

FRONTERAS EN PATOGÉNESIS Y MANIPULACIÓN GENÉTICA DE LAS INFECCIONES VIRALES

Juan D. Rodas G.

Existen 6 familias con genoma ARN de polaridad negativa: Arenaviridae, Filoviridae, Rhabdoviridae, Paramyxoviridae, Orthomyxoviridae y Bunyaviridae. Dentro de este grupo encontramos algunos de los agentes más importantes para la salud humana y animal (inclusive algunos agentes causantes de enfermedad en plantas). Bastaría mencionar agentes tales como la rabia, descrita desde tiempos inmemoriales; la influenza, que ha producido las mayores epidemias de origen viral conocidas por el hombre, hasta los tiempos del VIH; el sarampión y las paperas que continúan siendo, aún en la actualidad, infecciones comunes de la infancia; y los temibles virus causantes de la fiebres hemorrágicas en Sur América, Africa y Asia: Junin, Machupo, Guanarito, Sabia, Fiebre de lasa, Ebola y Hantavirus.

Estos virus comparten algunas características fenotípicas tales como: poseer envoltura, simetría helicoidal y ARN de cadena sencilla y polaridad negativa. Esta última característica les impone la necesidad de portar la enzima o el complejo enzimático necesario para su replicación ya que la célula carece de la función de transcripción para producir ARN a partir de ARN. Adicionalmente el ARN del virión se encuentra normalmente envuelto en nucleoproteína, que es la unidad requerida para llevar a cabo la replicación viral. De otro lado estos agentes presentan también una amplia gama de particularidades: Las formas fluctúan y los tamaños también varían con la forma: los esféricos como Arena, Bunya y Orthomyxovirus, entre 150 a 250 y en paramyxovirus entre 80 - 120 nm; pero en los alargados como Rhabdo y Filovirus, aunque el diámetro está dentro de los rangos de los anteriores, la longitud puede ser sorprendente, pues varía entre 170 y 800 a 1000 nm, respectivamente (quizás los más grandes entre los virus de los vertebrados).

En cuanto a su estructura genética, los paramyxovirus, rhabdo y filovirus presentan un solo segmento con señales de iniciación y terminación que les permite portar genes que, aunque con funciones independientes, están físicamente

interconectados al estilo de la genética de los eucariotes. De otro lado los arena, bunya y orthomyxovirus poseen 2, 3 y 8 segmentos, respectivamente, cada uno de los cuales codifica regularmente por una o dos proteínas. Los virus de estas tres familias aparentemente comparten un mecanismo bien descrito en orthomyxovirus para "robar" la estructura conocida como "Cap", requerida en el extremo 5' de los ARN mensajeros que sirve para el reconocimiento del ARN mensajero por parte del complejo traduccional. A pesar de las similitudes estructurales, los anteriores agentes han evolucionado para sobrevivir en ambientes distintos y por lo tanto han desarrollado diferencias fundamentales en sus ciclos de vida y en la forma como afectan a sus hospederos.

La presente minirrevisión está basada en estudios recientes que emplean sistemas novedosos para estudiar la patogénesis de algunos de estos virus de genoma ARN de polaridad negativa. Debido a las dificultades asociadas a la sensibilidad de su material genético y la forma particular de replicación, los estudios de los factores genéticos que determinan la virulencia en estos agentes han sido difíciles de abordar. Se describirán algunos de los experimentos clásicos, y otros más recientes, que abordan el estudio de la patogénesis de este selecto grupo de virus a un nivel molecular.

Inicialmente mencionaremos los estudios clásicos de patogénesis en arenavirus que usaron, y continúan usando como modelo, el virus de la coriomeningitis linfocítica (CML). La principales fortalezas de este modelo son su versatilidad, en términos de variedad de cuadros clínicos dependientes de los diferentes esquemas usados para la inoculación, y la facilidad de manipulación que ha permitido aclarar, con mucho detalle, la participación de la respuesta inmune en la patogénesis.

En segundo lugar nos acercaremos a una de las estrategias comunes al estudio de los virus segmentados; la obtención de lo que en inglés se denomina "reassortants" que consiste en la reagrupación experimental y como veremos, también natural de segmentos genéticos de diferentes virus que son coinoculados en cultivos celulares. De esta manera ha sido posible encontrar los segmentos, e incluso aproximarse a los genes, responsables de determinados aspectos patogénicos y, al mismo tiempo, hacer estudios de evolución viral. Para el efecto analizaremos el modelo del virus de la encefalitis de La Cross, el prototipo de la familia Bunyaviridae.

En tercer lugar se describirán algunos de los experimentos llevados a cabo con rhabdovirus, utilizando como modelo el virus de la estomatitis vesicular. En este caso se observará cómo el orden de los factores, en virología, sí altera el producto; es decir, cómo el rearrreglo de los genes en un virus no segmentado, puede conducir a un estado de atenuación.

Finalmente, analizaremos el virus de la influenza (Orthomyxoviridae) y una de las más novedosas aproximaciones a su estudio molecular que utiliza una metodología desarrollada recientemente, en la Universidad de Wisconsin, para producir virus de genoma ARN, de cadena negativa, a partir de ADN complementario (ADNc). Las posibilidades de este sistema son inimaginables y seguramente representan un hito en la historia de la investigación de este grupo de virus.

Arenaviridae

Los Arenavirus son los únicos virus bi-segmentados y bipolares; es decir que sus segmentos denominados S (por "short") y L (por "long"), presentan genes que codifican por diferentes proteínas en direcciones opuestas, separados por una región intergénica. El segmento S codifica por la nucleoproteína (Np) en el extremo 3' y la glicoproteína precursora (Gpc) en el extremo 5'; y el segmento L por la polimerasa (L) en el extremo 3' y por una proteína que se une al Zinc (Z) en el extremo 5'; para esta última proteína, aun no existe una función definida.

Acorde con su estructura los virus de esta familia muestran una particular forma de replicarse dividida en tres etapas: una primera transcripción a partir de los genes del extremo 3' Np y L, a continuación se produce una forma replicativa intermedia que tiene una doble función: servir de molde para la producción del genoma de la progenie y como fuente donde se genera una segunda transcripción de los genes que se encontraban originalmente en el extremo 5' Gpc; esta proteína sufre, posteriormente, un clivaje proteolítico y se subdivide en Gp1 (ligando viral) y Gp2 (que une Gp1 a la envoltura viral) y la proteína Z.

El virus de la CML ha sido clásicamente considerado el prototipo dentro de esta familia y de paso uno de los modelos más estudiados en el campo de la patogénesis viral. Varios conceptos importantes han sido descubiertos empleando este virus en su hospedero natural, el ratón: 1) el estudio de fenómenos inmunológicos tales como la restricción genética para el reconocimiento de las células T orquestada por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), 2) la idea de que además de proteger de las infecciones virales, la respuesta inmune puede afectar el tejido infectado tanto en infecciones agudas como persistentes y 3) la capacidad de algunos virus para producir enfermedades no citopáticas, interfiriendo con funciones especializadas de las células infectadas.

Una de las razones por las cuales el estudio de la inmunobiología del virus de la CML ha llamado la atención de los investigadores, es que el resultado de la infección varía dependiendo de la edad, estado de inmunocompetencia y genética de los animales infectados; así como la ruta de infección, la cepa viral

y la dosis inoculada. Por ejemplo la infección intraperitoneal (i.p.) de ratones adultos normales, con una dosis moderada 100 ó 1000 UFP de casi cualquier cepa, induce una respuesta inmune efectiva que elimina el virus en 10 a 14 días. Se sabe que la respuesta es principalmente mediada por linfocitos T citotóxicos.

El uso de este modelo ha ayudado a dilucidar los requisitos para la inducción de linfocitos citotóxicos, la especificidad del reconocimiento de los linfocitos T citotóxicos, y los mecanismos involucrados en la eliminación del virus. Así mismo este modelo ha permitido determinar cómo la memoria inmune es mantenida después de la infección viral y las estrategias mediante las cuales los virus pueden evadir la respuesta inmune. Sin embargo, si se utiliza la inoculación intracerebral, la respuesta antiviral se torna predominantemente inmunopatogénica y conduce a la muerte del ratón debido a leptomeningitis y coroiditis inflamatoria agudas.

Así pues, los mismos linfocitos T citotóxicos pueden proteger o matar el hospedero, dependiendo exclusivamente de la vía de inoculación. Se acepta que después de la infección intracerebral la respuesta inmune mediada por linfocitos T es protectora sólo cuando un gran número de células T son reclutadas tempranamente, y relativamente pocas células de la meninges están infectadas. Cuando el virus se disemina rápidamente y demasiadas células de las meninges se infectan, las células T inmunes causan una extensa lisis y, por lo tanto, el daño inmunopatológico es letal. Varios experimentos han demostrado que la enfermedad, en estos casos, es mediada por el sistema inmune. En primer lugar, la meningitis es bloqueada si los ratones son timectomizados, irradiados o inmunosuprimidos con drogas tales como ciclofosfamida. Adicionalmente, se ha determinado que si la respuesta inflamatoria aguda mediada por células T, es suprimida mediante la depleción de subclases específicas de células T, la enfermedad se previene pero la eliminación viral es retardada o bloqueada y se presenta una infección persistente.

En el caso de una alta dosis empleada por vía IP, el virus se replica intensamente en el hígado y los linfocitos T citotóxicos destruyen los hepatocitos y consecuentemente se produce una hepatitis. Si, en cambio, la inoculación es en forma intravenosa (i.v.), con una alta dosis del virus, el ratón padecerá una infección persistente asociada a inmunosupresión generalizada. Aparentemente, en este caso, la inmunosupresión que acompaña la infección aguda es debida a que, posterior a la respuesta de linfocitos T citotóxicos específicos contra el virus, se presenta una respuesta de linfocitos T no específicos, que se explicaría por la producción concomitante de citoquinas.

Por último cuando la inoculación, incluso intraperitoneal, del virus de la CML se realiza en ratones recién nacidos, ocurre la delección tímica de linfocitos

citotóxicos específicos contra el virus, lo que los hace incapaces de eliminar la infección, esto explica que los ratones se conviertan en portadores persistentes. En algunos de estos casos de infección persistente, en ciertas combinaciones de cepas de ratones con ciertas cepas virales, pueden producirse trastornos tales como el síndrome de deficiencia de la hormona del crecimiento o enfermedad por complejos inmunes.

De manera similar, las altas dosis i.v. del virus del CML conducen a infección persistente debida a altos títulos virales en los tejidos linfoides y el consecuente agotamiento de los linfocitos T citotóxicos. Una última forma asociada con el establecimiento de la infección persistente es a través del uso de un sistema claramente artificial en el cual se infecta un ratón transgénico que expresa en un alto porcentaje de sus células T un receptor (TCR) específico para el reconocimiento de un reducido número de epítopes del virus de la CML. En este caso el limitado repertorio de los LTC favorece la selección de variantes virales que escapan al reconocimiento inmune y establecen la infección persistente.

La diferencia crucial que conduce a la infección persistente neonatal, más que a la infección transitoria aguda en el ratón adulto, es que el neonato es incapaz de montar una efectiva respuesta antiviral mediada por linfocitos T citotóxicos CD8+. Esta respuesta es necesaria para eliminar la infección. La ausencia persistente de respuesta al virus es debida, en parte, a la presencia continua del virus en el timo, con la consiguiente falla para reconocer el virus como un extraño. El ratón persistentemente infectado porta grandes cantidades de virus en sangre y tejidos, y elimina el agente, a través de la orina, de por vida.

El llamado clon 13 se derivó del bazo de un ratón persistentemente infectado con el virus de la CML, cepa Armstrong, y tiene la capacidad de inducir una infección persistente en el ratón adulto inmunocompetente después de la inoculación i.v. Este virus clonado no induce una respuesta de linfocitos T citotóxicos en el ratón infectado en forma aguda y muestra tropismo por macrófagos, in vivo. El análisis genético molecular del clon 13 ha ayudado a dilucidar la propiedad inmunosupresora asociada a una simple sustitución aminoácídica (glutamina por fenilalanina) en el aminoácido 260 en la glicoproteína Gp1.

A diferencia del virus de la CML, el virus de la fiebre de Lassa, perteneciente a la misma familia se caracteriza por producir una infección aguda sin implicaciones inmunopatogénicas. En este caso la patogenicidad esta directamente asociada con el nivel de replicación viral; lo que permite predecir que, en el hombre, los agentes inmunosupresores no afectarían la infección con el virus de la fiebre de lassa.

Puesto que no existen clones moleculares infecciosos para los arnavirus, no existe la posibilidad de realizar aproximaciones convencionales de genética reversa; y por lo tanto los medios disponibles para estudiar determinantes

genéticas de virulencia son: el análisis de segmentos reasociados, la comparación genética, y los estudios funcionales de genes individuales.

Utilizando la primera opción se han producido, a través de cocultivos, combinaciones de los segmentos, de la cepa virulenta WE, del virus de la CML con la cepa avirulenta Arm del mismo virus, en cobayos se ha logrado establecer que el segmento que determina la virulencia del virus es el L. Utilizando los virus de Lassa y Mopeia se ha logrado un resultado similar. Este último es un virus estrechamente asociado con Lassa pero es apatogénico.

Estudios comparativos con Lassa y Mopeia, in vitro, han indicado que Lassa regula negativamente la producción de IL-8, una conocida citoquina de la respuesta inflamatoria que es mediadora de quimiotaxis de neutrófilos atraídos a los sitios de infección. Se considera que la capacidad de Lassa para regular la producción de IL-8 explicaría, en parte, la ausencia de respuesta inflamatoria en pacientes infectados. Estudios de segmentos génicos combinados de Lassa y Mopeia han permitido determinar que esta característica está asociada al segmento S. Así pues, aunque la capacidad de replicación está directamente relacionada con patogenicidad; y aquella, a su vez, depende del segmento L que codifica por la enzima viral, no se puede desconocer que la capacidad de bloquear el sistema inmune, asociada al segmento S, es también un factor de virulencia importante.

Bunyaviridae

Esta es la familia más grande de virus con genoma de ARN. Está subdividida en 5 géneros, de los cuales 4 son transmitidos por mosquitos (bunya, nairobi, flebo y tospovirus) y el uno por roedores (hantavirus). Vale la pena mencionar que los tospovirus sólo infectan plantas.

Los virus, dentro de esta familia, constan de 3 segmentos denominados L (large), que codifica por la polimerasa viral, M (medium), que codifica por las glicoproteínas Gp1 y Gp2 y, en algunos géneros, una proteína no estructural menor cuya función es aún desconocida; y, finalmente el segmento S (short), que codifica por la nucleoproteína viral y en algunos géneros también por otra proteína no estructural mayor.

El virus de La Cross (VLC) pertenece al género de los bunyavirus y produce una de las encefalitis virales más comunes, que afecta principalmente a la población infantil en la región llamada "midwest" (Medio Oeste) de los Estados Unidos, formada básicamente por los estados de Illinois, Indiana, Ohaio, Michigan, Iowa y Wisconsin. Se sabe que el mosquito que transmite el virus durante el verano, *Aedes triseriatus*, infecta también sus huevos que "hibernan" y de esta manera son una fuente perpetua del virus hasta la primavera. Los hospederos silvestres del VLC son principalmente ardillas y una variedad de roedor propia

de Norteamérica, denominada "chipmunk" (una especie de ardilla rastrera o topo).

El virus de James Town Canyon (VJC), aunque clasificado dentro del mismo género, produce una encefalitis que es más prevalente en adultos. En este caso el virus es transmitido por aedes diferentes al *triseriatus*. El hospedero vertebrado para el VJC es el venado de cola blanca. Como se puede concluir de lo anterior, estos dos virus, LC and JC, aunque comparten la misma zona geográfica presentan ciclos de vida totalmente independientes. Sin embargo, en 1986, un nuevo mosquito ingresó a los Estados Unidos procedente de Asia, de la misma forma que el *Aedes Aegypti* había ingresado años atrás en América: en el agua contenida en llantas transportados en barcos. Con la aparición de este nuevo vector se hizo patente el peligro potencial de la combinación "natural" de estos segmentos génicos, de virus diferentes, infectando el mismo hospedero invertebrado.

Con base en esta hipótesis se realizó un estudio para determinar la real capacidad de generar virus híbridos a través de pseudorecombinación o reasociación genética. Para el efecto se coinfectan cultivos celulares con dos virus segmentados, estrechamente relacionados, y se espera recuperar virus que contengan una combinación de los segmentos de los virus parentales. Los virus "híbridos" heredaran entonces, no sólo componentes genéticos de ambos "padres" sino también, por supuesto, las características fenotípicas asociadas a dichos segmentos. De esta manera, al estudiar y comparar la composición genética y los rasgos fenotípicos de la "descendencia" viral, teniendo como referencia la de los "progenitores", es posible determinar qué segmentos están asociados a determinados rasgos patogénicos.

Volviendo a nuestro modelo, los virus de JC y LC fueron inoculados en monocapas de la línea celular C6/36 procedente de tejido embrionario de *Aedes albopictus* y los diferentes agentes obtenidos de la coinfección, fueron seleccionados mediante clonación utilizando los diferentes tamaños de placas, para luego hacer la purificación y probar el genoma con sondas específicas para cada segmento. De esta manera se logró obtener 4 de las 6 posibles combinaciones de segmentos procedentes de cada uno de los progenitores: L-L-J, L-J-J, J-L-J y J-J-L. En donde las letras indican la procedencia de VLC o del VJC. El orden de los segmentos fue el mismo en todos los casos: L-M-S.

Posteriormente un ensayo similar fue llevado a cabo alimentando *A. albopictus* con sangre de conejo coinfectada con VLC and VJC y en este caso se obtuvieron los 4 virus híbridos antes mencionados más las otras dos combinaciones posibles: L-J-L y J-L-L. Lo que fue más sorprendente fue descubrir que todos los virus híbridos fueron capaces de infectar *A. albopictus* y además de ser transmitidos a ratones.

Luego de la obtención de los diferentes virus "híbridos", se quiso averiguar si la combinación de segmentos les otorgaba un nuevo rango de hospederos potenciales. Con este propósito se infectaron jerbos de Mongolia (*Merionis unguiculatis*), otra especie de roedor, nativa de Norteamérica, que es susceptible solamente a la infección por el VLC pero sobrevive y desarrolla viremias comparables a las que se observan en el chipmunk.

En este caso la detección de la infección es indirecta: se toma una muestra de sangre durante el pico de la viremia y esta se inocular en ratones recién nacidos. La muerte de los ratones es usada como sistema indicador de la infección en jerbos. A partir de este estudio se pudo concluir que el VJC, y los híbridos que contenían el segmento M (que codifica por las glicoproteínas) procedente de el VJC, no produjeron viremia detectable en jerbos; sin embargo, todos los virus híbridos que contenían el segmento M de el VLC, fueron capaces de infectar el animal. De esta forma, es posible observar como la generación de nuevos virus, con características genotípicas de ambos parentales, muestran un rango más amplio de posibles hospederos.

Finalmente se decidió estudiar la neuroinvasividad, tanto de los parentales como de los virus híbridos. Esta característica es particularmente importante puesto que muestra en forma más directa, la capacidad patogénica real de la progenie viral y, al mismo tiempo, ayuda a determinar los genes mayormente involucrados en este rasgo de la enfermedad. Con este fin se utilizaron dos ensayos diferentes, uno *in vitro* y otro *in vivo*. Antes de iniciar esta descripción vale la pena aclarar que se ha demostrado que la neuroinvasividad de estos virus esta directamente asociada con la capacidad del virus para replicarse en el sitio de entrada, a nivel de las células musculares; por este motivo se obtuvo una línea celular, C2C12, con la capacidad de desarrollar el fenotipo de mioblastos mediante la reducción de la concentración del suero fetal de 10 a 2%. Utilizando la prueba de inmunofluorescencia para detectar antígeno viral, se observó que el VLC, y los híbridos que poseían el segmento M de el VLC, infectaron más activamente los cultivos celulares que el VJC, lo que demostró una mayor capacidad de invadir el sistema nervioso central (SNC), asociada a los genes que codifican por las Gps virales.

El segundo ensayo consistió de la inoculación subcutánea de ratones lactantes, con los diferentes parentales y la progenie viral, para determinar la dosis letal (DL50) de cada uno y su posible asociación con alguno de los segmentos. De nuevo las menores DL50 fueron observadas en el VLC y los híbridos que contenían el segmento M proveniente de el VLC, confirmando los hallazgos previos.

Rhabdoviridae

A diferencia de las dos familias de virus anteriores, los rhabdovirus poseen un solo segmento multigénico, es decir que presenta señales de iniciación y ter-

minación para codificar para cada una de las proteínas que lo integran. En esta familia encontramos dos importantes representantes: el virus de la Rabia y el virus de la Estomatitis Vesicular (VEV). Este último ha sido explotado como un excelente modelo para estudios inmunológicos y genéticos. En 1995 se describió la recuperación de virus infeccioso de la estomatitis vesicular exclusivamente a partir de clones de ADN complementario (ADNc). Este nuevo instrumento de manipulación genética marcó un hito en el estudio de la replicación y en patogénesis molecular de los virus que contienen ARN de polaridad negativa.

Para comprender las implicaciones de este descubrimiento, es necesario recordar un poco acerca de la estructura y la forma de replicación de los virus que poseen ARN de cadena positiva o negativa. Para mayor ilustración se recomienda al lector ir a el capítulo correspondiente, sin embargo, mencionemos que el genoma de los virus de polaridad positiva es infeccioso (lo que significa que si el genoma es transfectado en una célula, es posible obtener partículas virales completas). Esto ha facilitado la posibilidad de llevar a cabo estudios acerca de los determinantes antigénicos en estos genomas, produciendo, mutaciones a diferentes niveles en el ADNc del genoma viral y observando luego los resultados a nivel fenotípico (tamaño de placas en cultivo celular, letalidad en modelos animales etc.).

Pues bien, los virus de polaridad negativa no tienen esta capacidad, primero deben ser transcritos a un ARN de polaridad positiva utilizando una enzima que ellos mismos transportan y a partir de esta molécula producir las proteínas que son requeridas para la replicación. Adicionalmente, se ha demostrado que se requiere el complejo formado por el ARN envuelto por la nucleoproteína, para el reconocimiento de la transcriptasa viral. En resumen, genomas de polaridad negativa, desprovistos de nucleoproteína, no son infecciosos; se requería el desarrollo de un sistema en el cual unos transcriptos en forma de ADNc pudieran ser asociados con la proteína de la nucleocápside y la polimerasa viral, como un prerequisite para su manipulación exitosa.

La técnica consiste, básicamente, en la construcción de los cDNAs, para cada uno de los genes que integran el genoma del VEV a través de la transcripción reversa (TR) del ARN genómico viral y la posterior reacción en cadena de la polimerasa (RCP) utilizando iniciadores específicos para la amplificación de los genes individuales. Luego, estos productos son clonados en plásmidos independientes, los cuales son posteriormente digeridos con enzimas de restricción y ligados en el orden deseado. Así se obtiene una versión completa en ADNc del ARN genómico del VEV (Indiana, para este caso) la cual es, a su vez, subclonada en un plásmido que contiene el promotor para la polimerasa viral T7. De esta manera cuando el plásmido es transfectado a células que han sido previamente infectadas con un virus recombinante de vaccinia, que porta el gen de la polimerasa del bacteriófago T7, la célula es capaz de producir

transcriptos del ADNc; es decir, genomas virales (ARNs) de polaridad positiva. Lo único que se requiere ahora es la presencia de las proteínas virales que hacen parte del complejo enzimático: P (fosfoproteína) Np (nucleoproteína) y L (ARN polimerasa dependiente de ARN). Los genes que codifican por estas proteínas son clonados también en el plásmido que contiene la polimerasa T7 y transfectados a la misma célula. El ARN de polaridad positiva (copia del genoma viral) servirá como fuente de ARNm para la producción de las proteínas virales y también como molde sobre el que la polimerasa viral producirá el ARN de polaridad negativa que será envuelto en nucleoproteína y encapsidado para formar nuevos viriones.

Posteriormente la producción viral es caracterizada a través de pruebas de formación de placa en cultivos celulares, donde es fácil distinguir aquellas producidas por el virus de vaccinia (VV) de las producidas por el VEV. Adicionalmente, el uso de AraC en los sobrenadantes de células transfectadas, inhibe la formación de placas por el VV y entonces la confirmación de las placas debidas al VEV se lleva cabo empleando una prueba de neutralización viral con anticuerpos específicos. Como se puede observar esta es una descripción extremadamente simple de un proceso muchísimo más complejo, que no había sido posible antes debido a diversos detalles limitantes en la manipulación molecular.

El logro de esta nueva tecnología permite, ahora, la manipulación genética del genoma completo del VEV. De esta forma las mutaciones introducidas a voluntad en el genoma viral con la consecuente obtención de los virus infecciosos permitirá estudiar el efecto de la ubicación dentro del genoma, sobre la replicación y la transcripción viral y, a la vez, examinar las repercusiones de este fenómeno a nivel del hospedero.

Esta tecnología abre también las puertas para la utilización del VEV como un vector de expresión, con capacidad para portar y expresar genes foráneos. Finalmente, puesto que la recombinación homóloga no ha sido observada en genomas de cadena simple, de polaridad, será posible la obtención de virus atenuados, incapaces de revertir a su patogenicidad original; esto crea un gran potencial de producción de virus vacunales mucho más seguros. Precisamente en relación con este último punto y utilizando la técnica descrita en el laboratorio de la Dra Gail Wertz, en Alabama (Estados Unidos), ya se han construido 10 VEV diferentes, basados en diferentes arreglos de los genes virales.

El genoma silvestre del VEV consta de 5 genes en el siguiente orden 3' N, P, M, G y L 5'; donde P es una fosfoproteína que participa en replicación, M es la proteína de la matriz y G es la glicoproteína viral. Pues bien, se sabe que existe un promotor de transcripción en el extremo 3' de estos virus y que la expresión genética, en términos de transcripción y traducción, está estrechamente rela-

cionada con la proximidad de los genes a dicho promotor. De esta forma la cantidad de Np>P>M>G>L (léase es mayor que) y, aparentemente, la concentración relativa de cada proteína juega un papel determinante en el resultado de la replicación viral. Con el fin de observar el efecto del desplazamiento de la Np (crítica para la el complejo enzimático viral), se construyeron 4 variantes del VEV denominados: NPMGL, PNMGL, PMNGL y PMGN; después de obtener los virus infecciosos a partir de los clones mutados, aquellos fueron probados in vitro (células de riñón de hamster, BHK) e in vivo (ratones) y se pudo determinar que:

- 1) A medida que el gen que codifica por la Np se aleja del promotor viral el virus produce menor número de placas en cultivos celulares, es decir se reduce el título.
- 2) Cuando los virus son inoculados intracerebralmente en ratones (prueba clásica para definir la Dosis Letal 50 con el VEV), muestran una disminución en la patogénesis que se correlaciona de nuevo con el desplazamiento del gen de la Np hacia el extremo 5' del genoma viral.
- 3) A pesar de la baja capacidad replicativa de los virus que han sido mutados en la posición de la nucleoproteína, los ratones inoculados con estas variantes aún producen una respuesta inmune humoral protectora contra el VEV silvestre.

Los anteriores hallazgos hacen pensar en la posibilidad de utilizar estos virus "mutantes" como capas vacunales más estables que las tradicionalmente obtenidas con base en cambios puntuales que podrían revertir en virus de alta capacidad replicativa y, más aún, contando con enzimas que cometen un gran número de errores en el procesamiento como es el caso del VEV.

En un trabajo posterior, se construyeron 6 virus más que poseen todas las posibles variaciones en el orden de los genes P, M y G, y se probaron de nuevo in vitro e in vivo. A partir de estos experimentos se concluyó que estos tres genes pueden ser rearrreglados en todas las posiciones posibles, sin que se elimine la infectividad. Aún es un misterio, entonces, la razón por la cual el orden genético es tan estrictamente conservado si las variaciones en el mismo, a excepción de las hechas en Np y L, no perturban las características fenotípicas del virus, de una manera significativa.

Orthomyxiviridae

El virus de la influenza sigue siendo una de las amenazas latentes en este comienzo de siglo. Su compleja ecología, su amplio rango de hospederos y su alta capacidad de mutación hacen de este agente uno de los virus reemergentes con mayores efectos epidemiológicos en la población humana; conjuntamente con el VIH y el Dengue.

El virus de la Influenza A posee 8 segmentos de ARN de polaridad negativa: PA, PB1 y PB2 que codifican por proteínas que hacen parte de complejo enzimático para la transcripción y Replicación viral. PB2, adicionalmente, actúa como una endonucleasa que cliva el extremo 5' de los ARN mensajeros celulares ("caps") para ser utilizados por el virus. Np codifica por la nucleoproteína que envuelve el genoma viral. M codifica por dos proteínas M1 denominada Matrix, con funciones a nivel del ensamblaje viral y M2 es una proteína integral de membrana con capacidad de actuar como canal iónico activado por pH ácido y cuya función es requerida a nivel de la fusión de membranas, celular y viral, en la entrada del virus a la célula.

NS está dividido en dos genes NS1 que inhibe procesamiento ("splicing") de pre-ARN mensajeros celulares y NS2 que se une a los complejos de ribonucleoproteína viral en el núcleo celular para dirigir su exportación al citoplasma. NA codifica por la Neuraminidasa cuya función es clivar el ácido siálico para favorecer la liberación y separación de los viriones recién formados de la célula hospedera. HA codifica por la hemaglutinina que sirve de ligando para la interacción con el receptor celular durante la absorción, que es el primer paso de la infección viral.

Continuando con los adelantos más recientes en el estudio molecular de la patogénesis viral, es obligatorio mencionar el modelo de generación de un virus de influenza A, a partir de clones de ADNc. Esta investigación surgió el año anterior en la Universidad de Wisconsin, bajo la dirección de uno de los científicos más reconocidos en el estudio de la influenza, el Dr. Yoshihiro Kawoka. Veamos en que consiste esta novedosa tecnología, cuáles son sus ventajas y sus aplicaciones potenciales:

La habilidad de generar virus ARN infecciosos a partir de clones ADNc no es realmente algo nuevo; como se describió en el modelo del VEV, se habían desarrollado estudios clonando genes independientes en plásmidos que contenían el promotor para la polimerasa T7. Sin embargo, la aplicación de este sistema a virus ARN de polaridad negativa y segmentados había sido limitada, por la eficiencia de recuperación, cuando se intentó en virus de 3 segmentos como los Bunya, y nunca había sido lograda con Orthomyxovirus. Tradicionalmente se requería la construcción in vitro de ribonucleoproteínas (adición de proteína Np y genoma viral), que eran transfectadas a células donde la recuperación de dicho genoma era auxiliada con la infección de un virus "ayudador", para finalmente llevar cabo un proceso de selección, dispendioso y complicado. Luego se logró la síntesis in vivo del ARN viral gracias a la clonación de los ADNc del virus de influenza en un nuevo plásmido (pHH1) que contenía el promotor de la ARN polimerasa I humana y el terminador de la polimerasa celular murina I.

La ARN pol I es una enzima celular que transcribe ARN ribosomal, el cual carece de las modificaciones postraduccionales observadas en los ARNm (metilguanosa o "cap" en el extremo 5' y una cola de poli Adeninas en el extremo 3'). De esta manera al transfectar cultivos celulares con estos plásmidos seguidos de la infección con un virus ayudador que codificara por las proteínas virales, era posible obtener virus transfectantes. Aun así era necesario hacer purificación de los virus que contenían los genomas procedentes de los clones de ADNc.

Con la nueva tecnología todos los ADNc correspondientes a cada uno de los ARN genómicos virales son clonados y transfectados a la célula (293T: células transformadas procedentes de riñón humano). De la misma manera, clonando todos los genes que codifican por proteínas virales en vectores de expresión que contienen el promotor de la ARN polimerasa II y transfectando estos vectores a la misma célula, se obtienen todos los elementos necesarios para reconstituir un virión completo, sin la necesidad de virus ayudador, y por lo tanto sin necesidad de selección del producto.

El número total de plásmidos transfectados: 16! constituye un evento sin precedentes en la historia de la biología molecular. La producción viral mejoró con relación al modelo de bunya; el aumento fue de hasta 100.000 veces más virus producidos.

Es aún difícil imaginar la potencialidad de este sistema; ahora cada nucleótido del genoma viral podría ser mutado e incorporado dentro un nuevo virión. Esto permitiría toda clase de estudios acerca del ciclo de vida viral, su regulación, la función de cada una de las proteínas virales y de los mecanismos moleculares de patogénesis.

Para validar este modelo, los autores han llevado a cabo dos ensayos: uno introduciendo una mutación en la proteína NA que les permite confirmar la identidad del virus recuperado a través de una prueba de inmunofluorescencia; y el segundo, introduciendo una mutación en el gen de la proteína PA, lo cual previamente había sido imposible debido a la carencia de un sistema de selección confiable. Finalmente, en marzo de este año, apareció una versión aún más avanzada de esta técnica que utiliza sólo 8 plásmidos con los 8 segmentos genéticos del virus apropiadamente insertados entre secuencias que permitirán no solo su transcripción para la producción de ARNm y genomas virales, sino también, para la traducción de todas las proteínas virales requeridas.

Existen dos utilidades adicionales para este sistema: 1) la capacidad de manipular genéticamente las vacunas del virus de influenza mejorará muy pronto, debido a que ahora los cambios en nucleótidos, que se correlacionan con la atenuación, o los fenotipos sensibles a la temperatura, pueden ser identificados específicamente e incluso introducidos en varias combinaciones para pro-

ducir nuevas vacunas potenciales. 2) La habilidad del virus de influenza para empaquetar segmentos adicionales de ARN permitirá también que el virus sea usado como vector para la introducción de proteínas a las células, con propósitos terapéuticos (terapia génica); sin embargo, la estabilidad de estos virus requiere más investigación.

Finalmente, la producción de viriones a partir de ADNc esta empezando a ser utilizada para la obtención de los otros virus segmentados previamente mencionados: La Cross (Bunyavirus) y CML (Arenavirus). En los años próximos, seguramente, tendremos la oportunidad de aprender mucho más acerca de las interacciones de estos agentes con sus hospederos y ello permitirá una manipulación genética más eficiente, en beneficio del ser humano, directa e indirectamente.

Bibliografía

- Ball A, Pringle C, Flanagan B, Perepelitsa V and Wertz G. Phenotypic consequences of rearranging the P, M and G genes of Vesicular Stomatitis Virus. *J of Virol.* 73(6): 4705-4712. 1999.
- Bridgen A and Elliot R. Rescue of a segmented negative-strand RNA virus entirely from cloned complementary DNAs. *PNAS.* 93: 15400-15404. 1996.
- Cheng LL, Rodas JD, Schultz KT, Christensen BM, Yuill TM, Israel BA. Potential for evolution of the California Serogroup Bunyaviruses by genome reassortment in *Aedes albopictus*. *Am J of Trop Med and Hyg.* 60(3): 430-438. 1999.
- Neumann G, Watanabe T, Ito H, Watanabe S, Goto H, Gao P, Hughes M, Perez D, Donis R, Hoffman E, Hobom G and Kawoka Y. Generation of Influenza A viruses enterily from cloned cDNAs. *PNAS.* 96: 9345-9350. 1999.
- Wertz G, Perepelitsa V and Ball A. Gene rearrangement attenuates expression and lethality of a nonsegmented negative strand RNA virus. *PNAS.* 95: 3501-3506. 1998.
- Whelan S, Ball A, Barr J and Wertz G. Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. *PNAS.* 92: 8388-8392. 1995.