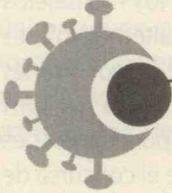


# Estrategias de replicación viral



**Juan D. Rodas G.** MV, M.Sc., PhD. Facultad de Ciencias Agrarias,  
Grupo de Investigación en Ciencias Veterinarias "Centauro",  
U de Antioquia.

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 eventos, vale la pena recordar que la síntesis de proteínas vírales 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 ARNm que la célula pueda reconocer como tal para que se pueda dar la traducción.

En este punto la célula impone tres restricciones a los virus:

Primero, la célula sintetiza su propio ARNm en el núcleo, por transcripción de su ADN, seguido de un procesamiento. La célula, por tanto carece de a) las enzimas necesarias para sintetizar ARNm a partir de un ARN genómico, ya sea en el núcleo o en el citoplasma y b) Enzimas capaces de transcribir ADN viral en el citoplasma. La consecuencia de estas restricciones es que solo los virus cuyo material genético sea ADN, y este alcance el núcleo, pueden tomar ventaja de las transcriptasas celulares para sintetizar el ARNm. Todos los demás virus tendrán que tener sus propias enzimas para generar su propio ARNm.

Segundo, la maquinaria de síntesis de proteínas en eucariotes, solo puede traducir mensajes mono-cistrónicos (aquellos ARNm que

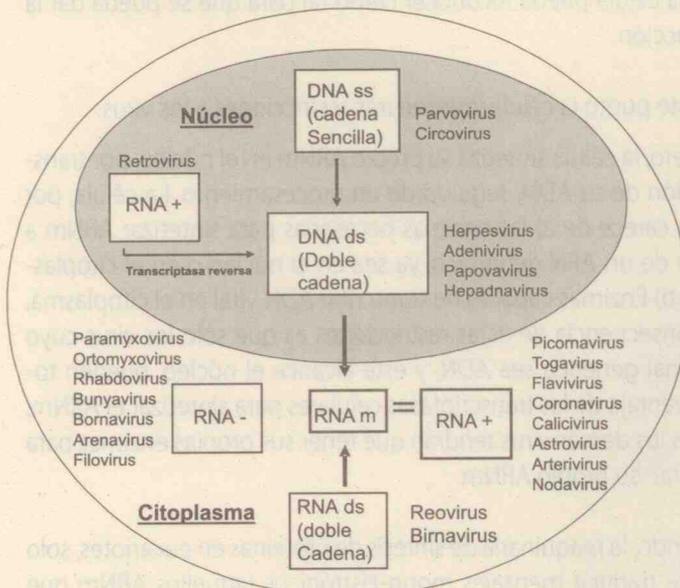


tienen un sitio único de iniciación y terminación de la traducción), en otras palabras, las células eucarióticas son incapaces de reconocer sitios internos de iniciación de la traducción en los ARNm. La consecuencia de esta restricción es que los virus deben utilizar estrategias variadas para explotar su, en ocasiones, escaso material genético disponible y en vez de producir por separado diferentes ARNm, utilizar otras estrategias, tales como disponer de diferentes sitios de terminación para los mensajeros leídos, utilizar procesamiento alternativo de sus ARNm (o "splicing alternativo"), es decir, segmentos del genoma que pueden en ocasiones ser tomados como intrones (pedazos de ARN no traducidos) y en otras como exones (los fragmentos del ARN que realmente se traducen); y finalmente, una opción adicional que pueden usar es la producción de grandes polipéptidos que, posteriormente, mediante el concurso de enzimas virales o celulares (proteasas), puedan dar lugar a proteínas funcionales de menor tamaño.

Tercero, en la célula infectada, la expresión de los genomas virales compite con la expresión de una gran cantidad de genes celulares. Para alcanzar cantidades abundantes de sus proteínas, los virus han desarrollado múltiples estrategias moleculares que les confieren ya sea una ventaja competitiva en la expresión de sus ARNm, o una capacidad para inhibir la síntesis o traducción de los ARNm celulares. Dichos procesos que hacen parte de los mecanismos moleculares de daño celular, están más allá de los alcances de este capítulo.

**Figura 3. Estrategias utilizadas por los diferentes grupos virales para la producción de ARNm**

(Adaptado del esquema de D. Baltimore (1971) *Bacterial. Rev.* 35:235)



La replicación propiamente dicha, tiene por objeto la síntesis de las proteínas necesarias para las nuevas partículas virales y la reproducción del nuevo genoma. Este proceso, aparentemente complicado, ha empezado a aclararse en los últimos años, si bien, para el caso de algunos virus representa aún un gran enigma.

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. Hasta el presente no se han descrito virus multipartitas que afecten a los animales o al hombre.

Entre los virus de genoma ARN, únicamente los reovirus y los birnavirus contienen un genoma de doble cadena; los primeros, constan de 10 a 12 segmentos; los segundos, como su nombre lo indica, contiene dos. Los genomas de todos los otros virus ARN son de cadena única; y pueden ser segmentados (ortomyxovirus, arenavirus y bunyavirus) o no segmentados (picornavirus, togavirus, paramyxovirus, rabdovirus, coronavirus, retrovirus, bornavirus, filovirus).

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

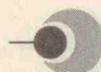
## Replicación de virus ARN

En términos generales, la replicación de la mayoría de los virus ARN ocurre estrictamente en el citoplasma de las células y es independiente de la maquinaria transcripcional nuclear. Son excepciones a lo anterior, los ortomyxovirus, que requieren factores de transcripción de ADN del hospedero; y los retrovirus, que requieren un intermediario de ADN.

La replicación del ARN viral es semi-conservativa y se lleva a cabo mediante un intermediario replicativo (IR). El IR consiste en ARN viral parental y sirve como molde para la transcripción de muchas cadenas de ARN, que se usan como molde para la síntesis de ARN viral.

Para efectos prácticos podemos dividir los virus con genoma ARN en cuatro grupos, de acuerdo a su replicación:

El **primero**, compuesto por los **calicivirus**, los **picornavirus**, los **astrovirus**, los **nodavirus**, los **flavivirus**, los **coronavirus**, los **togavirus**, y los **arterivirus** que poseen **ARN de**



**cadena sencilla y polaridad positiva** [ARN(+)], por lo cual, por sí mismo, puede servir como **ARNm** 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). En este grupo el tamaño del genoma varía desde menos de 5 kb en los nodavirus, hasta 20 - 30 kb en los coronavirus.

El ARN en primer lugar se traduce en proteínas, la primera de las cuales es una polimerasa necesaria para que el ARN(+) sea copiado en ARN(-) y este a su vez en un ARN(+), que será el nuevo genoma que se encapside con las proteínas previamente formadas. De entre este grupo de los ARNm, los picornavirus y los flavivirus, se "comportan" como (aunque no son) genomas policistrónicos. El genoma de estos es normalmente traducido en forma directa como un gran polipéptido, que al mismo tiempo que es traducido es cortado en varias proteínas mediante proteasas codificadas por el mismo virus, o proteasas de la célula hospedera. Los coronavirus, por su parte, tienen un patrón complejo que involucra varias rondas de traducción para completar el ciclo de replicación.

El **segundo** grupo está constituido por los **ortomixovirus**, los **paramixovirus**, los **arenavirus**, los **bunyavirus**, los **filovirus**, los **rhabdovirus** y los **bornavirus**, que también tienen **ARN de cadena sencilla**, pero de **polaridad negativa** [ARN(-)]. Estos virus tienen que transcribirse, en primer lugar, en ARN(+) (o sea ARNm). El tamaño de su genoma varía desde 10 hasta 20 kb. Puesto que la célula no tiene la transcriptasa necesaria para transcribir ARN(-), todos los virus de esta categoría tienen que llevar consigo la información genética que codifica por una ARN-polimerasa dependiente de ARN, responsable de convertir el ARN (-) en ARN (+), a partir de este se sintetizan las proteínas para el nuevo virus. El genoma del virus parental se copia en un ARN (+) que sirve de molde para el ARN (-) de la progenie viral (consecuentemente, el ácido nucleico extractado de esta clase de virus, no es infeccioso "per se"). Dentro de este grupo, los ortomyxo, bunya y arenavirus, poseen 8, 3 y 2 segmentos respectivamente, algunos de los bunya y los arenavirus poseen un genoma ambi-sentido, debido a que parte de sus segmentos se transcriben directamente a un ARNm con ayuda de la polimerasa viral, mientras la otra parte solo se transcribe después de formarse una copia del segmento completo, que sirve como molde para la producción del segundo transcripto y para la producción de segmentos genómicos a encapsidar (**Ver figura 4**). Precisamente para los arenavirus y bunyavirus, la transcriptasa y la nucleoproteína esenciales para la replicación viral están codificadas dentro de la porción que primero se transcribe y que va a mediar, eventualmente, la transcripción de los genes estructurales que son transcritos en la fase tardía de la replicación. En general, los virus con genoma negativo que poseen un solo segmento, exhiben múltiples ORFs (Open Reading Frames o marcos de lectura abierto) para la síntesis de sus proteínas, y representa aún un misterio cómo la polimerasa viral ignora los sitios de terminación de dichos transcriptos parciales y

utiliza este ARN de polaridad positiva también como molde para la producción de los genomas virales de polaridad negativa.

Un **tercer grupo** de virus ARN lo constituyen los **retrovirus**, que se caracterizan por tener un **ARN de cadena sencilla, de polaridad positiva, pero hacen su replicación mediante transcripción a ADN**. Como la célula no tiene una enzima capaz de realizar este proceso (convertir el ARN en ADN), 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 ADN a ARN y de éste a proteínas). Por acción de la transcriptasa reversa se produce una cadena de ADN complementaria al ARN viral, luego se produce una segunda cadena de ADN complementaria, lo cual da lugar finalmente a una cadena doble (ds del Inglés double strand) y circular de ADN que es llevada al núcleo, donde se integra al ADN de la célula hospedera, utilizando la acción de la integrasa, que es una enzima viral. 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 provirus permanece latente hasta que es "disparado" a producción activa de viriones. Es decir, el provirus es transcrito a ARNm por la ARN polimerasa II. Es conveniente mencionar que este virus también posee una enzima con acción proteasa, cuya función es fundamental para el corte de la poli-proteína que da lugar a varios de los péptidos de la estructura viral; esta enzima se ha convertido en uno de los blancos más importantes de la terapia antiretroviral, junto con las drogas dirigidas contra las enzimas transcriptasa reversa e integrasa. El arreglo del genoma viral de estos virus es un ARN de cadena simple diploide lineal, que se mantiene unido por proteínas.

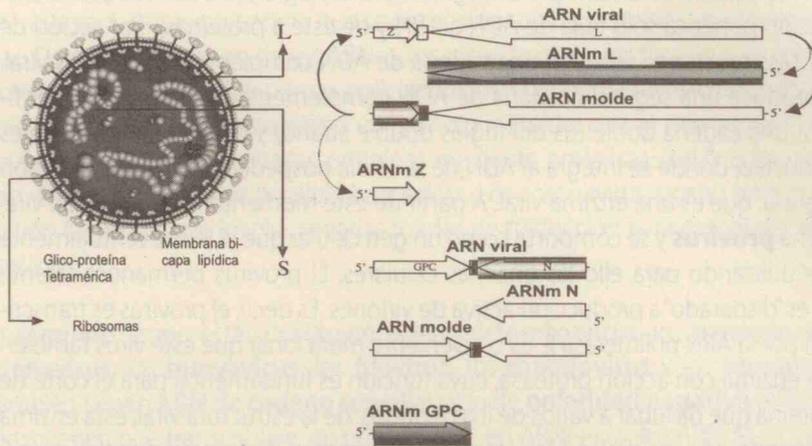
El genoma de los retrovirus posee tres regiones codificantes, que dan origen a tres poliproteínas: **gag** (antígenos de grupo), **pol** (polimerasa) y **env** (envoltura); **cada una de las cuales es clivada por enzimas virales o celulares**. Además codifica por algunas proteínas accesorias y dos proteínas reguladoras de la expresión del genoma viral.

El **último grupo** de virus ARN lo constituyen los **reovirus** y los **birnavirus**. El tamaño del genoma de estos virus va desde 4 kb hasta 20 - 27 kb. Estos virus poseen una **doble cadena de RNA segmentada** (una positiva y la otra negativa), los genomas son lineales, pero pueden ser de dos segmentos (*Birnaviridae*), o múltiples (*Reoviridae*, 10 a 12). La replicación del ARN de doble cadena de los reovirus es conservadora y asimétrica; solo una de las cadenas se replica, a diferencia del ADN de doble cadena. En este caso, la cadena positiva sale parcialmente de la cápside, y sirve como ARNm y, a la vez, como molde para que se produzca una cadena complementaria de ARN (-). De esta manera se produce la doble cadena de ARN que constituye el nuevo genoma.



El proceso de replicación requiere ARN polimerasas dependientes de ARN (replicasas) que son codificadas por el virus. En estos virus, la replicación no involucra la formación de intermediarios RI en el citoplasma de la célula hospedera, así que no hay formación de ARN ds libres. A la fecha, gran parte del resto del mecanismo de replicación de este tipo de genomas sigue siendo solo parcialmente entendido.

**Figura 4. Mecanismo de transcripción y replicación de un modelo de virus con RNA de polaridad negativa (arenavirus) y estrategia de replicación ambi-sentido**



Como se puede observar los primeros transcritos se derivan del segmento 3' - 5' de cada segmento viral (L del segmento L y N del segmento S). A continuación cada segmento produce un RNA intermedio completo, a partir del cual se produce el segundo transcripto (Z del segmento L y GPC del segmento S). Esta forma replicativa intermedia constituye también el molde para la formación de genomas virales de la progenie. Nótese que los viriones de este agente poseen ribosomas celulares que le dan su apariencia "arenosa" al microscopio electrónico. La función de estos ribosomas en el virión aún se desconoce (Tomado de Salvato MS and Rodas. Chapter 49: Arenavirus. In: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial infections, 10 ed, Virology volume, Mahy B and ter Meulen V. 2005).

Es necesario mencionar que todos los virus de animales en los que su ácido nucleico es un ARN de doble cadena lineal y segmentada; cada segmento corresponde a un ARNm monocistrónico.

En los últimos años, el desarrollo de técnicas de ingeniería genética reversa\*, con base en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) unida a la transcriptasa reversa (lo

\* Capacidad de estudiar fenotípicamente los cambios genéticos inducidos de manera artificial, a diferencia del estudio convencional de los cambios genéticos ocurridos en variantes genotípicas virales, generadas espontáneamente en la naturaleza.

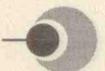
que nos permite producir ADN copia (cDNA) incluso de los ARN de polaridad negativa, que luego son transformados en ADN de doble cadena gracias al PCR) y la inserción de estos ADN copia de los ARN virales dentro de vectores plasmídicos de clonación y expresión, ha permitido el desarrollo de los sistemas llamados "clones infecciosos". Estos clones no son otra cosa que herramientas moleculares que facilitan la manipulación genética de los virus de polaridad negativa, segmentados (orthomyxo, bunya y arenavirus); o no segmentados (rhabdo, paramixo, filo y birnavirus), para determinar las funciones específicas de los diferentes genes virales.

Estos sistemas han permitido no solo el mejor conocimiento del ciclo de replicación viral a nivel molecular, si no que también representan instrumentos más seguros para la expresión de genes foráneos.

Un conocimiento adicional que se ha derivado de la manipulación genética de estos agentes y del estudio de las fases de transcripción y replicación dentro del ciclo de vida de los virus en la célula, es la identificación de mecanismos a través de los cuales los ARN virales (que no poseen estructuras para ser reconocidos como mensajeros), "roban", por ejemplo, estructuras celulares que les permiten ser reconocidos como transcriptos maduros, y de paso frenan la transcripción de los genes celulares. Adicionalmente, en virtud del reconocimiento de que existen proteínas virales que deben volver a entrar al núcleo de la célula hospedera para contribuir al movimiento de genes virales a través de los poros nucleares, ha permitido la descripción de las señales de exportación nuclear (SEN) en dichas proteínas, las cuales posteriormente se han encontrado en proteínas celulares que cumplen una función fisiológica parecida en las células no infectadas. Miembros bien caracterizados de este selecto grupo, son las proteínas Rev del VIH-1 y NS1 del virus de la influenza. Así mismo se ha observado, gracias a la caracterización funcional de la proteína Rev, como molécula que contribuye a la exportación de los complejos ribonucleoprotéicos del núcleo al citoplasma, que la exportación de este tipo de moléculas es un proceso que, si bien aún se conoce poco, aparentemente es concertado con múltiples proteínas celulares que poseen un receptor para movilizar moléculas que contengan SEN, a través del poro nuclear, para ser exportadas desde el núcleo. Algunas SEN se caracterizan por presentar secuencias ricas en leucina.

## Replicación de virus de ADN

En general, los virus ADN se replican dentro del núcleo. Son excepciones los virus de la viruela (poxvirus) y los iridovirus (virus de insectos y de peces y el virus de la peste porcina africana), que tienen transcriptasas codificadas por el virión y esto les permite replicarse en el citoplasma. Aquellos virus de ADN que se multiplican dentro del



núcleo, utilizan la ARN polimerasa dependiente de ADN del hospedero y son regularmente usadas para la transcripción celular. Luego, las proteínas estructurales son transportadas desde el citoplasma hasta el núcleo, donde interactúan unas con otras y con el genoma viral, ensamblando la cápside que rodea al ácido nucleico. La replicación del ADN viral de doble cadena a nivel nuclear, tal y como la del ADN celular, es semi-conservativa y simétrica, con replicación de ambas cadenas.

Las polimerasas del hospedero pueden estar involucradas en la replicación de genomas de tamaño pequeño a moderado (papilomavirus, poliomavirus), mientras que los virus con genomas grandes generalmente codifican para sus propias polimerasas (adenovirus, herpesvirus y poxvirus).

### **Igualmente los virus ADN se pueden dividir en 4 grupos:**

El **primer grupo** está constituido por los **papovavirus (papilomavirus, poliomavirus y agente vacuolante SV-40)**, los **adenovirus y los herpesvirus** que son transcritos y replicados en el núcleo de la célula hospedera haciendo uso de la maquinaria celular (por esto el ADN de estos virus, si se inyecta en el núcleo de una célula, puede ser infeccioso). El tamaño de los genomas de estos virus varía desde 5 - 8 kb en los polyomavirus (*Papovaviridae*) y hasta cerca de 300 kb en los herpesvirus. Se ha demostrado que los genomas circulares pequeños se replican bi-direccionalmente de manera similar a los plásmidos. Se postula que la replicación del ADN de los poliomavirus (cerrado, circular y de doble cadena) se lleva a cabo mediante un "mecanismo de manivela" que incluye endonucleasa y ligasa. La endonucleasa "corta" una cadena, permitiendo que se replique una región pequeña, y luego el corte es reparado por una ligasa.

El **segundo grupo** lo constituyen los **poxvirus** y el virus de la **peste porcina africana (PPA)**, los cuales inician su transcripción en la misma cápside y la finalizan en el 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 su mecanismo de replicación aún no está muy claro. La replicación del virus de la viruela y de algunos iridovirus a nivel del citoplasma, provoca la formación de cuerpos de inclusión que contienen las enzimas de origen viral necesarias, asociadas con la replicación, como las polimerasas de ADN dependientes de ADN viral.

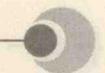
En el **tercer grupo** están los **parvovirus** y los **circovirus**, los cuales poseen una cadena sencilla de ADN. El tamaño del genoma varía de 3 a 6 kb para los primeros y puede llegar a ser hasta de 1.8 Kb para los segundos. El ADNss (single stranded o cadena simple), puede estar en forma de un solo componente lineal (*parvoviridae*), o de un solo componente circular (*circovirus*). La entrada del ADNss al núcleo estimula su "comple-

tación" a la forma replicativa de ADN de doble banda por las enzimas del hospedero. En el caso de los genomas circulares, la forma replicativa se asocia con las histonas del hospedero y otras proteínas nucleares, y de esta manera es "tratado" entonces como un cromosoma celular. La replicación ocurre en el núcleo e involucra la generación de una cadena de ADN de sentido negativo, que sirve como molde o patrón para el genoma de ADN sentido positivo de la progenie viral. Esto involucra la producción de un intermediario de ADNds, conocido como la forma replicativa. La replicación de estos virus tiene lugar en el núcleo y se piensa que el ADN circular de cadena sencilla de los circovirus, se replica mediante el mecanismo de círculo rodante.

En el grupo de los parvovirus, hay dos variantes, unos que son autónomos y otros que requieren de la presencia de un adenovirus o de un herpesvirus para poder iniciar su replicación. Hay diferencias importantes en los mecanismos íntimos que utilizan los virus autónomos en comparación con los virus defectuosos (aquellos que necesitan de otro para su replicación); pero en esta oportunidad no nos detendremos en más detalles.

El **cuarto y último** grupo de virus ADN lo constituyen los **hepadnavirus**. Su genoma está organizado como un ADN parcialmente de doble cadena, circular, cerrado no covalentemente, de 3.2 kb. Después del anclaje, la penetración y la decapsidación parcial del virión, el ADNds parcial entra al núcleo y es completado por la polimerasa viral o por enzimas celulares. Una vez completada, la doble cadena es sellada por la acción de una ligasa del hospedero.

Las dos cadenas de ADN que constituyen el genoma de este virus son transcritas cada una en ARNm que sirven para la traducción en proteínas, en primer lugar, y, en segundo lugar, mediante transcriptasa reversa, para dar lugar al ADN para el nuevo virus. En el núcleo, el ADN viral actúa como un "mini-cromosoma", después de su asociación con histonas del hospedero etc; sin embargo, la ADN polimerasa del hospedero no puede replicarlo. En el ciclo de replicación se produce un ARNm grande intermedio, llamado ARNpg (ARN pre-genómico), que es más largo que el ADN molde a partir del cual se transcribió, debido a la adición de una cola poli A (poli-adenina). Es este ARN intermediario el que sirve como molde para el ADN del nuevo virión. También se producen ARNm más pequeños que abandonan el núcleo y sirven como molde para la traducción, dando origen a la polimerasa viral y proteínas de la cápside; luego se da un ensamblaje parcial de la cápside. Parte del ARNpg es encapsidado en estos viriones inmaduros recientemente ensamblados. Dentro de la cápside se hace una copia de ADNc a partir del ARNpg por la transcriptasa reversa encapsidada (polimerasa viral). Después de la síntesis de la primera cadena complementaria de ADNc, la polimerasa viral degrada el ARNpg molde (acción ARNasa de la polimerasa viral), y empieza a sintetizar la segunda cadena de ADN. Los viriones con genoma de ADN de cadena doble parcial son, entonces, liberados de la célula por gemación.



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.

## Lecturas recomendadas

A Concise Review of Veterinary Virology. D.J. Wise and G.R. Carter. International Veterinary Information Service, Ithaca NY ([www.ivos.org](http://www.ivos.org)). 2005.

Fields, BN, Knipe, DM, and Howley, PM. (ed). Fields Virology. 3rd ed. Raven Press, New York, N.Y. 2003.

Flint, SJ, Enquist, LW, Krug, RM, Racaniello, VR, Skalka, AM. Principles of virology. ASM PRESS. Washington. DC. 2004.

Jorge E. Ossa. Replicación viral. En: Principios de virología. Editor Jorge Ossa. 2ª ed. 1994.

Norman Balcazar M. Replicación viral. En: Principios de virología. Editor Jorge Ossa., 3ra ed. Ed: Fondo Editorial Biogénesis, Medellín. Pp 37-48. 2000.

Principles of Molecular virology. 3rd ed. Alan J. Cann. Academic press. 2000

Salvato MS and Rodas. Chapter 49: Arenavirus. In: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial infections, 10th ed, Virology volume, Mahy B and ter Meulen V (Eds), 2005.

Webster, RG, & Granoff, A. (Ed). Enciclopedia de Virología. Academic Press. San Diego, CA. 1994.

White, DO, & Fenner, FJ, Medical Virology. 4th ed. Academic Press. San Diego, CA. 1997.