto de la inhibición de la síntesis de macromoléculas inducida por las proteínas virales, por efecto tóxico de ciertas proteínas virales (adenovirus) o por otros mecanismos no bien caracterizados.

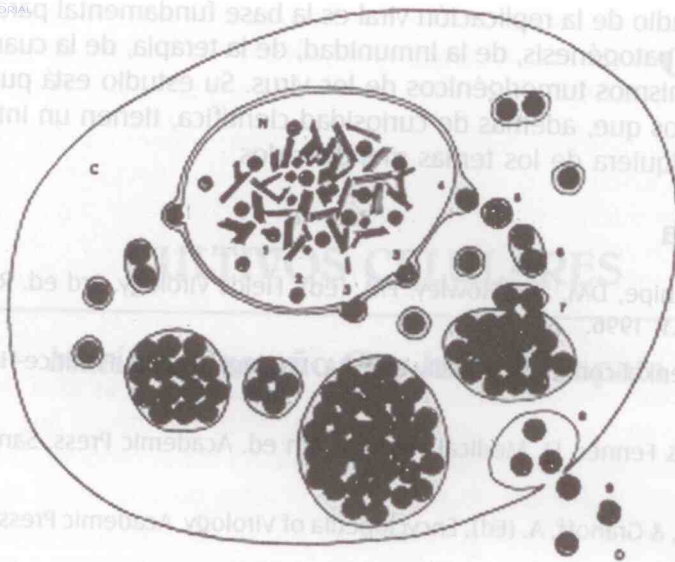


Figura 4. Representación esquemática de los diferentes pasos en la replicación del citomegalovirus (Herpesvirus) del cobayo en una célula de las glándulas salivales. El origen de la secuencia está indicado por numerales. N núcleo, C citoplasma, D ducto salival. Tomado de Fong et al. Arch. Virol. 64,(97-108) 1980.

Los virus que se ensamblan a nivel de membranas celulares, lo hacen introduciendo en primer lugar proteínas virales en la membrana; la nucleocápside se ensambla en la parte adyacente a la membrana modificada. El virus gana su envoltura al gemar de esa membrana, que puede ser la membrana citoplásmica, en cuyo caso el virus logra simultáneamente la liberación, retrovirus, por ejemplo, o puede ser una membrana intracitoplasmática (del aparato de Golgi o del retículo endoplásmico, como es el caso de los coronavirus y los flavivirus); en este caso el virus quedaría dentro de la célula y de allí puede salir por lisis.

La liberación por gemación es un sistema mucho más eficiente que la lisis, pues no implica necesariamente la destrucción de la célula; entre los virus que utilizan este método, los efectos patológicos sobre la célula varían; puede haber lisis como en los togavirus, o no lisis como es el caso de algunos retrovirus.

El proceso de ensamblaje de las proteínas en cápsides obedece a las leyes de la termodinámica en el sentido de que ocurre espontáneamente y se logran estructuras estables. Igualmente debemos tener presente para entender posteriormente los mecanismos de patogénesis viral, que los virus que se ensamblan y se liberan en asociación con membranas celulares, inducen cambios antigénicos en las células al introducir glicoproteínas de origen viral en dicha membrana; a través de estos cambios el sistema inmunológico puede reconocer el estado de infección de la célula y proceder a su destrucción.

Epílogo. El estudio de la replicación viral es la base fundamental para el entendimiento de la patogénesis, de la inmunidad, de la terapia, de la cuantificación y de los mecanismos tumorigénicos de los virus. Su estudio está pues, indicado para aquellos que, además de curiosidad científica, tienen un interés pragmático en cualquiera de los temas mencionados.

Bibliografía

- Fields, BN, Knipe, DM, and Howley, PM. (ed). *Fields Virology*. 3rd ed. Raven Press, New York, N.Y. 1996.
- Levy, JA, Fraenkel-conrat, H. and Owens, RA. *Virology*. 3rd ed. Prentice-Hall. NJ. USA. 1994.
- White, DO, & Fenner, FJ, *Medical Virology*. 4th ed. Academic Press. San Diego, CA. 1994.
- Webster, RG, & Granoff, A. (Ed). *Encyclopedia of Virology*. Academic Press. San Diego, CA. 1994.
- Flint, SJ, Enquist, LW, Krug, RM, Racaniello, VR, Skalka, AM. *Principles of virology*. ASM PRESS. Washington. DC. 2000.