

Leonardo Miguel Gutiérrez Arellano, Francisco Villaseñor Verdín y Edén Ocegüera Contreras

Baculovirus, un patógeno versátil

Se presenta un recorrido a lo largo de la historia de los baculovirus; además de elucidar los pormenores del conocimiento de su taxonomía, de su estructura, de su proceso evolutivo y de su portentoso mecanismo de expresión, detallaremos las posibilidades que ofrecen para la industria agroquímica y farmacéutica, entre las cuales destacan la producción de insecticidas y la de vacunas recombinantes.

Un pasado tejido en seda

Una leyenda china refiere la curiosa serendipia en la que la emperatriz Xi Ling-Shi, durante alguna tarde del siglo XVII antes de nuestra era, inventó la sericultura. Se cuenta que, mientras descansaba bajo la sombra de una de las moreras de su palacio, un gusano cayó sobre su taza de té. Al tratar de retirarlo, notó que de éste nacía una fibra blanquecina. Tejedora hábil, a la emperatriz le atrajo la idea de comenzar a hilar la seda del gusano para crear la tela de sus futuros atuendos.

Respecto de *Bombyx mori*, el lepidóptero holometábolo y volador que después del descubrimiento de la emperatriz fue bautizado como gusano de seda, se han redactado cientos de manuales que describen su cuidado y crianza, así como tratados completos que detallan las enfermedades —ya sean de origen fúngico, bacteriano o vírico— que pueden afectar a esta especie.

Prácticamente desde los tiempos de la emperatriz Xi Ling-Shi se identificó una enfermedad del gusano de seda —conocida como *grasseire*— que lo torna amarillento y de apariencia hinchada. Además de reducir su capacidad de movilidad general, provoca espasmos involuntarios y repetitivos en la región cefálica. El insecto que la padece muere durante las primeras instancias del desarrollo de esta patología, bañado por un líquido de color albo secretado por él mismo.

Muchas fueron las especulaciones de sus posibles causas, pero no fue sino hasta la mitad del siglo XX de nuestra era cuando la identificación de ciertas estructuras proteicas en los tejidos de los gusanos infectados delató al culpable: un virus perteneciente a la familia Baculoviridae, el cual infecta al gusano *B. mori* después de que éste consume hojas contaminadas.



A lo largo del texto, hablaremos del origen y la taxonomía de los baculovirus, aspectos que fungen como una prueba de su relación coevolutiva con los insectos a los cuales infectan. Estos virus son poseedores de un portentoso mecanismo de expresión genética y tienen una posición central en los avances más recientes de la tecnología del **ADN recombinante**, lo cual ofrece grandes posibilidades en la industria agroquímica y farmacéutica.

ADN recombinante
Unión de secuencias de ADN provenientes de dos organismos distintos.

■ Evolución y estructura: un asunto taxonómico

■ Incapaces de echar a andar su maquinaria genética por ellos mismos, los virus precisan de un hospedante (también llamado huésped) para propagarse. Es por lo anterior que, al estudiar sus mecanismos de infección y su existencia en general, no se les puede separar de los organismos en los que residen. La evolución de la mayoría de los virus se entiende, por lo tanto, como una coevolución. El de los baculovirus no es un caso aislado.

ADN bicatenario
ADN de doble cadena, para diferenciarse de los virus de una sola cadena.

En 2011 Thézé y cols. estudiaron el origen paleozoico de los virus de **ADN bicatenario** que infectan a diversas especies de insectos; sus conclusiones son de gran interés para el tema de este artículo. Valiéndose de lo que ellos describieron como un enfoque **filogenómico**, establecieron de manera precisa la relación evolutiva entre tres grupos de virus que afectan a los insectos (también llamados entomopatógenos): los nudivirus, los bracovirus y los baculovirus.

Filogenómico
Se refiere al análisis de datos genómicos y reconstrucciones evolutivas.

Su estudio filogenómico se sustentó en un análisis estadístico por inferencia bayesiana. Una vez compilados los datos, concluyeron que los baculovirus, a pesar de pertenecer a una ramificación independiente de la de los nudivirus y de los bracovirus, poseen un antepasado en común con ellos, por lo que se puede aseverar que estos tres grupos de virus entomopatógenos son monofiléticos, es decir, comparten el mismo origen evolutivo. Asimismo, se propone que originalmente surgieron a la par de los insectos a los cuales infectan, hace 310 millones de años, durante el periodo carbonífero de la era paleozoica. Entonces, los baculovirus existen como tal a partir de que se diversificaron evolutivamente de sus dos primos más cercanos durante la era mesozoica;



Oruga infectada por el baculovirus.

dicha diversificación coincidió con el surgimiento de los insectos holometábolos, como es el caso de *B. mori*, el gusano de seda.

Con el avance de la microscopía en el siglo XX, se supo que *grasseire*, la enfermedad del gusano de seda estaba caracterizada por la presencia celular de prominentes estructuras denominadas cuerpos oclusivos, las cuales tenían forma de poliedro; debido a lo anterior, uno de los nombres alternos para el padecimiento fue poliedrosis.

Gracias a los estudios de Bergold (1947) se demostró la naturaleza vírica de dichas estructuras encontradas en las células analizadas de los insectos enfermos. En 1943 el mismo investigador publicó un

artículo en el que propuso que los cuerpos poliédricos eran acumulaciones cristalinas de un virus. Gracias al uso de la microscopía electrónica y de la técnica de ultracentrifugación, en 1947 pudo demostrar que los **viriones** con forma de varilla eran, en efecto, los agentes infecciosos implicados en el padecimiento de la poliedrosis.

En 1952 se propuso que había dos variantes de poliedrosis. En la primera de ellas, los cuerpos poliédricos se desarrollaban en el núcleo celular (*nuclear polyhedrosis virus*: NPV); en la segunda de ellas, lo hacían en el citoplasma (*cytoplasmic polyhedrosis virus*: CPV). Sin embargo, debido a la forma icosaédrica de su cápside, los CPV fueron identificados como cypovirus, miembros de la familia Reoviridae (Xeros, 1952).

Con anterioridad se había descrito la existencia de una nueva enfermedad en *Pieris brassicae*, conocida como mariposa de la col, la cual es una especie de lepidóptero de la familia Pieridae, en la que se reportó la presencia de cuerpos oclusivos de tamaño pequeño y forma granular, que posteriormente fueron llamados *granulosis virus* (GV); retomando estas aportaciones se formalizaron los dos grupos principales de la familia Baculoviridae: el de los nucleopoliedrovirus (NPV), cuyos cuerpos oclusivos son poliedros, y el de los granulovirus (GV), cuyos cuerpos oclusivos son gránulos.

La última disputa que surgió durante los intentos por clasificar a los baculovirus fue la de su propio nombre. Al menos hasta la mitad del siglo XX existía un **problema de sinonimia** con los términos usados para referirse a ellos. La mayoría de los nombres propuestos para la familia hacían referencia a investigadores que colaboraron en los esfuerzos para compren-

der su naturaleza: Bergoldiavirus, por ejemplo, hacía alusión a Gernot Bergold. Fue poco antes de 1974 cuando Mauro Martignoni propuso el nombre Baculoviridae a partir del latín *baculum*, que significa “bastón”; basó su elección etimológica en la forma que tienen los viriones de los baculovirus.

El nombre asignado para el baculovirus causante de la *grasseire* fue BmNPV. Se le clasificó tomando en cuenta que era un nucleopoliedrovirus (NPV), y se antepusieron las iniciales del género y la especie que afecta (*B. mori*). Así, por ejemplo, PlxYNPV es el nucleopoliedrovirus que infecta a la palomilla dorso de diamante, *Plutella xylostella*. Además, en el nombre se puede especificar si el virus en cuestión posee nucleocápsides compuestas o individuales al agregar una M (de *multiple*) o una S (de *single*), como sucede con el nucleopoliedrovirus múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) y con el nucleopoliedrovirus individual de *Heliocoverpa armigera* (HaSNPV). Así, todos los miembros de la familia Baculoviridae son nombrados siguiendo estos criterios.

Entomopatógenos fascinantes: cómo es la infección

En el ciclo de replicación de los baculovirus existen dos fenotipos expresables: el de los virus de gemación (*budded virus*: BV) y el de los virus derivados de oclusión (*occlusion-derived virus*: ODV). A pesar de que la cápside de ambos es muy similar, difieren en cuanto a su origen,

Viriones

Partícula vírica morfológicamente completa e infecciosa.

Problema de sinonimia

En taxonomía, se refiere a la existencia de más de un nombre científico para un mismo taxón.



morfología, composición molecular en la estructura proteica de la nucleocápside, tejido diana de acción y mecanismo general de infección. Los BV son producidos durante la etapa temprana del proceso de infección, y son los responsables de la propagación intercelular del baculovirus. Los ODV, en cambio, suelen ser producidos en la etapa más tardía del proceso de infección, y son los responsables de la propagación del virus en las larvas de los insectos (Kong y cols., 2018).

El ciclo de vida del baculovirus (véase la Figura 1) comprende las siguientes fases. En la primera, también conocida como fase inmediata, los poliedros ingeridos son solubilizados en el tracto digestivo medio del insecto, donde los ODV son liberados e infectan a las células epiteliales. Los viriones migran al núcleo celular –en este punto carecen de envoltura– y la transcripción y traducción de los genes virales comienza. Durante la etapa temprana, existe un rearrreglo estructural tanto del citoesqueleto como del núcleo, el genoma del hospedante es degradado y la replicación del ADN del baculovirus da inicio. En

la fase tardía, ocurre el ensamblaje de los brotes de nucleocápside a través del insecto mediante una infección secundaria. En la fase muy tardía, comienza la producción de una sustancia llamada poliedrina. Los viriones se acumulan en el núcleo y son ocluidos dentro del poliedro. Los cristales del poliedro se acumulan hasta que la larva se desintegra, con lo cual se liberan más cristales, que serán consumidos por otros insectos (Palomares y cols., 2015).

La poliedrina es soluble solamente en medios con alto pH, característico del tracto digestivo medio de las larvas, y los ODV son protegidos del ambiente por su oclusión dentro de la poliedrina. El segundo tipo de cápside brota a través de la membrana celular durante la fase tardía del ciclo de vida del baculovirus. Solamente los BV son infecciosos en cultivo celular. Cuando el baculovirus es expandido *in vitro*, los ODV no son infecciosos. Además, la protección de la poliedrina no es necesaria debido a que sus sistemas de expresión de proteínas recombinantes están basados en la replicación del gen *polh*. Mediante esta estrategia, grandes cantidades de proteínas recombinan-

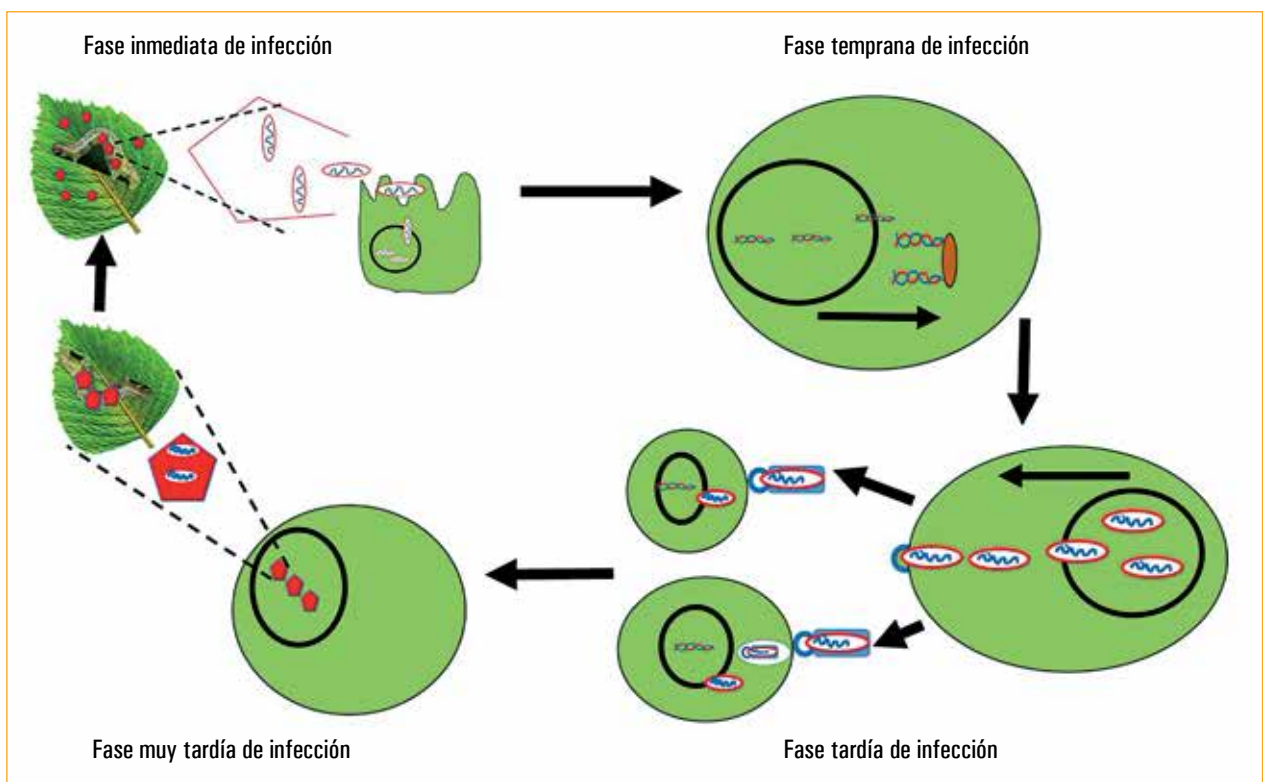


Figura 1. Ciclo de vida de los baculovirus. Modificado de Palomares y cols. (2015).



tes pueden ser obtenidas en una manera rápida, fácil y eficiente.

Baculovirus: del laboratorio a la industria

Los primeros esfuerzos de incorporación de ingeniería genética en baculovirus modificados estaban enfocados con precisión en el desarrollo de insecticidas para proteger cultivos. En 1994 se evaluaron las aptitudes como biopesticidas de dos variables de nucleopoliedrovirus de *A. californica*: la primera era un AcNPV “silvestre” y la otra era una versión modificada, en cuyo genoma se incluía una toxina de escorpión específica para atacar al lepidóptero *Trichoplusia ni*. Con dicho estudio se demostró la eficacia del AcNPV recombinante como pesticida, pues el daño causado por el insecto a los cultivos de col se redujo notablemente (Cory y cols., 1994). No obstante, surgieron ciertas alarmas del ámbito ético que frustraron la realización de investigaciones más profundas. Aunque se han hecho ensayos electrofisiológicos en los que se ha visto que la toxina recombinante solamente inhibe canales iónicos de insectos, mas no de mamíferos, aún falta buscar toxinas con este tipo de funcionalidad celular.

Por otra parte, uno de los hitos de la biología molecular consiste en la comprensión de los mecanismos de expresión del genoma de los virus, lo cual llevó a lograr el uso del ADN recombinante. De la misma manera en la que el equipo de Max Delbrück se valió del uso de bacteriófagos en la serie de experimentos que sentaron las bases de la genética de las bacterias, al inicio de la década de 1970 Paul Berg propuso al papovirus (SV-40) como un medio para estudiar la regulación y la expresión génica en los organismos eucariontes. Su plan era crear una téc-

nica de **transducción** basada en el papovirus, la cual permitiera añadir genes externos a la maquinaria replicacional y transcripcional de las células de mamíferos; el objetivo de lo anterior era diseñar moléculas de ADN infeccioso muy específicas.

De entre las generalidades del ADN recombinante, el componente que hace posible la clonación del gen deseado es conocido como vector. Lo que caracteriza a los vectores es que son autorreplicativos. Los vectores propuestos por Cohen y cols. (1973) eran los plásmidos, que son moléculas de ADN bicatenario y extracromosómico presentes en diversas bacterias, los cuales tienen un papel protagónico en los procesos de **reproducción horizontal**. La conjunción entre el vector y el gen aislado es lo que se llama ADN recombinante. Así, el gen se replica o se expresa dentro de un organismo distinto al que poseía originalmente dicha secuencia.

Además de los plásmidos, existen otros tipos de vectores que se pueden clasificar según su procedencia o su tamaño. Los virus son un tipo de vector muy diverso en cuanto a los organismos que utilizan como hospedantes para la expresión, ya que se puede trabajar con aquellos que infectan bacterias (como los ya mencionados bacteriófagos, a veces simplemente llamados *fagos*), plantas (como los gemnivirus), vertebrados (como el SV-40 con el que trabajó Berg) o invertebrados (los baculovirus son los vectores predilectos en este tipo de huéspedes). Gracias al avance en las técnicas de laboratorio, como la del ADN recombinante, la familia Baculoviridae ha comenzado a ser aprovechada ampliamente con diversos fines.

Por un lado, la creación de proteínas recombinantes ya ha resuelto problemas económicos y de salud pública con anterioridad; por ejemplo, las 10 proteínas recombinantes de mayor venta durante

Transducción

Proceso mediante el cual el ADN es transferido mediante la acción de un virus.

Reproducción horizontal

Mecanismo por el cual un organismo transfiere genes o genomas a células u organismos.

2009 sumaron un total de 50 000 millones de dólares en ventas, lo que representó casi la mitad de las reservas internacionales de México al 15 de septiembre de 2010. Por su parte, el uso de baculovirus como vectores para la expresión de genes tiene una cantidad delirante de usos industriales, entre los que destacan dos: la producción de insecticidas y la de vacunas recombinantes.

El sistema de expresión a base de células de insecto-baculovirus (BEVS, por sus siglas en inglés) consiste en una célula de insecto que es infectada con un baculovirus que contiene un gen de interés. Desarrollado por Gale Smith y Max Summers (Smith y cols., 1992), éste es un sistema altamente versátil que puede ser usado para la producción de una proteína recombinante, o bien para la expresión simultánea de varios genes. Tiene muchas ventajas que lo hacen ser un sistema de elección para su uso en múltiples aplicaciones, por ejemplo:

- Alta expresión del gen de interés: el baculovirus contiene uno de los **promotores** conocidos más fuertes, el promotor de polh.
- Seguridad: los procesos en los que se emplean los BEVS han sido clasificados con el nivel de bioseguridad 1.
- Modificaciones postraduccionales: las células de insecto pueden realizar la mayoría de las modificaciones postraduccionales de las proteínas eucariotas.
- Alta versatilidad: una sola línea celular y un solo esqueleto de baculovirus pueden ser usados para expresar cualquier gen deseado.
- Rápida expresión: la construcción de un baculovirus recombinante es un proceso estandarizado y puede ser eficientemente utilizado para producir una proteína recombinante en una semana con altos títulos de la proteína de interés.

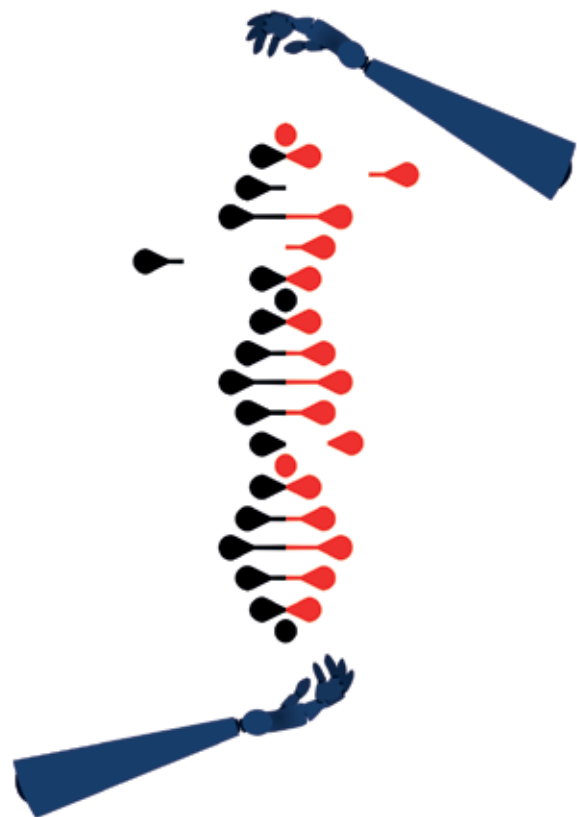
Estas ventajas han hecho que el uso de baculovirus no sólo sea para fines de laboratorio, sino también en la industria farmacéutica. Existen diversas plataformas moleculares que han utilizado BEVS como sistema de expresión de proteínas recombinantes, por mencionar algunas: Bayobac[®] CFS de Bayer, Porcilis[®]

Pesti y PCV de Intervet-Schering-Plough, Cervarix[®] de Glaxo Smith Kline, Provenge[®] de Dendreon, Best-H5[®] de Boehringer Ingelheim Vetmedica, Flublok[®] de Protein Sciences Corporation, y recientemente Novavax ha lanzado una vacuna muy prometedora contra el virus SARS-CoV-2, la cual pretende ser una opción más entre las vacunas que actualmente se encuentran en el mercado.

■ **Sobre el futuro: vectores BacMam**

■ Los BEVS han sido reingenierizados más allá de la expresión de proteínas en células de insecto; hoy día es posible entregar genes blanco a células de mamífero para la producción de proteínas y para posibles terapias génicas. A esta nueva plataforma molecular se le conoce como BacMam, en la cual el baculovirus recombinante contiene dentro del casete de expresión un promotor, ya sea de mamífero o de virus, donde se reemplaza el promotor polh u otros promotores del baculovirus. El BacMam recombinante llega a las células de los mamíferos por transducción

Promotor
Una región de ADN que controla la iniciación de la transcripción de un gen.



y permite la entrada del casete de expresión, pero no la replicación del baculovirus, debido a que los promotores de insecto no son activos en células de mamíferos.

Los BacMam recombinantes pueden ser producidos con cualquier plataforma BEVS, siempre y cuando el vector de transferencia contenga un promotor apropiado; el más frecuentemente utilizado es el promotor fuerte del citomegalovirus (CMV). Existe un ensayo que utilizó la transducción de un BacMam y logró satisfactoriamente la entrega de un gen blanco a todo un riñón porcino (Hitchman y cols., 2017). Esto nos abre las puertas para comenzar a realizar ensayos de terapia génica en humanos, con lo cual se puede acoplar ARN de interferencia (ARNi), contra interferones, para incrementar la transducción de virus y así aumentar la cantidad de proteína recombinante terapéutica deseada (Chavez-Pena y Kamen, 2018).

Leonardo Miguel Gutiérrez Arellano

Ingeniería en Sistemas Biológicos, Centro Universitario de los Valles, Universidad de Guadalajara.
leomigutare@gmail.com

Francisco Villaseñor Verdín

Ingeniería en Sistemas Biológicos, Centro Universitario de los Valles, Universidad de Guadalajara.
fvillasejunior@yahoo.com.mx

Edén Ocegüera Contreras

Laboratorio de Sistemas Biológicos, Centro Universitario de los Valles, Universidad de Guadalajara.
eden.oceguera@academicos.udg.mx

Referencias específicas

- Bergold, G. (1947), "Die Isolierung des Polyeder-Virus und die Natur der Polyeder. Zeitschrift für Naturforsch", *Sect. B J. Chem. Sci.*, 2:122-143. Disponible en: <<https://doi.org/10.1515/znb-1947-3-408>>, consultado el 14 de febrero de 2021.
- Chavez-Pena, C. y A. A. Kamen (2018), "RNA interference technology to improve the baculovirus-insect cell expression system", *Biotechnol. Adv.*, 36(2): 443-451. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.01.008>>, consultado el 14 de febrero de 2021.
- Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, H. W. Boyer y R. B. Hellin (1973), "Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 70:3240-3244. Disponible en: <<https://doi.org/10.1073/pnas.70.11.3240>>, consultado el 14 de febrero de 2021.
- Cory, J. S., M. L. Hirst, T. Williams, R. S. Hails *et al.* (1994), "Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide", *Nature*, 370:138-140.
- Hitchman, E., R. B. Hitchman y L. A. King (2017), "BacMam Delivery of a Protective Gene to Reduce Renal Ischemia-Reperfusion Injury", *Hum. Gene Ther.*, 28:747-756. Disponible en: <<https://doi.org/10.1089/hum.2016.100>>, consultado el 14 de febrero de 2021.
- Kong, M., H. Zuo, F. Zhu, Z. Hu *et al.* (2018), "The interaction between baculoviruses and their insect hosts", *Dev. Comp. Immunol.*, 83:114-123. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.01.019>>, consultado el 14 de febrero de 2021.
- Palomares, L. A., M. Realpe y O. T. Ramírez (2015), "An Overview of Cell Culture Engineering for the Insect Cell-Baculovirus Expression Vector System (BEVS)", en M. Al-Rubeai (ed.), *Animal Cell Culture*, Cham, Springer, pp. 501-519. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-10320-4_15>, consultado el 14 de febrero de 2021.
- Smith, G. E., M. D. Summers y M. J. Fraser (1992), "Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector 1983", *Biotechnology*, 24:434-443.
- Thézé, J., A. Bézier, G. Periquet, J. M. Drezen y E. A. Herniou (2011), "Paleozoic origin of insect large dsDNA viruses", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108: 15931-15935. Disponible en: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1105580108>>, consultado el 14 de febrero de 2021.
- Xeros, N. (1952), "Cytoplasmic polyhedral virus diseases [8]", *Nature*, 170(4338):1073. Disponible en: <<https://doi.org/10.1038/1701073a0>>, consultado el 14 de febrero de 2021.