

Artículos de Revisión

ENCUENTROS ENTRE LA BIOLOGÍA SINTÉTICA Y EL VIRUS DE LA GRIPE

Adolfo García-Sastre

Profesor en el Departamento de Microbiología
Director del Instituto de Salud Global y Patógenos Emergentes
de la Escuela Icahn de Medicina
Hospital Monte Sinaí. Nueva York (EE. UU.)

Resumen

Los virus de la gripe son virus segmentados, de RNA de polaridad negativa. Estos virus causan infecciones respiratorias con distintos niveles de gravedad en humanos, así como infecciones en animales y aves domésticos y salvajes. Los virus de la gripe están sujetos a cambios continuos, lo que les permite tanto reinfectar a sus huéspedes como el adaptarse a nuevos huéspedes, provocando epidemias anuales y ocasionales pandemias en humanos. Con el advenimiento de técnicas de ingeniería genética inversa para la generación de virus de la gripe recombinantes a partir de DNA sintético, se han realizado numerosos avances en la investigación tanto básica como aplicada de estos virus. Este artículo resume tales avances, así como las regulaciones que se han desarrollado para minimizar los posibles riesgos asociados con el uso de la ingeniería inversa.

Abstract

The influenza viruses are segmented negative-strand RNA viruses with the ability to cause respiratory infections with different degrees of severity in humans. In addition, these viruses infect diverse domestic and wild mammals and avian species. Influenza viruses are continuously changing leading to reinfections of the same host as well as adaptations to new host species responsible for annual human epidemics and pandemics. The development of reverse genetics techniques has allowed the generation of recombinant influenza viruses derived from synthetic DNA, promoting numerous advances in basic and applied research on influenza. This article summarizes these advances as well as the regulatory mechanisms that have been put in place to minimize the possible risks associated with the use of reverse genetics.

Manipulación del genoma del virus de la gripe

El desarrollo de las técnicas de biología molecular en la década de los 70 hizo posible el generar virus a partir de clones infecciosos basados en la expresión del genoma vírico (DNA o RNA) a partir de plásmidos en células transfectadas permisivas para la replicación del virus en cuestión. Esto permitió la introducción de mutaciones en el genoma de un virus para estudiar la influencia de estas

mutaciones en su replicación y capacidad de causar enfermedad. Entonces fue posible el establecimiento de clones infecciosos sintéticos para una gran parte de los virus de DNA y de RNA de polaridad positiva que, una vez transfectados en células susceptibles, dan lugar al virus correspondiente con un genoma derivado del clon infeccioso de DNA. Sin embargo, el rescate de virus de RNA

de polaridad negativa a partir de plásmidos de DNA llevó más tiempo, debido a que la expresión del genoma vírico no da lugar a su replicación, ya que dicho genoma vírico no funciona como mRNA para la síntesis de proteínas víricas las cuales se necesitan, junto con el genoma, para generar virus infecciosos. El rescate de virus de RNA de polaridad negativa a partir de plásmidos de DNA ha requerido la expresión, en células transfectadas, tanto de RNA genómico como de mRNA y, por tanto, de proteínas víricas que, una vez sintetizadas, dan lugar a la amplificación del genoma y la generación de virus infecciosos. En el caso del virus de la gripe, un virus con ocho segmentos de RNA de polaridad negativa, se ha requerido expresar los ocho RNA genómicos y las cuatro proteínas víricas necesarias para la síntesis de mRNA vírico y de más RNA genómico, las proteínas PB1, PB2, PA y NP^[1,2]. Estas técnicas de ingeniería inversa han permitido la generación de virus de la gripe recombinantes cuyos genomas se corresponden con las secuencias codificadas en los plásmidos de rescate, lo cual ha dado lugar a avances rápidos en los estudios tanto básicos como con aplicaciones clínicas sobre el virus de la gripe [Figura 1].

Estas técnicas de ingeniería inversa han permitido la generación de virus de la gripe recombinantes cuyos genomas se corresponden con las secuencias codificadas en los plásmidos de rescate

teínas víricas y de regiones específicas en el RNA del virus en su ciclo biológico y en su virulencia. Cabe destacar, entre otros estudios, el descubrimiento de la función de la proteína vírica NS1 gracias a la caracterización de virus recombinantes en los que la región codificante para esta proteína fue eliminada. En concreto, se pudo observar que un virus de la gripe recombinante sin NS1 (delNS1) es capaz de replicarse prácticamente sin problemas en huéspedes incapaces de montar una respuesta antiviral de interferón^[3]. Por el contrario, el

virus delNS1 apenas se replica en células y organismos con una respuesta intacta de interferón. Ello es debido a que, en presencia de NS1, el sistema del interferón es suprimido a niveles tanto de inducción transcripcional como postranscripcional^[4].

La ingeniería inversa ha permitido también el mapear las regiones en el RNA vírico requeridas para su replicación y empaquetamiento en las partículas víricas. El papel que desempeñan los distintos dominios de las proteínas víricas en entrada del virus, replicación de su RNA, salida del virus, propagación y capacidad de inducir enfermedad en modelos de animales, ha sido y está siendo investigado exhaustivamente mediante la introducción de mutaciones específicas en el genoma del virus, y la caracterización fenotípica de los virus recombinantes correspondientes. Gracias a ello se han podido elucidar gran parte de los procesos celulares implicados en interacciones célula huésped-virus relacionados con la entrada, replicación del genoma, expresión de proteínas, evasión de la respuesta inmune, ensamblaje y salida del virus de la gripe en células infectadas.

Estudios de función de los dominios del RNA y las proteínas víricas

Desde sus inicios, la ingeniería inversa del virus de la gripe se ha utilizado para investigar la función de las pro-

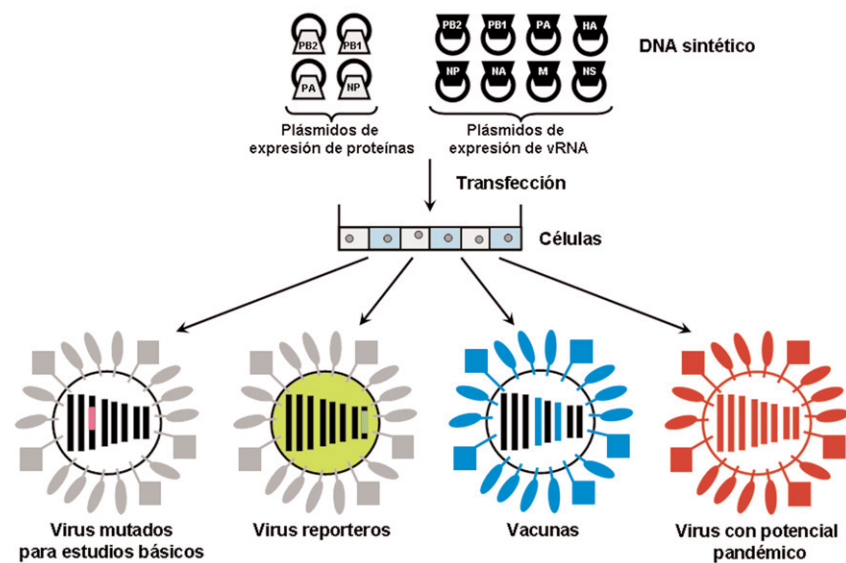


Figura 1: Aplicaciones de la biología sintética en el rescate de virus de la gripe. La transfección de plásmidos de DNA sintético en células permisivas da lugar a la generación de virus de la gripe recombinantes con distintas aplicaciones posibles (Figura elaborada por el autor).

Virus reporteros

Otra de las grandes aplicaciones de la ingeniería inversa del virus de la gripe desde un punto de vista tanto de investigación básica como de desarrollo de antivirales, ha sido el diseño y generación de virus de la gripe que expresan proteínas reporteras de fácil cuantificación o visualización, como GFP, RFP o la luciferasa. Manicassamy *et al.* fueron los primeros que usaron un virus de la gripe recombinante que expresa GFP para visualizar las células infectadas *in vivo* a distintos tiempos después de la administración respiratoria del virus en un modelo de

ratón^[5]. Se han usado virus de la gripe recombinantes que expresan luciferasa, también en hurones, un modelo animal que semeja en gran medida la infección del virus de la gripe en humanos, para determinar la dinámica de propagación y transmisión de la infección a un nivel anatómico con una resolución celular, ya que las células infectadas quedan marcadas para su detección luminosa al expresar la luciferasa^[6].

El uso de virus reporteros de la gripe ha facilitado el desarrollo de ensayos de cribado de alto rendimiento, tanto para la detección de inhibidores de la replicación del virus en sistemas de cultivo de tejido celulares usando librerías de compuestos químicos^[7], como de genes celulares que codifican proteínas que facilitan o dificultan la replicación vírica^[8]. En estos ensayos, la inhibición de un factor de restricción del virus aumenta la señal del gen reportero al facilitar la replicación del virus, mientras que la inhibición de un factor celular requerido para la replicación vírica disminuye la señal del gen reportero. Se prevé que esta información facilite el desarrollo de nuevos antivirales basados en la inhibición de factores requeridos para la replicación vírica o en la activación de factores que la inhiben, siempre y cuando esto no cause efectos secundarios adversos.

Vacunas y vectores

Quizá el mayor impacto de las técnicas de ingeniería inversa que usan DNA sintético para el rescate de virus recombinantes desde el punto de vista de salud pública ha sido su aplicación para el desarrollo de vacunas contra la gripe. El virus de la gripe se caracteriza por su capacidad evolutiva para evadir inmunidad preexistente, lo que le permite reinfectar al mismo hospedador varias veces durante su existencia. Aún más problemáticos son los casos de pandemias de gripe que ocurren entre diez a cincuenta años y que se caracterizan porque el virus que nos afecta cambia antigénicamente de un modo drástico debido a la adquisición de proteínas víricas provenientes de cepas del virus de huéspedes animales (cerdos o aves). Debido a ello, las vacunas de gripe –que están basadas en cepas del virus inactivadas o atenuadas– deben de cambiar cada año su composición para corresponderse antigénicamente con las cepas circulantes; esto dificulta su elaboración a tiempo antes de que empiecen los casos de gripe cada año. La generación de las cepas vacunales a

▶▶ Otra de las grandes aplicaciones de la ingeniería inversa del virus de la gripe, ha sido el diseño y generación de virus capaces de expresar proteínas reporteras de fácil cuantificación o visualización

partir de DNA sintético ha agilizado y reducido el tiempo necesario para la elaboración de vacunas de gripe^[9]. En el caso de vacunas para virus de la gripe de alta virulencia, es posible, usando virus vacunales derivados de DNA, el eliminar de estas cepas los determinantes genéticos de alta virulencia, haciendo posible su crecimiento sin peligro de infección grave en el personal de producción de las empresas productoras de vacunas. Actualmente existen distintas líneas de investigación dedicadas a la mejora de vacunas del virus de la gripe,

con una mayor capacidad de protección contra cepas diversas de la gripe que las vacunas que ahora existen, con lo cual el prospecto de una vacuna “universal” contra el virus de la gripe que proteja contra todas las cepas posibles y que elimine la necesidad de vacunación anual puede que se haga realidad en un futuro no muy lejano gracias a las técnicas de ingeniería inversa^[10].

Del mismo modo que la ingeniería inversa ha permitido el generar virus de la gripe recombinantes expresando genes reporteros, es ahora posible, gracias a estas técnicas, el producir virus de la gripe recombinantes que expresan antígenos adicionales provenientes de otros patógenos, como los que ocasionan la malaria, la tuberculosis o el sida, o de células tumorales. Aunque todavía no se han probado clínicamente ninguno de estos virus recombinantes, ensayos preclínicos en modelos de animales han dado buenos resultados como posibles cepas vacunales contra las enfermedades correspondientes al antígeno que expresan^[11].

Generación de virus con posible capacidad pandémica: riesgos y estrategias de mitigación

Del mismo modo que el uso de la biología sintética ahora permite la generación de virus de la gripe con aplicaciones terapéuticas y vacunales, también estas técnicas han hecho posible la generación de virus de la gripe con propiedades pandémicas. Uno de estos casos fue la reconstrucción del virus de la gripe que causó la pandemia de 1918. Esta pandemia de gripe, mal llamada “gripe española” ya que no se originó en España, causó aproximadamente 40 millones de muertes en el mundo, y es considerada uno de los episodios infecciosos más devastadores en la historia de la humanidad. Sin embargo, la cepa de virus que la causó

▶▶ El virus de la gripe se caracteriza por su capacidad evolutiva para evadir inmunidad preexistente, lo que le permite reinfectar al mismo hospedador varias veces durante su existencia

no fue aislada en su época, ya que por aquel entonces se desconocía que el agente causante de la gripe fuera un virus, y no se disponía de técnicas adecuadas de aislamiento del virus de la gripe. De este modo la cepa de virus de la gripe que causó la pandemia de 1918 se extinguió, siendo sustituida en la naturaleza por cepas menos virulentas que siguieron infectando a humanos. Desde que se descubrió el virus de la gripe en los años 30, se ha especulado mucho sobre qué fue lo que hizo ser tan letal a la pandemia de 1918, sin que eso fuera posible de resolver del todo, debido a la falta del virus causante. Hasta el advenimiento de las técnicas de ingeniería inversa que permiten rescatar virus de la gripe recombinantes a partir de DNA sintético. Aunque no se conoce existencia de ninguna muestra de tejidos humanos de 1918 que contenga virus vivos de la gripe, en la actualidad ha sido posible encontrar muestras de pulmón de pacientes que fallecieron de gripe en el 1918 en las cuales aún se pudo amplificar y secuenciar el genoma del virus, a pesar de hallarse bastante fragmentado y deteriorado. Estas muestras de pulmón se encontraron en archivos forenses de las fuerzas armadas del ejército de los Estados Unidos, gracias un programa establecido por el presidente Lincoln por el cual se habían preservado en parafina muestras de tejidos de soldados fallecidos por causas desconocidas, para su investigación por generaciones futuras. A partir de este tejido se pudo obtener una secuencia parcial del virus de la gripe de 1918. Sin embargo, no fue posible lograr una secuenciación completa hasta el hallazgo de otra muestra correspondiente a tejidos pulmonares del cadáver de una mujer fallecida en 1918 debido a la gripe en un pueblo de Alaska; allí fue enterrada por debajo de la línea de congelación del suelo, por lo que se pudo obtener todavía algo de tejido pulmonar casi 100 años más tarde. La secuenciación completa del virus de la gripe de 1918 fue publicada en el 2005^[12], y eso hizo posible la síntesis del genoma completo de esta cepa como DNA, y el uso de ingeniería inversa para recrear esta cepa, hasta entonces extinta, en un laboratorio de alta contención del CDC de los Estados Unidos por un equipo de investigación que estuvo dirigido por mí^[13]. Antes de regenerar el virus de 1918, nos planteamos seriamente tanto los riesgos como los beneficios de este experimento. Los riesgos consisten en la posibilidad de escape del virus del laboratorio de contención, ya sea por un

▶▶ Esta pandemia de gripe, mal llamada “gripe española” ya que no se originó en España, causó aproximadamente 40 millones de muertes en el mundo

▶▶ El caso de la reconstrucción del virus de la gripe de 1918, inició un debate global sobre lo que ahora se denomina *investigaciones de doble uso* y *experimentos de riesgo de ganancia de función*

accidente o de un modo deliberado como acto terrorista, es decir, hurto de la cepa o regeneración de la misma cepa usando los mismos métodos, lo cual es posible una vez hecha pública la secuencia. Aunque estos escenarios son improbables, no son imposibles. Las consecuencias asociadas con este riesgo serían, por fortuna, menos devastadoras que en 1918, ya que existe una gran cantidad de gente con anticuerpos

que neutralizan el virus de 1918 debido a los virus circulantes actuales que son antigénicamente similares al de 1918, y también a que contamos con medicamentos y vacunas para contrarrestar al virus. Pero eso no hace el riesgo completamente nulo. Los beneficios consisten en la posibilidad de averiguar qué es lo que hizo al virus de 1918 tan virulento, y qué medidas se pueden tomar para reconocer rápidamente un virus como el de 1918 que pueda emerger durante la evolución natural del virus de la gripe, y para frenarlos con medicamentos o vacunas. Al final, reconstruimos el virus de la gripe de 1918, lo cual nos permitió, usando modelos animales, descubrir y mapear sus marcadores de virulencia, y comprobar que el virus se puede tratar y prevenir usando antivirales y vacunas^[14,15]. Pudimos, por ejemplo, concluir que, cuando el virus pandémico del 2009 –muy parecido al virus de 1918– emergió, este virus no tenía los mismos marcadores de virulencia del virus de 1918.

El caso de la reconstrucción del virus de la gripe de 1918, así como otros casos de uso de técnicas de biología sintética para generar patógenos, inició un debate global sobre lo que ahora se denomina *investigaciones de doble uso* (para el beneficio o el perjuicio de la humanidad) y *experimentos de riesgo de ganancia de función*. En el caso del rescate del virus de 1918, los experimentos, antes de su publicación, fueron evaluados por un comité independiente de expertos en patógenos, enfermedades infecciosas, bioterrorismo y ética científica, establecido en los Estados Unidos a raíz de los ataques por correo con cartas conteniendo esporas de ántrax; dicho informe concluyó por unanimidad que los beneficios asociados con su publicación son superiores a los riesgos. Experimentos posteriores con virus de la gripe aviar de alta patogenicidad, realizados en dos laboratorios independientes y que describen mutaciones generadas en condiciones experimentales en estos virus que los hacen más transmisibles en hurones^[16,17], generaron más controversia y la decisión en Estados Unidos de parar todo tipo de ensayos de ganancia

de parar todo tipo de ensayos de ganancia

cia de función con virus de la gripe hasta el establecimiento de una normativa que, objetivamente, valore la utilidad, beneficios y riesgos de experimentos con posibilidad de generar virus pandémicos antes de ser aprobados para su realización. Dentro de esta normativa, también se incluye una valoración de las estrategias de mitigación que se necesitan establecer para disminuir el posible riesgo e impacto negativo que puedan tener experimentos de ganancia de función. Si el comité considera que los riesgos superan los posibles beneficios de un experimento en concreto, su ejecución no sería aceptable. Con ello se

▶▶ Si el comité considera que los riesgos superan los posibles beneficios de un experimento en concreto, su ejecución no sería aceptable

emergentes, tales como virus de la gripe pandémicos, bacterias con multirresistencia a antibióticos y los virus del Zika, MERS o similares.

logra una valoración más objetiva y regulada del tipo de experimentos que se pueden realizar con mínimo riesgo para la población humana y que tratan cuestiones tan importantes como qué es lo que determina que un patógeno determinado se haga más virulento durante su evolución natural, con objeto de poder establecer medidas racionales que prevengan el impacto en salud pública de patógenos

Agradecimientos

La investigación en el laboratorio del Dr. García-Sastre está financiada por: los proyectos del NIH, R01CA229818, U19AI135972, R33AI119304, R01AI127302, HHSN272201300023C, U19AI117873, U19AI118610, R01AI127658, R01AI125524, U01AI124297, R21AI129486 y R01AI127775; por CRIP (Center for Research in Influenza Pathogenesis); un Center of Excellence for Influenza Research and Surveillance (CEIRS), también financiado por el NIH (HHSN272201400008C0); y por the Bill and Melinda Gates Foundation.

✉ adolfo.garcia-sastre@mssm.edu

Adolfo García-Sastre llevó a cabo sus estudios de doctorado en el Departamento de Bioquímica y Biología de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca, dirigidos por el profesor Enrique Villar, obteniendo el título de doctor en Ciencias Biológicas en 1990. El posdoctorado lo realizó sobre biología molecular del virus de la gripe en el Departamento de Microbiología de la Escuela de Graduados en Ciencias Biológicas del hospital Monte Sinaí, en Nueva York, bajo la dirección del *Professor Peter Palese*, donde continuó su carrera de investigador, primero como asistente (1997-2001) y luego como asociado (2001-2003). Desde 2004 es *Professor* en dicho Departamento y, a partir de 2007, Director del Instituto de Salud Global y Patógenos Emergentes en la misma institución.

Su actividad profesional ha dado como resultado más de 500 publicaciones en revistas científicas sobre la biología y patogénesis de los virus RNA, sus interacciones con el sistema inmune, antivirales y vacunas víricas. En la actualidad es director del Centro de Investigación sobre la Patogénesis de la Influenza (CRIP), uno de los cinco Centros de Excelencia financiados por el NIAID para la Investigación y Vigilancia de la gripe. Fue uno de los primeros miembros de la Sección de Estudio de Vacunas y miembro de la Sección de Estudio de Virología B del NIH. Además, ha sido editor científico del *Journal of Experimental Medicine*, es editor de *PLoS Pathogens*, *Journal of Virology* y *Virus Research* y miembro del Consejo Editorial de *Virology*, *Vaccine*, *NPJ Vaccines e Influenza and Other Respiratory Diseases* y es miembro de la junta asesora científica de Keystone Symposia.

Su publicación en *Science* sobre la reconstrucción y caracterización del virus de la influenza pandémica de 1918 fue galardonada con la distinción de "artículo del año 2005" por *Lancet*, año en que se convirtió en miembro de la Academia Estadounidense de Microbiología, y en 2009 recibió la cátedra Beijerinck de la Academia Nacional de Ciencias de los Países Bajos. En 2011 fue elegido presidente de la Sociedad Internacional de Vacunas (años 2014 y 2015). En 2017, miembro de la Real Academia de Farmacia de España. En junio de 2018 ha sido propuesto por las Facultades de Ciencias y de Ciencias de la Salud, el Consejo de Gobierno de la Universidad de Burgos, para el nombramiento doctor *honoris causa*.

REFERENCIAS

- [1] Fodor, E. *et ál.* (1999). "Rescue of influenza A virus from recombinant DNA". *J. Virol.* **73**: 9679-9682.
- [2] Neumann, G. *et ál.* (1999). "Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs". *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **96**: 9345-9350.
- [3] García-Sastre, A. *et ál.* (1998). "Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems". *Virology* **252**: 324-330.
- [4] Ayllon, J. y García-Sastre A. (2015). "The NS1 protein: a multitasking virulence factor". *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **386**: 73-107.
- [5] Manicassamy, B. *et ál.* (2010). "Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus". *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **107**: 11531-11536.
- [6] Karlsson, E. A. *et ál.* (2015). "Visualizing real-time influenza virus infection, transmission and protection in ferrets". *Nat. Commun.* **6**: 6378.
- [7] White, K. M. *et ál.* (2015). "A potent anti-influenza compound blocks fusion through stabilization of the prefusion conformation of the hemagglutinin protein". *ACS Infect. Dis.* **1**: 98-109.
- [8] König, R. *et ál.* (2010). "Human host factors required for influenza virus replication". *Nature* **463**: 813-817.
- [9] Dormitzer, P. R. (2015). "Rapid production of synthetic influenza vaccines". *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **386**: 237-273.
- [10] Krammer, F., García-Sastre, A. y Palese, P. (2018). "Is It Possible to Develop a «Universal» Influenza Virus Vaccine? Toward a Universal Influenza Virus Vaccine: Potential Target Antigens and Critical Aspects for Vaccine Development". *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**: a028845.
- [11] García-Sastre, A. (2000). "Transfectant influenza viruses as antigen delivery vectors". *Adv. Virus Res.* **55**: 579-597.
- [12] Taubenberger, J. K. *et ál.* (2005). "Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes". *Nature* **437**: 889-893.
- [13] Tumpey, T. M. *et ál.* (2005). "Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus". *Science* **310**: 77-80.
- [14] Palese, P., Tumpey, T. M. y García-Sastre, A. (2006). "What can we learn from reconstructing the extinct 1918 pandemic influenza virus?" *Immunity* **24**: 121-124.
- [15] Pappas, C. *et ál.* (2008). "Single gene reassortants identify a critical role for PB1, HA, and NA in the high virulence of the 1918 pandemic influenza virus". *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **105**: 3064-3069.
- [16] Herfst, S. *et ál.* (2012). "Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets". *Science* **336**: 1534-1541.
- [17] Imai, M. *et ál.* (2012). "Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets". *Nature* **486**: 420-428.

