

LOS VIRUS COMO HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS, CASO DE ESTUDIO: BACULOVIRUS.

Aguillón Torres, E. A.[±]; Rodríguez Benítez, J. A.[±]; Castillo Guardado, S. G.[±]; Molina Elías, J. A.[±]; Méndez Pineda, L. G.[±]; Martínez Hernández, X. E.[±]; Cárdenas Soriano, O. E.^{*+}, Díaz Crespín, G.^{*§}

[±] Estudiante Cátedra de Biorreactores, Biofertilizantes y Biocontroladores, Universidad Dr. José Matías Delgado, Facultad de Agricultura e Investigación Agrícola.

⁺ *Universidad Dr. José Matías Delgado, Facultad de Agricultura e Investigación Agrícola. ocardenas@ujmd.edu.sv

[§]* Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Escuela de Química. guillermo.diaz@ues.edu.sv

Artículo elaborado en la Cátedra Biorreactores, biofertilizantes y biocontroladores, BBB0, Ingeniería en Agrobiotecnología, Facultad de Agricultura e Investigación Agrícola, Universidad Dr. José Matías Delgado. Fecha: 25 de mayo del 2020.

Resumen

Los virus, desde siempre han tenido mala reputación; sin embargo, estos microorganismos desempeñan un papel importante en los procesos evolutivos que han dado paso a la vida tal y como la conocemos. Los virus pueden ser muy útiles, si son bien aprovechados. El desarrollo de la virología y las aplicaciones en biotecnología hallará cada vez más beneficios para el ser humano y el medio ambiente. El presente documento, hace una breve revisión de las aplicaciones beneficiosas de los virus, como herramientas de la biología molecular y la biotecnología.

INTRODUCCIÓN

Los virus son los parásitos más pequeños, en general miden entre 0,02 y 0,3 μm , aunque recientemente se han descubierto varios virus grandes como el *Megavirus chilensis*¹, de 700 nm de diámetro o el *Pandoravirus*² de 1 micra de tamaño. Se sabe que los virus requieren de las células (bacterianas, vegetales o animales) para reproducirse, por lo que son agentes

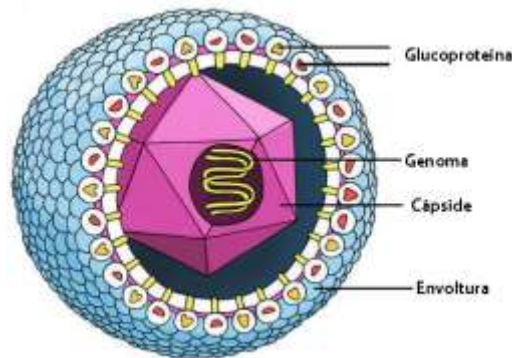
¹ LEGENDRE, Matthieu, et al. Genomics of Megavirus and the elusive fourth domain of Life. *Communicative & integrative biology*, 2012, vol. 5, no 1, p. 102-106.

² YUTIN, Natalya; KOONIN, Eugene V. Pandoraviruses are highly derived phycodnaviruses. *Biology direct*, 2013, vol. 8, no 1, p. 25.

infecciosos. Al introducir su material genético, obligan a la célula huésped a sintetizar los nucleótidos y otras biomoléculas necesarias para formar una nueva copia del virus. El primer virus conocido fue descubierto en 1899, por Martinus Beijerinck³.

Los virus

Estructuralmente, los virus tienen una cubierta externa de proteínas y a veces lípidos, un núcleo de RNA o DNA y, a veces, enzimas necesarias para los primeros pasos de la replicación viral. En función de esto, se pueden clasificar en varios tipos morfológicos diferentes sobre la base de la arquitectura de su cápside (Ver tabla 1).



<https://www.ck12.org/book/ck-12-conceptos-biolog%C3%ADa/section/7.9/>

Figura 1. Diagrama de un citomegalovirus.

La cápside encierra el material genético del virus. La envoltura que rodea la cápside está hecha normalmente de partes de las membranas de la célula huésped, tales como, fosfolípidos y proteínas (Figura 1); no todos los virus poseen una envoltura viral⁴.

Por otro lado, los virus se pueden clasificar a partir de la naturaleza y la estructura de su genoma y de su método de replicación, no de acuerdo con las enfermedades que causan. Por lo tanto, hay virus de DNA y virus de RNA; cada tipo puede tener su material genético en forma de cadenas simples o dobles. Los virus de RNA de cadena simple se dividen en aquellos con RNA de sentido (+) y aquellos de sentido (-).

³ BOS, L. Beijerinck's work on tobacco mosaic virus: historical context and legacy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 1999, vol. 354, no 1383, p. 675-685.

⁴ TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. *Introducción a la microbiología*. Ed. Médica Panamericana, 2007.

Los virus de DNA generalmente se replican en el núcleo de la célula huésped, y los virus de RNA lo suelen hacer en el citoplasma. Sin embargo, ciertos virus de RNA de cadena simple y sentido (+) llamados retrovirus utilizan un método de replicación muy diferente⁴.

Tabla 1. Clasificación de los virus según su arquitectura

Helicoidal.	Con forma de hélice, poseen una cavidad central en donde se aloja el material genético .	Virus de mosaico del tabaco ^{3,5}
Icosaédrica.	Tienen forma casi esferoidal, simétricos, son los más abundantes y los más contagioso en animales.	<i>Adenoviridae</i> ⁶
Complejos.	Pueden ser parcialmente icosaédricos, helicoidales e incluso tener estructuras adicionales. En muchos casos, hasta “colas” que emplea a modo de jeringa para inocular a la célula huésped su material genético.	Bacteriofago T4 ⁷
Envoltura.	Poseen una cubierta de lípidos que obtienen de la misma membrana celular del hospedero. Esa misma capa es utilizada para depositar su material genético dentro de la célula.	MERS-CoV ⁸ , SRAS-CoV ⁹ , CoVID-19 ¹⁰

Coronavirus (CoV)

son una extensa familia de virus, las cuales causan diversas afecciones, entre los síntomas están fiebre y problemas respiratorios (tos y disnea o dificultad para respirar). En casos graves, pueden provocar neumonía, insuficiencia renal, síndrome respiratorio agudo severo e, incluso, hasta la muerte. Los ejemplos más emblemáticos de estas infecciones son el “Síndrome Respiratorio de Oriente Medio” identificado como MERS-CoV y el que ocasiona el “Síndrome Respiratorio Agudo Severo” (SRAS-CoV).

Covid-19

⁵ GOODING, G. V. Tobacco mosaic virus epidemiology and control. En *The plant viruses*. Springer, Boston, MA, 1986. p. 133-152.

⁶ LYNCH, Joseph P.; FISHBEIN, Michael; ECHAVARRIA, Marcela. Adenovirus. En *Seminars in respiratory and critical care medicine*. © Thieme Medical Publishers, 2011. p. 494-511.

⁷ MCGRATH, Stephen, et al. *Bacteriophage: genetics and molecular biology*. Caister Academic Press, 2007.

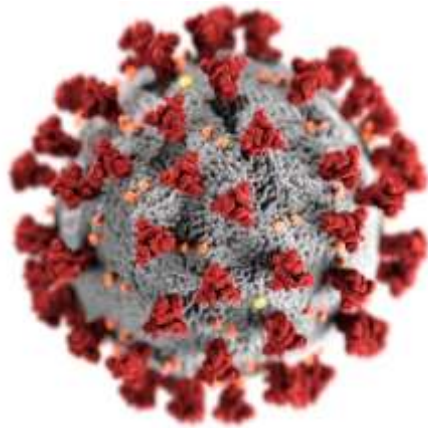
⁸ VALENTÍN, Elver Leguía; MONTERO, José Segundo Niño; FLORENTINI, Mariano Gastón Quino. Coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV). *Revista Médica Carriónica*, 2020, vol. 1, no 1.

⁹ GARCIA APAC, Coralith; MAGUIÑA VARGAS, Ciro; GUTIERREZ RODRIGUEZ, Raul. Síndrome respiratorio agudo severo (SRAS). *Revista Medica Herediana*, 2003, vol. 14, no 2, p. 89-93.

¹⁰ CASEY, Georgina. A pandemic in action. *Kai Tiaki: Nursing New Zealand*, 2020, vol. 26, no 3, p. 17-17.

Es el más reciente coronavirus descubiertos hasta el día de hoy. Es un patógeno perteneciente a la subfamilia Orthocoronavirinae, dentro de la familia Coronaviridae. Su nombre deriva del latín *corōna*, que significa corona, esto debido a la morfología que tienen estos patógenos vistos bajo el microscopio, que evoca a una corona solar. La figura 2, muestra una interpretación artística pero científica, con todos los detalles relevantes de la superficie de este virus, incluye las glicoproteínas de espiga, la hemaglutinina esterasa (HE), las proteínas de la envoltura (E) y proteínas transmembrana (M) y la envoltura¹⁰.

La envoltura viral puede darle a un virus algunas ventajas sobre otros virus que sólo tienen cápside. Por ejemplo, obtienen mejor protección contra el sistema inmune, las enzimas y ciertos químicos del huésped. Las proteínas en la envoltura pueden tener glucoproteínas, las cuales actúan como moléculas receptoras.



<http://envejecimientoenred.es/covid-19-coronavirus-medidas-de-proteccion-para-personas-mas-vulnerables/>

Figura 2. Ilustración microscópica de COVID-19.

Éstas permiten a las células huésped reconocer y unir los viriones, lo que puede dar como resultado una absorción más fácil del virión dentro del hospedero. La mayoría de los virus con envoltura dependen de ella para infectar las células. Sin embargo, debido a que la envoltura contiene lípidos, el virus es más susceptible a ser inactivado por agentes ambientales como los detergentes que alteran lípidos⁴.

Con esos antecedentes, los virus son considerados una enorme amenaza para la vida, sin embargo, no todos los virus son indeseables. Muchos de ellos han resultado ser de gran utilidad e incluso pueden contribuir al estudio del nuevo coronavirus SARS-CoV-2, responsable de la enfermedad denominada como COVID-19, y así ayudar a detener la pandemia. Entre los virus utilizados como herramientas destacan los baculovirus¹¹.

Baculovirus y sus aplicaciones.

La familia *Baculoviridae* es un extenso grupo de virus patógenos con ADN como material genético, con el cual infecta de forma específica a muchas especies de insectos, destacando polillas y mariposas, algunas de las cuales son plagas de ciertos cultivos. Hasta la fecha se han descrito más de 1.000 especies distintas¹².

Considerando sus atributos como insecticidas, su alta persistencia en el medio, y por otro lado, su inocuidad para la fauna y en particular para el humano, así como la facilidad de ser producidos a gran escala, han permitido que los baculovirus, sean reconocidos como uno de los pesticidas más seguros. Es así que, los bioplaguicidas se están utilizando en escalas crecientes y hay un interés considerable en su potencial como alternativas a los convencionales pesticidas.

El mercado de productos biológicos agrícolas se valoró en USD 6,75 mil millones hace tres años y es proyectado para crecer a una tasa compuesta anual de 13.80% hasta llegar a USD 14.65 mil millones para 2023). Por ello, se han convertido en un elemento fundamental para la disminución del uso de insecticidas químicos^{13,14}.

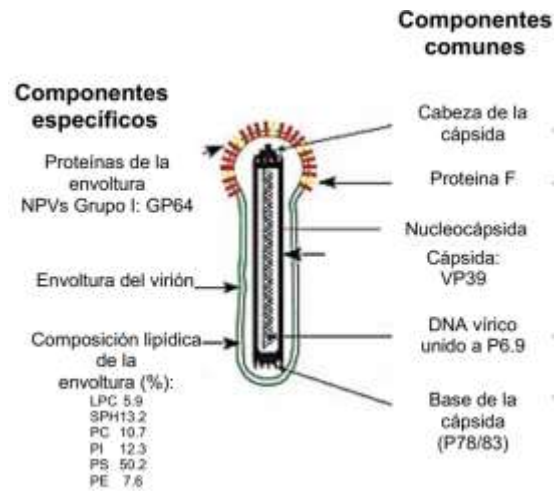
Los baculovirus poseen ADN circular de doble cadena, este se encuentra condensado y empaquetado al interior de una vaina proteica formando la nucleocápsida (figura 3). La nucleocápsida engloba y protege de la temperatura y radiaciones solares al material genético.

¹¹ HERRERO, Salvador. (2020, abril 2). Baculovirus, un aliado en la lucha contra la COVID-19. En: *The Conversation* [en línea]. Disponible en: <https://theconversation.com/baculovirus-un-aliado-en-la-lucha-contra-la-covid-19-135081> [Recuperado 15 de mayo de 2020].

¹² PÉREZ, Rosa Murillo; CABALLERO, P. El potencial de los baculovirus como agentes de control biológico de plagas. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, 2006, no 179, p. 51-63.

¹³ BLACK, Bruce C., et al. Commercialization of baculoviral insecticides. En *The baculoviruses*. Springer, Boston, MA, 1997. p. 341-387.

¹⁴ STÎNGACI, Aurelia. Baculovirus biopesticide in protecting Lepidoptera diversity in the Republic of Moldova. En *Biotehnologii avansate–realizări și perspective*. 2019. p. 128-128.



López Vidal, J. (2015).

Figura 3. Esquema general de un baculovirus.

Los primeros baculovirus recombinantes se desarrollaron a mediados de los años 80, empleándose desde entonces como una herramienta biotecnológica muy versátil. A través de ellos, se logró el desarrollo y crecimiento de los sistemas de expresión de proteínas recombinantes. El sistema permite, modificaciones pos-traduccionales, transporte y ensamblaje de polipéptidos sintetizados en las células de insectos, las que producen proteínas funcionalmente similares a las nativas, conservando así sus características antigénicas o inmunogénicas^{15,16,17}. En la figura 4, se muestra orugas infectadas por un baculovirus, las cuales se les modificó el metabolismo para expresar simultáneamente dos proteínas fluorescentes (roja y verde)^{11,18}.

¹⁵ RAIBENBERG, Fernando. Clonado y expresión de la proteína estructural de cápsida VP6 de Rotavirus Humano A en el sistema baculovirus-células de insecto. 2015.

¹⁶ KOST, Thomas A.; CONDREAY, J. Patrick. Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends in biotechnology*, 2002, vol. 20, no 4, p. 173-180.

¹⁷ KOST, Thomas A.; CONDREAY, J. Patrick; JARVIS, Donald L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature biotechnology*, 2005, vol. 23, no 5, p. 567-575.

¹⁸ SEHGAL, Deepak; GOPINATHAN, Karumathil P. Recombinant Bombyx mori nucleopolyhedrovirus harboring green fluorescent protein. *Biotechniques*, 1998, vol. 25, no 6, p. 997-1006.



https://www.nationalgeographic.com.es/ciencia/baculovirus-aliado-lucha-contra-covid-19_15395

Figura 4. Orugas infectadas por un baculovirus, para expresar simultáneamente dos proteínas fluorescentes.

La necesidad de proteínas recombinantes, por parte de la industria farmacéutica y de la investigación académica, ha crecido en los últimos años. Para satisfacer dicha necesidad, los sistemas eucariotas han sido la opción preferente, entre ellos destaca el baculovirus nucleopoliedrovirus múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV)¹⁹, como el vector de expresión de proteínas recombinantes en células de insecto, BEVS (baculovirus Expresión Vector System)²⁰. Una vez introducidos el gen o los genes en código genético del virus, se procede a la infección del hospedador, las líneas celulares más utilizadas en el sistema BEVS provienen de los lepidópteros *Spodoptera frugiperda* (Sf21 (IPLB-SF21-AE) y *Trichoplusia ni*, (Tn-5)^{21,22}.

Las modificaciones postraduccionales, muy parecidas a las de células de mamíferos, el tiempo de desarrollo de la proteína y el fácil escalado de la producción²³, han despertado la atención de la industria farmacéutica y biotecnológica, pues se puede llevar a cabo la infección en ciertas orugas y acrecentar el rendimiento de la producción de la proteína;

¹⁹ AYRES, Martin D., et al. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 1994, vol. 202, no 2, p. 586-605.

²⁰ HITCHMAN, Richard B.; POSSEE, Robert D.; KING, Linda A. Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect cells. *Recent patents on biotechnology*, 2009, vol. 3, no 1, p. 46-54.

²¹ HASHIMOTO, Yoshi, et al. Erratum to: BTI-Tnao38, a new cell line derived from *Trichoplusia ni*, is permissive for AcMNPV infection and produces high levels of recombinant proteins. *BMC biotechnology*, 2012, vol. 12, no 1, p. 12.

²² LÓPEZ VIDAL, Javier. *Utilización de elementos reguladores en "cis" y "trans" para la mejora de vectores baculovirus*. 2015. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

²³ VICENTE, Tiago, et al. Large-scale production and purification of VLP-based vaccines. *Journal of invertebrate pathology*, 2011, vol. 107, p. S42-S48.

convirtiéndolas así, en pequeñas factorías de bajo coste al generar grandes cantidades de las proteínas objetivo. Esto ha permitido ampliar su aplicación a campos tales como las vacunas^{24,25}. En la literatura se citan diversos ejemplos de medicamentos aprobados por la Agencia Europea del Medicamento (EMA; European Medicines Agency) o por la Agencia Americana de Alimentos y Medicamentos (FDA; Food and Drug Administration), en la tabla 2 se resumen algunos de ellos²².

Por ejemplo, la vacuna contra la influenza, FluBlok® representa un cambio de paradigma en cuanto a la forma de producción, el método clásico de producción es a partir de un huevo de pollo embrionado, al cual se le inocula el virus activo para, posteriormente, recuperar el material genético que se replicó y purificarlo parcialmente.

FluBlok® es producida con tecnología de ADN recombinante, clonando el gen que codifica la hemaglutinina del virus de la influenza y se inserta en un baculovirus (*Autographa californica*) y luego inocula en células de insecto (*Spodoptera frugiperda*), de esta forma se obtiene exclusivamente el antígeno de la proteína hemaglutinina, exenta de trazas de huevo, formaldehído, antibióticos, latex y timerosal²⁶, lo que supone una alternativa para los pacientes alérgicos al huevo.

Otro ejemplo de la aplicación de vacunas recombinantes, es el empleo de baculovirus como nuevo candidato para la producción de una vacuna contra SARS-CoV 2 a partir de virus vivos²⁷. También, el baculovirus recombinante se emplea en la producción de un test basado en la producción de las proteínas de la cubierta del virus SARS-Cov-2, la prueba permite diagnosticar a las personas infectadas. La detección se basa en los anticuerpos desarrollados por el sistema inmune contra las proteínas del SARS-CoV-2.

²⁴ PRABAKARAN, Mookkan, et al. Gastrointestinal delivery of baculovirus displaying influenza virus hemagglutinin protects mice against heterologous H5N1 infection. *Journal of virology*, 2010, vol. 84, no 7, p. 3201-3209.

²⁵ MADHAN, Selvaraj; PRABAKARAN, Mookkan; KWANG, Jimmy. Baculovirus as vaccine vectors. *Current gene therapy*, 2010, vol. 10, no 3, p. 201-213.

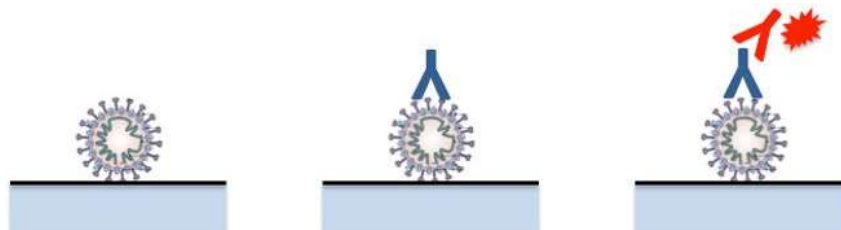
²⁶ ALONSO, José Antonio Navarro. La gripe: 76 años de vacuna antigripal... y de la hemaglutinina!. *Revista Madrileña de Salud Pública*, 2020, vol. 3, no 11, p. 1-8.

²⁷ FENG, Qian, et al. Baculovirus surface display of SARS coronavirus (SARS-CoV) spike protein and immunogenicity of the displayed protein in mice models. *DNA and cell biology*, 2006, vol. 25, no 12, p. 668-673.

Tabla 2. Productos aprobados para uso clínico

NOMBRE	PATOLOGÍA	COMPAÑÍA
Cervarix®	Cáncer cuello útero	GlaxoSmithKline ²⁸
Provenge®	Cáncer de próstata	Dendreon Corporation ²⁹
Virvagen®	Parvovirus canina	Virbac ³⁰
FluBlok®	Influenza humano	Protein Sciences Corporation ³¹

La detección ocurre por la unión de las proteínas que tiene el virus en su superficie con los anticuerpos del paciente, lo que permite el desarrollo de una coloración, en la figura 5 se muestra un esquema del funcionamiento de un test de reconocimiento de anticuerpos frente al virus, este se basa en la formación de un complejo proteínas del virus-anticuerpo humano-anticuerpo de otro animal. Este segundo anticuerpo se encuentra marcado poner de manifiesto la reacción^{11,32}.



<https://www.bbc.com/mundo/noticias-52214479>

Figura 5. Detección de anticuerpos frente al virus.

²⁸ KIRNBAUER, R., et al. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, vol. 89, no 24, p. 12180-12184.

²⁹ SMALL, Eric J., et al. Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. *Journal of Clinical Oncology*, 2000, vol. 18, no 23, p. 3894-3903.

³⁰ DE MARI, Karine, et al. Therapeutic Effects of Recombinant Feline Interferon-co on Feline Leukemia Virus (FeLV)-Infected and FeLV/Feline Immunodeficiency Virus (FIV)-Coinfected Symptomatic Cats. *Journal of veterinary internal medicine*, 2004, vol. 18, no 4, p. 477-482.

³¹ TREANOR, John J., et al. Protective efficacy of a trivalent recombinant hemagglutinin protein vaccine (FluBlok®) against influenza in healthy adults: a randomized, placebo-controlled trial. *Vaccine*, 2011, vol. 29, no 44, p. 7733-7739.

³² LÓPEZ-GOÑI, Ignacio. (2020, abril 8). Coronavirus: los 3 test que juntos nos ayudarán a controlar la pandemia de covid-19. En: *BBC News* [en línea]. Disponible en: <https://www.bbc.com/mundo/noticias-52214479> [Recuperado 15 de mayo de 2020].

Conclusión

Es evidente que la biotecnología y la biología molecular son herramientas importantes contra el coronavirus, las aplicaciones del baculovirus aquí citadas son solo un ejemplo en términos de su gran capacidad de inserción y del elevado potencial recombinante, enfocado en la producción de proteínas o vacunas de interés farmacéutico. Es así que, tanto los virus modificados mediante biología molecular y, por otro lado, los insectos empleados en procesos biotecnológicos como biofactorías podrían ser el siguiente paso en la producción de proteínas terapéuticas a gran escala.

Aclaración: El presente documento tiene un objetivo académico para la cátedra de Biorreactores, Biofertilizantes y Biocontroladores, y se ha basado parcialmente en el artículo “**Baculovirus, un aliado en la lucha contra la COVID-19**”, publicado por Salvador Herrero, Profesor del Departamento de Genética en de la Universidad de Valencia, España; al cual se le ha adicionado información complementaria para fortalecer los conocimientos de los alumnos.