



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Vectores virales para el desarrollo de vacunas
de nueva generación y terapéutica en
animales domésticos**

TESIS

que para obtener el título de:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

Grecia Zitlalxochitl Ayala Mondragón

ASESOR:

M. en C. Víctor David González Fernández

Cuautitlán izcalli, Estado de México, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis.**

Vectores virales para el desarrollo de vacunas de nueva generación y terapéutica en animales domésticos.

Que presenta la pasante: **Grecia Zitlaxochitl Ayala Mondragón.**

Con número de cuenta: **415065629** para obtener el título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 01 de junio de 2023.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|----------------------|------------------------------------------|-------|
| PRESIDENTE | Dr. Tonatiuth Alejandro Cruz Sánchez | |
| VOCAL | Dr. Hugo Ramírez Álvarez | |
| SECRETARIO | M. en C. Víctor David González Fernández | |
| 1er. SUPLENTE | M.V.Z. Alma Noemí Montes de Oca Chávez | |
| 2do. SUPLENTE | Dra. Marcela Autran Martínez | |

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

MCVB/ntm*

Dedicatoria

*A todos los que seguramente se desvelarán
y entrarán en crisis existenciales al escribir su tesis
o intentar titularse
hay una fuerza desconocida dentro de cada ser humano.*

*Somos una terrible mezcla de ácidos nucleicos
y de recuerdos,
de deseos y de proteínas.*

Francois Jacob.

Agradecimientos

En primera instancia, agradezco a mi tutor el doctor Víctor David González Fernández el haberme adentrado al intrigante campo de la vectorología y, por ende, en el área de investigación. Gracias por haberme alentado cuando más lo necesitaba; por su tiempo y dedicación, sin su guía habría sido imposible continuar esta tesis.

En segundo lugar, quiero agradecer a todos mis sinodales y a aquellos que hicieron posible este gran proyecto; gracias a sus comentarios y correcciones mejoré significativamente la calidad de mi trabajo, agradezco especialmente al doctor Hugo Ramírez Álvarez por su invaluable contribución.

Agradezco a mi alma mater, la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por la formación académica que me brindó.

Quiero agradecer a mis padres y a mis abuelitos, todo el apoyo y paciencia para que se concretara esta tesis, gracias por esperar.

Asimismo, quiero agradecer a mis dos personas favoritas en este mundo mi hermano Brasil y a mi novio Xicotencatl, por estar ahí en mis momentos más frágiles y ayudarme a levantarme; también quiero agradecer todas las caguamas involucradas en el desarrollo de esta tesis.

Igualmente agradezco a mis adorables y entusiastas compañeros caninos Hachi y Yasha por su cariño incondicional.

Y, por último, pero no por eso menos importante quiero agradecerme a mí, por seguir adelante con este trabajo pese a todo pronóstico y por mi arduo trabajo físico y mental; espero que sea de gran utilidad para nuevas generaciones.

Índice

| | |
|---------------------------------------------------------------|----|
| Dedicatoria..... | 3 |
| Agradecimientos | 4 |
| Índice de figuras..... | 7 |
| Índice de cuadros | 8 |
| Abreviaturas..... | 10 |
| Resumen..... | 13 |
| Abstract | 14 |
| I. Introducción | 15 |
| Antecedentes | 15 |
| Generalidades de los virus | 16 |
| Biología, replicación, implicaciones médicas y sociales | 17 |
| Replicación | 17 |
| Justificación..... | 19 |
| Objetivos..... | 19 |
| Metodología..... | 20 |
| II. La “vectorología” como ciencia naciente | 21 |
| Definición de vectorología..... | 21 |
| Diseño de vectores | 22 |
| Construcción de vectores virales | 23 |
| Sistemas de expresión..... | 26 |
| Purificación del vector viral..... | 27 |
| VECTORES VIRALES ADN | 28 |
| Poxvirus | 28 |
| Herpesvirus | 35 |
| Adenovirus | 44 |
| Virus Adenoasociados | 49 |
| Baculovirus..... | 56 |
| Retrovirus..... | 62 |
| Lentivirus | 66 |
| VECTORES VIRALES ARN | 68 |
| Paramyxovirus..... | 70 |
| Rhabdovirus | 77 |
| Coronavirus..... | 84 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| Bunyavirus..... | 87 |
| Alphavirus | 93 |
| Flavivirus | 96 |
| III. Vacunología basada en vectores virales | 100 |
| Vacunación..... | 100 |
| Vacunas de nueva generación..... | 102 |
| Actualidad y perspectivas del uso de vacunas vectorizadas | 107 |
| Plataformas vacunales | 108 |
| IV. Farmacología basada en vectores virales..... | 109 |
| Terapia génica | 109 |
| Terapia oncológica..... | 113 |
| Conclusión..... | 118 |
| Perspectivas | 120 |
| Referencias | 122 |
| Bibliografía..... | 132 |
| Anexos | 134 |
| Proceso de diseño y construcción de vectores virales | 134 |
| Diseño de vectores virales..... | 134 |
| Construcción de vectores virales | 139 |

Índice de figuras

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1. Esquema general del ciclo de replicación de un virus..... | 18 |
| Figura 2. Estrategia de clonación general..... | 26 |
| Figura 3. Uso de LAMP2 actúa como un enhancer | 38 |
| Figura 4. Diseño del genoma del vector AAV recombinante..... | 50 |
| Figura 5. Serotipos de virus adenoasociados (1-9) y su tropismo celular..... | 51 |
| Figura 6. Ciclo de replicación del baculovirus y su modificación a vector viral | 57 |
| Figura 7. Representación del genoma de NDV..... | 72 |
| Figura 8. Esquema del genoma del virus de la rabia..... | 78 |
| Figura 10. Representación esquemática del genoma del flavivirus..... | 97 |
| Figura 11. Diferentes plataformas vacunales enfocadas al SARS-CoV2 | 106 |
| Figura 12. Estrategias utilizadas en terapia génica..... | 112 |
| Figura 13. Diversos enfoques de terapia génica enfocada a cáncer utilizando adenovirus como vector | 117 |
| Figura 14. Terapia in vivo y ex vivo..... | 135 |
| Figura 15. Diferentes formas de introducir material genético extraño en una célula..... | 137 |
| Figura 16. Estructura general de un vector de clonación y un vector de expresión..... | 140 |
| Figura 17. Mapa genético del plásmido pcDNA3.1 | 141 |
| Figura 18. Mecanismo de clonación en el plásmido..... | 142 |
| Figura 19. Cortes generados por enzimas de restricción..... | 143 |
| Figura 20. Purificación del inserto | 144 |
| Figura 21. Estrategia de clonación general..... | 147 |

Índice de cuadros

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Cuadro 1. Fortalezas y debilidades de usar Poxvirus como vectores..... | 31 |
| Cuadro 2. Ejemplos de antígenos virales expresados en diferentes vectores de Poxvirus | 32 |
| Cuadro 3. Virus ORF (cepa D1701L) como vector de antígenos de vacunas veterinarias..... | 34 |
| Cuadro 4. Fortalezas y debilidades del uso de Herpesvirus como vector viral..... | 40 |
| Cuadro 5. Herpesvirus como vectores vacunales comerciales de aves de corral (HVT y MDV)..... | 40 |
| Cuadro 6. Vectores derivados de la familia Herpesviridae | 41 |
| Cuadro 7. Herpesvirus de perros y gatos como vectores para proteger contra diferentes enfermedades | 42 |
| Cuadro 8. Fortalezas y debilidades del uso de adenovirus como vector viral..... | 47 |
| Cuadro 9. Adenovirus usados como vectores en medicina veterinaria | 48 |
| Cuadro 10. Fortalezas y debilidades de los virus adenoasociados | 54 |
| Cuadro 11. Vectores AAV enfocado a diferentes aplicaciones clínicas | 55 |
| Cuadro 12. Fortalezas y debilidades del Baculovirus como vector..... | 60 |
| Cuadro 13. Productos derivados de BEVS con licencia para uso comercial..... | 60 |
| Cuadro 14. Productos farmacéuticos producidos mediante BEVS y autorizados para su uso en humanos y animales | 61 |
| Cuadro 15. Fortalezas y debilidades de los Retrovirus como vectores | 65 |
| Cuadro 16. Fortalezas y debilidades de los vectores Lentivirales..... | 67 |
| Cuadro 17. Fortalezas y debilidades de los Paramyxovirus | 74 |
| Cuadro 18. Cepas de Newcastle que inmunizan contra diversas etiologías | 75 |
| Cuadro 19. Fortalezas y debilidades de los Rhabdovirus más comúnmente usados como vectores virales (VR y VEV) | 81 |
| Cuadro 20. Candidatos vacunales basados en el virus de la rabia..... | 82 |
| Cuadro 21. Candidatos vacunales basados en VEV | 83 |
| Cuadro 22. Fortalezas y debilidades de los vectores basados en Coronavirus | 86 |
| Cuadro 23. Fortalezas y debilidades de los vectores basados en Bunyavirus | 90 |
| Cuadro 24. Potenciales candidatos vacunales basados en Bunyavirus | 91 |
| Cuadro 25. Fortalezas y debilidades de los Alphavirus | 95 |
| Cuadro 26. Fortalezas y debilidades de los Flavivirus..... | 98 |
| Cuadro 27. Vacunas candidatas en desarrollo basados en el virus de la fiebre amarilla | 99 |
| Cuadro 28. Fortalezas y debilidades de las vacunas basadas en microorganismos vivos u inactivados | 101 |
| Cuadro 29. Fortalezas y debilidades de las vacunas basadas en péptidos | 103 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Cuadro 30. Fortalezas y debilidades de las vacunas de ADN Y ARN | 104 |
| Cuadro 31. Fortalezas y debilidades de las vacunas basadas en vectores virales | 105 |
| Cuadro 32. Vacunas basadas en vectores virales disponibles comercialmente en medicina veterinaria en México..... | 108 |
| Cuadro 33. Fortalezas y debilidades de la terapia génica..... | 111 |
| Cuadro 34. Genes utilizados en quimioterapia molecular..... | 114 |
| Cuadro 35. Comparación de las rutas de administración ex vivo e in vivo en terapia génica | 136 |

Abreviaturas

- 17D** Cepa 17D del virus de la fiebre amarilla
- AAV** Virus adenoasociados
- Ac** Anticuerpos
- AcMNPV** *Autographa californica múltiple núcleo-polihedrovirus*
- AcN** Anticuerpos neutralizantes
- Ad** Adenovirus
- Ad5** Adenovirus tipo 5
- ADN** Ácido desoxirribonucleico
- ADNc** ADN complementario
- ADNds** ADN de doble cadena
- ADNr** ADN recombinante
- ADNss** ADN de cadena sencilla
- Ad-R-** Vectores adenovirales sin capacidad de replicación
- Ad-R+** Vectores adenovirales con capacidad de replicación
- AIV** Virus de la influenza aviar (*avian influenza viruses*)
- AKAV** Virus de la enfermedad de akabane (*akabane virus*)
- ARN** Ácido ribonucleico
- ARNm** ARN mensajero
- ARNss (-)** ARN de cadena sencilla de sentido negativo
- ARNss (+)** ARN de cadena sencilla de sentido positivo
- BAC** Cromosomas artificiales bacterianos (*Bacterial artificial chromosomes*)
- BacMam** Baculovirus aplicados en mamíferos (*Baculoviruses applied on mammals*)
- BEVS** Sistema de expresión en baculovirus (*Baculovirus Expression Vector System*)
- BUNV** Virus bunyamwera
- C19** Cromosoma 19
- CCHFV** Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (*Crimean- Congo hemorrhagic fever virus*)
- CELO virus** Adenovirus aviar
- CoVs** Coronavirus
- CPA** Célula presentadora de antígenos
- CRISPR-Cas9** Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente intercaladas y su proteína asociada Cas (*Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats*)
- dsFv:** Fragmento Fv estabilizado con disulfuro (*disulfide-stabilized Fv fragment*).
- EEVE** Virus de la encefalitis equina venezolana
- EIAV** Virus de la anemia infecciosa equina
- FIPV** Virus de la peritonitis infecciosa felina
- FMGs** Glicoproteínas fusogénicas de membrana
- GDF8** Gen de la miostatina
- GFP** Proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*)
- HA** Hemoaglutinina
- HRSV** Virus respiratorio sincitial humano
- HVT** Herpesvirus del pavo

IBDV Virus de la bursitis infecciosa
IBV /VBI Virus de la bronquitis infecciosa
IFLC Clones infecciosos de longitud completa
IFN-1 Interferón 1
IL Interleucina
ILTV Virus de la laringotraqueítis infecciosa (*Infectious laryngotracheitis virus*)
IRES Sitio de entrada ribosomal interno
ITR Regiones repetidas de forma invertida
ITU Unidad transcripcional independiente
iVLP o trVLP system Partículas similares a virus infecciosos
JEV Virus de la encefalitis japonesa
JUNV Virus Junin (*Junin virus*)
KRIV Virus Kairi (*Kairi virus*)
Lac-Z Gen Lac-Z
LASV Virus de Lassa (*Lassa virus*)
LAT Latencia
LCMV Virus de la coriomeningitis linfocítica (*Lymphocytic choriomeningitis virus*)
LTR Repetición terminal larga (*Long Terminal Repeat*)
LV Lentivirus
MACV Virus de Machupo (*Machupo virus*)
MD Virus de la enfermedad de marek (*Marek disease*)
MG Minigenoma o minireplicon
MHC I o II Complejo mayor de histocompatibilidad I o II
MHV Virus de la hepatitis del ratón
MN Células mononucleares
MoMLV Virus de la leucemia murina de Moloney
MV Virus del sarampión
MVA Vaccinia Ankara Modificado
ND Enfermedad de Newcatle
NDV / VN: Virus de Newcastle
OCT4, SOX, KLF4, c-MYC, NANOG y LIN28: Genes que codifican para factores de transcripción relacionados con la correcta regulación de la expresión de genes
ODVs Virus derivados ocluidos
ORF Marco de lectura abierto (*open reading frame*)
ORFV Virus Orf
PPRV Virus de la peste de pequeños rumiantes
QTL Caracteres cualitativos
QTN Caracteres cuantitativos
RPV Virus de la peste bovina
RSV Virus sincitial respiratorio bovino
RT Transcriptasa inversa
RVFV Virus de la fiebre del Valle de Rift (*Rift Valley fever virus*)
SARS-CoV Coronavirus del síndrome respiratorio agudo y severo
scFv Anticuerpo monocatenario (*single-chain variable fragment*)

SFTSV Virus del síndrome de fiebre severa con trombocitopenia (*Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus*)

SFV Virus del bosque de Semliki (*Semliki forest virus*)

SINV Virus Sindbis (*Sindbis virus*)

SLAM: Molécula de activación de linfocitos de señalización (*Signaling Lymphocyte Activation Molecule*)

SNC Sistema nervioso central

SNPs Polimorfismo de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*)

STRs Polimorfismo de repetición en tandem corto (*Short tandem repeat polymorphism*)

TG₅ Gen de la Tiroglobulina

TGEV Virus de la gastroenteritis transmisible en cerdos

UTR Regiones no traducidas de los genes (untranslated region)

VB Virus brotado

VEEV Virus de la encefalitis equina venezolana

VEV / VS Virus de la estomatitis vesicular

VFEB Virus de la fiebre efímera bovina (*Bovine ephemeral fever virus*)

HSV Virus del herpes

VIF Virus de la inmunodeficiencia felina (*Feline Immunodeficiency Virus*)

VIH Virus de la inmunodeficiencia humana

VIS Virus de inmunodeficiencia en simios

VLPs Partículas pseudovirales (*Virus like particles*)

VND Virus de Newcastle (Newcastle Disease Virus)

VPN Virus de la poliedrosis nuclear

VPFC Virus de la fiebre porcina clásica (Classical swine fever virus CSFV)

VR Virus de la rabia

VRHE Retrovirus humanos endógenos

VS Virus de la estomatitis vesicular

VV Virus vaccinia

YF Virus de la fiebre amarilla (*Yellow fever virus*)

YF_{17D-204} y 17DD Cepa 17 de la fiebre amarilla

Resumen

Los virus, por su alta especialización para infectar, transferir, almacenar y expresar material genético en células específicas, son agentes que se han utilizado como vectores para transportar una o varias moléculas de una célula hacia otra distinta con la finalidad de que en ésta tenga un efecto esperado.

La presente tesis ha recopilado una gran cantidad de información relacionada a las principales características y cualidades que poseen los virus más investigados como vectores virales, así como su proceso de diseño y construcción, junto con las modificaciones necesarias para volverlos más seguros y eficaces para inducir una correcta terapia. Aunque la mayoría continúa en investigación para resolver problemas relacionados a su capacidad de integración genética, de presencia de premunidad, de mutagénesis insercional y/o de reversión a la virulencia, se han obtenido varias pruebas clínicas exitosas y productos aprobados para su comercialización que mantiene optimista a la comunidad científica sobre el futuro de los vectores virales en el campo de la medicina.

Además, en este trabajo se da a conocer las estrategias que sigue la terapia génica, la terapia oncológica y vacunal para llevar a cabo sus respectivos objetivos biológicos.

Este es el primer documento en español que recopila información actualizada en materia de biotecnología aplicada a la vectorología viral con enfoque veterinario.

Palabras clave: Vectores virales, virus, cáncer, terapia génica, vacunas, biotecnología animal

Abstract

Viruses, due to their high specialization to infect, transfer, store and express genetic material in specific cells, are agents that have been used as vectors to transport one or more molecules from one cell to another with the aim of inducing an expected biological effect.

This thesis has compiled a large amount of information related to the main characteristics and qualities that the most investigated viruses have as viral vectors, as well as their design and construction process, together with the necessary modifications to make them safer and more effective to induce a correct therapy.

Although most of the viral vectors continue in research to solve problems related to their capacity for genetic integration, presence of premunity, insertional mutagenesis and/or reversion to virulence, several successful clinical trials have been obtained and products approved for commercialization; this data keeps the scientific community optimistic about the future of viral vectors in the field of medicine.

In addition, this script discloses the strategies followed by gene therapy, cancer and vaccine therapy to carry out their respective biological objectives.

This is the first document in Spanish that compiles updated information on biotechnology applied to viral vectorology with a veterinary approach.

Keywords: Viral vectors, virus, cancer, gene therapy, vaccines, animal biotechnology.

I. Introducción

Antecedentes

Desde que el género *Homo* existe en la Tierra, hace aproximadamente 2 millones de años, la mayor parte de su existencia permaneció sin que se instaurase una relación con los animales más allá de la caza, sin embargo, a medida que transcurría el tiempo, el ser humano ha modificado sus interacciones con el medio que le rodeaba a través del pensamiento y la técnica; posteriormente, el *Homo sapiens* siendo un animal con un comportamiento colectivo más sofisticado, comienza a criar a la primer especie animal domesticada: el perro (*Canis familiaris*), aproximadamente hace 14,000 años^{1,2}.

El hombre Paleolítico y Mesolítico fue un mero depredador de la naturaleza, ya que se limitaba a consumir los vegetales y animales que estaban al alcance de su mano; es aquí cuando el hombre empieza a establecer una relación más compleja con los animales, persiguiendo las manadas a distancia para poder cazarlos y explotarlos para aprovechar su carne, piel, cuernos, etc³.

En el Neolítico, en cambio, el *Homo sapiens* se torna sedentario y empieza a agrupar animales y seleccionarlos a partir de su comportamiento y su talla⁴, con lo que se transforma en un productor que genera fuentes de alimentación, por lo que la caza, antes esencial para la subsistencia humana, pasa a ser secundaria y más tarde un mero deporte⁵.

Como vemos, a lo largo de la historia los animales han sido parte esencial de la vida del ser humano, siendo aprovechados como fuente de alimento, en cultos religiosos, como abrigo, medio de transporte y entretenimiento; más recientemente, también han sido utilizados en el control de plagas, para hacer seguimiento de enfermedades que afectan a otros animales, a humanos o ambos; para idear nuevos medicamentos, tratamientos, y/o vacunas. Gracias a la producción animal y sus subproductos se aseguró la supervivencia, evolución y progreso del ser humano como la especie dominante del planeta.

Pese al tiempo transcurrido, todavía dependemos de los animales, principalmente para alimentarnos adecuadamente, ya que son una importante fuente de nutrientes de buena calidad ⁶, así como para el estudio de algunas enfermedades. Debido al

incremento de la población, ha aumentado la demanda de alimento de origen animal, por lo que hoy día más del 50% de la población tiene comida insuficiente y muchos sufren de una dieta deficiente. Además, la salud de los animales está bajo la constante amenaza de enfermedades infecciosas que podrían prevenirse mediante la vacunación, quimioterapia y medidas de higiene; sin embargo, no se cuenta con vacunas contra todas las enfermedades de alta importancia y sus variantes, incluso cuando representan un alto impacto en la economía y en la salud pública^{7,8}. Además, la evolución microbiana ha desarrollado resistencia a antibióticos, por lo que es necesario desarrollar nuevas estrategias terapéuticas⁹. Es así como ha surgido la idea de aprovechar a los virus como transportadores de moléculas que permitan innovar la tecnología biomédica; si los virus han evolucionado por millones de años para transmitir y diseminar información genética de la forma más eficaz para su replicación, ¿por qué no aprovechamos esta capacidad en nuestro beneficio para introducir material genético que nos interese manifestar dentro de determinado organismo? Este concepto, de la mano del desarrollo de herramientas de biología molecular que permiten la secuenciación del ADN y la síntesis de ADN recombinante, incluidos genes individuales, la identificación de las mutaciones de secuencia relacionadas a trastornos genéticos¹⁰, entre otros, ha dado impulso al estudio y desarrollo de virus como transportadores de genes de nuestro interés.

Naturalmente, a día de hoy (abril 2023), efectivamente se ha logrado diseñar y construir vacunas y terapias muy eficaces contra diversas enfermedades, basadas en vectores virales.

Generalidades de los virus

Los virus son entidades biológicas replicativas que necesitan de una célula viva para hospedarse, generar copias de sí mismo y continuar su ciclo; su composición únicamente consiste en un tipo de ácido nucleico (ADN o ARN) y en algunas proteínas tanto estructurales como replicativas; dado que penetran a las células hospederas y utilizan su maquinaria bioquímica para la síntesis de sus moléculas esenciales, tienen un enorme potencial como mediadores biotecnológicos que permite usarlos como vectores para el desarrollo de vacunas o terapia génica¹¹.

Sin embargo, para esto primero es necesario conocer su naturaleza tanto fuera como dentro del hospedero para el óptimo aprovechamiento de sus propiedades como diseminadores y acarreadores de información y/o moléculas¹².

Biología, replicación, implicaciones médicas y sociales

Los virus son inmensamente diversos, si bien los más conocidos son una minoría que causa enfermedades en humanos, animales, plantas y bacterias. Sin embargo, todos los virus tienen una estructura semejante: están formados por un genoma que puede ser ADN o ARN, el cual codifica las “instrucciones” que le permiten al virus multiplicarse y persistir; el genoma se encuentra protegido por una capa de proteínas llamada cápside, algunos virus también pueden tener una envoltura, que es una cubierta lipídica adicional tomada de la membrana celular anfitriona de la que emergió. Una vez dentro de la célula, la información que codifica el virus dirige muchos eventos moleculares que implican la síntesis de moléculas que serán ensambladas finalmente por los virus de progenie para después liberarse y diseminarse hacia otras células. Dado que los virus toman control de la célula para replicarse, esto puede matarla como en el caso de los virus tumorales o alterar el funcionamiento de la célula de forma permanente¹³.

Lo que diferencia a los organismos unicelulares, como las bacterias y protozoos de los virus, es que estos últimos no contienen organelos ni metabolismo, se les ha llegado a denominar “parásitos genéticos”, porque además, requieren de procesos metabólicos de la célula huésped, es por esto que resulta imposible cultivar virus sin la presencia de una población celular en constante división¹¹.

Replicación

El virus, después de ingresar al organismo y adherirse a su receptor específico en la célula hospedadora, se introduce por endocitosis o fusión de su envoltura y posteriormente se libera en el citoplasma y se desencapsida para liberar su genoma que contiene la información necesaria para generar nuevos viriones, este es transcrito y traducido para sintetizar las moléculas necesarias para formar los viriones de progenie. Dependiendo del momento en que los genes virales son expresados durante la replicación son clasificados en: inmediatos tempranos, tempranos y tardíos¹⁴. A esto le sigue el proceso de ensamblaje que conduce a la

formación de nuevas partículas virales. Cuando los virus recién producidos maduran, salen de la célula por exocitosis o lisis celular para infectar otras células (Figura 1).

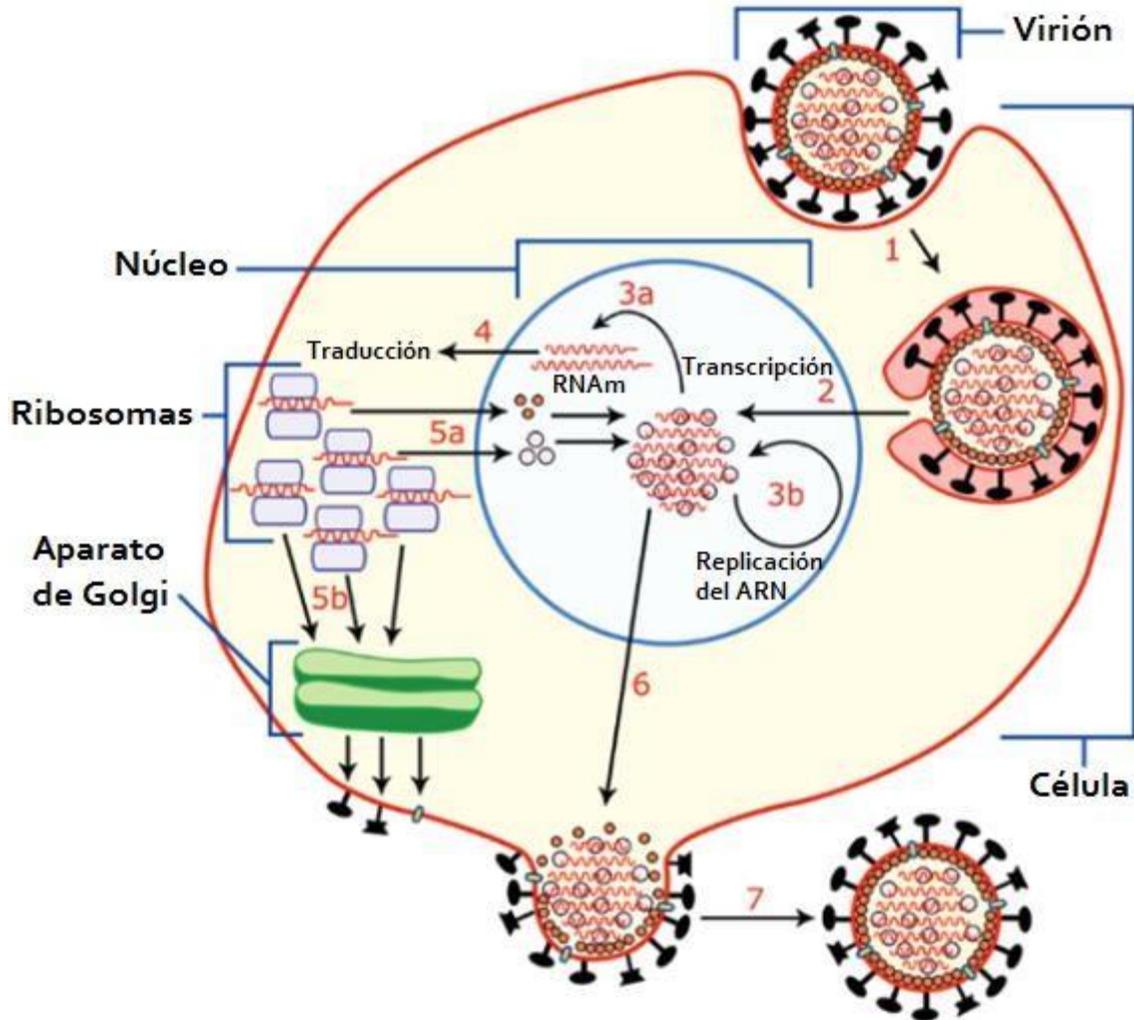


Figura 1. Esquema general del ciclo de replicación de un virus ²³. (1) Adhesión al receptor celular, (2) Liberación del ácido nucleico (denudación), (3) Transcripción del ARN, (4) Traducción del ARNm, (5a) Síntesis del ARNm a proteínas virales enzimáticas necesarias para su replicación, (3b) replicación del ARN con ayuda de las enzimas sintetizadas en 5a, (5b) Síntesis de proteínas virales estructurales y de superficie en el aparato de Golgi, (6) Ensamble del virión y maduración (7) Salida de la célula.

Justificación

La recopilación y análisis de información sobre vectores virales para el desarrollo de vacunas de nueva generación y terapéutica en animales domésticos busca dar un acercamiento al tema, facilitar la búsqueda de la información a hispanohablantes al estar recopilada en un solo texto y adaptada al español.

Dado el avance tecnológico cada vez más acelerado en el ámbito del desarrollo de vacunas y otros productos de la industria médica es necesario una mayor difusión, documentación e investigación al respecto entre los países de América latina, hay que recordar que la terapia génica tiene al menos 30 años de su descubrimiento y aplicación por lo que ya es una realidad con mucho potencial en salud animal, es por esto que debemos estar a la vanguardia mejorando planes de estudio atrasados en países en vías de desarrollo y disponiendo de información actualizada, para permitirnos valorar nuevas perspectivas y oportunidades en la ciencia animal, que de lo contrario supondría un retraso científico y tecnológico que también tendría repercusiones socio-económicas.

Objetivos

- Recopilar información enfocada a la vectorología viral y los campos principales de aplicación (terapia génica, terapia oncológica y vacunal) para hacerla más digerible hacia la comunidad estudiantil latinoamericana y fomentar el interés por la investigación.
- Servir como un primer acercamiento a la comunidad hispanohablante hacia el campo de la vectorología viral.
- Recopilar tratamientos y vacunas basados en vectores virales aprobados legalmente y en fases de investigación.

Metodología

Se analizó, tradujo y resumió la información acerca de vectores virales para el desarrollo de vacunas de nueva generación y terapéutica en animales domésticos. Esto se realizó utilizando bases de datos especializadas como:

- Scopus
- Pubmed
- Science Direct
- SpringerLink
- Journal of Virology
- Europe PCM

Usando artículos de difusión, revistas del área y artículos científicos, los cuáles fueron clasificados en cinco temas principales: Antecedentes, vectorología, biotecnología animal, vacunas basadas en vectores virales, farmacología basada en vectores virales, dentro de los cuales se tratarán otros subtemas. Además, se incluyeron cuadros y diagramas para ordenar la información y facilitar la comprensión de este texto.

II. La “vectorología” como ciencia naciente

Definición de vectorología

El término *vectorology* ha sido utilizado por referentes científicos en las revistas *Nature* o *Science*¹⁵ y se refieren al estudio del diseño y producción de vehículos para introducir moléculas exógenas de naturaleza variada a un organismo o a cierto tipo celular del mismo¹⁵. Es por lo que la castellanización “vectorología” puede ser utilizado en textos de lengua española para referirse a la misma información de manera que esta idea se pueda divulgar más fácilmente entre la comunidad estudiantil de las ciencias biomédicas.

Los vectores en ciencia biomédica son aquellos agentes biológicos que permiten el transporte de una o varias moléculas de una entidad biológica hacia otra distinta con la finalidad de que en ésta última tenga un efecto esperado. Por ejemplo, en el caso de las vacunas vectorizadas el efecto esperado es una respuesta inmune específica, mientras que en el caso de la fagoterapia antimicrobiana es la disminución de cierta carga bacteriana¹⁶.

Algunos de los virus ADN utilizados como vectores han sido: *Poxvirus* (en el desarrollo de una vacuna oral contra rabia)¹⁷, *Herpesvirus*¹⁸ (en la vacuna contra el Virus respiratorio sincitial bovino), *Baculovirus*¹⁹ (en el desarrollo de una vacuna contra influenza) y *Adenovirus*²⁰. (en el desarrollo de diversas vacunas contra el SARS-CoV2); mientras que algunos de los virus ARN que han sido utilizados son los *Coronavirus*, *Retrovirus*²¹, *Paramyxovirus* (como la vacuna “Patria”)²², *Rhabdovirus*²³ y *Alphavirus*²⁴

En los últimos 10 años, gracias a la ingeniería genética, se ha logrado diseñar nuevas vacunas que expresan epítomos¹ foráneos con el potencial de combatir diversos patógenos, gracias a los sistemas de genética inversa, es posible obtener virus ARN (-) a partir de una copia completa de ADN. El virus de la rabia fue el primer virus de este tipo que se obtuvo a partir de una copia de su genoma fue el virus de la rabia en 1994.

¹ **Epítomos:** región o regiones antigénicas reconocidas por un anticuerpo específico.

Esto fue seguido rápidamente por el rescate de otros virus de ARN de sentido negativo. La capacidad de alterar específicamente el genoma en cualquier sitio elegido²⁵ ha llevado a una mejor comprensión de las funciones e interacciones de las proteínas del virus y ha permitido el desarrollo de vacunas de virus activos atenuados; en particular, vacunas marcadoras²⁶ (identifican animales vacunados de los animales infectados naturalmente). Otra aplicación es el uso de estas vacunas de virus como vectores para liberar inmunógenos de otros agentes patógenos¹².

La terapia genética es el uso de material genético para tratar, curar o prevenir una enfermedad o condición médica causada por una proteína deficiente o disfuncional. El principio de la terapia génica se basa en la transferencia de un gen terapéutico utilizando vectores virales o no virales como resultado de lo cual las células receptoras comenzarán a producir proteínas que corrijan un trastorno genético o una enfermedad adquirida¹⁶

Diseño de vectores

Los vectores utilizados en terapia génica, oncológica o como vectores vacunales deben cumplir con ciertas características según el efecto que esperamos que cumpla. A menudo debe eliminarse o disminuirse el tropismo natural del vector para evitar efectos secundarios tóxicos, a la vez que deben diseñarse para infectar células diana que no infecta de forma natural, por lo que se requiere añadir los genes adecuados, en la cantidad adecuada, sin una toxicidad latente y al mismo tiempo dirigirse específicamente solo a la célula diana evitando dañarla, utilizando promotores y receptores que solo estén activos en la célula de interés dependiendo del objetivo que se busque; además, se debe asegurar la introducción eficiente del ácido nucleico terapéutico en las células correctas y su expresión génica en la célula diana, en el caso de vacunas y fagoterapia también deberá de asegurarse la efectiva presentación ante las CPA¹¹ que conlleven posteriormente a una correcta y efectiva activación de la respuesta inmune; por otro lado, si buscamos administrar determinado gen para corregir defectos genéticos debemos evitar que el gen de interés sea desintegrado, y lo ideal es que nuestro vector sea lo menos

¹¹ CPA: Células presentadoras de antígeno. Ejemplos de ellas son macrófagos, células dendríticas y linfocitos B.

inmunogénico posible para que sea capaz de evadir al sistema inmunológico del individuo²⁷. Como veremos más adelante, cada vector viral se caracteriza por un conjunto inherente de propiedades que afectan su idoneidad para ser aplicados en cualquier terapia y está limitado por el grado de complejidad del genoma viral.

Construcción de vectores virales

Una vez que ya sabemos hacia qué terapia y patología está orientado el vector en cuestión, así como las características que se desean manifestar o eliminar, se procede a convertir nuestro virus a un vector viral. Con este fin hacemos uso de varias herramientas moleculares derivadas de procesos genéticos que las bacterias ya realizan de forma natural en conjunto con otras técnicas para llevar a cabo lo que se denomina clonación^{III}, ésta nos permite insertar genes que deseamos (molécula recombinante) dentro del genoma de un virus (vector viral), el objetivo es obtener millones de copias del genoma del virus elegido que a su vez contenga el gen o genes recombinantes deseados para posteriormente purificarlo y hacer uso de él²⁸.

Para llevar a cabo la clonación se necesita principalmente de un vector de clonación (que almacena grandes secuencias genéticas) o un vector de expresión (que busca producir un transcrito ARN o una proteína de determinada secuencia génica) y de un inserto que puede ser ADN obtenido de cualquier organismo, y puede ser producto de una retro-transcripción del ARN, de PCR o un ARN obtenido por transcripción *in vitro*²⁹.

Los plásmidos, bacteriófagos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC) o de levadura (YAC) suelen ser utilizados como vectores de clonación³⁰, sin embargo, el de uso más común es el plásmido por lo que en este texto se profundizará más en éste.

Los plásmidos son pequeñas moléculas circulares de ADN que de manera natural constituyen material genético móvil de algunas bacterias, éstos pueden tener

^{III} **Clonación de ADN o clonación molecular:** es la introducción de un fragmento de ADN denominado inserto dentro de una molécula de ADN denominado vector que puede replicarse de manera autónoma e independiente del genoma de la célula hospedera.

múltiples copias que se replican y permanecen de manera episomal^{IV}; la información que codifican puede ser para la resistencia a antibióticos y su transmisión sucede mediante fisión binaria o través de conjugación mediante los pili. Para poder utilizarlos se les ha modificado genéticamente para mantener características deseables, la adicción de algunas otras además de eliminar el ADN innecesario, por lo general constan solo de 2 a 5 kilobases^V (kb) de longitud, lo que facilita el análisis de los insertos incorporados en él y pueden transportar hasta 15kb. Existen cientos de plásmidos disponibles comercialmente³¹.

Independientemente del tipo de vector, se debe contar con ciertos elementos básicos^{31, 32}:

- 1- **Origen de replicación:** comúnmente referido como «ORI»; es una secuencia en el ADN del vector que ayuda a identificar el sitio de inicio de la replicación.
- 2- **Marcador de selección:** es un gen que confiere resistencia a un antibiótico o genera un fenotipo particular que ayude a identificar a las células que internalizaron al vector. Los genes de selección más comunes son ampicilina y kanamicina, otros marcadores son el gen *LacZ*^{VI} y el gen GFP^{VII}.
- 3- **Sitio de clonación múltiple:** es un fragmento de ADN que contiene una serie de sitios únicos de reconocimiento para enzimas de restricción, muy cercanos entre sí y permite insertar cualquier fragmento de ADN que tenga los mismos sitios.

A parte de estos elementos, los vectores de expresión cuentan con un casete de expresión que contiene los siguientes elementos genéticos:

^{IV} **Episomal:** ADN no incorporado en el genoma nuclear.

^V **Kilo base (Kb):** es una unidad de medida para determinar la longitud del ARN o ADN. 1kb equivale a 1000 nucleótidos o 1000 pares de bases.

^{VI} **Gen *LacZ*:** está ubicado en el operón Lac de *E. coli* y codifica la enzima galactosidasa. Cuando el vector con el gen *LacZ* presente se replica dentro de la célula hospedera la enzima puede expresarse y al entrar en contacto con el sustrato análogo de la enzima esta podrá degradarlo produciendo como resultado un color azul.

^{VII} **Green Fluorescent Protein GFP:** la célula transformada emitirá fluorescencia al exponerse a luz ultravioleta.

- 1- Un **promotor** fuerte y potente que induzca la expresión de un gen, también ayuda a que se exprese solo en tejidos específicos; por ejemplo, el promotor Erb-B potencializa la expresión transgénica específicamente en tumores de glándula mamaria, mientras que el uso de creatina quinasa muscular impulsa la expresión génica preferentemente en el músculo.
- 2- **Secuencias de terminación de la transcripción** y una **cola de poliadenilación** para proteger al transcrito de la degradación de las nucleasas, lo que permitirá extender su vida media.
- 3- **Sitio de unión al ribosoma (IRES)** ^{VIII}, que ensambla la maquinaria para iniciar la traducción en los ARNm procariotes³³. La construcción de el vector viral se puede resumir en los siguientes puntos ver **Figura 8**³⁰:
 1. Preparación del inserto que se va a clonar: selección de enzimas de restricción
 2. Preparación del vector para la clonación: digestión enzimática, desfosforilación del vector y purificación.
 3. Ligación del inserto.
 4. Preparación de células competentes.
 5. Transformación celular de la bacteria competente.
 6. Identificación de las colonias celulares que contienen el vector recombinante

^{VIII} **Sitio de unión al ribosoma internal ribosome entry site (IRES)**: o secuencia Shine-Dalgarno esta precede el codón de inicio AUG de la traducción en los ARNm en procariotes. Esta secuencia es complementaria con el extremo 3' del ARNr 16s cuya hibridación permite ensamblar la maquinaria de inicio de la traducción.

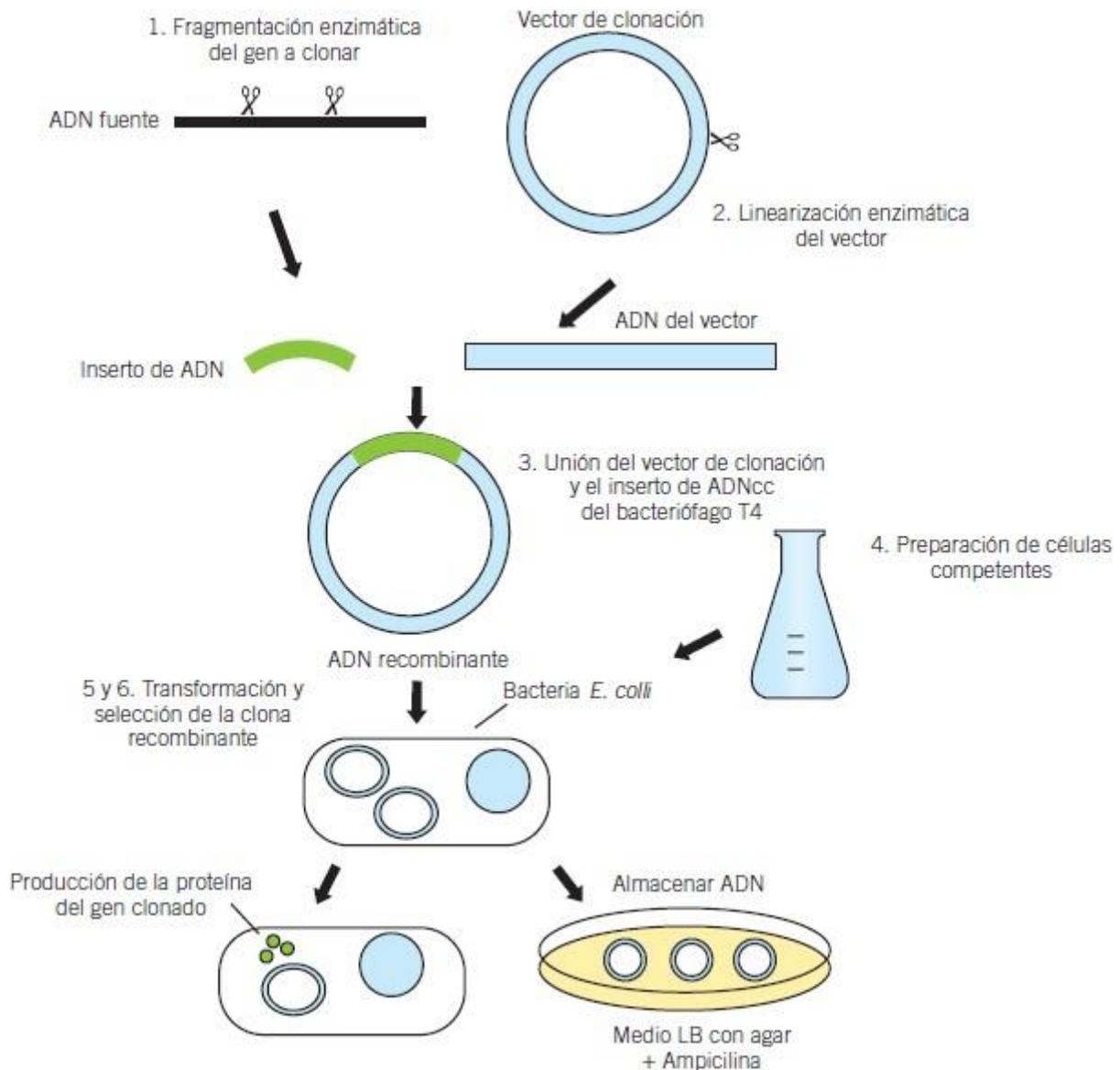


Figura 2. Estrategia de clonación general ³⁰. (1) se corta el fragmento de ADN a clonar con enzimas de restricción al igual que (2) el vector de clonación estos posteriormente (3) (4) se preparan células competentes en este caso *E. coli* (5) y (6) ocurre la transformación y selección de la clona recombinante, así como la producción de la proteína que codifica para el gen clonado estos son cultivados en medio LB con agar y ampicilina.

Sistemas de expresión

Existen diversas técnicas para generar vectores virales, a continuación revisaremos algunas de ellas.

Producción por transfección transitoria

Se transfectan células con los plásmidos recombinantes para que se puedan producir partículas virales, por lo tanto, la eficiencia de producción es reducida. Una

de las grandes ventajas de estos sistemas es que se obtienen en su mayoría partículas virales completas³³.

Producción en células de insecto

Los Baculovirus, del cual se hablará a profundidad más adelante, pertenecen a la familia *Baculoviridae*, son virus de ADN e infectan células de insectos del orden *Lepidóptera*. La principal ventaja de este sistema son los promotores fuertes que permiten producir grandes cantidades de proteínas y además, realizar modificaciones postraduccionales generando proteínas complejas³³.

CRISPR/Cas9

La relativamente reciente tecnología, descubierta en 2012, CRISPR/Cas9 permite seleccionar y editar con mayor precisión el genoma, fue implementada en el 2020 para generar la vacuna ALVAC-CDV-M-F-H/C5 capaz de proteger contra el *Virus del distemper canino* obteniendo altas tasas y títulos de anticuerpos en zorros y visones por lo que podría ser útil tanto para perros como para animales silvestres³⁴.

Purificación del vector viral

La purificación del vector es uno de los pasos que se debe seguir para obtener preparaciones puras que garanticen la seguridad y eficacia de la transferencia génica en protocolos clínicos sin embargo, esto puede afectar la producción de títulos suficientemente altos lo que ha propiciado el desarrollo de diversos métodos de purificación³³ Ejemplos:

- Purificación por gradiente de cloruro de cesio.
- Purificación por gradiente discontinuo de iodixanol.
- Ultracentrifugación.
- Purificación por cromatografía líquida de alta resolución.
- Cromatografía de intercambio iónico.
- Cromatografía por afinidad ^{33,35}.

VECTORES VIRALES ADN

Poxvirus

La familia *Poxviridae* se divide en dos subfamilias: *Entomopoxvirinae* (poxvirus de insectos) y *Chordopoxvirinae* (poxvirus de vertebrados), ésta a su vez se divide en 8 géneros. Los virus pertenecientes a esta familia inducen lesiones características de viruela en la piel de los animales afectados^{36, 37}. El virus prototipo de esta familia, es el virus vaccinia (VV)³⁸.

Las partículas virales son pleomórficas, en forma de ladrillo (220-450 nm x 140-260 nm) con una superficie irregular de estructuras tubulares o globulares proyectadas. Son virus grandes que contienen un genoma de ADN lineal de doble cadena que varía en tamaño entre 130 y 300 kb. Pueden acomodar grandes cantidades (más de 25 kb) de ADN extra, por lo que varios transgenes pueden expresarse simultáneamente proporcionando un enfoque multivalente a la vacuna. Se replican dentro del citoplasma de las células infectadas y no se integran en el genoma del huésped, eliminando así el potencial riesgo de mutagénesis de inserción²⁴; posteriormente, son liberados por gemación (viriones envueltos), por exocitosis o por lisis celular (viriones sin envoltura)³⁶. En 1982 se demostró que los poxvirus podían funcionar como vectores virales³⁹.

Ciclo viral

La replicación inicia después de la fusión del virión con la membrana plasmática o después de la endocitosis y posteriormente se libera en el citoplasma donde se desencapsida permitiendo la liberación de su ADN genómico y se lleva a cabo la replicación y el ensamblaje viral. La transcripción inicia con la transcriptasa viral y otros elementos transportados por el virión (ADN polimerasa, timidina quinasa) que median la producción de ARNm incluyendo varias otras enzimas necesarias para la replicación del genoma y mediado por la expresión de genes tempranos, intermedios y tardíos. Algunas de estas proteínas virales requieren para su funcionamiento modificaciones postraduccionales por escisión proteolítica, fosforilación, glicosilación, etc. Mientras se da la producción de estas proteínas virales se inhibe la síntesis macromolecular del huésped. Por otro lado, el ADN permanece en estructuras inmaduras en forma de media luna. Y finalmente son

liberados por gemación (viriones envueltos), por exocitosis o por lisis celular (viriones no envueltos)^{36, 40}.

De Poxvirus a vector

Las cepas silvestres del VV pueden producir efectos indeseables en humanos por lo que se han atenuado y obtenido variantes modificadas, como el virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA), la cual ha perdido el 15% de su genoma incluido genes determinantes de tropismo y virulencia⁴¹; otra cepa modificada es la NYVAC, desarrollada a partir de la cepa de la vacuna Copenhagen VV por la delección dirigida de 18 genes⁴².

Ambas variantes experimentan una replicación muy limitada o nula en células de mamíferos y se han utilizado con éxito para inducir protección contra patógenos animales²⁴ contra el virus de la rabia (RABORAL V-RG®⁴³), virus de la enfermedad de Aujeszky⁴⁴. Por otro lado el mixomavirus del conejo se ha utilizado para proteger contra la mixomatosis y la enfermedad hemorrágica viral del conejo^{45, 46} así como el *capripoxvirus* para proteger contra peste bovina y viruela ovina (*lumpy skin disease*)⁴⁷ en el **cuadro 2** podemos ver más ejemplos de los diferentes poxvirus vectorizados.

Los Poxvirus se han preferido frente a otros virus debido a su limitado y estricto espectro de hospederos naturales, entre ellos destaca el *capripoxvirus*⁴⁷ y el *avipoxvirus* siendo los más estudiados hasta ahora para la administración de antígenos en mamíferos el ALVAC *canaripoxvirus*⁴⁸ ya que se limitan a infectar células de caprinos y canarios respectivamente por lo tanto no resultan peligrosos en mamíferos por lo que su uso otorga una buena seguridad.

Los *avipoxvirus* en células de mamíferos, inician una infección abortiva^{IX}, pero pueden expresar antígenos y estimular respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares contra el producto transgénico. Los virus recombinantes de la viruela aviar se han utilizado con éxito para expresar antígenos en cobayas⁴⁹, en gatos y en cerdos⁵⁰. Los vectores recombinantes de la viruela del canario son aproximadamente 100 veces más eficaces que los vectores de la viruela aviar

^{IX} **Infección abortiva:** se caracterizan por una reducción en el rendimiento total de partículas virales o en el grado de infectividad. Refleja una incompatibilidad entre el virus y la célula hospedera.

comparables en la inducción de inmunidad protectora. Aun con su extensa investigación y aplicaciones solo está permitido su uso en animales de compañía y caballos, en humanos se comenzó a probar su efectividad en 2009⁴⁸.

Sin embargo, también se han usado poxvirus que tienen como huésped natural a la misma especie en la que se busca implementar una terapia por ejemplo el virus de la viruela porcina se utilizó para proteger contra el virus de la enfermedad de Aujeszky⁴⁴, esto no es recomendable por su posible reversión a la virulencia por lo que hasta ahora solo se permite la comercialización de TROVACTM-AIV-H5⁵¹ en aves y más recientemente Nobivac Myxo-RHD PLUS⁴⁵ en conejos.

Otro inconveniente es la premunidad resultante de una infección natural previa o la transferencia de anticuerpos maternos en las crías, lo que puede reducir la capacidad del vector para replicarse y, por tanto, inducir una inmunidad menos eficaz. Por otro lado, se sabe que los poxvirus generan una inmunidad casi de por vida en su especie huésped natural después del contacto inicial, por esto el uso repetido en animales inmunes no se recomendaría²⁴. Para sobrellevar este obstáculo se utilizan virus de replicación deficiente, lo que induce una baja inmunidad contra el vector y permite que sea administrado tantas veces se requiera estimular la respuesta inmune engendrada por una vacuna de virus inactivo y con distintos fines terapéuticos⁵², sin embargo, requiere administrar un título viral mayor para lograr un efecto adecuado. Otra alternativa es sensibilizar primero con un VV replicante y luego reforzar con un VV carente del ectodominio^X B5 (que es el objetivo principal de los anticuerpos neutralizantes (AcN)^{XI53} para que sea identificado como algo diferente y provoque una respuesta de anticuerpos más fuerte contra el producto transgénico en vez de utilizar VV recombinante en ambas inoculaciones. Otra ventaja en la terapia vacunal es que nos permite diferenciar animales infectados naturalmente de los vacunados, ya que los recombinantes expresan solo uno o dos antígenos de los patógenos y otros antígenos permanecen disponibles

^X **Ectodominio**: Dominio de una proteína integral de la membrana plasmática que queda del lado extracelular. En los receptores de membrana, los sitios específicos de unión del ligando específico se localizan en él.

^{XI} **Anticuerpos neutralizantes (AcN)**: Anticuerpo que se une a los virus y bloquea su capacidad de unirse a su receptor celular por lo que interfiere con su capacidad infectiva.

para pruebas inmunológicas independientemente si son Poxvirus replicantes o deficientes en replicación⁵⁴. En el **cuadro 1**, se muestra un resumen de las fortalezas y debilidades de este sistema vectorial.

La especie del virus Orf (ORFV) o dermatitis pustulosa contagiosa, del género *Parapoxviridae* se ha propuesto como un candidato para nuevas vacunas con vectores marcadores. El ORFV tiene un rango de hospedadores muy restringido *in vivo* e *in vitro* (ovejas y cabras, ocasionalmente humanos), tropismo cutáneo restringido y ausencia de infección sistémica. Entre las diferentes cepas de la vacuna ORFV, solo la D1701 es una cepa muy atenuada con una patogenicidad notablemente reducida después de la aplicación subcutánea. Esta cepa presenta varias ventajas para su uso como vector viral, incluida su capacidad para propagarse en una línea celular, desencadena una fuerte respuesta inmunoestimulante y reguladora en huéspedes no permisivos como ratones y cerdos⁵⁵, además, evita la interferencia inmunitaria después de inoculaciones repetidas gracias a sus proteínas inmunomoduladoras que interfieren con la respuesta inmune del huésped para evitar la eliminación del virus⁵⁶. En el **cuadro 3** se mencionan algunos ejemplos del ORFV como vector vacunal.

Cuadro 1. Fortalezas y debilidades de usar Poxvirus como vectores ^{12, 31}

| Fortalezas | Debilidades |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Lleva ADN heterólogo de hasta 30 Kb. | Potencialmente citotóxico. |
| Posee múltiples sitios de inserción de transgenes. | Expresión transitoria del transgén. |
| Apta como vacuna recombinante atenuada. | Altamente inmunogénico. |
| Muy adecuada como vector oncolítico. | Promotores heterólogos difíciles de usar. |
| Alta especificidad de especie. | Alta premunidad en huéspedes naturales |
| Baja premunidad en hospederos no naturales. | Requiere más de una inoculación para |
| Baja replicación. | inducir respuesta inmunitaria protectora. |
| Induce inmunidad humoral y celular. | |

Cuadro 2. Ejemplos de antígenos virales expresados en diferentes vectores de Poxvirus ²⁴

| Vector | Antígeno | Patógeno al que va dirigido la terapia | Especie | Disponibilidad comercial |
|----------------|-----------------------|-----------------------------------------------|-----------------|--------------------------------------------------|
| Virus vaccinia | Proteína H | Virus de la peste bovina | Bovino | |
| | Proteínas H + F | - | - | |
| | F, G, N | Virus sincitial respiratorio bovino | Bovino | |
| | G | Virus efímero bovino | Bovino | |
| | P67 | <i>Theileria parva</i> | Bovino | |
| | VP2, VP5 | Virus de la lengua azul | Borrego | |
| | Proteína de envoltura | Virus de la leucemia bovina | Borrego | |
| | Env | Artritis encefalitis caprina | Cabra | |
| | E0, E2 | Virus de la peste porcina clásica | Cerdo | |
| | H5 | Virus de la influenza aviar | Ave | |
| Cepa MVA | F, G | Virus sincitial respiratorio bovino | Bovino | |
| | HA, NP | Influenza equina | Ponis | |
| | Ag85A | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | Bovino | |
| Cepa NYVAC | H, F | Virus del distemper canino | Zorro | |
| | prM, E, NS1 | Virus de la encefalitis japonesa | Cerdo | |
| | gB, gD | Virus de la enfermedad de Aujeszky | Cerdo | |
| Cepa ALVAC | gB, gC, gD | Herpes virus equino 1 | Caballo | |
| | Glicoproteína G | Virus de Nipah | Cerdo | |
| | VP2 y VP5 | Virus de la lengua azul | Borrego | |
| | H5 | Virus de la influenza aviar | Gato | |
| | F y H | Virus del distemper canino | Perros y zorros | RECOMBITEK CDV PUREVAX FDV |
| | Env, gag/ pol | Virus de la leucemia felina | Gato | PUREVAX FeLV Merial Inc (Europa, USA, Canadá) |
| | prM y E | Virus del Nilo occidental | Caballo | RECOMBITEK equine WNV ⁵⁷ - |
| | H3 | Influenza H3N8 | Potro | PROTEQ-FLU TM |
| | G | Virus de la rabia | Gato | Merial Inc (USA, Canadá) ⁵⁷ |

| | | | | |
|---------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| | HA y F | Virus del distemper canino | Perros y hurones | Merial, Inc (USA; Argentina, Brasil, Colombia, Canadá, Uruguay) ⁵⁷ |
| ALVAC >>> | HA | Virus de la influenza equina | Caballos | Merial, Inc ⁵⁷ (Europa, USA) |
| Myxomavirus | Gen de la cápside (cepa F9) | Calicivirus felino | Gato | |
| | Hemaglutinina de la influenza | Virus de la influenza aviar | Conejo | |
| | Vp60 | Virus de la enfermedad hemorrágica del conejo | Conejo | Nobivac Myxo-RHD PLUS ⁴⁵ |
| Swinepoxvirus | Gp50 y gp63 | Virus de la enfermedad de Aujeszky | Cerdo | |
| Capripoxvirus | H y F (cepa KS1) | Virus de la peste bovina | Bovino | |
| | H y F (cepa KS1) | Virus de la peste de los pequeños rumiantes | Cabra | |
| | VP7 (cadena KS1) | Virus de lengua azul | Borrego | |
| | Gp del virus de la enfermedad de la piel gruesa | Virus de la rabia | Bovino | |
| | G1 y G2 (LSDV neethling) | Virus de la fiebre del Valle del Rift | Ratón | |
| Avipoxvirus | H5 o H7 (+gen N1) | Virus de la influenza aviar | Gallina | TROVAC™-AIV-H5 |
| | HN, ±F | Virus de Newcastle | Gallina | Biomune ⁵⁷ USA |
| | gB | Virus de la enfermedad de Marek | Gallina | |
| | Env | Virus de la necrosis del bazo | Gallina | |
| | VP2 | Virus de la bursitis infecciosa | Gallina | |
| | Gen F | Neumovirus de la rinitis del pavo | Pavo | |
| | Gen F (Pigeonpox) | Virus de Newcastle | Gallina | |
| | HS? HA | Virus de la influenza aviar | Gallina | Merial, Inc (USA, Canadá) ⁵⁷ |
| | LT + AE | Virus de la laringotraqueítis infecciosa y encefalomielitis aviar | Gallina | Biomune Co (Lenexa, KS, USA) ⁵⁷ |
| | MG + AE | <i>Mycoplasma gallisepticum</i> y Encefalomielitis aviar | Gallina | Biomune Co. USA ⁵⁷ |

>>>(LSDV neethling)

>>>ALVAC (Toxina tetánica plus y adyuvante carbopol)

Cuadro 3. Virus ORF (cepa D1701L) como vector de antígenos de vacunas veterinarias ²⁴

| Antígeno | Patógeno | Especies | Consecuencias inmunológicas |
|----------|------------------------------------|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| gC o gD | Virus de la enfermedad de Aujeszky | Ratón | Fuerte respuesta humoral anti-gC después de una dosis única |
| P40 | Virus de la diarrea viral bovina | Rata | Inducción de células B, células plasmáticas y células T |
| gC+gD | Virus de la enfermedad de Aujeszky | Cerdo | Relación equilibrada Th ₁ / Th ₂ después del cebado del ADN |
| E2 | Virus de la peste porcina clásica | Cerdo | Mayores títulos de anticuerpos y mejora de la frecuencia de células mononucleares productoras de IFN- γ |

Herpesvirus

Engloba a las subfamilias *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae*. Se han encontrado en insectos, peces, reptiles, anfibios, moluscos, así como en aves y mamíferos, en los cuales mantiene una infección persistente de por vida con replicación viral restringida, pero recurrente que coincide con periodos de estrés, por lo que los animales infectados son reservorios potencialmente no diagnosticados para la transmisión del virus³⁶.

Los viriones están envueltos, tienen un diámetro de 120 a 250 nm su nucleocápside es icosaédrica, el genoma es ADN lineal de doble hebra, de una longitud de 125 a 290 kb⁵⁸. Los virus de mayor importancia clínica son el herpesvirus bovino tipo 1 y 2 (BHV-2 BHV-1), herpesvirus felino 1, laringotraqueítis infecciosa aviar, rinotraqueítis viral felina, enfermedad de marek, y fiebre catarral maligna³⁶.

Los primeros virus del herpes diseñados para expresar antígenos heterólogos fueron el BHV-1, que causa rinotraqueítis infecciosa bovina/balanopostitis pustulosa infecciosa y el virus de Aujeszky²⁴.

Ciclo biológico

El herpesvirus se adhiere a la superficie celular, mediante la unión de sus glicoproteínas virales presentes en la envoltura del virus con los receptores en la membrana celular y se fusiona con la membrana plasmática. Posteriormente libera su nucleocápside en el citoplasma y esta es transportada hacia el núcleo donde replica su genoma. Luego del ensamblaje, los viriones abandonan el núcleo y se dirigen hacia la membrana citoplasmática externa por procesos de gemación a partir de membranas intracitoplasmáticas, adquiriendo su envoltura. Finalmente son transportados dentro de vesículas intracelulares a la membrana citoplasmática para su posterior liberación de la célula¹⁴.

La reactivación del estado de latencia es iniciada principalmente por estímulos externos (estrés o inmunosupresión, glucocorticoides, etc.); que generan la reactivación viral desencadenando el cuadro patogénico²⁴.

Cambios y modificaciones del Herpesvirus para transformarse en vector

El herpesvirus (HSV) gracias a su amplia longitud y a el hecho de que muchos de sus genes no sean necesarios para su replicación lo convierten en el vector con más alta capacidad de transporte (30-40-150 kpb)⁵⁸, esto permite empaquetar varias copias de un transgén disminuyendo así la dosis por célula infectada o para administrar múltiples genes como es el caso del parkinson⁵⁹, sin embargo, hay que estudiar cuidadosamente el sitio de inserción porque puede desencadenar en la atenuación del virus, o presentar una reducida expresión del transgén. Los genes US1, US2, US10 y TK están establecidos como genes no esenciales para el crecimiento de herpesvirus en cultivos celulares, el sitio US2 en especial favorece una alta expresión del gen resultando en una protección total contra el agente infeccioso contra el que se está inmunizando⁶⁰. Los vectores derivados de HSV como amplicón tienen una capacidad de 150kpb⁶¹; otro beneficio es que no hay riesgo de inmunidad previa ya que muchos herpesvirus son específicos de especie²⁴.

A diferencia de los vectores lentivirales, los virus adenoasociados (AAV) y los adenovirus (Ad) los HSV infectan células neuronales e incluso neuronas sensoriales de forma natural ya que forma parte de su ciclo natural de infección, una vez que alcanza el núcleo de la célula el genoma lineal se circulariza y se mantiene como un episoma con integración mínima produciendo infecciones latentes sin la necesidad de inyectarlo directamente en el cerebro⁵⁹ y esto también disminuye el título de virus necesarios para la propagación del virus replicante⁵⁸. Además, puede infectar eficazmente varios tipos de células, como en músculos e hígado, lo que permite utilizarlo en el tratamiento de enfermedades no neurológicas⁶².

También nos es posible modificar el tropismo, al cambiar las proteínas de envoltura por la de otros virus lo que también reducirá la transducción fuera del objetivo como se ha demostrado con la proteína de VSV-G⁶¹.

Sin embargo, la replicación de estos vectores es muy tóxica para las células infectadas por ejemplo en SNC provocará una encefalitis letal por lo que sería viable utilizarlo en tratamientos oncológicos, aun con esta complicación se han empleado

en SNC para el tratamiento de Alzheimer, Parkinson y principalmente en cánceres como glioblastoma multiforme⁶¹. Los genes asociados a la patogenicidad, son el gen de la timidina quinasa o los genes que codifican las glicoproteínas gC , gG, gE, orgI²⁴.

Para reducir esta toxicidad se han eliminado los genes de transcripción temprana ICP4 o ICP27 que provocan lisis celular en todos los tipos celulares⁵⁹ esto reduce sin eliminar del todo la replicación del vector citotóxico dentro de la célula y minimiza la respuesta inmune del huésped a los productos genéticos virales⁶³. Como resultado estos vectores pueden mantener la expresión de un transgén hasta por 3 semanas en cultivo celular y 1 mes *in vivo*⁶¹. No obstante, puesto que hay que proveer los genes ICP4 o ICP27 en el cultivo celular hay que asegurarse que las secuencias genéticas presentes en el cultivo y las secuencias restantes del propio virus no se superpongan de lo contrario, se podría producir una recombinación genética sin embargo, difícilmente se generaría un virus de tipo salvaje ya que el virus requiere forzosamente que el gen ICP27 esté integrado en su genoma para su replicación⁵⁹.

Al inactivar el gen ICP34.5 que permite al HSV crecer en células quiescentes evita su replicación en neuronas eliminando así su virulencia y por consiguiente la encefalitis al tiempo que mantiene y potencia su capacidad de transducir células neuronales. Aunado a esto para robustecer la seguridad del vector se le pueden eliminar genes no asociados directamente a la replicación, pero que contribuyen a reducirla u obstaculizarla como es el caso del gen Vmw65 y el gen que codifica ICP4⁵⁹.

Los elementos clave que ayudaron a mejorar el diseño de HSV así como de muchos otros virus es la identificación de secuencias necesarias para la replicación, la señal de escisión/empaquetamiento y el origen viral⁶¹.

Otra barrera que tienen que enfrentar los herpesvirus es el limitado tiempo de expresión ya que el herpesvirus de forma natural interrumpe la expresión de sus genes e inicia una infección latente en tan solo unos días, de tal manera que es como si el virus no estuviera presente⁶⁴, sin embargo, una pequeña fracción del

genoma asociada a la latencia (LAT) se mantiene activa⁵⁸. A partir de este conocimiento se empezó a investigar al promotor de LAT con la esperanza de mejorar la expresión del vector y los resultados concluyeron que LATP2 actuaba como un potenciador con la capacidad de expresar dos genes cada uno bajo el control de sus propios promotores en orientaciones opuestas con el elemento LATP2 en el centro (**Figura 3**) y además, mantenía la expresión hasta por seis meses. Este elemento podría implementarse en terapias que requieran la expresión de dos genes o para expresar tanto un gen como un marcador terapéutico, en terapia *ex-vivo* con células madre de médula ósea o células dendríticas donde es muy difícil transducir genes exógenos. Se busca utilizar LAP2 con promotores celulares con patrones de actividad específica de tipo celular para determinar si puede expresarse a largo plazo dentro de un vector viral. En una evaluación de HSV recombinante no replicante transportando GFP y galactosidasa logró una infección 100% pura⁵⁹.

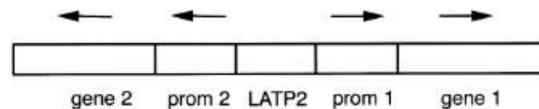


Figura 3. Uso de LATP₂ actúa como un enhancer^{xii}. La región LATP₂ dirige la expresión a largo plazo de dos promotores localizados en sentidos opuestos⁵⁹.

Por otro lado, se ha evaluado la seguridad del vector HSV carente del gen ICP34.5 con el objetivo de que replique y destruya células de glioma en división frente a la presencia de herpesvirus de tipo salvaje latente sin efectos dañinos por lo que es improbable la replicación aun cuando hay HSV de tipo salvaje⁵⁹.

El mayor obstáculo en el progreso de HSV son los métodos ineficientes de producción ya que este proceso requiere de virus auxiliares o líneas celulares que proporcionen las proteínas faltantes en trans^{xiii} para que se construya el vector viral⁵⁹. Para intentar resolver esto se han generado vectores auxiliares carentes de

^{xii} **Enhancer**: también llamados potenciadores o secuencias amplificadoras son secuencias cortas que potencian o aumentan el inicio de la transcripción de un gen en conjunto con otras secuencias reguladoras.

^{xiii} **Trans**: Son secuencias de ADN (elementos reguladores) que codifican factores de transcripción para genes distantes Ej. El cromosoma 10 puede actuar como regulador del 4.

señal de empaquetamiento en diferentes cósmidos^{XIV}, con esto se consiguió un vector con un menor nivel de virus auxiliar (contaminante), pero no se logró eliminar la replicación del virus auxiliar citotóxico⁶¹.

Otro método de producción es el sistema BAC^{XV} usado para expresar genes virales complementarios tiene ventajas al trabajar con múltiples cósmidos, pero la contaminación del virus auxiliar persiste⁶¹.

Una desventaja del método basado en amplicón es que estos vectores generan una expresión relativamente limitada además, de que la expresión en células en división es transitoria por que el ADN del vector se pierde durante la mitosis⁵⁸.

Otra desventaja es la premunidad, lo que limita la expresión génica con el fin de resolver esto se han desarrollado vectores híbrido que combinan componentes del amplicón de HSV-1 con elementos genéticos de otros vectores virales de esta forma se han creado vectores híbridos HSV-AAV que combinan una alta capacidad de inserción y amplio tropismo con altos niveles de expresión por tiempo prolongado⁵⁸.

Los HSV continúan en vías de desarrollo como candidatos para desarrollar vectores para el tratamiento de enfermedades neurológicas y terapia génica y oncológica en humanos y vacunas^{59, 60} en animales sin embargo, los herpesvirus tienen un potencial oculto que debe seguir investigandose⁶¹, para que se asemejen a otros sistemas vectoriales actuales seguros y eficientes. También se propone su uso como vacuna de refuerzo para mejorar la respuesta inmune celular contra antígenos específicos o como adyuvante para mejorar y aumentar la respuesta de células B⁶³. En el **Cuadro 4** se recopilan las fortalezas y debilidades de los HSV. En los **Cuadros 5 - 7** se enlistan algunos ejemplos de vectores herpesvirales aplicados a la inmunización de diversos agentes etiológicos.

^{XIV} **Cósmidos**: Son vectores híbridos, poseen el ADN de un plásmido (proporciona resistencia a antibióticos) y los sitios *cos* del bacteriófago (le permiten empaquetar ADN). Se replican de manera independiente y aceptan grandes insertos (4,5kb).

^{XV} **BAC**: Cromosomas artificiales bacterianos, es un constructo derivado del plásmido F capaz de transportar entre 150 y 350kbp.

Cuadro 4. Fortalezas y debilidades del uso de Herpesvirus como vector viral ¹²

| Fortalezas | Debilidades |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tropismo celular amplio. | Posible citotoxicidad residual. |
| Posee la más alta capacidad de transporte 30 a 150 kb dependiendo el sistema de expresión. | El genoma del vector no se integra en el genoma de la célula huésped. |
| Tropismo natural por células neuronales (vectores HSV) o linfoides B (vectores EBV). | Riesgo de recombinación con células infectadas por el virus del herpes simple de forma latente. |
| Muy adecuado como vector oncolítico. | Altos niveles de inmunidad preexistente en el huésped natural. |
| Se ha logrado mantener una expresión prolongada del transgén (6 meses). | Sistemas de producción poco efectivos. |

EBV: Virus de Epstein Barr

Cuadro 5. Herpesvirus como vectores vacunales comerciales de aves de corral (HVT y MDV) ⁶⁵

| Nombre comercial (manufactura) | Antígeno expresado |
|--------------------------------|----------------------|
| Innovax-ND (Merck) | NDV-F |
| Vectormune ND (Ceva) | NDV-F |
| Vectormune AI (Ceva) | AI-H5 |
| Vectormune LT (Ceva) | ILTV-gB |
| Vectormune IBD (Ceva) | IBDV-VP ₂ |
| Vaxxitek HVT-IBD (Merial) | IBDV-VP ₂ |
| Innovax_ILT (Merck) | ILTV-gI & gD |

HVT: Herpesvirus del pavo, MDV: Virus de la enfermedad de Marek, ND: enfermedad de Newcastle, AI Influenza aviar, ILTV: Virus de la Laringotraqueítis infecciosa, IBDV: Virus de la bursitis infecciosa

Cuadro 6. Vectores derivados de la familia Herpesviridae ²⁴

| Vector | Patógeno objetivo | Antígeno objetivo expresado |
|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Herpesvirus bovino 1 | Virus sincitial respiratorio bovino | Proteína G de unión a BRSV |
| | Virus de la diarrea viral bovina | Glicoproteína E2 |
| | <i>Cryptosporidium parvum</i> | Proteína de superficie p23 |
| | Virus de la fiebre aftosa | VP1 |
| Herpesvirus bovino 4 | Virus de Aujeszky | gB, gC, gD, gE, gI |
| | BVDV | Glicoproteínas E2 |
| Herpesvirus canino | <i>Herpesvirus bovino -1</i> | Glicoproteínas D |
| | Virus de la rabia | Glicoproteínas |
| Herpesvirus equino | <i>Neospora caninum</i> | Proteína de superficie NCSRS2 |
| | Virus de la diarrea viral bovina | Proteínas estructurales C, Ems E1, E2 Proteínas E y prM |
| Herpesvirus felino | Virus del Nilo occidental | Env, gag |
| | Virus de la leucemia felina | Antígeno ROP2 |
| Herpesvirus del pavo | <i>Toxoplasma gondii</i> | IBDV VP2 |
| | Virus de la bursitis infecciosa y Virus de la enfermedad de Marek | Hemaglutinina H5 y H7 |
| Virus de la laringotraqueítis infecciosa | Virus de la influenza aviar | Proteína de fusión F |
| | Virus de la enfermedad de Newcastle | VP2 |
| Virus de la enfermedad de Marek | Virus de la bursitis infecciosa | Glicoproteína E2 |
| | Virus de la fiebre porcina clásica | Proteína NS1 |
| Virus de Aujeszky | Virus de la encefalitis japonesa | VP1 |
| | Virus de la fiebre aftosa | GP5 |
| Virus de la gastroenteritis transmisible | Virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino | Proteína S1 |
| | Virus de la gastroenteritis transmisible | Proteína de cápside |
| Parvovirus canino tipo 2 | Parvovirus canino tipo 2 | P1-2A (FMDV)+ VP2 (PPV) |
| | FMDV+ Parvovirus porcino | Glicoproteína |
| Virus de la rabia | Virus de la rabia | Hemaglutinina H3 |
| | Virus de la influenza porcina | |

FMDV: Virus de la fiebre aftosa; PPV: Parvovirus porcino

Cuadro 7. Herpesvirus de perros y gatos como vectores para proteger contra diferentes enfermedades⁶⁵

| Vector viral | Agente | Antígeno | Modelo animal | Respuesta |
|--------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Herpesvirus canino CHV | <i>Neospora caninum</i> | NcSRS2 | Perro | Anticuerpos IgG de <i>N. caninum</i> |
| | Virus de la rabia | G proteína | Perro | AcN protectores |
| Herpesvirus felino FHV-1 | Rabia | gpG del virus de la rabia | Gato | AcN protectores durante el desafío |
| | <i>Toxoplasma gondii</i> | Antígeno ROP2 | Gato | IgG |
| | Virus de la leucemia felina | Glicoproteína de envoltura | Gato | Protección parcial |
| | Virus de la inmunodeficiencia felina | Gag proteína | - | - |
| | Calicivirus felino | Gen precursor de la cápside | Gato | Protección completa |
| | PRRS | GP5-M | Ratones más que cerdos | AcN y respuesta linfoproliferativa |
| | Fiebre aftosa | Gen P1 | Cerdo | Respuesta humoral y celular con protección incompleta |
| | | P1 y el gen "FHG" * | Cerdo | Mejora la inmunogenicidad Requiere más estudios |
| | | VP1 | Cerdo | No protege |
| | | VP1 | Cerdo | No protege |
| Virus de Pseudorabia | | FMDV y PPV | Ratón | Actividad neutralizante en ratón |
| | Circovirus porcino-2 | ORF2 | Lechones | Respuesta de proliferación de linfocitos y anticuerpos (Ac) |
| | | ORF1 y gen ORF2 parcial | Ratones Balb/c | Protección completa |
| | | Glicoproteína | | |
| | Peste porcina clásica | Glicoproteína E1 | Cerdo | |
| | Virus de la encefalitis japonesa | Gen NS1 | Ratones Balb/c, cerdos y cerdas gestantes | Protectora |
| | | Proteína SX09S-01 de pre membrana y envoltura | Ratón | Ac |
| | | E 2 gen | Cerdo | Protección completa |
| | CSFV | Sj26GST y SjFABP | Ratón y Borrego | Protección parcial |
| | <i>Schistosoma japonicum</i> | | | |
| | Subtipo del virus de la influenza porcina (H3N2) | HA | Ratones | Protectora |
| | Influenza del cerdo (H1N1) Influenza A | Gen HA | Cerdo | Efectiva durante el estudio |
| | Parvovirus porcino | VP2 | Piglets | Protección completa |
| | Virus de la gastroenteritis transmisible | Gen S | - | - |
| | <i>Toxoplasma gondii</i> | TgSAG1 | Ratones | Protección parcial |
| | Virus de la rabia | rgp | Perro | Respuesta inmune |
| | Coccidiosis | Gen Ea1A | Aves | - |
| | Virus de la influenza aviar (H7N1) | HA | Aves | Protección completa |
| | <i>Chlamydia psittaci</i> | pmpD-N | Aves SPF de 1 día de edad | Protección parcial y disminución de los signos clínicos. |

| | | | | |
|----------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Virus del herpes aviar y virus de Marek ⁶⁶ | Cepa H5N1 (A/swan/Hungary/4999/2006) | Gen hemoaglutinina (HA) | Aves | Protección durante el desafío con una vacuna viva adyuvada |
| | Enfermedad de Newcastle | Gen F | Pollitos de un 1 día | Protección completa |
| | Bursitis infecciosa | VP2 | <i>In ovo</i> o por vía subcutánea, a pollitos de 1 día | Protección completa |
| | Laringotraqueítis infecciosa aviar | Glicoproteína B | Pollos SPF Pollos de engorda | (92-100%) protección 67 y 87% no desarrolló signos clínicos |
| Virus de la influenza aviar de baja patogenicidad (H9N2) | Gen de HA y de Neuraminidasa | - | - | - |

*FHG: gen multiepítipo, consta de 6 epítomos de células B y dos epítomos de células T de FMDV; SPF: Libre de patógenos específicos.

Adenovirus

La familia *Adenoviridae* comprende 54 géneros: *Mastadenovirus*, (mamíferos incluido el humano), *Aviadenovirus* (aves), *Atadenovirus* (serpientes, lagartos, patos, gansos, aves, zarigüeyas y rumiantes), *Ichtadenovirus* (peces) y *Siadenovirus* (rapaces, periquitos y tortugas). Por lo general, causan enfermedades respiratorias o gastroentéricas agudas de diversa gravedad³⁶. Los Adenovirus (Ad) humanos son los mejor caracterizados y la mayoría de estudios de transferencia genética se han llevado a cabo con vectores derivados del serotipo 5 de Ad (Ad5)²⁴.

Los virus de esta familia no tienen envoltura, son de contorno hexagonal, con simetría icosaédrica, de 70 a 90nm de diámetro, su genoma consta de ADN lineal de doble cadena de 26 a 48kpb de tamaño, con repeticiones terminales invertidas, se replica en el núcleo y se libera por lisis celular; además, es hemoaglutinante y algunas especies han mostrado actividad oncogénica en animales de laboratorio³⁶.

Dentro del genoma del Ad los productos génicos E1A y E1B son responsables de la transformación celular y por lo tanto de la oncogenicidad (experimental) de algunos adenovirus⁶⁷.

Ciclo biológico

La replicación tiene lugar en el núcleo mediante un proceso complejo de transcripción temprana y tardía (antes y después de la replicación del ADN); los viriones se liberan por lisis celular. Se forman cuerpos de inclusión intranucleares que contienen un gran número de viriones, a menudo en matrices paracristalinas³⁶.

Cambios y modificaciones del Ad para transformarse en vector

Los principales estudios que se conocen giran en torno al Ad5 humano con aplicaciones clínicas tanto para humanos como para animales independientemente si son hospederos naturales o no²⁴.

Es capaz de transducir la mayoría de células quiescentes y en división además, después de una inyección intracraneal infecta neuronas, astrocitos, oligodendroglía, ependimocitos, epitelio coroideo y microglía⁶⁸. Cuenta con una alta capacidad de inserto de hasta 20kb y a pesar de que se replica en el núcleo su genoma

permanece de manera episomal sin riesgo de que se integre al genoma del hospedero⁶⁹. La entrada del virus en la célula mejora asociando la fibra de entrada a un correceptor de integrina, e igual que en otros virus es posible alterarla para que pueda unirse más eficientemente a otros componentes de la superficie celular y otros hospederos⁶².

Dentro del genoma la región E3 a cargo de modular la respuesta inmune del huésped a la infección por adenovirus, no es esencial para su replicación y se puede eliminar o reemplazar sin interrumpir la replicación del virus *in vitro* y por lo tanto, es uno de los sitios de inserción de ADN heterólogo cuando se construyen vectores adenovirales⁶². Otra particularidad es que el propio virión induce la expresión de citoquinas sin la necesidad de que se expresen los genes virales. Y mantiene su efecto por más tiempo de lo que se espera de infecciones virales agudas en murinos y simios²⁴.

Los vectores adenovirales proporcionan una expresión muy intensa, pero en un corto plazo (5 a 10 días) para contrarrestar esto se eliminó el gen E1 y otros relacionados con la replicación permitiendo ampliar el tiempo de expresión a 30 días sin embargo, se expresan niveles bajos de antígenos virales después de la infección y por lo tanto un nivel bajo de replicación que también disminuye el tiempo de expresión⁶⁹. Por otro lado, parece que la respuesta prolongada no se debe a que se mantiene la expresión del antígeno ya que esta tan solo duró una semana, si no a que el antígeno permanece en el cuerpo durante al menos 30 días tiempo en el cual ceba a las células T vírgenes²⁴. Aun así, puede ser apropiado su uso en vacunación o en el tratamiento de enfermedades que requieran una expresión transitoria como enfermedades cardiovasculares y cáncer⁶².

Se han construido tanto Ad-R+ ^{xvi} que requieren un título menor para ejercer su efecto y logran inducir inmunidad de las mucosas más efectiva como Ad-R-^{xvii}. No obstante, el uso de vectores Ad-R+ en hospederos permisivos da lugar a la producción de partículas infecciosas que pueden ser liberadas al medio ambiente

^{xvi} **Ad-R+**: Vectores adenovirales con capacidad de replicación en el huésped.

^{xvii} **Ad-R-**: Vectores adenovirales no replicativos, incapaces de multiplicarse en el huésped.

por lo que se busca retirarlos y permitir solo las cepas cuya inocuidad ha sido firmemente establecida²⁴. Es por esto que se prefiere el uso de Ad no replicativos o Ad-R-.

Comparando varios Ad entre si transportando al mismo ADN heterólogo se descubrió que los vectores basados en Ad5 son particularmente inmunogénicos, principalmente en la inducción de células T CD8+ específicas contra los antígenos. Provoca una fuerte inmunidad innata que al administrarla en ratones induce una inflamación intensa, acompañada de la secreción de altos niveles de citocinas proinflamatorias e inducción de la maduración de las células dendríticas²⁴. Debido a esto, el uso repetido de Ad sería bloqueado rápidamente por la respuesta humoral para contrarrestar esto se administran agentes inmunosupresores o citoquinas, pero preferentemente se intercala el uso de distintos serotipos lo cual resulta muy efectivo aun en presencia de anticuerpos neutralizantes⁶⁹.

Después de que en 1970 a un grupo militar se le administro una vacuna compuesta por Ad4 y Ad7 en forma de tabletas con recubrimiento entérico durante 25 años sin efectos adversos y proporcionando un nivel significativo de protección contra la enfermedad respiratoria aguda²⁴, se considera la posibilidad de generar respuestas sistémicas y de mucosas con vectores adenovirales, sin embargo, aún no se obtienen resultados prometedores en animales manteniendo niveles bajos o indetectables del vector aun depositándolo directamente en estómago o intestino delgado de ovinos y cerdos²⁴. En el **Cuadro 8** se enlistan las fortalezas y debilidades características de los Ad.

En veterinaria se ha estudiado al adenovirus porcino, bovino y adenovirus aviar (CELO virus) como potenciales vectores con el objetivo de inmunizar contra algún antígeno, generando en la mayoría de los casos respuestas inmunes protectoras, e incluso ha logrado producir AcN como podemos observar en el **Cuadro 9**. La respuesta más favorable se obtuvo en la protección de cerdos y bovinos contra el virus de la fiebre aftosa mediante una sola inoculación con en el vector Ad5²⁴.

Recientemente en 2020 también se generaron las vacunas Johnson & Johnson, AstraZeneca, CanSino y Sputnik V todas ellas basadas en adenovirus⁷⁰ dirigido a proteger contra el SARS-CoV 2 en humanos.

Cuadro 8. Fortalezas y debilidades del uso de adenovirus como vector viral ^{69, 71.}

| Fortalezas | Debilidades |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Amplio tropismo por células quiescentes ^{XVIII} y en división salvo células hematopoyéticas. | Altamente inmunogénico. |
| Transporta 20 kb de ADN heterólogo. | El genoma del vector no se integra en el genoma de la célula huésped. |
| Garantiza altos niveles de expresión transgénica y facilidad de producción. | Expresión transitoria del transgén. |
| Muy adecuado como vector oncolítico. | Altos niveles de inmunidad preexistente. |
| Produce títulos altos (10^{10} ufp / ml). | |
| Puede ser usado como replicante o no replicante. | |
| Baja recombinación en el genoma. | |
| Expresión transitoria del gen por 60 días. | |

^{XVIII} **Quiescentes:** células que no se dividen.

Cuadro 9. Adenovirus usados como vectores en medicina veterinaria ²⁴

| Vector | Patógeno objetivo | Antígeno expresado | Especies | Respuesta inmune |
|-------------------------------|------------------------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Adenovirus porcino | Virus de la peste porcina clásica | Gp55 | Cerdos | Protegió contra la exposición virulenta con 1 dosis |
| Adenovirus porcino | Virus de Aujeszky | GpD | Cerdos | Protegió a los cerdos contra el desafío |
| Adenovirus ovino | Virus de la hepatitis murina | NS3 | Ratón | Genera células T secretoras de IFN específicas de NS3 en ratones |
| Adenovirus bovino | Herpesvirus bovino tipo 1 | GpD | Bovinos | Indujo respuestas protectoras en terneros |
| Adenovirus canino serotipo 2 | Virus de la rabia | Glicoproteína | Ratón, Perro, gato | En perros, la inoculación Sc de un Ad replicante genero AcN y protegieron contra el desafío letal En gatos la inoculación IM generó AcN y protección |
| Cav2 | Virus de la panleucopenia felina | VP2 | Gatos | Provoco AcN en todos los gatos y protegió contra la enfermedad |
| Cav2 | Virus de la fiebre aftosa | VP1 | Cerdos | Dio lugar a una respuesta humoral, incluida la inducción de AcN, en cerdos |
| CELO virus (adenovirus aviar) | Bursitis infecciosa | PV2 | Gallinas/ <i>in ovo</i> | Indujo protección tras la inyección en pollos o en huevos |
| Adenovirus porcino | Virus de la gastroenteritis transmisible | Proteína spike | Cerdos | A la vacunación oral indujo AcN específicos de TGEV en cerdos y se detectó IgA específica en intestino y pulmones de animales inmunizados |
| Adenovirus de ave | Bronquitis infecciosa aviar | Subunidad spike | Gallinas, Pollos | Resultaron protegidos después de la vacunación oral |

Virus Adenoasociados

Los virus adenoasociados (AAV) fueron descubiertos como contaminantes no patógenos en preparaciones de adenovirus en 1965, pertenecen a la familia *Parvoviridae* y a el género *Dependovirus*³³ tienen 4.7 Kb y están constituidos por ADN de cadena sencilla, requieren de un adenovirus o de un herpesvirus que coopere con sus funciones para que se puedan replicar⁷².

Las proteínas en la cápside viral diferencian a los serotipos de AAV y les confieren tropismos tisulares característicos⁷³, hasta ahora se han descubierto 12 serotipos de AAV humanos (AAV1-AAV12) y 100 en primates no humanos. El AAV2 ha sido el más estudiado y el primero en ser aprobado para terapia de reemplazo genético (**Cuadro 11**) para el tratamiento de amaurosis congénita de Leber en humanos⁷³, hemofilia B (hígado), fibrosis quística (pulmón) y la enfermedad de Parkinson (cerebro)¹⁶.

Ciclo biológico

Consta de dos etapas: lítica y lisogénica.

El ciclo lítico ocurre solo en presencia de un virus ayudador que puede ser adenovirus o herpesvirus en esta etapa ocurre una replicación activa, expresión genética y producción de viriones infecciosos. En ausencia del virus auxiliar el AAV entrará al ciclo lisogénico en el cual se integra como ADN de doble cadena en el genoma de la célula hospedera en un locus^{xix} específico gracias a la recombinación dirigida por la región viral rep, manteniéndose latente hasta que se produzca una infección por adenovirus o herpesvirus⁷⁴.

^{xix}**Locus:** Lugar específico del cromosoma donde está localizado un gen o una secuencia de ADN.

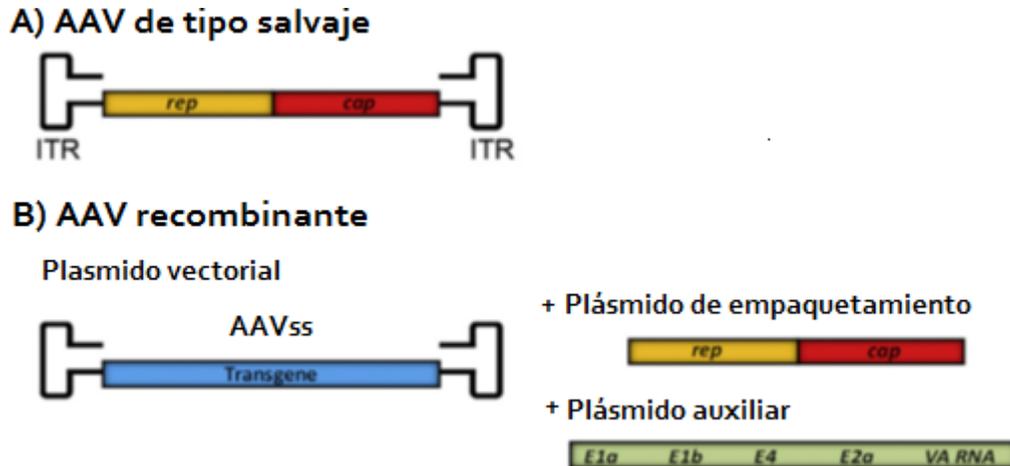


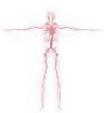
Figura 4. Diseño del genoma del vector AAV recombinante. (A) El genoma de AAV de variantes virales de campo consta de los genes *rep* y *cap* virales entre ITR^{XX}. (B) ADN monocatenario (AAVss) conteniendo el transgén, los genes de empaquetamiento (*rep* y *cap*) y auxiliares (*E1a*, *E1b*, *E2a*, *E4* y VA ARN) se administran en plásmidos individuales para completar la replicación del AAV y adquirir el transgén (modificado de⁷⁵).

Características y modificaciones de los AAV para transformarse en vector

Entre sus características destacan su amplio tropismo transduciendo desde pulmón, hígado, músculo, retina, células madre hematopoyéticas, líquido sinovial articular, células endoteliales, intestino⁷⁴, hasta neuronas y en algunos casos astrocitos, microglía y oligodendrocitos⁵⁸, pero son especialmente eficaces en miotúbulos de músculo estriado principalmente en fibras de contracción lenta que rápida y neuronas maduras. Bazo y timo son menos eficientemente transducidos por vectores AAV⁷⁴.

^{XX} ITR: Regiones repetidas de forma invertida.

Figura 5. Serotipos de virus adenoasociados (1-9) y su tropismo celular ^{33, 72}.

| Serotipo/ Tropismo |  Sistema nervioso central |  Músculo esquelético |  Retina del epitelio vascular |  Páncreas |  Célula lisa |  Hígado |  Riñón |  Corazón |  Pulmón |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| AAV1 | X* | X | X | X | | | | X | |
| AAV2 | X* | X | | | X | X | X | | |
| AAV3 | | X | | | | X | | | |
| AAV4 | X* | | X | | | | | | |
| AAV5 | X* | X | X | | | | | | X |
| AAV6 | | X | | | | | | X | X |
| AAV7 | X* | X | X | | | | | | |
| AAV8 | X* | X | X | X | | X | | X | |
| AAV9 | X* | X | | X | | X | X | X | X |

AAV: Virus adenoasociado

*Hasta el momento el AAV9 es el único serotipo presente en la naturaleza que ha demostrado atravesar la barrera hematoencefálica

Los AAV permiten la eliminación y remplazo de los genes rep (replicación) cap (proteínas estructurales) solo conservando los extremos ITR indispensables para el empaquetamiento, síntesis de la segunda cadena e integración de los transgenes ⁷⁴ pese a que eliminan la mayor parte del genoma solo es posible transportar de 4,5⁵⁸-5,2kpb de ADN y 5kpb en células musculares o neuronales⁶² por lo que se sigue trabajando para expandir su capacidad desarrollando híbridos de parvovirus por ejemplo B19/AAV47, uso de promotores más pequeños o usar la actividad promotora del ITR de AAV, heterodimerización ^{XXI} de distintos vectores AAV permitiendo extender la capacidad de inserto a 10kb⁷⁴.

La integración en el genoma si llegara a suceder es al azar⁷², en todos los serotipos excepto el serotipo AAV1 que se integra en un locus específico en el cromosoma 19 (C-19) y está dado por las proteínas generadas a partir de la secuencia rep (helicasa y endonucleasa). Sin embargo, el gen rep es eliminado para tener mayor capacidad de inserto y por su alta toxicidad³³; por otra lado, la ausencia de este gen propicia que AAV se integre en puntos heterogéneos del genoma del huésped a través de

^{XXI} **Heterodimerización:** Unión de dos moléculas diferentes en una entidad activa funcionalmente.

las secuencias ITR, para evitar esto se agrega una proteína rep regulable por RU486 lo que favorece su correcta integración en el cromosoma 19 (C-19)⁷⁴.

Sin embargo, AAV1 silvestre es capaz de interrumpir la expresión de C-19 asociado al gen TNNT1 que codifica isoformas de troponina 1 expresadas en músculo esquelético por lo que representa un riesgo para las células musculares (multinucleadas)^{74, 76}.

Dado que requiere de auxiliares para completar su replicación se tenía la incógnita de si mantendría la expresión en ausencia de estos y parece no ser relevante su presencia, manifestando eficiente infección y expresión génica estable a largo plazo en parénquima cerebral y células musculares⁶². Una de las particularidades de los AAV es que forman concatámeros ^{XXII} integrados o episomas circulares de secuencias de entrada que podrían servir como plantillas para la expresión episomal independientemente de la integración⁷⁴.

Entre las observaciones más interesantes en cultivos de células musculares humanas después de la infección con el vector AAV la mayoría de ADN de cadena sencilla desaparecía, pero durante esta etapa y la posterior los niveles de expresión transgénica aumentaban, esto estaba asociado a la transformación del ADNss a ADNds⁵⁸ por lo que al acelerar la presentación de ADNds se puede mejorar la expresión de nuestro transgén, e integrando la proteína ssD-BP capaz de regular la síntesis de la cadena complementaria podemos potenciar y asegurar que se lleve a cabo este proceso.

Para mejorar la transferencia del gen se debe perfeccionar la interacción con los receptores celulares, estimular la conversión eficiente de AAV monocatenario a AAV de doble cadena y lograr la apropiada expresión del transgen⁷⁴.

El tiempo que se mantiene la expresión varía según el tipo de tejido transducido por ejemplo en ratas a la administración intramuscular con el AAV-lacZ se mantuvo una expresión de varios meses hasta 1,5 años, en perros se mantuvo igualmente por 1,5 años, en cardiomiocitos se obtuvo una expresión de 2 a 3 meses, en el sistema

^{XXII} **Concatámero**: es una molécula de ADN que contiene múltiples copias de una misma secuencia de nucleótidos dispuestas en serie.

hematopoyético se obtuvo una expresión a largo plazo y en ocasiones incluso logró corregir completamente el trastorno hematológico⁷⁶.

Los AAV son apatógenos en mamíferos y humanos⁷², pese a esto, se debe tener cuidado al administrarlo en sitios localizados (espacio articular, parénquima cerebral) ya que la infección de estos crea desafíos inmunológicos mucho más fuertes que los generados por una infección natural⁷³.

En cuanto a la respuesta inmune aun cuando el ser humano es su huésped natural y posee anticuerpos contra el serotipo más común AAV2 solo una minoría es capaz de neutralizar las infecciones por AAV in vitro y parece ser que el AAV transduce adecuadamente aun en presencia de AcN⁷⁴.

Las CPA no son transducidas eficientemente y no proliferan esto explica la falta de respuestas inmunitarias celulares^{33, 58}, pero manteniendo una buena respuesta humoral contra las proteínas de cápside del vector. Aun así, la respuesta inmune generada puede verse afectada debido a factores asociados al individuo⁷³, al transgén, presencia de contaminantes (virus o proteínas auxiliares) y a la administración (sitio, dosis)⁷⁴.

La homología entre los diferentes serotipos de AAV puede variar mucho entre algunos AAV lo que permite transfectar distintos tipos celulares y dotándolos de características particulares, esto hace que sean más eficientes transduciendo un tipo celular que otro⁷³; por ejemplo, a la administración en parénquima cerebral el: AAV4 transduce mejor endotelios, AAV2 neuronas y el AAV5 neuronas y astrocitos aparte de que es 130-300 veces más eficaz que el AAV2⁵⁸. La posibilidad de reactividad cruzada puede eliminarse fácilmente intercalando diferentes serotipos⁷⁴.

Además, los serotipos AAV 1, 5, 9, y 10 transducen mejor en SNC, y el 9, 8 y 10 pueden ingresar a SNC desde la circulación sanguínea y a lo largo de vías neuronales específicas después de la inyección parenquimatosas, lo que permite administrar el gen ampliamente dentro de SNC. Para aprovechar esta propiedad se deben conocer las variaciones entre patrones de transporte dentro de sistemas cerebrales, así como, entre especies para que sea aplicado de forma efectiva⁵⁸.

Otro hallazgo importante de los AAV es que sensibilizan a las células frente a drogas terapéuticas, de tal forma que la infección con el virus AAV2 incrementa la fragmentación de las células Hela y de las A549 que induce la quimioterapia con cisplatino⁷².

En cáncer se probó como vector para transportar productos antiangiogénicos contra el factor de crecimiento endotelial vascular transduciendo eficientemente las células y logrando inhibir la proliferación de células endoteliales capilares⁷⁶.

A diferencia de los vectores Ad la producción de vectores AAV requiere mucha mano de obra y tiempo ya que requiere de plásmidos auxiliares o líneas celulares que le provean de las proteínas necesarias para completar su replicación, además, se corre el riesgo de contaminación con el plásmido auxiliar y también la posibilidad de generar viriones vacíos. A pesar de esto pueden concentrarse y purificarse a títulos muy altos⁵⁸. Su capacidad de empaquetamiento se restringe cuando se lleva a cabo a gran escala lo que genera una producción ineficiente⁷².

En el **Cuadro 10** se resumen las fortalezas y debilidades que expresan los AAV.

Cuadro 10. Fortalezas y debilidades de los virus adenoasociados ^{58, 72-76}.

| Fortalezas | Debilidades |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Transduce células quiescentes y en división. | Lleva ADN heterólogo de hasta 5-5,2 |
| No son patógenos. | Kb. |
| Buena respuesta humoral. | Producción ineficiente a gran escala. |
| Muy utilizado en SNC y como terapia génica. | Necesita coinfección por virus auxiliar |
| Alto potencial en tratamientos musculares y oncolíticos. | (adenovirus o virus del herpes simple). |
| Permanece como concatámeros o episomas circulares. | Riesgo de mutación por inserción. |
| El tamaño de inserto puede ampliarse con heterodimerización. | Integración potencial en sitios específicos. |
| El tiempo de expresión varía según el tipo celular de meses hasta 1,5 años. | Respuesta celular inexistente o reducida. |

Cuadro 11. Vectores AAV enfocados a diferentes aplicaciones clínicas ¹⁶

| Órgano | Enfermedades objetivo | Serotipos | Candidatos vectores emergentes |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Hígado | Hemofilia, deficiencia de a-1 antitripsina, deficiencia de ornitina transcarbamilasa | AAV8 | AAV2(Y→F), AAV7, AAV-HSC15/17 |
| Corazón | Falla cardíaca congénita, cardiomiopatías | AAV1, AAV6, AAV9 | AAVM41, AAV218, AAV9.45 |
| Esqueletos | Distrofias musculares, deficiencia de a-1 antitripsina | AAV1, AAV6, AAV9 | AAV7, AAV2.5, AAV6 |
| Músculo | Deficiencia de lipoproteína lipasa, trastorno de almacenamiento lisosomal | | (Y445F/Y731F), AAV218, AAV9.45 |
| Pulmón | Fibrosis quística, deficiencia de a-1 antitripsina | AAV5 | AAV6.2, AAV25T, AAV-HAE1/2 |
| SNC | Parkinson, Alzheimer, epilepsia, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia espinal muscular, síndrome de rett, trastorno de almacenamiento lisosomal | Intracraneal: AAV1, AAV5, AAV8 Sistémico: AAV9 | Para uso sistémico: AAVrh 10, Clon AAV 32/83 |
| Ojo | Amaurosis congénita de Leber, degeneración macular | AAV4, AAV8 | AAVShF10, AAV2 (Y→F), AAV8(Y733F) |

Baculovirus

Los *Baculovirus*, o *nucleopoliedrovirus* (VPN) llamados así debido a las inclusiones que hacen en el núcleo de las células infectadas, se han usado ampliamente desde 1980⁷⁷ con la finalidad de producir una proteína o expresar simultáneamente varios genes, son miembros de la familia *Baculoviridae* que incluye a los géneros *Granulovirus* y *Nucleopoliedrovirus*⁷⁸. Son virus grandes con envoltura y genoma ADN circular bicatenario de 80-180 kbp. Hasta ahora solo se han encontrado en los artrópodos y su rango de hospedadores es restringido a estos por lo que se utilizan con éxito para el control de plagas de múltiples insectos²⁴.

El baculovirus más estudiado es *Autographa californica multiple núcleo-polyhedro virus* (AcMNPV). El ADN genómico del AcMNPV es de 134 kpb, está empaquetado en una nucleocápside con forma de varilla cuya longitud es proporcional al tamaño del genoma, lo que permite la inserción de grandes segmentos de ADN extraño²⁴.

Ciclo biológico

En la naturaleza, los viriones de baculovirus se encuentran incrustados en una matriz proteica paracristalina formada principalmente por una sola proteína llamada poliedrina (polh). Una vez ingerido por las orugas susceptibles, la matriz se disuelve en el intestino del insecto y el virión (ODVs; virus derivados ocluidos) se fusionarán a las células epiteliales, luego las nucleocápsides migrarán al núcleo estableciendo la infección primaria. Como parte de su replicación bifásica, las células infectadas producen otro tipo de virión (VB; virus brotado) que facilita la entrada viral por endocitosis en otros tipos de células, y el establecimiento de una infección sistémica en las larvas de insectos⁷⁹ (**Figura 6**).

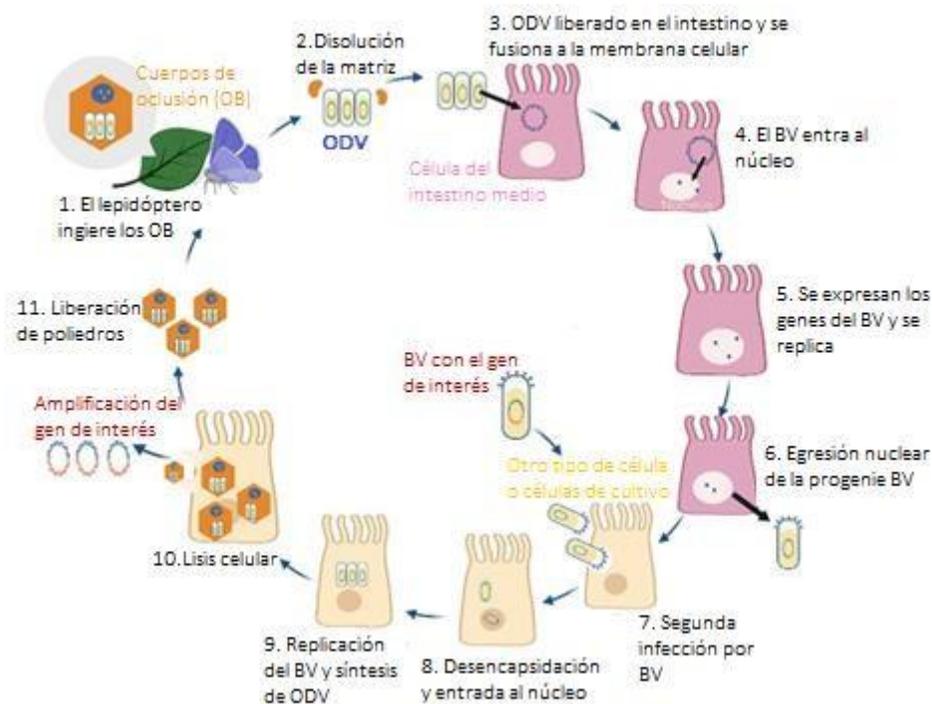


Figura 6. Ciclo de replicación del baculovirus y su modificación a vector viral (modificado de ⁸⁰). (1) el lepidóptero consume plantas infectadas con cuerpos de oclusión de baculovirus (2) se disuelve la matriz de poliedrina en el intestino del insecto (3) los virus derivados de la oclusión (ODV) son liberados en el intestino medio y se fusionan a la membrana celular (4) el baculovirus **brotado** (BV) entra al núcleo. (5) Expresión y replicación del gen BV. (6) sale la progenie de BV. (7) infección secundaria con BV portador del gen de interés utilizando células cultivadas. (8) desencapsidación y entrada al núcleo. (9) replicación del BV y síntesis de ODV. (10) lisis celular y amplificación del gen de interés (11) liberación de poliedros

Características y modificaciones del baculovirus para transformarse en vector

Después de descubrir a los baculovirus en 1983, estos se comenzaron a emplear como sistemas de producción de proteínas recombinantes al que llamaron BEVS ^{XXIII} (Cuadro 14) que consiste en la infección de una célula de insecto con un baculovirus que contenga el gen que codifica para nuestra proteína de interés⁸¹ usando como promotores al promotor de polh y los genes p10 que impulsan la expresión de genes tardíos y en nuestro caso del gen heterólogo⁷⁸.

Se caracteriza por ser el método más simple, seguro, rápido y económico para la producción de proteínas recombinantes a comparación de sistemas tradicionales

^{XXIII} **BEVS**: Baculovirus Expression Vector System o sistema de expresión en baculovirus. Sistema de expresión con base en células de insecto-baculovirus.

basados en células eucariotas o procariotas, ha sido utilizado ampliamente para la producción rápida y eficaz de vacunas basadas en *virus like particles* (VLPs)^{xxiv} incluso durante emergencias epidémicas⁸¹, el **Cuadro 13** menciona algunos ejemplos de uso comercial.

Como sistema de expresión el BEVS se ha utilizado para mejorar la expresión de vectores virales que no tienen una producción tan eficaz, como es el caso del AAV³³ que se ve limitado al requerir virus auxiliares que le provean las proteínas necesarias para su replicación, a partir de esto el BEVS bajo los sistemas *ThreeBac System*, *TwoBac system* y *OneBac system*^{xxv}, logró que las células de insecto expresaran AAV recombinantes y redujo los costos generales⁸¹.

Después del surgimiento de la ingeniería genética, los baculovirus también pueden ser empleados como medio para entregar material genético o expresar proteínas en la célula blanco, es decir ser utilizado como vector viral, a esta herramienta biotecnológica se le llamó BacMam^{xxvi} este sistema es producido mediante cualquier plataforma BEVS; consta de un promotor que generalmente es el del Citomegalovirus en lugar de polh⁸², el casete de expresión que nos interesa y otros elementos necesarios para regular la transcripción y traducción de la proteína de interés igual que en cualquier otro vector viral.

Los baculovirus como vectores virales tienen un amplio tropismo celular, son eficientes y seguros al entregar genes en células de mamíferos²⁴ ya que los promotores génicos de insecto no están activos en estas células, tiene una alta tasa de expresión, puede expresarse durante la fase de oclusión⁸³, aceptan grandes insertos (38kbp) y manifiestan un buen perfil inmunogénico que activa respuestas humorales y de células T CD8, además, puede funcionar como adyuvante inmunológico contra antígenos coinyectados, la limitante es que la expresión solo dura entre 7 y 14 días pos inoculación^{24 81}.

^{xxiv} **VLPs**: Virus Like particles Partículas similares a virus.

^{xxv} **OneBac system**: Hace referencia al número de baculovirus empleados en el BEVS.

^{xxvi} **BacMam**: Baculovirus aplicados en mamíferos.

Los baculovirus recombinantes se obtienen inicialmente reemplazando el gen de la poliedrina de AcMNPV, estos se cotransfectan en células de insecto Sf21 con una mezcla del ADN viral y el vector donante y finalmente se aísla y purifica el recombinante⁸¹.

Con el fin de manejar baculovirus más simples, se ha reducido el tamaño de su genoma, sin embargo, esto genera que varios genes naturales del baculovirus presenten defectos a la hora de expresar genes foráneos en su conformación, aun así, es posible reemplazar varios loci en el genoma de AcMNPV con moléculas heterólogas⁸⁴.

Inicialmente, los virus se inactivaban en presencia de suero nativo mediante el sistema de complemento, para superar este problema se le añadió el factor humano acelerador del deterioro en la envoltura viral, lo que no solo inhibió la inactivación por complemento si no también mejoró la transferencia de genes en ratas recién nacidas. Otra solución fue pseudotipar los virus BacMam con la proteína G del Virus de la estomatitis vesicular (VSV), esto los volvió resistentes a la inactivación por sueros animales. Además, requiere una dosis 10 veces menor de virus para inducir una respuesta inmune celular específica²⁴.

Derivado del BacMam surge el *Baculovirus display technology*, esta tecnología utiliza al baculovirus como presentador de antígenos al mostrar proteínas o péptidos inmunogénicos desplegados en su superficie. La presentación del antígeno se logra al fusionar a la glicoproteína gp64 a las proteínas de interés⁸¹.

En terapia oncológica se ha demostrado que AcMNPV induce inmunidad adquirida antitumoral; es decir, es un potencial virus o agente de terapia tumoral que induce inmunidad innata y adquirida⁸⁵. Encima de esto, también se han considerado para el desarrollo de pruebas diagnósticas en terapia génica y cáncer⁸¹.

A continuación, el **cuadro 12** resume las fortalezas y debilidades del baculovirus como vector.

Cuadro 12. Fortalezas y debilidades del Baculovirus como vector ^{84, 78}

| Fortalezas | Debilidades |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Alta expresión del gen de interés. | Requiere de incubadoras de agitación |
| Alto margen de seguridad. | continua de alto rendimiento. |
| No replica en células de vertebrados. | Menor tasa de expresión comparada con |
| Se obtienen altos títulos de la proteína de interés. | un sistema procarionte. |
| Es fácil de producir en laboratorio. | |
| Baja citotoxicidad en comparación a virus de mamíferos. | |
| Los mecanismos para la modificación postraducciona l de las proteínas en los sistemas de los insectos son similares a los de los sistemas de los mamíferos. | |

Cuadro 13. Productos derivados de BEVS con licencia para uso comercial ⁸⁶

| | Producto | Manufactura | Tipo de producto |
|----------------------------------|---------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| FPC | Porcilis Pesti | MSD Animal Health | Vacuna de subunidades |
| | Bayovac CSF E2/ Advasure* | Bayer AG/Pfizer Animal Health | Vacuna de subunidades |
| Circovirus porcino tipo 2 | Circumvet PCV | Merck Animal Health | VLP |
| | Ingelvac CircoFLEX | Boehringer Ingelheim Vetmedica | VLP |
| | Porcilis PCV | MSD Animal Health | VLP |

*Descontinuado; CSF Classical swine fever; PCV Circovirus porcino.

Cuadro 14. Productos farmacéuticos producidos mediante BEVS y autorizados para su uso en humanos y animales ⁸⁷

| Manufactura | Patógeno objetivo | Año | Antígeno expresado | Línea celular |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Bayobac CFS (Bayer) | Fiebre porcina clásica | 2002 | gEnv E2 | Sf9 |
| Porcilis Pesti (Intervet-Schering-Plough) | Fiebre porcina clásica | 2004 | gEnv E2 | Sf9 |
| Porcilis PCV (Intervet-Schering-Plough) | Circovirus porcino 2 (PCV) | 2004 | ORF2 | Sf9 |
| Cervarix (Glaxo Smith Kline) | Papilomavirus humano | 2007 | L1 | Sf9 |
| Ingelvac Cicoflex (Boehringer Ingelheim Vetmedica) | Circovirus porcino 2 | 2009 | ORF2 | High five ® |
| Priovenge (Dendreon) | Cáncer de próstata (inmunoterapia) | 2010 | Ácido prostático- fosfatasa ligada al factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos | Express SF + ® |
| Best-H5 (Boehringer Ingelheim Vetmedica) | Virus de la influenza aviar | 2012 | Hemaglutinina del virus de la influenza | Sf21 |
| Glybera (uniQure) | Restaurar la enzima lipoproteína lipasa | 2012 | Vector de Virus adenoasociado tipo 1 | Express SF + ® |
| Flublock (Protein Sciences corporation) | Influenza estacional | 2013 | Three HA, H1, h3 y B | Express SF + ® |

Retrovirus

Los retrovirus fueron llamados así a mediados de la década de 1970, después del descubrimiento de una enzima clave, la transcriptasa inversa (RT) la cual refleja la propiedad de los retrovirus para usar su genoma de ARN como molde para generar ADNds proviral mediante RT, este ADNds posteriormente se transporta al núcleo, donde es integrado de forma estable en el genoma del huésped gracias a una enzima llamada integrasa^{62, 36}.

Los viriones miden de 80 a 100 nm de diámetro y están conformados por un genoma diploide, formado por un dímero de dos moléculas de ARN lineal de sentido positivo, monocatenario, cada uno de un tamaño de 7 a 11 kb rodeado por una nucleoproteína interna con simetría helicoidal y una cápside icosaédrica, a su vez rodeada por una envoltura con glicoproteínas (proteínas de superficie y transmembrana)³⁶.

Dependiendo del retrovirus y su respectivo huésped, pueden ser agentes causales de ciertos tipos de cáncer, trastornos inmunosupresores, enfermedades inmunomediadas, o pueden existir como componentes estables del genoma del hospedador. Algunos retrovirus de relevancia en veterinaria son causantes de enfermedades como leucosis aviar, leucemia felina e inmunodeficiencia felina^{58, 36}.

Ciclo biológico

Primero el retrovirus se une a su receptor específico logrando entrar al citoplasma una vez ahí se desencapsida y libera tanto su ARN de cadena sencilla como sus proteínas virales una de ellas la transcriptasa inversa que complementará las bases de la cadena de ARN obteniendo así ADN de doble cadena para finalmente obtener copias del ARN viral, a partir de este, luego el provirus se trasladará al núcleo y se integrará en el genoma de la célula hospedadora de forma permanente con la ayuda de la integrasa. La segunda fase incluye la síntesis y procesamiento de los genomas, ARNm y proteínas virales con los recursos celulares, bajo la influencia de productos génicos virales. Los viriones se ensamblan y liberan de la célula por gemación de la membrana; las proteínas de la membrana celular del hospedador a

menudo se incorporan en la envoltura del virus. La integración viral ocurre durante la fase S del ciclo celular; por lo que las células que no se dividen son resistentes a la infección retroviral. Sólo los lentivirus son capaces de infectar células que no se dividen⁸⁸.

Características y modificaciones del retrovirus para transformarse en vector

Los retrovirus más estudiados y caracterizados para la transfección de genes derivan de modificaciones del *Virus de la leucemia murina de Moloney* (MoMLV)⁶², el *Virus del sarcoma de Rous* y el *Virus de la inmunodeficiencia humana* (VIH)⁷².

Entre las preocupaciones del uso de retrovirus destaca la mutagénesis insercional debido al ciclo infectivo natural de los retrovirus, ya que estos insertan su genoma en el de la célula huésped permitiendo la posibilidad de que se vuelva parte integral y sustancial del genoma produciendo la expresión permanente del gen insertado que podría causar efectos inesperados e indeseados en el genoma celular como la interrupción de un gen esencial para la biología de la célula en cuyo caso teóricamente solo afectaría la integridad de las células infectadas sin provocar ningún daño al organismo⁷².

Sin embargo, si el gen inactivado está relacionado con un gen supresor de tumores, se desencadenaría un proceso tumoral. Además, el hecho de que contenga secuencias promotoras a ambos lados abre la posibilidad de que genes contiguos al provirus posteriores en cuanto a la dirección de transcripción de éste puedan ser anómalamente activados por la propia integración proviral y podría disparar un proceso tumoral^{89, 90}. Estas sospechas fueron confirmadas en el año 2002 al utilizar un gen marcador para señalar células de médula ósea de ratón que fueron trasplantadas en animales irradiados sin ningún efecto adverso. Sin embargo, cuando las células de estos ratones iniciales fueron trasplantados a un segundo grupo de ratones, muchos desarrollaron leucemia mieloide; después de un análisis exhaustivo, se comprobó que el gen celular Evi1 que codifica un factor de transcripción que en cooperación con el producto del transgén contribuyó a la aparición de este tipo de leucemia. Poco tiempo después, también se vio reflejado en pacientes humanos a los que se les suministraba un gen terapéutico *ex-vivo*

desde el año 2000 con resultados positivos a células madre hematopoyéticas mediante un vector retroviral, pero dos años después apareció un caso de leucemia cuyo análisis demostró que se debía a una proliferación desmesurada de linfocitos T que habían recibido al transgén y en donde se hallaba integrado el provirus en el cromosoma 11 cerca del gen implicado en la aparición de leucemias juveniles a este caso se sumaron dos más, uno con síntomas y el otro asintomático, pero gracias al seguimiento pudo darse el tratamiento oportuno a todos los pacientes⁸⁹.

Es por esto que se prefieren retrovirus deficientes en replicación a través de la eliminación y sustitución de genes que codifican para proteínas estructurales y relacionadas con la replicación como la secuencia psi (empaquetamiento del virión), gag, pol y env donde posteriormente se podrá colocar los genes de interés de hasta 8kb⁷². La falta de proteínas virales no solo lo vuelve deficiente en replicación, además, reduce su antigenicidad, lo que promueve una expresión génica persistente; en contraste, al inestabilizar a la partícula viral, la envoltura se torna más frágil, por lo que genera títulos virales bajos e incapacidad para transducir células en división⁹¹.

Para resolver este problema se implementó una tecnología denominada «pseudotipado» que consiste en remplazar la envoltura del retrovirus por la de otro virus con el fin de conferir resistencia mecánica suficiente para la producción de partículas virales; en el caso de retrovirus, se ha utilizado la glicoproteína G de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular⁸⁹

Otro inconveniente del uso de retrovirus es la alta frecuencia de mutaciones, debido principalmente a la falta de un mecanismo de corrección de nucleasas²⁴.

Por otro lado, se piensa que los retrovirus humanos endógenos (VRHE) podrían reactivar la habilidad replicativa de los retrovirus, sin embargo, esto no es posible debido a que VRHE y MoMLV son diferentes en cuanto a el promotor, al *enhancer* y al sitio de unión del ARNt utilizados. Además, las secuencias de VRHE *gag*, *pol* y *env* también están ausentes en MoMLV lo que reduce su capacidad de empaquetamiento y replicación por lo que existe una baja probabilidad de que se vuelva replicativo; también aplica en casos concomitantes con VIH⁹².

Entre las ventajas del empleo de retrovirus se encuentra la estabilidad funcional y estructural de las formas integradas del vector⁷² y que son capaces de infectar una amplia gama de tipos celulares. Sin embargo, ya que derivan de oncoretrovirus precisan que las células estén en división para que la forma de provirus (ADN) pueda integrarse en el genoma, con lo que su empleo se restringe a células en división activa^{67, 93}, además, parece haber ciertos lugares de inserción preferenciales⁷². Aun así, puede convertirse en una ventaja en la terapia *ex vivo* y el tratamiento del cáncer, ya que las células cancerosas que se dividen activamente en un tejido que normalmente no se divide, como el cerebro, pueden infectarse y eliminarse selectivamente sin mayor riesgo para las células normales⁶². En el **Cuadro 15** se enlistan las fortalezas y debilidades de este vector.

Cuadro 15. Fortalezas y debilidades de los Retrovirus como vectores ^{24, 62, 67, 91, 72.}

| Fortalezas | Debilidades |
|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Capacidad de inserto de hasta 8kb. | Probabilidad de mutagénesis insercional. |
| Induce respuestas protectoras de linfocitos T citotóxicos ²⁴ . | Alta frecuencia de mutaciones. |
| Se integra al genoma. | Riesgo de activación oncogénica. |
| Estabilidad genética. | Solo transduce células en división. |
| Baja probabilidad de reversión a la virulencia. | . |
| Expresión duradera de antígenos. | |
| Uso como anticancerígeno y en terapia <i>ex vivo</i> . | |

Lentivirus

Los Lentivirus son un género perteneciente a la familia *Retroviridae*, se les considera más complejos debido a la presencia de varios otros genes reguladores y “accesorios” en su genoma⁷².

Muchos de los vectores lentivirales que se utilizan en terapia génica se basan en el VIH tipo 1 y 2 aunque también se ha utilizado el virus de inmunodeficiencia simiaca (SIV), virus de inmunodeficiencia felina (FIV) y virus de la anemia infecciosa equina (EIAV)⁵⁸. Provocan enfermedades tales como lentivirus de pequeños rumiantes (Maedi-visna y Artritis encefalitis caprina), anemia infecciosa equina, inmunodeficiencia bovina, felina y humana³⁶.

Características y modificaciones del lentivirus para transformarse en vector

La principal ventaja de los LV es que pueden transducir células en división y quiescentes⁹⁴, por lo tanto se pueden utilizar para la expresión de transgenes en neuronas⁷². Además, poseen una capacidad de inserto bastante aceptable (10 kb)⁶⁷, pero producir títulos suficientemente altos de este vector es muy difícil⁹¹.

Por otro lado, se puede ampliar su número de hospederos a partir del pseudotipado con VSV-G, MoMLV, virus de Mokola, virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) y la rabia. La inmunidad preexistente es nula en la mayoría de los huéspedes, por ejemplo, en personas con VIH en un inicio se esperaría que eliminara el vector debido a la existencia de anticuerpos, sin embargo, las proteínas de la cápside del VIH parecen tener una vida media corta, lo que reduce la posibilidad de que el sistema inmune pueda reconocer las células transducidas⁵⁸. No transfieren secuencias que codifican proteínas relacionadas con el empaquetamiento, minimizando así el riesgo de que las células transducidas por vectores sean atacadas por linfocitos T citotóxicos específicos⁶⁷.

Otra característica de este virus es su capacidad de integrarse en el genoma, solo que a frecuencias más bajas que otros retrovirus, además, de ser mucho más estable^{91,94} lo que permite mantener la expresión del transgén a largo plazo, por ejemplo, en cardiomiocitos de ratones se ha mantenido por cinco semanas⁹⁵. Para

el VIH, este proceso es facilitado por la proteína integrasa, la proteína matriz, *vpr* y el PPT. Sin embargo, la progresión a través del ciclo celular es necesaria para transducir algunos tipos de células⁹⁴. Debido a que la posibilidad de provocar mutaciones está latente, se estudia la posibilidad de mantener a los LV de forma episomal; uno de estos estudios logró mantener la expresión episomal cerca de 1 año en células hematopoyéticas de ratones, pero debe limitarse su uso hasta tener claros los mecanismos por los cuales ocurre esto⁹⁶.

Por último, en LV no hay evidencia que confirme transformación celular, lo que los vuelve más seguros. Para aumentar la seguridad, los LV se diseñan para ser autoinactivables, donde el promotor y el potenciador de la LTR se eliminan de la forma integrada del provirus, esto a la vez elimina la competencia del promotor del casete de expresión⁵⁸.

En el **cuadro 16** se enlistan las fortalezas y debilidades de los Lentivirus.

Cuadro 16. Fortalezas y debilidades de los vectores Lentivirales ^{58, 67, 91, 94}

| Fortalezas | Debilidades |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Infectan células quiescentes y en división. | Riesgo de activación oncogénica. |
| Infecta células neuronales. | Probabilidad de mutagénesis insercional, |
| Tiene una capacidad de transporte de 10kb. | aunque a frecuencias más bajas que el retrovirus. |
| Se integra al genoma de forma estable. | Produce títulos bajos. |
| Terapia génica. | |
| Puede ampliar el número de hospederos que infecta. | |
| Inmunidad preexistente nula o muy reducida. | |
| Expresión a largo plazo. | |
| No generan transformación celular. | |

VECTORES VIRALES ARN

A diferencia de los vectores virales ADN los ARN requieren de sistemas de genética inversa para poder ser replicados, esta técnica permite obtener ADNc transcrito inversamente a partir de un genoma ARN completo o análogos de genomas truncados además, permite la inserción de mutaciones y unidades de transcripción adicionales⁹⁷. El virus de la rabia fue el primero en obtenerse siguiendo esta metodología en 1994²⁴, luego le siguieron otros virus ARN (-).

Los sistemas de genética inversa incluyen, los sistemas de minigenomas (MG), partículas pseudovirales (iVLP) y clones infecciosos de longitud completa (IFLC). Estos sistemas, además de permitirnos replicar y manipular ARN, son capaces de recapitular algunos o todos los pasos del ciclo de replicación viral, las interacciones virus-huésped, su patogénesis y su proceso evolutivo⁹⁸.

Minigenomas (MG)

El primer sistema MG se estableció en 1989 para la modificación de un virus ARN segmentado, pero dependía de virus auxiliares lo que restringió sus aplicaciones. Fue hasta 1995 que se estableció el primer sistema MG basado en el promotor T7⁹⁸.

Minigenoma o minireplicón es la versión corta de un genoma viral y solo contiene los elementos de inicio de la replicación y final de la transcripción, donde se encuentran los elementos regulatorios necesarios para la encapsidación, transcripción, replicación y empaquetamiento de éste⁹⁹. Son utilizados para estudiar la replicación y transcripción del virus.

La transcripción del MG puede estar a cargo de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 o la ARN polimerasa I celular, en el primero los transcritos se producen en el citoplasma y el segundo en los núcleos celulares⁹⁷. Se pueden generar MG sentido (-) o antisentido (+) MG⁹⁸.

Partículas pseudovirales infecciosas (iVLP o trVLP system)

Aunque el MG nos permite observar varios de los pasos de la replicación del virus, no incluye la entrada, brote y empaquetamiento. Este sistema ha sido desarrollado para generar partículas de infección de ciclo único principalmente aprovechadas para estudiar y generar Bunyavirus (BUNV). El primer sistema iVLP fue construido con éxito para BUNV en 2006, y se utilizó para investigar el papel de la proteína NSm durante el ensamble y la morfología del virus ¹⁰⁰.

Clones infecciosos de longitud completa (IFLC)

Este sistema se ha utilizado para generar virus infecciosos de campo o recombinantes y tiene un enorme potencial para estudiar el ciclo de replicación del virus en su totalidad. Consta de un plásmido de expresión que codifica proteínas indispensables para el virus y de un plásmido de transcripción que transferirá los promotores, ya sea para la ARN polimerasa del bacteriófago T7 o para la ARN polimerasa I celular que ayudarán a expresar el resto de los segmentos del genoma viral. Se empleó con éxito en 1996 para rescatar al BUNV¹⁰¹.

Paramyxovirus

La familia *Paramyxoviridae* involucra a cuatro subfamilias: *Metaparamyxovirinae*, *Rubulavirinae*, *Avulavirinae* y *Orthoparamyxovirinae*²⁴; estos virus infectan a una amplia variedad de mamíferos, aves y reptiles provocando enfermedades sistémicas que pueden ser devastadoras en la industria avícola y ganadera. Las enfermedades de importancia clínica en veterinaria son Newcastle (NDV), rubulavirus porcino (LPMV), distemper canino (CDV), peste bovina (RPV), y peste de pequeños rumiantes (PPRV)³⁶.

Los viriones están envueltos, son pleomórficos (formas esféricas y filamentosas) y tienen un diámetro de 150 a 300 nm. Están cubiertos de grandes espículas (de 8 a 14 nm), contienen una nucleocápside helicoidal simétrica en "forma de espina de pescado". El genoma consta de una sola molécula lineal de ARNss (-) de 13 a 19kb de longitud¹⁰². La mayoría forma sincitios y codifican la proteína hemaglutinina, lo que les otorga la capacidad de hemoadsorción, excepto en el género morbilivirus, este último forma cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos e intranucleares y no requiere de las funciones nucleares para su replicación³⁶; los paramixovirus se empezaron a utilizar como vectores en 1996¹⁰³.

Ciclo viral

En primer lugar, se une a su receptor celular; después de la unión, ingresa al citoplasma y en ausencia de síntesis proteica celular, inicia una transcripción inicial con ayuda del complejo proteico N, P, L y la ARN polimerasa dependiente de ARN, generando así una copia de ARNss (+) unida a la proteína N que servirá de molde para la cadena de ARNss (-). Después de iniciar una segunda fase de síntesis de ARNm a partir de estos se amplifican la síntesis de proteínas virales, además, el gen P en la subfamilia *Orthoparamyxovirinae* tiene la capacidad de codificar de 3 a 7 proteínas P/V/C que también acelera la síntesis del genoma viral. Finalmente, el producto resultante de la traducción genera proteínas virales que se ubicarán en la membrana plasmática de la célula huésped donde se reensamblará el virus y se liberará mediante gemación³⁶.

Características y modificaciones de los paramyxovirus para transformarse en vectores

Los primeros paramyxovirus utilizados como vectores fueron el *Virus respiratorio sincitial humano* (HRSV) el cual es un miembro prototipo de la familia *Pneumoviridae* y el respiravirus sendai, posteriormente, se empezaron a usar otros paramyxovirus como el *Virus de Newcastle*. Las cepas vivas atenuadas de los virus HRSV, el virus del sarampión (MV), RPV y PPRV son muy buenos inductores de respuestas inmunes humorales y celulares. Una característica de esta familia de virus, y de otros virus de ARN de cadena negativa, es que el ARN desnudo, cuando se transfecta a las células, no es infeccioso en contraste con los ARN de sentido positivo²⁴.

El Virus de Newcastle se empezó a utilizar como vector en el 2000 y se aprobó su uso comercial en China en el 2006 como una vacuna activa atenuada basada en la cepa LaSota que protege contra la influenza aviar (AIV), H₅N₁ y NDV y como vacuna activa y muerta en México con el gen H₅N₂. Dos décadas después de que se explorará el NDV como vector, se generaron numerosas vacunas candidatas basadas en el NDV para enfermedades infecciosas humanas y animales, y los resultados obtenidos respaldan el hecho de que son inmunogénicas y eficaces¹⁰².

Entre las fortalezas técnicas del NDV se encuentran su alto rendimiento infectivo al propagarlo en embriones de pollo, sobre todo las cepas de Newcastle lentogénicas alcanzando títulos de 9E+10/mL,¹⁰ lo que permite una buena producción a bajo costo^{102, 104} y, por tanto, su producción local en regiones con un modesto progreso en biotecnología; además de la extensa memoria inmunológica que inducen, llegando a ser de por vida después de la administración de una o dos dosis²⁴.

Otro beneficio del NDV es que es posible clonarlo por completo en un plásmido debido a la corta longitud de su genoma (15kb), además, acepta y expresa adecuadamente los insertos y no ve afectada su expresión aun después de varios pases. No obstante, su capacidad de aceptación de inserto es de solo 5kb^{24,105} y debe ubicarse en el sitio de unión P-M para expresarse adecuadamente (**figura 7**)

ya que al insertar al gen como una unidad transcripcional independiente, atenúa la transcripción de los genes posteriores a éste y la replicación del virus¹⁰².

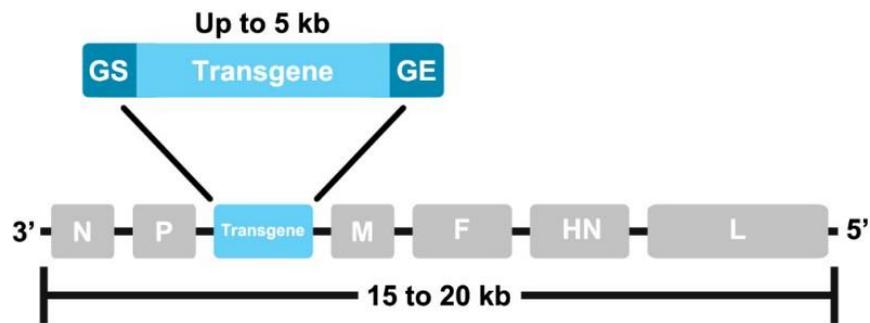


Figura 7. Representación del genoma de NDV. La localización más óptima del transgén es entre los segmentos P y M ¹⁰⁶.

Para eliminar este aparente obstáculo se empezó a utilizar IRES como un marco de lectura abierto que expresa el gen de interés, independientemente de su ubicación y permite expresar múltiples genes para generar vacunas multivalentes¹⁰².

Uno de los puntos de debate es el riesgo de recombinación ya sea entre las cepas de la vacuna NDV y las cepas virales de campo o entre el NDV y el huésped, sin embargo, el NDV es un virus ARN de sentido negativo no segmentado y una recombinación en este tipo de virus no es frecuente, además, su replicación es intracitoplasmática, por lo que la posibilidad de integrarse al genoma del hospedero es mínima, es por esto que no es un punto de preocupación; por otra parte, insertar genes extraños en este tipo de virus no aumenta la virulencia ni su tropismo, pero sí su atenuación¹⁰⁷.

Uno de los puntos llamativos de las cepas lentogénicas del NDV es que provocan una respuesta inmunitaria integral (de mucosas, humoral y celular) al replicar eficientemente en el tracto respiratorio, lo que permite su administración masiva mediante aspersion, agua potable²⁴, e inyección automática *in ovo*, por ello resultan ser candidatos vacunales ideales (**cuadro 18**). En cuanto a las cepas velogénicas también se han utilizado como vectores vacunales y aunque se ha afirmado su seguridad aún se deben evaluar en campo¹⁰².

En mamíferos, el NDV tiene la ventaja de que no hay premunidad, sin embargo, en aves de corral es donde radica el mayor problema ya que existen anticuerpos contra el NDV; para evitar esto, en 2013 se generó un vector quimérico reemplazando los genes F y HN del NDV con los del paramyxovirus aviar al tiempo que se expresó el gen HA de H5N1 y la vacuna recombinante generada resultó ser muy inmunogénica y eficaz en pollos con anticuerpos contra el NDV, esto acompañado de un esquema de vacunación heterólogo mejoró la respuesta inmune. De igual manera, los anticuerpos específicos contra el Virus de Influenza Aviar pueden inhibir la seroconversión y la protección de las vacunas de AIV generadas en el con vector de NDV en pollos comerciales, que es incluso más fuerte que la inhibición de anticuerpos específicos contra el NDV. Se debe investigar más a fondo el papel de los AcN contra el NDV en la inhibición de la vacunación para evitar este inconveniente¹⁰².

El NDV también ha dado paso a la generación de vacunas para la protección de aves acuáticas contra el virus tembusu del pato, la parvovirus del ganso y el avastrovirus del ganso¹⁰⁸, y se ha propuesto para generar vacunas en cerdos y ganado por otro parte está en vías de investigación en modelos animales para generar vacunas contra el polio y el virus de la encefalitis japonesa en humanos con respuestas muy positivas hasta el momento, esto sugiere que el NDV es un vector prometedor para desarrollar vacunas y como adyuvante de citoquinas ya que potencia la respuesta de IFN-1 también puede funcionar como coadyuvante de citoquinas¹⁰².

Se ha investigado su uso como potencial anticancerígeno, debido a sus propiedades fusogénicas y a la sobre expresión de sus receptores en células malignas por ejemplo nectina 4 es un marcador de células tumorales para cáncer de mama, pulmón y ovario y en carcinoma de próstata lo es el ácido siálico. Además, existen varios ensayos experimentales que muestran resultados exitosos con el uso de paramyxovirus por ejemplo para combatir el mieloma murino¹⁰⁵. En el **cuadro 17** se presentan las fortalezas y debilidades de este vector.

Cuadro 17. Fortalezas y debilidades de los Paramyxovirus ^{24, 102}

| Fortalezas | Debilidades |
|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Protección de por vida después de la administración de una o dos dosis. | Capacidad de inserto entre 4,5 y 5kb. |
| El genoma ARN (-) no es infeccioso. | No hay integración en el genoma. |
| Producción a gran escala. | Interferencia de anticuerpos maternos en aves de corral con el vector NDV. |
| Se pueden administrar a través del agua o por aspersión o <i>in ovo</i> . | Los transgenes atenúan al virión. |
| Bajos costos de administración. | |
| Expresan altos niveles de proteínas extrañas. | |
| Bajo riesgo de intercambio y recombinación de genes. | |
| Inmunidad humoral, celular y de mucosas. | |
| En mamíferos no hay problemas de inmunidad previa. | |
| Potencia la respuesta de IFN-1 ^{xxvii} . | |
| Potencial anticancerígeno, uso como vector vacunal. | |

^{xxvii} **Interferón 1 (IFN-1):** ejercen diferentes actividades biológicas, tales como anti-virales, anti-proliferativas, pro-apoptóticas y efectos inmunorreguladores. Interfieren en la infección por virus ARN y ADN.

Cuadro 18. Cepas de Newcastle que inmunizan contra diversas etiologías¹⁰²

| Cepa NDV | Antígeno | Patógeno | Modelo animal | Ruta de inmunización |
|----------------------|--------------------|----------|------------------|-----------------------|
| Hitchner B1 | HA | H1N1 | Ratón | IV, IP |
| La Sota | HA | H5N1 | Gallina/ratón | ON gallina / IP ratón |
| La Sota | HA | H5N1 | Gallina | ON |
| La Sota | HA | H5N2 | Gallina | IM / spray |
| La Sota | HA | H5N1 | Gallina | IM / ON |
| La Sota/ chiNDV-2FHN | HA/HA NA | H5N2 | Gallina | IN |
| chiNDV-8FHN | HA | H5N1 | Gallina | ON |
| chiNDV-2FHN | HA | H5N1 | Gallina | ON |
| La Sota/ chiNDV-2FHN | HA o HA; NA/M1/NS1 | H5N1 | Gallina | ON |
| TS09-C | HA/HA1 | H5N1 | Gallina | IN/IO |
| La Sota | HA | H5N1 | Pato | IO |
| La Sota | HA | H5N2 | Gallina | IO |
| BC | HA | H5N1 | Mono | IN/IT |
| La Sota | HA | H9N2 | Gallina | ON/IM |
| NA strain | HA | H9N2 | Gallina | ON |
| chiNDV-2FHN | HA | H9N2 | Gallina | ON |
| Htchneer B1 | HA | H7N2 | Gallina | IO |
| Htchneer B1 | HA | H7N2 | Gallina | IO |
| La Sota | HA | H7N1 | Gallina | IN |
| La Sota | HA | H7N9 | Gallina | IM / ON |
| LX | HA | H7N9 | Gallina | IN |
| rA14 | HA | H7N9 | Gallina | IN/IO |
| La Sota | HA | H7N3 | Gallina | IN |
| La Sota/ chiNDV-2FHN | HA/HA NA | H7N8 | Ratón | IN |
| Clone 30 | HA | H6N2 | Gallina | ON |
| La Sota | VP2 | IBDV | Gallina/pavo | IO |
| F | VP2 | IBDV | Gallina | IO |
| rLaC30L | VP2 | IBDV | Embrión de pollo | <i>In ovo</i> |
| La Sota | gB/gD | ILTV | Gallina | IN/IO |
| La Sota | gB/gC/gD | ILTV | Gallina | ON |
| La Sota | S | IBV | Gallina | ON |
| La Sota | S1 | IBV | Gallina | ON |
| La Sota | S1 (multi-epítipo) | IBV | Gallina | ON |
| La Sota | G | AMPV | Gallina | IN/IO |

| | | | | |
|----------------------|--------------------|-------------------|-------------------|----------|
| La Sota | F+G | AMPV | Gallina | IN/IO |
| La Sota | fiber 2 | FAdV | Gallina | IM |
| SH12 | Cap | GoAstV | Ansarino | ON |
| NA | VP3 | GPV | Ansarino | Sc |
| GM | prM+E | DTMUV | Pato | Sc |
| Clone 30 | N/P | Bornavirus | Cockatiel/canario | IM |
| La Sota | G | BEFV | Bovino | IM |
| La Sota | gD | BHV-1 | Becerro | IN/IT |
| La Sota | F/H | CDV | Visón | IM |
| La Sota | G | Virus de la rabia | Perro | IM |
| La Sota | E2/Erns | CSFV | Cerdo | IN |
| La Sota | GP5/GP3 + GP5 | PRRSV | Lechón | IM |
| La Sota | G | VSV | Ratón | IM |
| Hitchner B1 | Gag | HIV-1 | Ratón | IN |
| La Sota | Gag | HIV-1 | Ratón | IN |
| La Sota | Gag/Env/ Gag + Env | HIV-1 | Cobayo/ ratón | IN |
| La Sota/ chiNDV-2FHN | gp160 | SIV | Cobayo | IN |
| BC/La Sota | GP | EBOV | Mono | IN/IT |
| APMV-3/chiNDV-3FHN | GP | EBOV | Cobayo | IN |
| BC | HN | HPIV-3 | Mono | IN/IT |
| La Sota | G/F | NiV | Cerdo | IM |
| BC/ La Sota | VP1 + VP2 | NV | Ratón | IN |
| BC/ La Sota | S | SARS-CoV | Mono | IN/IT |
| La Sota | S | MERS-CoV | Ratón/camello | IM |
| Hitchner B1 | F | RSV | Ratón/camello | IN |
| La Sota | P1 + 3CD | Poliovirus | Cobayo | IN |
| La Sota | BmpA/OspC | Lyme | Hamster | IN/IM/IP |
| La Sota | Gn | RVFV | Bovino | IN/IM |
| La Sota | PrM/E | WNV | Ratón | IM |
| La Sota | E/NS1 | JEV | Ratón | IN |
| La Sota | PD1/PD-L1/CTLA4 | Melanoma | Ratón | IT |
| La Sota | PD1/PD-L1/CD28 | Melanoma | Ratón | IT |

IV, Intravenoso; IP, intraperitoneal; ON, ocular; IM, intramuscular; IN, intranasal; IO, intraocular; IT, intratumoral; Sc, subcutánea.

Rhabdovirus

La familia *Rhabdoviridae* incluye los géneros *Lyssavirus*, *Vesiculovirus*, *Ephemerovirus*, *Sprivirrus* y *Novirhabdovirus* y dos géneros más que afectan a plantas. Infectan a una amplia gama de huéspedes, incluidos mamíferos, aves, peces, insectos y plantas. Las enfermedades infecciosas más relevantes en medicina veterinaria provocadas por rhabdovirus son la rabia (VR), fiebre efímera bovina (VFEB) y estomatitis vesicular (VEV)¹⁰⁹.

Tienen aproximadamente 45-100 nm de diámetro y 100-430 nm de largo, y constan de una nucleocápside cilíndrica lo que le da apariencia de *bala*, ésta se encuentra enrollada y rodeada por una envoltura con picos de glicoproteína grandes (de 5 a 10 nm de longitud). El genoma consta de ARN de cadena sencilla de sentido negativo, de una longitud de 11 a 15 kb. La maduración es por gemación a través de la membrana plasmática^{36, 110}.

El VEV es más citopático y afecta de forma más acelerada a las células mientras que los VR y VFEB generalmente no son citopáticos y tardan más tiempo en afectar a las células. El VR produce cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos (cuerpos de Negri)³⁶.

Ciclo viral

Se une e incorpora a la célula huésped mediante la glicoproteína G mediante endocitosis, la replicación se realiza en el citoplasma³⁶ e inicia con la transcripción del ARNm a través de la polimerasa del virión cuando se han generado cantidades suficientes de N y P se transcriben ARNss de sentido positivo que luego servirán de molde para sintetizar ARNss (-). La mayor parte del genoma no siempre es codificado debido a que existen muchas señales de inicio y de parada acumulándose como virus defectuosos, solo unas pocas polimerasas completan la transcripción por lo que se producen más ARNm ubicados al inicio del extremo 3' y esto genera la acumulación de muchas proteínas estructurales (N) en relación con la ARN polimerasa (proteína L). Finalmente, se ensamblan y son liberadas por gemación a través de la membrana plasmática^{111, 112} (**Figura 8**).



Figura 8. Esquema del genoma del virus de la rabia. Se muestran los genes que codifican para las 5 proteínas de RV: gen N nucleoproteína; gen M1 proteína de matriz; gen P (M2) fosfoproteína; gen G glicoproteína; gen L codifica para la ARN polimerasa. El sentido de la cadena es de 3' → 5' (Información tomada de ¹¹⁰).

Características y modificaciones de los rhabdovirus para transformarse en vector

Como muchos virus ARN, los rhabdovirus requieren genética inversa para ser producidos. Entre los puntos fuertes de esta familia destacan su capacidad de transportar glicoproteínas extrañas en su envoltura que pueden sustituir o expresarse simultáneamente con las glicoproteínas propias del virus²³. Son altamente inmunogénicos y desencadenan respuestas inmunitarias humorales y celulares, existe ausencia casi total de seropositividad tanto en humanos como en animales para este virus por lo que existe una baja probabilidad de interferencia premunitaria, principalmente en cuanto a VEV, conjuntamente debido a su replicación intracitoplasmática no existe riesgo de recombinación, reversión o integración del genoma viral en el genoma del huésped¹¹³.

Dentro de los *Rhabdoviridae* el VR y el VEV se han utilizado como vectores virales ya que aceptan unidades transcripcionales adicionales manteniendo la estabilidad genética del genoma modificado³⁶.

El VR acepta un inserto de 6,5 kb lo que supera a otros ARN(+), no es citopático, expresa niveles modestos de proteínas extrañas por largos periodos de tiempo, replica en las mucosas lo que favorece la inmunización vía oral con resultados protectores, en amígdalas de caninos favoreciendo el contacto con las células B y T así como con CPA y células dendríticas^{24, 113}. Además, algunas células infectadas pueden sufrir apoptosis generando cuerpos apoptóticos que luego son fagocitados por las CPA lo cual intensifica aún más la respuesta inmune¹¹⁴.

Adicional a esto, se debe disminuir su patogenicidad, lo cual se consigue al generar mutaciones o eliminando uno o varios genes para generar una replicación deficiente

con el fin de que los virus sean seguros. La glicoproteína (G) nativa de la rabia se puede conservar o eliminar. Se sabe que para introducir genes heterólogos tanto en VR como en VEV se deben utilizar señales cortas de inicio y finalización de la transcripción^{23, 113}.

El VR es altamente inmunogénico debido en parte a que su nucleocápside posee las propiedades de un superantígeno ^{xxviii} de ahí que haya sido utilizado eficientemente como vacuna de virus inactivado lo que lo convierte en un vehículo ideal para inmunizar¹¹³ (**cuadro 20**), sin embargo, la premunidad preexistente podría interferir con la respuesta a la proteína extraña. En el caso de las glicoproteínas foráneas el problema de la inmunodominancia puede evitarse eliminando la glicoproteína G, sin embargo, no se puede eliminar ninguna otra glicoproteína porque son necesarias para la propagación del virus. En raras ocasiones es necesario modificar las glicoproteínas extrañas como es el caso del virus de la fiebre del valle de rift para que se inserten adecuadamente en la envoltura viral²³.

El uso de VR se ha propuesto para erradicar los reservorios de SARS-CoV y, gracias a los recientes hallazgos, se piensa que este enfoque es factible¹¹³.

Por otro lado, el VEV es altamente citopatogénico debido a la proteína M que bloquea la exportación de ARNm del huésped²³, pero expresa proteínas extrañas a títulos altos y puede producirse de manera eficiente debido a su velocidad de replicación que supera al VR. Tiene un rango de huéspedes limitado a bovinos, equinos y porcinos. En cuanto a inmunidad induce una fuerte respuesta de interferón en comparación a VR²⁴.

Los VEV han sido comúnmente utilizados para producir VLPs con la finalidad de usarlos en ensayos de neutralización, estudios de mediación de glicoproteínas extrañas en la unión y entrada, y para estudiar virus con bioseguridad de tipo 4²³.

La glicoproteína G del VEV se ha incorporado a otros virus debido a su estabilidad y amplio tropismo tisular del huésped, la adición de esta glicoproteína en Retrovirus

^{xxviii} **Superantígenos:** son una clase de antígenos que provocan una activación excesiva del sistema inmunitario. Específicamente, provoca la activación no específica de las células T, lo que resulta en la activación de las células T y la liberación masiva de citocinas.

y lentivirus ha permitido mejorar la eficacia de transducción para diversas aplicaciones, incluso para terapia génica. Adicionalmente, ha sido utilizado como virosoma ^{xxix}, es decir vesículas recubiertas de VEV-G para administrar anticuerpos, ADN o moléculas anticancerígenas en las células. Pero su uso principal es como virus oncolítico y vector vacunal (**cuadro 21**); por lo general, se emplea como virus replicante, pero con mutaciones atenuantes o el VEV-G nativo es remplazado por una glicoproteína diferente²³.

El VEV-G puede usarse para destruir específicamente células cancerosas ya que estas tienden a ser deficientes en interferón, elemento al cual es muy susceptible el virus al tiempo que actúa como una proteína de membrana fusogénica^{xxx}¹¹⁵ que al expresarse en las células provoca la formación de sincitios y muerte celular. También se ha utilizado VEV expresando la glicoproteína del virus Sindbis para dirigirse al receptor Her2/neu sobre expresado en cáncer de mama protegiendo a ratones contra el crecimiento tumoral. Por otro lado, ambos virus pueden expresar e incorporar los receptores celulares CD4 y CCR5 en su estructura, lo que les permite dirigirse específicamente a células infectadas por VIH-1 con lo que también tiene potencial como terapia génica²³.

Las preocupaciones alrededor del VEV giran a entorno al riesgo que representan para individuos inmunocomprometidos y mujeres embarazadas, porque son más susceptibles a la infección incluso con virus atenuados. Otra limitante es que en gran parte del mundo el VEV no es endémico, e introducirlo podría tener consecuencias en la fauna silvestre equina, porcina y rumiante, por lo que se hace necesario garantizar que el VEV no mute para evitar la restauración del virus. Estos dos problemas podrían resolverse con el uso de VEV inactivados¹¹⁶. En el **cuadro 19** se enlistan las características de los vectores prototipo de esta familia.

^{xxix} **Virosoma:** es una partícula artificial, carente de ADN formada por una vesícula esférica delimitada por una membrana compuesta de una doble capa de fosfolípidos a la que se incorporan proteínas virales.

^{xxx} **Glicoproteínas fusogénicas de membrana (FMGs):** se localizan en la envoltura viral y median la entrada del virus a la célula por fusión entre la envoltura y la membrana celular, algunas veces durante la replicación viral, la expresión de proteínas de fusión en la membrana celular, previo a la formación de la partícula viral, produce la fusión de la célula infectada con células vecinas y con ello la consecuente formación de sincitios y la consiguiente muerte celular.

Cuadro 19. Fortalezas y debilidades de los Rhabdovirus más comúnmente usados como vectores virales (VR y VEV) ^{23, 24, 113}

| | Fortalezas | Debilidades |
|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Virus de la rabia | <p>Desencadenan fuertes respuestas celulares, humorales y de mucosas.</p> <p>Ausencia de seropositividad en humanos y animales.</p> <p>Fácil manipulación.</p> <p>Excelente candidato como vector vacunal.</p> <p>Seguros incluso en personas inmunodeprimidas.</p> <p>Inmunización oral en perros</p> | <p>Inmunidad preexistente.</p> <p>No se puede eliminar cualquier glicoproteína de superficie²³.</p> <p>En ocasiones es necesario modificar las glicoproteínas virales heterólogas.</p> |
| Virus de la estomatitis vesicular | <p>Desencadenan fuertes respuestas celulares y humorales.</p> <p>Produce títulos altos de proteínas heterólogas.</p> <p>Alta velocidad de replicación.</p> <p>Uso como anticancerígeno y vector vacunal.</p> <p>Ensayos de neutralización, estudios de mediación de glicoproteínas extrañas (unión y entrada).</p> <p>Estudiar virus con bioseguridad tipo 4.</p> | <p>Altamente citopatogénico.</p> <p>No es endémico en todo el mundo.</p> <p>Se debe continuar investigando para evitar que se restaure la patogénesis del virus.</p> <p>Inmunocomprometidos y mujeres embarazadas son más susceptibles incluso con virus atenuados²³.</p> <p>Limitado número de huéspedes.</p> |

Cuadro 20. Candidatos vacunales basados en el virus de la rabia ²³.

| Tipo de vacuna | Objetivo vacunal | Antígeno |
|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Activa e inactivada | Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 | S1 proteína Spike |
| Inactivada | Virus de la fiebre del valle de Rift | Glicoproteína |
| Inactivada | Virus de Marburg | Glicoproteína |
| Inactivada | Virus Nipah | Glicoproteína |
| Inactivada | Virus de la fiebre de Lassa | Glicoproteína |
| Replicación deficiente | Virus de la Coriomeningitis linfocítica | Glicoproteína |
| Activa atenuada | Virus del murciélago de Lagos 2 | Glicoproteína |
| Inactivada | Proteína spike del coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio | Glicoproteína |
| Inactivada | Virus del distemper canino | Glicoproteína |
| Activa atenuada e inactivada | Virus del parvovirus canino | Proteína 2 |
| Activa atenuada e inactivada | Virus de Hendra | Glicoproteína |
| Activa atenuada | Virus del distemper canino | Hemoaglutinina |
| Inactivada | <i>Clostridium Botulinum</i> | Neurotoxinas de los serotipos A, B y E |
| Activa atenuada e inactivada | Virus del Ébola | Glicoproteína |
| Activa atenuada | Hormona liberadora de gonadotropina (inmunococepción ^{xxxI}) | |
| Inactivada | Antígeno protector contra ántrax | |
| Activa atenuada | Proteína spike del coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo | |
| Replicación deficiente | Virus de la inmunodeficiencia humana | Proteína Env |
| Activa atenuada | Virus de la inmunodeficiencia humana | Proteínas Gag, Pol |
| Activa atenuada | Virus de la inmunodeficiencia humana | Proteína Gag |
| Activa atenuada | Virus de la inmunodeficiencia humana y simio | Proteína Env |
| Activa atenuada | Virus de la inmunodeficiencia humana | Proteína Env |
| Activa atenuada | Virus de la inmunodeficiencia humana quimérico | Proteínas Env (GP120/GP41) |
| Activa atenuada | Virus de la inmunodeficiencia humana | Proteínas Gag-Pol o Gag-Pol and Env |
| Activa atenuada e inactivada | Hepatitis C | Proteínas de envoltura |
| Activa atenuada | Virus de la inmunodeficiencia humana | Proteína Gag |
| Inactivada | Virus de la rabia | Glicoproteínas de Mokola y lyssavirus 1 del murciélago europeo |
| Replicación deficiente | Virus Mokola | Glicoproteína |

^{xxxI} **Inmunococepción:** es un método que utiliza los anticuerpos creados contra la zona pelúcida o contra los receptores de GnRH para evitar la concepción.

Cuadro 21. Candidatos vacunales basados en VEV ²³.

| Tipo de vacuna | Objetivo vacunal | Antígeno |
|------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Activa atenuada | Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 | Proteína Spike |
| Activa atenuada | Virus Andes y Sin nombre | Glicoproteína |
| Activa atenuada | Virus de la fiebre hemorrágica del Congo | Glicoproteína |
| Activa atenuada | Virus de la diarrea epidémica porcina | Proteína spike |
| Activa atenuada | Virus del Ébola y | Glicoproteína / |
| | Virus de Zika | Pre-membrana y proteínas de envoltura o pre-membrana y proteínas de envoltura soluble |
| Activa atenuada | Virus de chikungunya y | Poliproteína de envoltura/ Glicoproteínas de membrana-envoltura |
| | Virus de Zika | |
| Activa atenuada | Virus de Zika | Proteína de cápside |
| Activa atenuada | Coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio | Proteína spike |
| Replicación deficiente | Virus del Ebola | Glicoproteína |
| Activa atenuada | Virus de la encefalitis equina venezolana | Glicoproteína E2/E1 |
| Activa atenuada | Virus de Zika | Proteína de envoltura |
| Activa atenuada | Enterovirus 71 | Proteína VP1 |
| Activa atenuada | Virus del dengue 2 | Proteínas de envoltura y pre-membrana |
| Activa atenuada | PRSS | Proteínas GP5, M, GP4, GP3, GP2 y proteínas de nucleocápside |
| Activa atenuada | Virus Lassa | Glicoproteína |
| Replicación deficiente | <i>Mycobacterium ulcerans</i> | Proteína MUL2232 y MUL3720 |
| Activa atenuada | Virus Hendra | Glicoproteína |
| Activa atenuada | Virus Nipah | |
| Activa atenuada | Virus de la lengua azul | Serotipo 8 proteína VP2 |
| Activa atenuada | Virus de Coxsackie tipo B3 | Proteína VP1 |
| Activa atenuada | <i>Bundibugyo ebolavirus</i> | Glicoproteína |
| Activa atenuada | Virus Andes | Glicoproteína |
| Activa atenuada | Retrovirus Simio tipo 2 | Gag y Env |
| Activa atenuada | <i>Norovirus humano</i> | Proteína VP1 |
| Activa atenuada | Virus de la Hepatitis B | Proteína de la superficie de la envoltura media |
| Activa atenuada | Virus Vaccinia | Proteínas B5R y L1R |
| Activa atenuada | Virus de la inmunodeficiencia humana | Proteína gp160 |

Coronavirus

La familia *Coronaviridae* pertenece al orden de los *Nidovirales*, y se subdivide en 2 subfamilias: la *Coronavirinae* (que incluye a los géneros *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gamma coronavirus* y *Deltacoronavirus*) y la *Torovirinae* (con los géneros *Torovirus* y *Bafinivirus*)¹¹⁷.

Han sido descritos infectando una gran cantidad de mamíferos, aves y varias especies silvestres, provocando por lo general cuadros subclínicos de enfermedades entéricas o respiratorias aunque también pueden afectar al SNC, hígado o riñón^{118, 36}. Los virus de importancia clínica en veterinaria son el coronavirus bovino, Virus de la gastroenteritis transmisible porcina (TGEV), el Virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV), el Virus de la bronquitis infecciosa aviar y el coronavirus felino¹¹⁹.

Los *Coronaviridae* son pleomórficos o esféricos poseen una cápside helicoidal y tienen un tamaño que va de 80 -220 nm su genoma consta de una sola molécula de ARN lineal de sentido positivo con un tamaño de 27,6 a 31 kb, es el ARN viral no segmentado más grande conocido¹¹⁷.

El primer coronavirus utilizado como vector fue el virus de la TGEV en el año 2000, de ahí le siguieron el coronavirus del síndrome respiratorio agudo y severo (SARS-CoV) en 2003, virus de la hepatitis del ratón (VHM) en 2002 y coronavirus aviares¹¹⁹.

Ciclo viral

El ciclo infectivo de los coronavirus (CoVs) comienza con la unión de la proteína de superficie a su receptor celular con la posterior endocitosis del virus, la membrana viral se fusiona con la membrana del endosoma y se produce el desensamble del virión y la liberación del genoma viral al citoplasma donde se forma ARN complementario a partir del cual se traducen a proteínas virales estructurales y accesorias dando lugar a los viriones inmaduros, estos luego son transportados hacia un compartimento entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi donde se ensambla el virus maduro y finalmente son liberados por exocitosis³⁶.

Características y modificaciones del coronavirus para transformarse en vector

En cuanto a la seguridad los CoVs como otros virus ARNss replican en el citoplasma sin intermediarios de ADN por lo que no hay riesgo de que se integre en el genoma del huésped. Además, posee el genoma ARN más grande y por tanto se infiere que tenga espacio suficiente para insertar grandes fragmentos de genes¹¹⁷.

No obstante, uno de los principales inconvenientes de usar CoVs es su alta recombinación genética que suele ocurrir entre genomas de coronavirus diferentes, pero relacionados sumado a la acumulación de mutaciones como resultado de errores de la polimerasa durante la transcripción²⁴, lo que provoca inestabilidad en los vectores provocando la pérdida de genes heterólogos.

Uno de los puntos fuertes de este vector es su capacidad para inducir una efectiva respuesta inmune sistémica y secretora ya que infectan de forma natural superficies mucosas respiratorias y entéricas, además de estimular tejido linfoide asociado a intestinos, e incluso logra estimular la inmunidad lactogénica. También es posible modificar su tropismo celular y especificidad de especie modificando tan solo la proteína S¹¹⁷ por ejemplo, un mutante de VHM al que se le reemplazó el ectodominio de la proteína S por el ectodominio del virus de la peritonitis infecciosa felina adquirió la capacidad de infectar células felinas a la vez que perdió su capacidad de infectar células de murino¹²⁰.

Otro punto a favor es la existencia de cepas no patógenas de CoVs que tienen la capacidad de *infectar* a la mayoría de las especies de interés y permiten desarrollar vectores virales seguros¹¹⁷.

La capacidad inserción de genes extraños en el genoma de CoVs depende del sistema de expresión utilizado, se han desarrollado dos sistemas principales:

- **Sistema de expresión dependiente de un virus auxiliar:** son replicones^{xxxii} que se obtienen a partir de minigenomas derivados de MHV, TGEV, coronavirus humano y VBI¹²¹ con un tamaño inicial de 3kb, los cuales tienen

^{xxxii} **Replicones:** Unidad de ADN o ARN capaz de replicarse por sí misma.

una capacidad de clonación teórica cercana a los 27 kb, ya que es eficientemente amplificado y empaquetado por el virus auxiliar y el genoma del virus termina teniendo una extensión de unos 30 kb. La máxima expresión obtenida usando minigenomas de VBI es de 2- 8 g/10⁶ células¹¹⁸. Además, permite diseñar vectores de expresión multigénicos debido a la estrategia transcripcional de los CoVs y ofrece un mayor nivel de seguridad ya que los replicones no son infecciosos²⁴.

- **Clones de ADN complementario (ADNc):** basado en genética inversa o por ingeniería de ADNc codifica un solo genoma infeccioso y solo permite la expresión de 3,1kb después de delecionar genes no esenciales esta cantidad se encuentra dentro del rango esperado para un virus ARN ya que para el Virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV) con un tamaño de genoma de 12kb acepta un inserto de 1kb, a partir de 2,5kb deja de expresarse correctamente y pierde los genes heterólogos insertados. Es probable que esta capacidad de clonación se amplie en un futuro al reconocer otros genes no esenciales en la replicasa (con más de 20kb)¹¹⁹. Los clones de ADNc están disponibles para coronavirus porcino, humano, aviar y murino y para la familia *Arteriviridae* estrechamente relacionada con los coronavirus específicamente el virus de la Arteritis viral equina y PRRS^{122, 120}.

El **cuadro 22** menciona las características de los coronavirus.

Cuadro 22. Fortalezas y debilidades de los vectores basados en Coronavirus ^{24, 117, 119,}

120

| Fortalezas | Debilidades |
|--------------------------------------------------|--------------------------------|
| Soporta insertos de amplia longitud. | Alta recombinación entre cepas |
| Respuesta inmune celular, humoral y de mucosas. | semejantes. |
| Estimula tejido linfoide asociado a intestino. | Alta frecuencia de mutaciones. |
| Tropismo modificable. | |
| Existen cepas no patógenas. | |
| Infecta a la mayoría de las especies de interés. | |

Bunyavirus

Los Bunyavirus antes considerados en la familia *Bunyaviridae*, actualmente conforman el orden *Bunyvirales* que incluye a 12 familias virales que agrupan enfermedades emergentes y reemergentes que afectan desde artrópodos, protozoarios, plantas hasta animales y humanos ⁹⁸. Dentro de estos existen cinco familias que infectan a vertebrados *Arenaviridae*, *Hantaviridae*, *Nairoviridae*, *Perybunyaviridae* y *Phenuiviridae*¹²³, todos transmitidos por artrópodos excepto los Hantavirus que son diseminados por roedores. La mayoría no afecta a animales domésticos ni humanos, pero los que lo hacen causan enfermedades importantes que van desde malformaciones fetales congénitas hasta enfermedades sistémicas. Los de importancia clínica veterinaria son el virus Akabane, el virus de la fiebre del Valle del Rift (RVFV), enfermedad ovina de Nairobi y los virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (CCHFV), virus bunyamwera (BUNV)³⁶.

Son viriones envueltos de forma esférica con 80 a 100 nm de diámetro, tienen picos de glicoproteínas, dentro contiene tres complejos circulares de ribonucleoproteína ^{xxxiii} viral compuestos por segmentos individuales de ARN monocatenario bisegmentado (*Arenaviridae*) o tri-segmentado (*Hanta-*, *Nairo-*, *Perybunya-* y *Phenuiviridae*¹²³) (**figura 9**) de sentido negativo, y unos pocos son ambisentido^{xxxiv} con un tamaño de entre 11-19kb³⁶.

Los bunyavirus causan una infección transitoria en sus huéspedes vertebrados y una infección persistente de por vida en sus vectores (artrópodos) mientras que los hantavirus lo hacen en sus reservorios (roedores). Son citolíticos en células de mamíferos, pero no citolíticos en células de invertebrados excepto los hantavirus y algunos nairovirus³⁶.

La primera expresión de genes extraños en bunyavirus fue a partir del virus de la fiebre del Valle de Rift²⁴.

^{xxxiii} **Ribonucleoproteína:** es una nucleoproteína que contiene ARN, es decir, es un compuesto que combina tanto ácido ribonucleico como proteína.

^{xxxiv} **Ambisentido:** genoma que contiene cadenas en sentidos positivo y negativo.

Ciclo viral

Después de la penetración a la célula huésped y la desencapsidación, se produce la activación de la ARN polimerasa del virión (transcriptasa) y su transcripción de los ARNm virales de cada uno de los tres ARN del virión nombrados como segmentos L (*large*), M (*medium*) y S (*small*)¹²³ según sus tamaños relativos, *Arenaviridae* solo incluye los segmentos L y S. Después de la transcripción y traducción del ARNm viral ocurre la replicación del virión y comienza una segunda ronda de transcripción amplificando genes que codifican para proteínas estructurales. El virión finalmente madura por gemación en vesículas del aparato de Golgi que después son liberadas por exocitosis fuera de la célula³⁶.

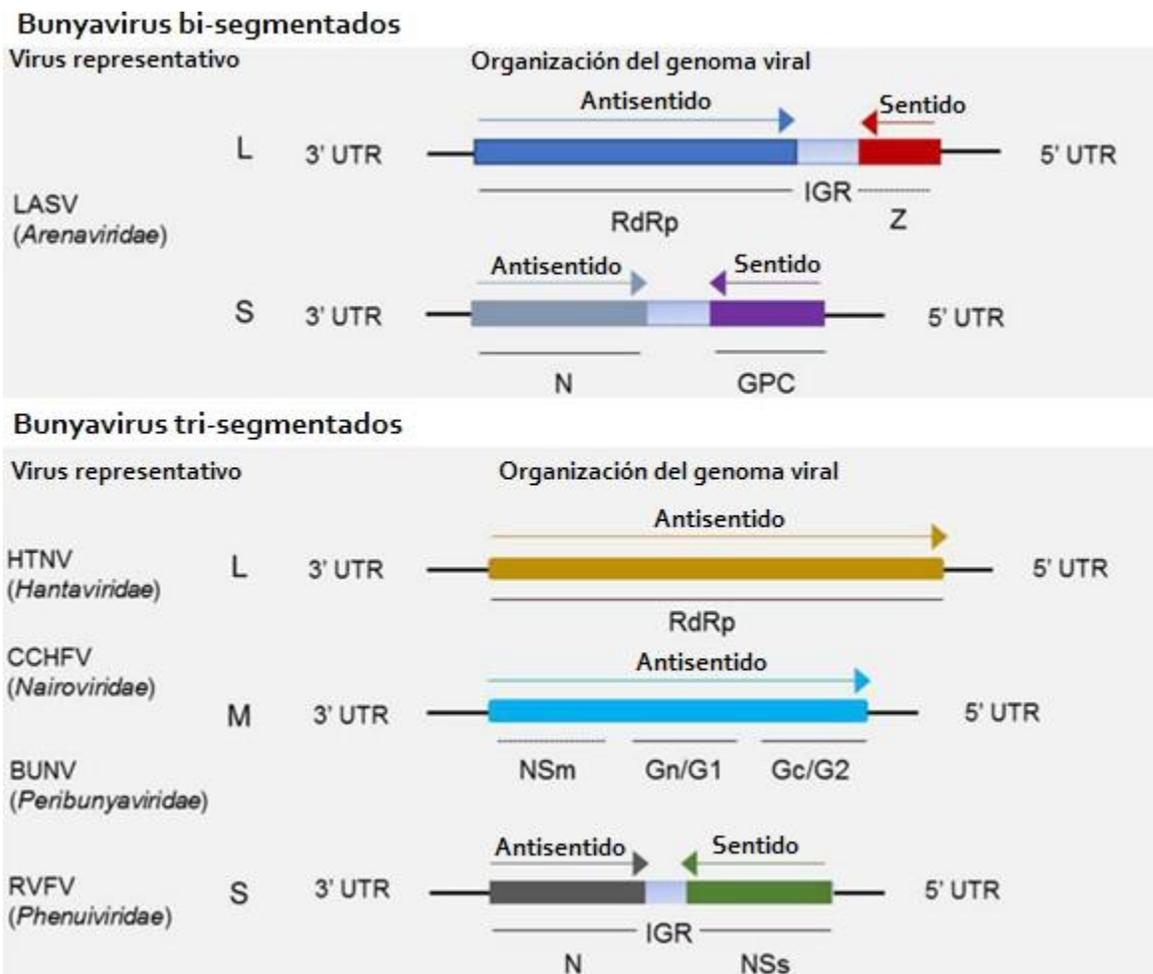


Figura 9. Esquema de la organización del genoma de Bunyavirus bisegmentados y trisegmentados⁹⁸

Características y modificaciones de los bunyavirus para transformarse en vectores

Los *Bunyavirales* continúan en estudio hasta el momento se sabe que se puede obtener copias virales de bunyavirus mediante los sistemas de genética reversa, o utilizando la ARN polimerasa I/II celular o la ARN polimerasa del bacteriófago T7⁹⁸.

Se conocen algunos factores de virulencia, siendo el principal la proteína NSs. Por ejemplo, en el caso de BUNV y virus de Akabane la proteína NSm participa en la formación de virus tubulares por lo que deleciónar este gen atenúa su fenotipo. En los *Arenaviridae* la proteína Z y NP (nucleoproteína) inhiben al IFN, además, la GPC codificada por el segmento S afecta su replicación en animales¹²⁴. En el caso de Virus del Valle de Cache, Virus Kairi, Virus Oropouche y Virus Schmallerberg la proteína NSs es antagonista de IFN mientras que esta misma proteína en RVFV inhibe la transcripción del hospedero, suprime la activación del promotor de IFN/b y facilita la traducción viral mediante la degradación de la proteína quinasa^{97, 98 125}

Referente a la inmunidad, los mecanismos de protección no están bien definidos, las infecciones por RVFV y Virus del síndrome de fiebre severa con trombocitopenia están mediadas por AcN, en arenavirus las respuestas inmunitarias humorales y celulares brindan protección, sin embargo, en VFHCC la inducción de AcN no se correlaciona con la eficacia de la vacuna¹²⁵. Aun así, existen varios candidatos vacunales basados en bunyavirus ver **cuadro 24**.

En un inicio la técnica más sencilla fue inducir mutaciones o deleciones en sitios específicos en el genoma viral, sin embargo, la sobre atenuación, inestabilidad genética de las mutaciones e, introducción de mutaciones compensatorias son preocupaciones de este enfoque. Dado que NS y NSm sirven como factores virulentos se han deleciónado del genoma en la cepa ZH501 del RVFV salvaje para generar vacunas activas atenuadas, logrando los virus ZH501-DNSs y ZH501-DNSs/DNSm, los cuales eran seguros e inducían inmunidad en ratones, ovejas adultas, mono titi y ovejas gestantes protegiendo incluso al feto contra abortos y malformaciones. Sin embargo, el virus Schmallerberg recombinante carente de NS después de pases en serie condujo a la reversión de la virulencia⁹⁷.

Una alternativa para disminuir los niveles de expresión génica y la posibilidad de reversión a la virulencia es la desoptimización de codones esto es el remplazo de codones de uso común por codones no preferidos en los ORF virales, no obstante, los inconvenientes de este enfoque incluyen la inestabilidad genética *in vivo* y niveles reducidos de crecimiento viral debido a la disminución de la expresión de proteínas virales, comprometiendo la efectividad de la vacuna¹²⁶.

El **cuadro 23** menciona las fortalezas y debilidades de los bunyavirales.

Cuadro 23. Fortalezas y debilidades de los vectores basados en Bunyavirus ^{97, 98, 125}

| Fortalezas | Debilidades |
|------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Amplio tropismo. | Existen muchos vacíos de información. |
| Candidatos a vacunas activas atenuadas. | La delección de un mismo gen o la misma |
| Hay sistemas adecuados para producirlos. | estrategia en otro virus del orden |
| Algunos prototipos brindan buena | <i>Bunyavirales</i> puede conducir a un |
| protección con AcN. | resultado distinto al esperado. |
| En muchos casos solo requiere una dosis. | |

Cuadro 24. Potenciales candidatos vacunales basados en Bunyavirus ⁹⁷

| Vector viral | Tipo de producto | Modificaciones | Respuesta inmune |
|-----------------------------------------|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MP-12 de RVFV | Delecciones específicas | Carente de NSm y de una proteína accesoria de 78kDa | Altamente eficaz en la protección de rumiantes y ratones vacunados contra RVFV. |
| SFTSV | Delecciones específicas | Mutaciones en el gen NSs Y mutación de sustitución de un solo aminoácido | Ambas generaron fuerte AcN a dosis única en hurones de edad avanzada contra un genotipo cruzado. |
| LASV | VRP | Gen GPC ausente | Sin manifestaciones clínicas en cobayos. Protector en los animales inmunizados. |
| CCHFV | VRP | Segmentos L y S. Carente del receptor IFN. | Sin signos clínicos. Se considera una plataforma segura de vacunas contra el CCHFV. |
| RVFV MP-12 (scMP-12) | VRP | scMP-12 (N y GFP). Segmentos L, M y S. | Sin neurovirulencia Produce AcN y protege a ratones inmunizados. |
| RVFV MP-12 (scMP-12) | VRP | Variante de scMP-12. NS mutantes que no inhiben la transcripción del huésped, pero si degradan a la enzima PKR. | Mejor inmunogenicidad y eficiencia de esta variante. |
| RVFV -4s recombinante | Rearreglo genómico | 4 segmentos Segmento M dividido en dos, uno codificaba para Gn y otro para Gc. Con NS. | NS no es virulento en ratones. |
| RVFV -4s recombinante Virus Machupo | Rearreglo genómico | Sin NS. | Corderos con dosis única quedaron protegidos. |
| Virus de la coriomeningitis linfocítica | Rearreglo genómico | La mitad del segmento S codificaba MACV NP + GPC del virus Chavpare y la otra MACV GPC + GPC del virus guaranito Mutaciones de NP y L. Reemplazo de IGR-L con IGR-S. | El virus es moderadamente estable. 50% de los animales sobrevivió al desafío con JUNV. |
| LCMV | Rearreglo genómico | Reemplazo de L-IGR con S-IGR de un arenavirus diferente. | IGR es importante en arenavirus. Se replica eficientemente en cultivo celular, pero está muy atenuado <i>in vivo</i> . Protegió contra la exposición letal a ratones. Atenuación de la virulencia. Inmunidad protectora. |

| | | | |
|------------|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LCMV | Rearreglo genómico | Se intercambiaron los ORF de arenavirus | Se logro la atenuación, 1 dosis protegió contra el virus. |
| RVFV ZH501 | Quimérico recombinante | Segmento S que codificaba NS de TOSV y puntatorovirus. | Mantuvieron su virulencia. |
| RVFV ZH501 | Quimérico recombinante | Segmento S que codificaba NS de virus siciliano de la fiebre del flebótomo y PKR negativa dominante. | Se logró su atenuación en ratones. |
| JCV/LAC | Quimérico recombinante | Reemplazo el ORF del segmento M de LACV con el ORF del virus del cañón de Jamestown y su glicoproteína. | Carece de neurovirulencia en ratones y es altamente inmunogénico. |
| MACV | | GPC del virus de Junin. | Logro la atenuación. Mayor inmunogenicidad que JUNV y producción de AcN. Protección total contra el desafío. |
| MOPV | | GPC de LASV. Con mutaciones en NP anulando IFN de tipo I. | Una dosis provoca una respuesta humoral y celular T robusta. Protección completa contra el desafío de LASV. |

JCV/LAC virus del cañón de Jamestown / Virus de la encefalitis de La Crosse; LCMV Virus de la coriomeningitis linfocítica; CCHFV Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo; JUNV Virus de junin; LASV Virus de Lassa; MACV Virus de Machupo; MOPV Virus Mopeia; RVFV Virus de la fiebre del valle de Rift; SFTSV Virus del síndrome de fiebre severa con trombocitopenia; TOSV Virus toscana.

Alphavirus

Pertenece a la familia *Togaviridae* e incluye a los géneros *Alphavirus* y *Rubivirus* este último género solo incluye un patógeno humano el virus de la rubeola. Poseen un genoma ssARN (+)⁵⁸ de 9,7 a 12 kb de tamaño, son transmitidos por artrópodos, los viriones son esféricos, de apariencia uniforme, de 70 nm de diámetro, y constan de una envoltura que rodea a una nucleocápside icosaédrica¹²⁷.

Afecta tanto animales como humanos y mantienen un ciclo de infección enzoótica^{xxxv} que incluye insectos y reservorios animales, a excepción de los alfavirus de los salmónidos. Las enfermedades de interés en veterinaria son las relacionadas con los virus de la encefalitis equina venezolana (EEVE), encefalitis equina del oeste, encefalitis equina del este y getah, incluido los virus causantes de enfermedades zoonóticas tales como el virus Semliki Forest (SFV) y chikungunya. Dependiendo del virus puede causar alguno de estos cuadros: neurológicos (encefalitis), enfermedad febril con poliartritis o sin signos aparentes^{36,128}.

Causan cambios citopáticos graves en muchos tipos celulares de vertebrados donde provoca un bloqueo total de las síntesis de proteínas y ácidos nucleicos de las células. En mosquitos no existe esta interrupción, pero persiste la infección y la eliminación constante del virus¹²⁸.

Ciclo biológico

El ciclo inicia cuando la glicoproteína E2 se une a sus receptores de superficie, entra por endocitosis donde posteriormente se libera la nucleocápside al citoplasma³⁶. El ARN genómico actúa como ARNm en algunos alphavirus al traducirse produce dos poliproteínas (no estructurales) que se encargan de sintetizar la cadena de ARN molde de sentido negativo a partir del ARN base para luego sintetizar ssARN (+) y un ARN subgenómico^{xxxvi}. Posteriormente, el ssARN (+) se encapsida en nuevos viriones mientras que el ARN subgenómico actúa como mensajero para la síntesis de proteínas estructurales que darán lugar a proteínas individuales. La

^{xxxv} **Enzoótica**: enfermedades infecciosas que afectan de forma continuada a una población animal durante periodos de tiempo prolongados en un área geográfica limitada.

^{xxxvi} **ARN subgenómico**: es ARN resultado de la replicación viral de regiones genómicas parciales.

nucleocápside se ensambla en el citoplasma y se mueve hacia la membrana plasmática donde adquiere picos de glicoproteínas virales. Por último, geman a través de la membrana plasmática (mamíferos y aves) y membranas celulares internas (insecto)^{36,127}.

Características y modificaciones del alphavirus para transformarse en vector

Los alphavirus destacan por infectar un amplio número de huéspedes, expresar proteínas heterólogas de forma transitoria, pero en grandes cantidades, ausencia de inmunidad preexistente en el humano, y la respuesta inmune que genera como vector vacunal se ve intensificada gracias a que algunas células infectadas por el vector sufren apoptosis dando lugar a cuerpos apoptóticos que luego son fagocitados por las CPA¹¹⁴.

Para aumentar la seguridad de estos vectores se construyen deficientes en su replicación, eliminando sus proteínas estructurales, por lo que son capaces de entregar el transgén, pero no de empaquetarse a menos que se proporcionen estas proteínas⁵⁸.

Entre los virus prototipo utilizados como vectores se hallan el Virus Sindbis (SINV), el SFV y el EEVE los cuales comparten muchas características en común además, de la simplicidad de su genoma¹¹⁴. Todos ellos tienen proteínas específicas que inhiben la transcripción de la célula huésped, esto compromete la síntesis molecular de la célula huésped y aumenta la producción de virus infeccioso, las neuronas inmaduras son más susceptibles a la citotoxicidad³⁶.

El SFV y SINV se mantienen estables con un inserto de 2kb, insertos mayores a este tamaño son más inestables. El SINV con una longitud de 11,8kb en su genoma expresa un casete de hasta 3,2kb lo que refleja la flexibilidad del virus para expresar insertos grandes, sin embargo, después del tercer pase apenas si hay cantidades detectables de los productos de expresión y en el quinto pase se pierden por completo. No obstante, al insertar genes más grandes el crecimiento del virus se retarda, el tipo de gen a expresar también limita su replicación, por ejemplo el vector EEVE que expresa glicoproteínas no se replica a títulos tan altos como los que expresan proteínas citoplasmáticas¹²⁰.

El tropismo está dado por la glicoproteína E2 y, aunque se sospecha que tiene varios sitios de unión al receptor o en todo caso es ubicuo, es posible modificarlo para que se limite a un solo tipo celular³⁶.

Los alphavirus son capaces de transportar genes pertenecientes al virus de la influenza, VIH, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Plasmodium falciparum*; además, se encuentra en pruebas experimentales en ratones para evaluar su potencial como anticancerígeno¹¹⁴ y se está evaluando su eficacia en otros modelos animales.

Los sistemas principales mediante los cuales se producen vectores a partir de alphavirus son mediante partículas de replicación deficiente (partículas de replicón) o partículas virales competentes para la replicación¹²⁹. El **cuadro 25** menciona las fortalezas y debilidades de los alphavirus como vectores.

Cuadro 25. Fortalezas y debilidades de los Alphavirus ^{36, 114, 120, 129}.

| Fortalezas | Debilidades |
|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Acepta insertos de 2 kb a pesar de la corta longitud de su genoma. | Citotoxicidad neuronal. |
| Infecta un amplio número de huéspedes. | Insertos >2 -3,2kb son inestables y se van perdiendo entre países. |
| Expresa proteínas heterólogas en grandes cantidades. | El tipo o el gran tamaño del inserto retardan el crecimiento del virus. |
| Ausencia de inmunidad preexistente en humanos. | Requiere profundizar las investigaciones sobre este vector como potencial anticancerígeno y otras posibles aplicaciones. |
| Es posible modificar su tropismo. | |
| Efectivos como portadores de genes foráneos. | |

Flavivirus

Los flavivirus pertenecen a la familia *Flaviviridae* y son principalmente transmitidos por artrópodos consta de tres géneros Flavivirus, Pestivirus y Hepacivirus. Los flavivirus afectan a un grupo de huéspedes más reducido principalmente humanos, bovinos, equinos, y cerdos; provocando cuadros de encefalitis, fiebres hemorrágicas, abortos y en algunos casos puede generar una infección sistémica³⁶. Los más representativos en veterinaria son, el virus de la diarrea viral bovina y el virus de la fiebre porcina clásica (VPPC), virus de la enfermedad de frontera, virus de la encefalitis japonesa (JEV), y virus del Nilo Occidental y los 4 serotipos del dengue en humanos^{130, 131}.

Los viriones son esféricos, de 40 a 60 nm de diámetro y cubiertos de una envoltura lipídica cubierta con peplómeros que rodean una nucleocápside icosaédrica que contiene un genoma ARN monocatenario de sentido positivo de una longitud de 11, 12.3, y 9.6 kb para flavivirus, pestivirus y hepacivirus respectivamente¹³².

El virus prototipo de esta familia es el virus de la fiebre amarilla. La cepa 17D es un virus atenuado obtenido de la cepa Asibi del virus YT salvaje¹³⁰ utilizado como vacuna comercial desde 1936¹¹⁴.

Ciclo viral

Una vez que se une a su receptor, la tetraspanina, el flavivirus es endocitado y se bloquea parcialmente la síntesis de proteínas y ARN en las células huésped de los mamíferos; ya en el citoplasma, inicia la síntesis de ARNc de sentido negativo que servirá de molde para la síntesis de ARN de sentido positivo. La traducción producirá una sola poliproteína encargada de formar por escisión las diversas proteínas estructurales y no estructurales¹³³.

En el caso de los flavivirus transmitidos por mosquitos el ensamble del virión se lleva a cabo en las membranas del retículo endoplásmico y la membrana plasmática de las células del mosquito, no se observan cápsides preformadas. Los viriones maduros se observan dentro de las cisternas del retículo endoplásmico y son liberadas por exocitosis o lisis celular^{36, 132}.

Características y modificaciones del flavivirus para transformarse en vector

Uno de los virus más destacados dentro de la familia *Flaviviridae* para la construcción de vectores es el virus de la fiebre amarilla (YF), a partir del cual se desarrollaron las cepas YF17D-204 y 17DD¹³⁴ utilizadas desde 1936 para distintos fines²⁴.

La cepa 17D ha sido utilizada contra el virus de la fiebre amarilla en humanos durante más de 70 años mostrando ser segura y eficaz, además, de mantener una inmunidad hasta por 40 años. Aunque se desconocen los mecanismos celulares y moleculares por los cuales ocurre esto¹³⁴.

Está contraindicada para su administración en niños menores de 6 meses de edad, a pesar de esto, una sola dosis proporciona una inmunidad celular y de mucosas duradera e induce protección mediada por células T CD8. Se piensa que la fuerte inmunogenicidad se debe a que los vectores replican en células dendríticas en el sitio de inoculación¹¹⁴. Además, la proteína NS3 y E desencadenan una respuesta citotóxica y el gen E por sí solo genera una respuesta de tipo humoral, por lo que resulta adecuado expresar epítomos heterólogos en esta sección con los beneficios adicionales de que estimula el MHC I o II¹³⁴ y se han descrito 2 sitios de expresión en este sitio.

Los sitios de inserción descritos para YF17D son los sitios NS2B/NS3, la proteína E en el bucle fg y el gen NS1¹³¹ (figura 10).

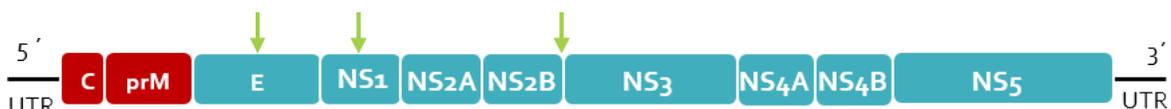


Figura 10. Representación esquemática del genoma del flavivirus. Los genes en rojo codifican para proteínas estructurales: C cápside; prM premembrana mientras que los genes en azul para proteínas no estructurales NS1 - NS5. Las flechas indican los sitios de inserción.¹³¹

Para construir un vector a partir de YF17D se sigue el método de pseudotipado, reemplazando los genes estructurales prM/M y E con los de otros flavivirus como el virus de la encefalitis japonesa, virus del Nilo occidental, y los cuatro serotipos del Dengue para generar virus quiméricos como vacunas contra pestivirus^{114, 24}; aunque puede haber mutaciones a nivel de las proteínas estructurales al adaptarse el virus

y la proteína foránea prM/M a la cápside de YF17D. Además, puede mutar a otros niveles mientras el virus se adapta a crecer en el cultivo¹³⁴.

La principal limitación de este sistema es su limitada capacidad de inserto, ya que solo puede expresar genes foráneos de hasta 1,5 Kb²⁴. Para resolver este problema se ha propuesto insertar genes de 2,0kb entre los genes E/NS1 dado que este sitio representa un cambio funcional de un gen estructural a uno no estructural, por lo tanto, el gen podría acomodarse mejor y generar menos alteraciones¹³⁴. Sin embargo, también habría que asegurar que las peptidasas necesarias para cortar el gen heterólogo estén presentes.

Otra alternativa para aumentar el tamaño de inserto aceptado por YF17D fue agregar IRES en el extremo 3' sin embargo, resultaron ser muy inestables y rápidamente se perdía este fragmento¹³⁴. Una estrategia más fue inserción de las secuencias foráneas en la región no traducible (UTR) 3', pero existen problemas de estabilidad genética¹¹⁴.

Este flavivirus se ha utilizado como prototipo de vacuna activa atenuada contra la misma fiebre amarilla y otros flavivirus como el virus del Nilo occidental²⁴, adicionalmente contra otros agentes etiológicos tales como *Plasmodium yoelii* logrando reducir la carga parasitaria en murinos y en *P. falciparum* donde indujo anticuerpos en ratones¹¹⁴. También se ha demostrado la protección de cobayas frente al virus de la fiebre de Lassa¹³⁵ mas prototipos vacunales en el **Cuadro 27**. En VPPC en cerdos se debe explorar más a fondo y la vacuna contra el JEV ha sido recientemente aprobada para su uso en humanos¹¹⁷. Además, se debe continuar verificando su seguridad en otras especies a parte del humano¹³¹.

El **Cuadro 26** menciona las fortalezas y debilidades de los flavivirus.

Cuadro 26. Fortalezas y debilidades de los Flavivirus ^{24, 114, 131, 134}.

| Fortalezas | Debilidades |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Provee de una inmunidad celular y de mucosas fuerte y prolongada. | Solo soporta un inserto de 1,5kb. |
| Induce protección medida por células T CD8. | Contraindicada en niños <6 meses. |
| | Se debe mejorar la estabilidad genética de inserción. |
| | Su seguridad continúa en evaluación. |

Cuadro 27. Vacunas candidatas en desarrollo basados en el virus de la fiebre amarilla (modificado de¹³⁶)

| Patógeno | Vacuna | Formulación de la vacuna | Especie | Estado | Respuesta inmunitaria |
|---------------------------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Virus de la encefalitis japonesa DENV1-4 | Imojev™(JE-CV) | Proteínas prME de JEV SA14-14-2 el 17D | | Con licencia | |
| | Dengvaxia® | 17D-204 con prM y E de YF reemplazados con los de los cuatro serotipos de DENV salvaje | | Con licencia | |
| WNV | ChimeriVax-WN01 | 17D con WN NY99prME | Ratones ICR y macacos Rhesus | Fase pre-clínica | Reducción de la neurovirulencia y el neurotropismo en comparación con el WNV de tipo salvaje |
| WNV | ChimeriVax-WN02 | Igual que WN01 con mutaciones añadidas en E:L107F, A316V y K440R | Humanos | Fase clínica II | Pruebas de seguridad e inmunogenicidad (seroconversión de AcN) de dosis baja, media y alta En equinos fue retirado en 2010 ya que causaba la muerte del animal ¹³¹ |
| ZIKV | ChimericVax-Zika (CYZ) | 17D con prME de ZIKV | A129 ratón | Pre-clínica | Cargas virales reducidas, neurovirulencia/ neuroinvasión reducidas, seroconversión de AcN, protección contra el desafío letal |
| ZIKV | YF-ZIKprM/E | 17D con prME of ZIKV | Ratones e inmunocompetentes | Pre-clínica | Protege contra el desafío letal; incluso en infecciones cerebrales y malformaciones en fetos de ratón |
| <i>Plasmodium falciparum</i> | 17D/13 and 17D/8 | SYVPSAEQI porción de proteína Plasmodium yoelii CS insertada en el sitio fg en EDII | Macacos Rhesus | Pre-clínica | Prueba de neurovirulencia en mono |
| YF17D/ENS1/Tc | <i>Trypanosoma cruzi</i> | Proteína-2 de superficie de amastigote insertada entre E y NS1 de 17D | Ratones A/J | Pre-clínica | Seroconversión de AcN |
| rYF17D/SIVGag45-269 | VIH | SIV mac 239 Secuencias Gag insertadas entre E y NS1 de 17D | Macacos Rhesus | Pre-clínica | Generación de respuestas de células T CD8+ |
| YFV17D/LASV-GPC | Lassa virus | Glicoproteínas de Lassa insertadas en la región C-terminal de la proteína 17D E | Cuyes | Pre-clínica | Seroconversión de anticuerpos; protección contra el desafío letal |
| YF-So | SARS-CoV-2 | Proteína de pico de prefusión no escindible de SARS-CoV-2 insertada entre E y S1 o 17D | Hámsters, ratones y macacos | Pre-clínica | Seguridad, AcN, protección contra SARS-CoV-2 |

DENV Virus del dengue; JEV Virus de la encefalitis japonesa; WNV Virus del Nilo occidental; YF Virus de la fiebre amarilla; YF Virus de la fiebre amarilla; YF17D Cepa 17D del virus de la fiebre amarilla; ZIKV Virus de zika

III. Vacunología basada en vectores virales

Vacunación

La primera evidencia relacionada con la vacunación data del siglo XI en la literatura china, donde implementaban la “variolización” para prevenir el contagio de viruela inoculándose pus proveniente de pacientes que habían contraído la enfermedad¹³⁷ en 1721 esta práctica es transmitida a el continente europeo por Mary Wortley Montague; a partir de este conocimiento, en 1796 el doctor Edward Jenner desarrolla un método para prevenir la viruela humana utilizando muestras de tejido infectado con viruela bovina¹⁰⁴ (primer ejemplo documentado de reacción inmune cruzada entre virus emparentados), esta técnica se utilizó durante más de siglo y medio en todo el mundo; pero es hasta 1799, después de haberla comprobado de forma metódica y experimental, Louis Pasteur en honor a Edward Jenner la denomina vacunación^{xxxvii, 137}. Estas primeras vacunas son las más básicas y se les conoce como vacunas clásicas, se caracterizan por portar al microorganismo patógeno modificado mediante métodos físicos y químicos con el objetivo de eliminar ya sea su capacidad patogénica en el caso de vacunas atenuadas (vivas) o replicativa en el caso de vacunas inactivadas (muertas), estas últimas además conservan intacta su estructura inmunogénica ^{8, 171, 139}. El **cuadro 28** reúne las características de las vacunas clásicas.

La vacuna se puede definir como aquella preparación inerte que transporta a un patógeno completo (vivos o muertos) o alguna fracción de éste (proteínas, subunidades o toxinas) que ayudan a entrenar al sistema inmune para reconocer y atacar a determinado antígeno (virus/bacteria/hongo/parásito) en el momento en que entra al cuerpo y no permite desarrollar la enfermedad ^{8, 140, 141}. Así pues, independientemente del sistema vacunal que siga para conseguirlo, el objetivo de cualquier vacuna es activar la respuesta inmune celular y humoral específicas.

^{xxxvii} **Vacunación**: significaba inoculación con fluido de vaca y “**vacunado**” era la persona a quien se le hacía la inoculación de la vacuna. “**Vacuna**” proviene del latín vacca que significa vaca.

Cuadro 28. Fortalezas y debilidades de las vacunas basadas en microorganismos vivos u inactivados ⁸

| | Fortalezas | Debilidades |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Vacunas atenuadas (vivas) | Estimula inmunidad humoral y celular. Inmunidad duradera y efectiva. Requiere pocas inoculaciones y dosis. Bajo costo de producción. Adyuvantes no necesarios. | Virulencia residual y posible reversión de la virulencia. Diseminación en la población. Enfermedad asociada a la vacuna. Microorganismos contaminantes. Problemas de almacenamiento. |
| Vacunas inactivadas (muertas) | No virulencia residual. Mas seguridad. Menos efectos secundarios. Estables. Bajo costo de producción. | No estimula la inmunidad celular. Induce una respuesta menos potente. Requiere varias inoculaciones y mayores dosis. Adyuvantes necesarios. |

Ambos tipos de respuesta se producen generalmente de forma coordinada y conjunta, aunque dependiendo del agente extraño, puede ser más importante un tipo de respuesta que otra¹⁴², funcionan de la siguiente manera:

La **respuesta inmune humoral** es liderada por células plasmáticas^{xxxviii}, que se han diferenciado a partir de linfocitos B los cuales generan anticuerpos que tienen el fin de reconocer, adherirse al agente extraño y evitar que penetre o infecte a las células esta respuesta funciona mejor ante una segunda exposición. La **respuesta inmune celular** corresponde a los linfocitos citotóxicos, los cuales reaccionan a la primera exposición al antígeno y rápidamente actúan adhiriéndose a los agentes invasores y liberando sustancias que atraigan a más células de defensa para eliminarlo; de esta forma, logramos que al primer ataque del patógeno, el organismo invadido tenga la posibilidad de controlar la enfermedad por sí mismo^{169, 170}.

^{xxxviii} **Células plasmáticas:** Son células B diferenciadas capaces de producir anticuerpos.

Vacunas de nueva generación

Incluso en la actualidad no se poseen vacunas contra todas las enfermedades de mayor impacto tanto en la producción pecuaria, la salud pública, así como en el comercio internacional; por esta razón, se busca el desarrollo de nuevas alternativas de vacunación que produzcan buenos títulos de anticuerpos por tiempo prolongado y a bajo costo; con este objetivo, el progreso de la ingeniería genética en técnicas de ADN recombinante (ADNr) ha jugado un papel importante en el desarrollo de vacunas de nueva generación²⁸ que superan los beneficios de las vacunas convencionales (vacunas vivas e inactivas), ya que permiten inducir una respuesta inmune dirigida, eficaz y con una seguridad sin precedentes, que evita la necesidad de inyectar al paciente microorganismos completos, muertos o modificados. Mas aun permiten la ausencia de adyuvantes y la necesidad de cadena fria⁸.

Las vacunas génicas se caracterizan por no administrarse directamente el antígeno inmunizante en el paciente a vacunar, sino más bien el gen que lo codifica, el cual dirige la síntesis de este antígeno por parte de las células del huésped. El antígeno sintetizado desencadena, a su vez, la correspondiente respuesta inmunitaria, que es de tipo humoral y celular, igual que en las vacunas vivas atenuadas¹⁴².

La OIE divide a las vacunas veterinarias derivadas de ADNr en 3 grandes categorías¹⁴⁵:

- **Categoría I:** consiste en productos viables o muertos que representan un riesgo insignificante para el medio ambiente, salud animal y pública. Estos pueden encontrarse inactivados, enteros o sus subunidades y son creados a partir de ADNr.
- **Categoría II:** contienen microorganismos vivos, modificados mediante la inclusión de genes que codifican antígenos marcadores, enzimas u otros subproductos bioquímicos o la eliminación de uno o más genes no necesarios o perjudiciales que pueden codificar virulencia, oncogenicidad, antígenos marcadores, enzimas u otros subproductos bioquímicos. En esta categoría se ubican los plásmidos.
- **Categoría III:** emplean vectores vivos como portadores de genes extraños derivados de una recombinación, que codifican antígenos inmunizantes.

Estos pueden portar uno o más genes extraños efectivos para inmunizar a la especie destino un ejemplo de ellos son los vectores virales.

Cabe resaltar que se combinan distintas técnicas para crear un producto vacunal seguro y eficaz; por ejemplo, se utilizan vectores no virales como los liposomas para transportar moléculas de ARN con el fin de evitar su degradación, también es utilizada para envolver a vectores virales muy inmunogénicos cuando no se busca estimular la respuesta inmune. Para definir a qué tipo de plataforma vacunal pertenece, debemos enfocarnos en la pieza clave, es decir, quién entrega finalmente el epítipo que estimulará la respuesta inmune. A continuación, veremos las diferentes plataformas vacunales existentes:

Vacunas de péptidos

Vacunas de subunidades o proteínas sintéticas

Consiste en la producción de una proteína o proteínas inmunogénicas purificadas de un agente infeccioso sin necesidad del propio microorganismo, esto se realiza mediante técnicas de ingeniería genética que fragmentan el ADN correspondiente y lo expresan en diferentes vectores, generalmente *Escherichia coli*, levaduras y baculovirus. La vacuna contra el parvovirus canino ha sido de las más exitosas⁸.

Partículas pseudovirales (Virus like particles)

Son estructuras que se ensamblan e imitan la conformación de un virión ensamblado, lo que las vuelve muy inmunogénicas, pero sin genoma viral lo que anula su capacidad replicativa¹⁴⁶. **(Cuadro 29)**

Cuadro 29. Fortalezas y debilidades de las vacunas basadas en péptidos⁸

| Fortalezas | Debilidades |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Uso autorizado en humanos. | Alto costo. |
| Amplia experiencia. | Necesita adyuvantes. |
| No requiere al agente infeccioso. | No replicantes. |
| Evita reacciones de hipersensibilidad y lesiones que causarían un virus completo. | Requiere una mayor cantidad de antígeno. |

Vacunas de ácidos nucleicos

Vacunas de ADN

Están formadas por un fragmento de ADN que contiene genes antigénicos que han sido seleccionados del patógeno en cuestión, estos van a ser insertados en un plásmido que al lograr penetrar la célula, el ADN será traducido a ARNm, que finalmente serán traducidos en proteínas antigénicas y presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II^{8, 28, 142}.

Vacunas de ARN

Es un pequeño fragmento de ARNm del virus que contiene las instrucciones para crear alguna proteína del virus, debe ser recubierta con una capa de lípidos para evitar su degradación. Al penetrar la célula, se codifica directamente la proteína antigénica para posteriormente ser expresada en su superficie¹³⁷. (**Cuadro 30**)

Cuadro 30. Fortalezas y debilidades de las vacunas de ADN Y ARN⁸

| | Fortalezas | Debilidades |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ARN | No requiere manejar al virus activo. Rápida producción y desarrollo. Inmunogénicas. Molécula lista para ser codificada. | Puede producir reacciones adversas. Costosa. Requiere infraestructura avanzada (cadena fría de -70°C). |
| ADN | No requiere manejar al virus activo. Muy estables. No requiere cadena fría. Bajo costo. Estimula respuesta celular y humoral. | La respuesta inmune no es tan potente. Requiere grandes cantidades de moléculas. Susceptible al juicio moral de ciertos sectores de la sociedad. |

Vacunas vectorizadas

Vectores virales

Son agentes biológicos de origen viral que permiten el transporte de una o varias moléculas de una entidad biológica hacia otra distinta con el objetivo de que se exprese una proteína de interés dentro de la célula blanco, estos pueden ser competentes o no competentes^{16, 62, 71}. Además, pueden ser utilizados ya sea como

vectores de entrega (*gene delivery*)¹⁴⁷ o bien como vectores de despliegue (*virus display*)¹⁴⁸. Algunos ejemplos de virus vacunales son *Poxvirus*, *Herpesvirus*, *Adenovirus*, *Paramyxovirus*, *Rhabdovirus* y *Flavivirus* (**ver capítulo II**).

Vectores no virales

Son agentes físicos (electroporación) o químicos (polímeros y liposomas) que permiten el transporte o la introducción de cierto material genético dentro de una célula con el objetivo de expresar una determinada proteína de interés ¹⁴⁹. (**Cuadro 31**).

Cuadro 31. Fortalezas y debilidades de las vacunas basadas en vectores virales ^{142, 149}

| Fortalezas | Debilidades |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Facilidad de manejo y producción (estructura predeterminada, solo cambia el gen de interés). | Experiencia limitada en humanos. |
| Estimulan la respuesta humoral y celular. | Existe riesgo en pacientes inmunocomprometidos. |
| Bajo costo. | Puede ser destruido antes de surtir efecto. |
| Baja recombinación <i>in vivo</i> y retorno a la virulencia. | Inmunidad previa. |
| Puede no requerir adyuvantes. | |

En la **figura 8** se resumen las diferentes plataformas vacunales que existen.

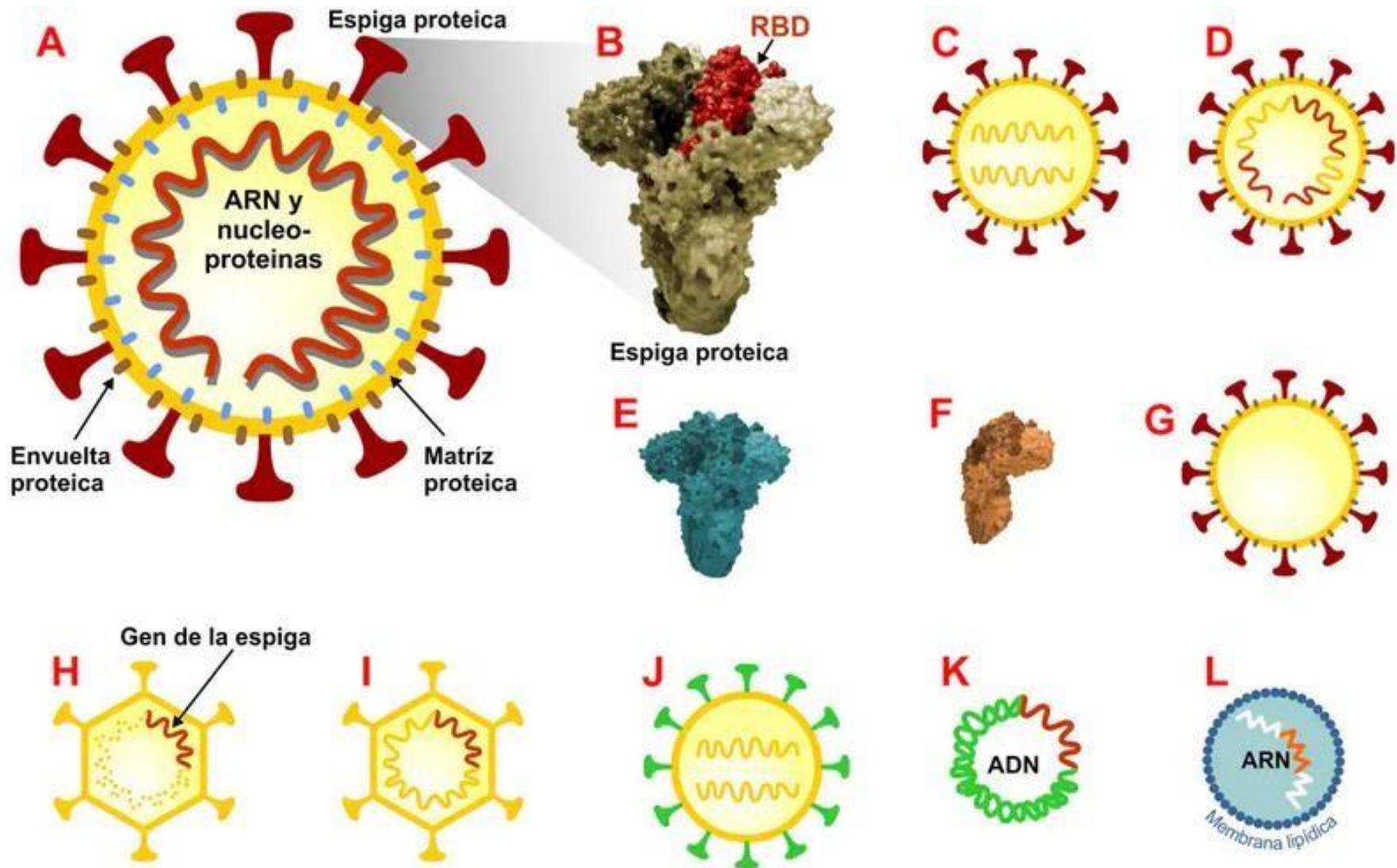


Figura 11. Diferentes plataformas vacunales enfocadas al SARS-CoV2. (A) Virus nativo/salvaje sin modificaciones. (B) Proteína Spike del coronavirus es inmunogénica, la fracción roja representa a la proteína RBD y media la unión al receptor celular por lo que es la llave de entrada a nuestras células. (C) vacuna de virus muerto/inactivado nótese el genoma ha cambiado de color al amarillo para indicar que el genoma ha sido inactivado y no puede replicarse. (D) Vacuna de virus activo/atenuado nótese que ciertas partes del genoma se encuentran todavía activas. (E). Vacuna de subunidades proteína Spike. (F) Proteína RBD. (G) Vacuna basada en Virus like particles nótese que no hay genoma solo la cápside asemejando al coronavirus. (H) Vacuna vectorizada por un adenovirus no replicante nótese que solo contiene al gen que codifica para la proteína Spike. (J) Vacuna vectorizada por un adenovirus replicante observe que el genoma está completo. (K) Vacuna de ADN, fragmento de ADN insertada en un plásmido. (L) Vacuna de ARN obsérvese rodeado por la membrana lipídica.

Obtenido de: https://www.huffingtonpost.es/entry/covid-19-por-que-las-primeras-vacunas-exigen-congelacion_es_5fbada4cc5b68ca87f7c727a

Actualidad y perspectivas del uso de vacunas vectorizadas

Con esta revisión podemos darnos cuenta de que existe una amplia variedad de candidatos virales para actuar como vectores, cada uno de ellos con diferentes limitantes y propiedades que facilitan su uso y, como hemos visto a lo largo de los capítulos, hay que ir experimentando con nuevas alternativas, proteínas, metodologías para salvar los distintos retos que nos presenta el posible uso de vectores para lograr una exitosa entrega del material antigénico y conseguir activar la respuesta inmune¹⁶. Es por esto que, aunque ya existen vectores virales aprobados para su comercialización y uso, en distintas terapias se continúan haciendo esfuerzos para mejorar, encontrar y desarrollar virus vectorizados más efectivos.

Las vacunas vectorizadas prometen reducir los riesgos de infección, reversión a la virulencia o patogenicidad, además, de seguridad durante su fabricación al manejar exclusivamente a los genes que codifican para las proteínas antigénicas^{28,142}.

Desconocemos los efectos a largo plazo que este tipo de biológicos pudieran tener a nivel genético, ya que esta ciencia es relativamente joven y no se poseen estudios ni ha transcurrido el tiempo necesario para sacar conclusiones. Se requiere hacer estudios o un seguimiento de los posibles efectos secundarios del uso de vacunas no solo vectorizadas si no génicas y la vacunación mundial basada en vacunas de ARN (Moderna, Pfizer, CureVac) y vectores virales (Johnson&Johnson, AstraZeneca, Sputnik V)^{150,151} contra el SARS-CoV2 podría proporcionarnos dicha información.

Sigue siendo un amplio campo por explorar y se tiene la esperanza de encontrar la fórmula adecuada, al menos para los agentes patógenos más importantes en la salud humana y animal. Algunos autores mencionan que el campo de la vectorología nos tomará dominarlo el mismo tiempo que tomó desarrollar los anticuerpos monoclonales y serán tan seguros como lo son ahora estos¹⁵².

Plataformas vacunales

Por el momento, las vacunas que ya se encuentran disponibles y aprobadas para su uso en animales se enlistan en el **cuadro 32**.

Cuadro 32. Vacunas basadas en vectores virales disponibles comercialmente en medicina veterinaria en México ¹⁵³

| Especies | Vacuna | Manufactura | Patógeno | Tecnología (vector viral) |
|----------|---------------------------|----------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Caninos | Recombitek® CDV | Boehringer Ingelheim | Virus del distemper canino | Vector viral (Canarypox) |
| Felinos | PureVAX® Recombinant FeLV | Boehringer Ingelheim | Virus de la leucemia felina | Vector viral (Canarypox) |
| Equinos | PureVAX® Feline Rabies | Boehringer Ingelheim | Rabia | Vector viral (Canarypox) |
| | ProteqFlu | Boehringer Ingelheim | Influenza equina | Vector viral (Canarypox) |
| Suinos | ALVAC®-WNV | Pfizer | Virus del oeste del Nilo | Vector viral (Canarypox) |
| | FosteraTMPCV | Zoetis | Circovirus porcino tipo 2 | Vector viral quimérico (PCV-1) |
| | Suvaxyn® CSF Marker iPED+ | Zoetis | Virus de la fiebre porcina clásica | Vector viral quimérico (BVDV) |
| Bovinos | Sequivity® | Merck Animal Health | Virus de la influenza porcina A | Replicón de ARN (VEEV) |
| | Adt.A24 FMD | GenVec | Fiebre aftosa | Vector viral (adenovirus) |
| Aves | Trovac®-AIV H5 | Boehringer Ingelheim | Influenza aviar | Vector viral (fowlpox) |
| | Vectormune® AI | CEVA Biomune | Influenza aviar | Vector viral quimérico (HVT/MD) |
| | Vectormune® ND | CEVA Biomune | Newcastle | Vector viral quimérico (HVT/MD) |
| | Vectormune® FP LT | CEVA Biomune | Laringotraqueítis infecciosa | Vector viral quimérico (fowlpox) |
| | Vectormune® FP MG | CEVA Biomune | <i>Mycoplasma gallisepticum</i> | Vector viral quimérico (fowlpox) |
| | Vectormune® FP-N | CEVA Biomune | Newcastle | Vector viral quimérico (fowlpox) |
| | Innovax®-ND | Merck Animal Health | Newcastle | Vector viral quimérico (HVT/MD) |
| | Innovax®-ND-IBD | Merck Animal Health | Newcastle y Enfermedad infecciosa de la bursitis | Vector viral quimérico (HVT/MD) |
| | Innovax®-ND-ILT | Merck Animal Health | Newcastle y Laringotraqueítis infecciosa | Vector viral quimérico (HVT/MD) |
| | Fauna silvestre | ORNAB® | Artemis Technologies, Inc | Rabia |
| Conejos | Raboral V-RG® | Boehringer Ingelheim | Rabia | Vector viral (virus vaccinia) |
| | Novibac® Myxo-RHD | Merck animal health | Enfermedad hemorrágica de los conejos | Vector viral quimérico (Myxoma virus) |
| | Novibac® Myxo-RHD Plus | Merck animal health | Enfermedad hemorrágica de los conejos | Vector viral quimérico (Myxoma virus) |

IV. Farmacología basada en vectores virales

Terapia génica

La terapia génica comenzó a inicios de los 70 y 80 con dos ensayos no aprobados donde se trató el síndrome de deficiencia de arginasa mediante terapia génica *in vivo* usando como vector el virus de papiloma de Shope de tipo salvaje con el objetivo de que la arginasa viral reemplazara la enzima faltante. El otro experimento fue la terapia génica *ex vivo* para la β -talasemia, se trasplantó células de la médula ósea tratadas con un plásmido que contenía β -globina. En ambos experimentos participaron dos pacientes, pero no hubo seguimiento y aparentemente no les perjudicó ni benefició¹⁵²

Le siguieron dos ensayos serios de terapia génica en Estados Unidos a finales de 1990 usando retrovirus, pero sin éxito. Durante el resto de la década de los noventa, el ritmo se aceleró y sólo en 1999 el NIH ^{xxxix} y RAC ^{xl} aprobaron 84 nuevos ensayos¹⁵². En septiembre de 1999 murió Jesse Gelsinger un hombre de 18 años al que se le estaba tratando una enfermedad hepática, Jesse fue la decimoctava persona en recibir el vector viral modificado y mientras que los pacientes anteriores solo presentaron síntomas parecidos a un gripa Jesse tuvo una reacción adversa severa, como consecuencia de una fuerte respuesta inmune causada por el uso del vector adenoviral, lo que le produjo un fallo multiorgánico y muerte cerebral, esto llevó a un fuerte escrutinio de la prensa al mundo de la terapia génica al tiempo que ayudo a comprender porque el diseño de los ensayos o los estándares éticos no eran satisfactorios, aunque también arrojaron una sombra injusta sobre todo el campo de la genética y ciencias biomédicas provocando que se cerraran investigaciones y estudios clínicos en marcha¹⁵⁴.

Hasta el año 2000, se empezó a escuchar de informes anecdóticos de los primeros éxitos aparentes: factor IX para la hemofilia, células madre transducidas para la inmunodeficiencia combinada severa ligada a X, y vectores oncolíticos. A mediados

^{xxxix} **NIC**: National institutes of health.

^{xl} **RAC**: the Recombinant DNA Advisory Committee.

del 2000, casi 4000 pacientes habían sido tratados con terapia génica en más de 500 ensayos¹⁵².

La innovación se ha acelerado dramáticamente en los últimos años gracias al descubrimiento de la tecnología de CRISPR-Cas9^{XLI} en el año 2012, herramienta que ha permitido una edición altamente específica de genes, de forma mucho más económica y rápida que métodos anteriores¹⁵⁴.

La terapia génica es cualquier procedimiento que transfiera ácido nucleico exógeno, ya sea ARN o ADN, mediante el cual se modifiquen genéticamente las células con el fin de tratar o prevenir una enfermedad^{62, 154}. La EMA^{XLII} excluye a las vacunas de esta definición. Tiene la finalidad de introducir genes ausentes; inhibir genes sobre expresados, y/o; la corrección de genes defectuosos, para restablecer una función celular defectuosa o ausente, interferir con una función celular no deseada, o introducir una nueva función¹⁵⁴. Y justamente la herramienta utilizada para entregar este material genético son los vectores (virales y no virales) de los que ya hemos hablado ampliamente.

Las estrategias que existen sobre terapia génica pueden clasificarse en¹⁴⁹:

- **Terapia génica de línea germinal:** el gen terapéutico o modificado se transmitirá a la siguiente generación, sin embargo, se desconoce las repercusiones que pueda generar en generaciones futuras. Existen mayores dificultades para insertar genes en células germinales.
- **Terapia génica somática:** el material genético se inserta en algunas células blanco, pero el cambio no se transmite a la siguiente generación por lo que existen menos preocupaciones bioéticas. Solo está permitida esta terapia.

El **cuadro 33** menciona las fortalezas y debilidades de la terapia génica.

^{XLI} **CRISPR** es el acrónimo del inglés para "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats" es decir "repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y espaciadas regularmente".

^{XLII} **EMA:** Agencia Europea de Medicamentos.

Cuadro 33. Fortalezas y debilidades de la terapia génica ¹⁴⁹

| Fortalezas | Debilidades |
|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Contribuye a prevenir una enfermedad. | Modificación de habilidades humanas. |
| Contribuye a erradicar enfermedades. | Cambiar el acervo genético. |
| Ayuda a reducir los riesgos de enfermedad en las generaciones futuras. | Aumento potencial de la enfermedad. |
| Extiende la esperanza de vida. | Problemas de seguridad. |
| Evita medicación frecuente. | Altos precios. |
| Permite una mejor comprensión de como trabajan los genes. | Preocupaciones éticas. |
| | Efecto a corto plazo de algunas estrategias. |
| | Potencial inexplorado. |
| | Podría no ser efectiva contra enfermedades complejas. |

Como ya se mencionó anteriormente se utilizan distintos mecanismos en terapia génica para corregir una patología^{154, 149}:

Terapia de augmentación (*augmentation*) genómica: o aumento de genes se refiere a agregar copias normales de genes generalmente para revertir una enfermedad.

Terapia de silenciamiento genético: en este caso es un gen que bloqueé la expresión del gen que se encuentra por defecto en la célula.

Terapia de edición genética: aquí se inserta una copia del gen corregido para sustituir al gen defectuoso que se expresa de forma natural en la célula logrando así corregir el funcionamiento normal esta.

Terapia génica suicida: se administra un gen que codifique para una pro-droga no tóxica en un metabolito citotóxico que solo se exprese en determinada célula diana regularmente se trata de células cancerígenas de esta forma solo se eliminan estas.

(Figura 9)

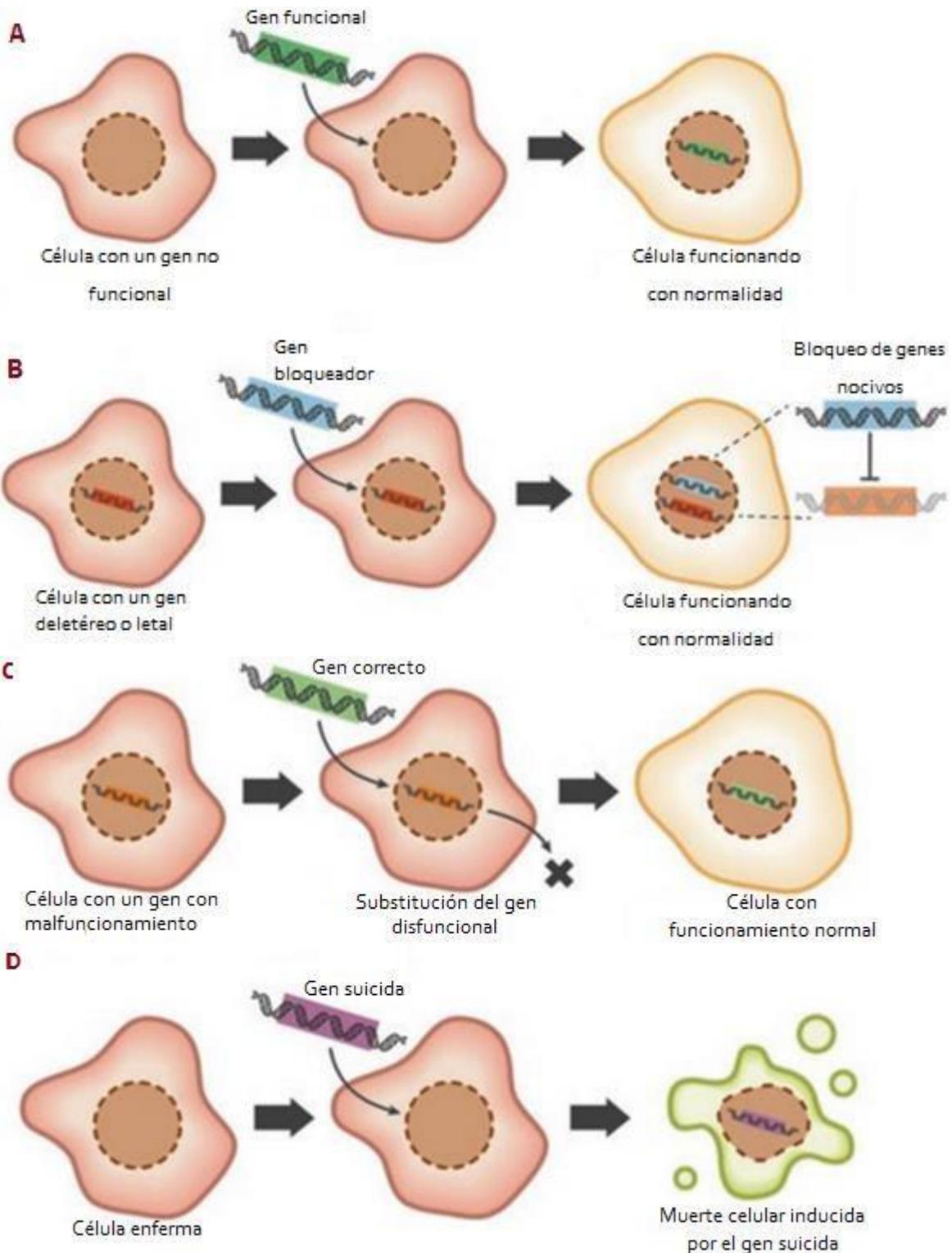


Figura 12. Estrategias utilizadas en terapia génica (modificado de)¹⁴⁹. A. Terapia de augmentación: agrega una copia de un gen normal B. Terapia de silenciamiento genético: es un gen que bloquea la expresión de otro gen. C. Terapia de edición genética: inserta una copia del gen corregido para sustituir a un gen disfuncional. D. Terapia génica suicida: se administra un gen que codifique un metabolito citotóxico que solo se exprese en células que se deseen eliminar.

Terapia oncológica

El cáncer es una transformación maligna mediante la cual una célula adquiere nuevas características que le permiten proliferar sin control e invadir localmente y a distancia órganos y sistemas en un individuo, esta etiología parece estar asociada a distintos factores que pueden ser tanto genéticos, epigenéticos^{XLIII} como nutricionales y medio ambientales. Actualmente, los tratamientos implementados hasta ahora no resultan suficientemente efectivos y el pronóstico de los pacientes no ha mejorado de forma significativa¹⁵⁵. En medicina veterinaria el cáncer es la enfermedad mortal más común en perros que va del 15 a 30 % de los perros y con un 26% en gatos¹⁵⁶. Debido a esto, se hace necesario implementar nuevas alternativas para tratar este padecimiento y una de estas es la terapia oncológica (o terapia génica enfocada a cáncer) la cual se enfoca en sustituir proteínas características de la célula tumoral que le permiten proliferar sin control, reducir la angiogénesis, mejorar la respuesta inmune, y/o bloquear la proliferación de células cancerígenas¹⁵⁵.

A continuación, se explican los distintos enfoques para corregir procesos oncológicos:

Terapia génica por corrección de mutaciones o inhibición de oncogenes activados

La mayoría de mutaciones que conducen al desarrollo tumoral afectan a protooncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN, además de ser comunes en muchos tumores, por lo que el restablecimiento de su función normal puede ser diana de una terapia génica contra el cáncer¹⁴⁹.

Por ejemplo, el gen p53, se encuentra mutado en más del 50% de los tumores, y su expresión normal puede restablecerse mediante un adenovirus que codifique la copia silvestre del mismo (Ad-p53). Ad-p53 ejerce un efecto antitumoral al administrarse en conjunto con quimio/radioterapia o con nuevos medicamentos antitumorales, maximizando la eliminación del tumor, y minimizando los efectos

^{XLIII} **Epigenéticos:** modificaciones genéticas que afectan la actividad genética sin cambiar la secuencia del ADN.

colaterales¹⁵⁷. Otro gen supresor tumoral frecuentemente mutado es el retinoblastoma (rb) el cual controla la proliferación celular. La copia silvestre del gen Rb (Ad-RB110) inhibe el crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo*¹⁵⁸, aunque una variante de este gen incluido en un vector ha tenido efectos adversos¹⁵⁹.

Otros mecanismos para mantener la homeostasis celular es controlar la apoptosis^{XLIV} y la autofagia^{XLV} si se ven alterados estos mecanismos se desarrollan procesos cancerígenos y puede haber resistencia a terapias tradicionales para resolver esto se puede inducir la apoptosis y sensibilizar a las células utilizando como diana a las proteínas Bcl-2 o ligandos como el factor de necrosis tumoral. La autofagia se puede inducir mediante el gen XAF1 con Adeno-XAF1 en células de cáncer gástrico¹⁶⁰.

Quimioterapia molecular o terapia génica suicida

Es la transfección y expresión de un gen suicida que codifica una enzima capaz de catalizar una pro-droga no tóxica en un metabolito citotóxico potente y de corta duración con la capacidad de difundir desde la célula tumoral donde se produce y a las células tumorales adyacentes a esta ^{149, 104}. **(Cuadro 34)**

Cuadro 34. Genes utilizados en quimioterapia molecular ⁸

| Gen suicida | Profármaco | Metabolito tóxico |
|-----------------------------------------------------|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Timidina-cinasa del Herpesvirus (HSV-tk-GCV) | Ganciclovir (GCV) | Deoxitimidina trifosfato, un análogo de la purina que inhibe la ADN polimerasa e induce apoptosis como resultado del arresto del ciclo celular |
| Citosina desaminasa (CD) de <i>E. coli</i> | 5-fluorocitocina (5-FC) | 5-fluorouracilo |

Se han desarrollado nuevos sistemas suicidas como el basado en el gen del citocromo P450 (gen suicida) y ciclofosfamida o isofosfamida como profármacos

^{XLIV} **Apoptosis:** muerte celular programada.

^{XLV} **Autofagia:** muerte celular programada (tipo II).

cuya actividad antitumoral se potencializa con la transferencia del gen del citocromo P450¹⁶¹.

Numerosos ensayos preclínicos en el tratamiento de glioma, cáncer de vejiga, colon, gástrico y pulmón utilizando el vector HSV-tk-GCV han resultado exitosos y se ha sugerido como tratamiento primario o adyuvante¹⁶⁰.

Oncólisis viral

Es la lisis de células tumorales utilizando virus de replicación selectiva (incapaces de replicarse en células normales), provocando oncólisis, y liberación de los viriones a las células tumorales circundantes manteniendo el ciclo de infección, replicación y lisis mientras haya células tumorales, su efecto se incrementa si va acompañado de genes que codifiquen citocinas o enzimas^{149, 162}. Por lo general, se utilizan adenovirus por su ciclo de vida lítico sustituyendo sus promotores virales por promotores selectivos del tumor a tratar como alfa-feto proteína antígeno prostático específico, calicreína, mucina 1 y osteocalcina¹⁶⁰. También se pueden diseñar virus que complementen su actividad oncolítica con la enzimática como el virus oncolítico Ad5/3-Delta24-FCU1 es una quimera (Ad5/3) con eficiencia de transfección mejorada, restringe su expresión a células tumorales deficientes en Rb y porta el gen FCU1 un gen suicida que codifica una enzima que metaboliza la 5-Fluorocitosina, en 5-fluorouracilo y monofosfato de 5-fluorouridina^{163, 164}.

Virus naturalmente oncotrópicos, como los parvovirus, el virus de la estomatitis vesicular o el virus de la enfermedad de Newcastle están siendo estudiados como terapia oncológica¹⁶².

Terapia génica inmunopotenciadora o vacunación genética

Debido a que las células tumorales son poco inmunogénicas y además, no causan inflamación ni daño tisular, no se activa una respuesta inmune que controle su crecimiento por lo tanto esta terapia busca inducir una inmunización activa e incrementar la capacidad del sistema inmune de reconocer y rechazar antígenos tumorales¹⁶⁰. Ya sea mediante la introducción de genes que expresen citocinas estimuladoras (IL-2, IL-12 o interferón) o la modificación de células del sistema

inmune (CPA y linfocitos infiltrantes de tumor natural killer o linfocitos T citotóxicos específicos dirigidos a antígenos tumorales) que resultan en el incremento de la inmunogenicidad o en la potenciación de la respuesta inmune respectivamente¹⁴⁹. Las múltiples alteraciones que pueden estar presentes en un tumor dificultan la elección de un blanco molecular único por lo que se suelen utilizar varias dianas. En un modelo de mieloma múltiple *in vitro* se administró Ad-p53/GM-CSF^{XLVI}/B7-1^{XLVII} e indujo apoptosis, proliferación de linfocitos y citotoxicidad específica contra células tumorales¹⁵⁷.

Terapia génica antiangiogénesis

La angiogénesis es fundamental para la vascularización del tumor y favorece su supervivencia, progresión y desarrollo de metástasis, su inducción requiere de varios factores de crecimiento y proteínas, y un desequilibrio en estos favorece la neovascularización del tumor. Un tumor sin irrigación permanecerá en estado latente y eventualmente morirá al no recibir nutrientes¹⁶⁰.

Con este objetivo se buscan genes que inhiban la angiogénesis tales como la endostatina humana presente en el vector adenoviral Ad-rhEndo evitando la angiogénesis endógena, logrando mayor espectro antitumoral, menor toxicidad y manteniendo una alta expresión. Diversos vectores han demostrado buena actividad antitumoral actualmente se está evaluando en casos de cáncer avanzado en humanos¹⁶⁵. Por otro lado el rAd, que codifica la endostatina murina, inhibe la formación de vasos sanguíneos, la migración y proliferación de células endoteliales, e induce apoptosis en células del endotelio vascular *in vitro* e *in vivo*¹⁶⁶.

Para mejorar los resultados de la terapia se combinan dos o varias de estas estrategias terapéuticas o terapias tradicionales (neoadyuvancia^{XLVIII}) manteniendo resultados exitosos mejorando la respuesta de los pacientes y disminuyendo la dosis a administrar¹⁶⁰. La **figura 10** desglosa las estrategias utilizadas en terapia oncológica.

^{XLVI} **GM-CSF**: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.

^{XLVII} **B7-1**: molécula coestimuladora también llamada CD80 y modulan la respuesta de células T.

^{XLVIII} **Neoadyuvancia**: es la terapia génica en combinación con los tratamientos tradicionales.

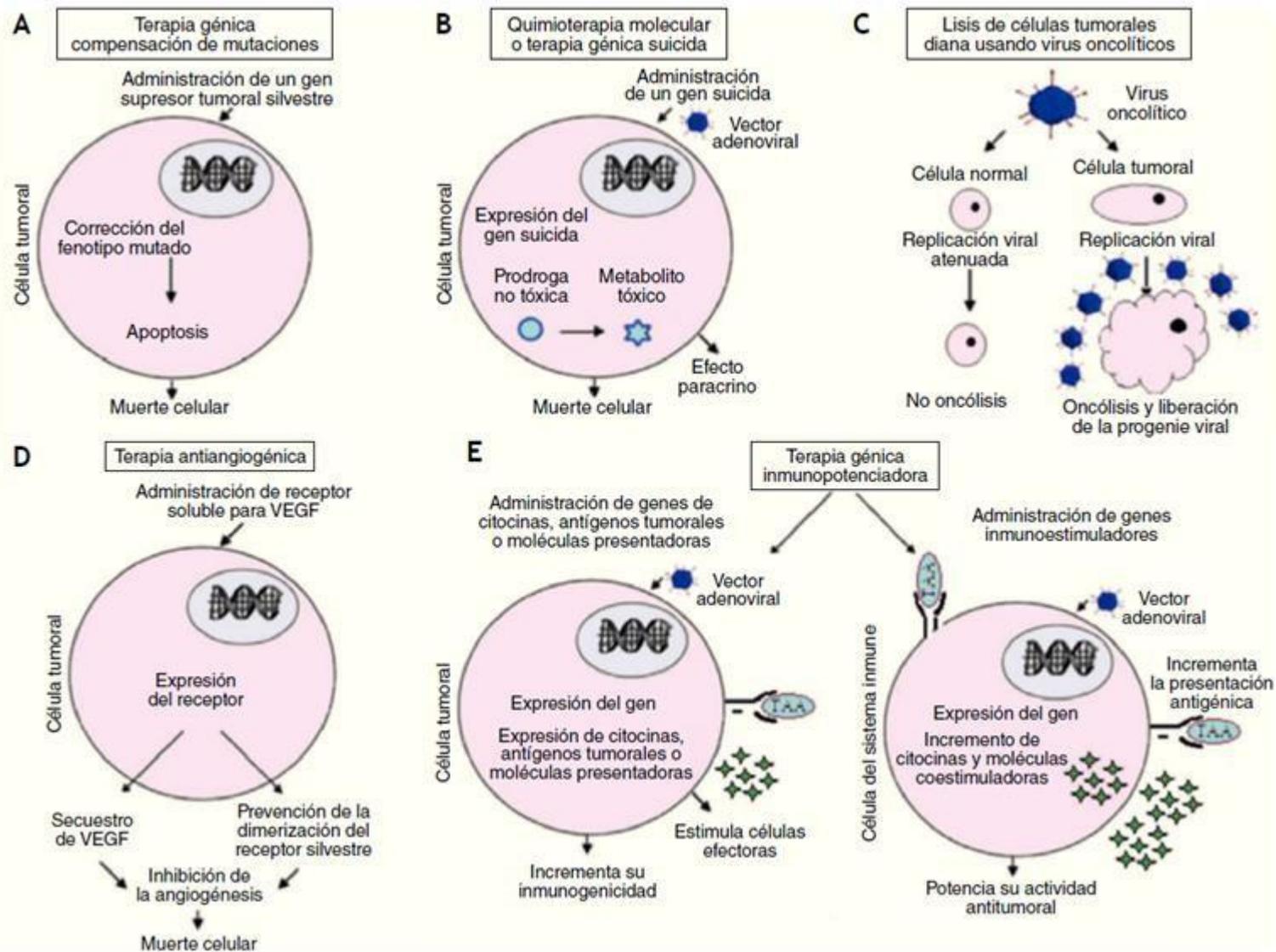


Figura 13. Diversos enfoques de terapia génica enfocada a cáncer utilizando adenovirus como vector ¹⁶⁰ A: Sustitución de un gen supresor tumoral mutado: resulta en apoptosis y muerte de la célula tumoral. B. Quimioterapia molecular o terapia génica suicida: la transfección y expresión de un gen suicida resulta en la conversión de una pro-droga no tóxica en un metabolito citotóxico. C. Oncólisis viral: la infección viral del tumor resulta en la replicación viral, oncólisis, y liberación de los viriones a las células circundantes. D. Terapia génica antiangiogénica: la transfección de un receptor soluble para factor de crecimiento endotelial vascular resulta en el secuestro del factor de crecimiento endotelial vascular y la subsecuente inhibición de la neovascularización. E. Terapia génica inmunopotenciadora: a la izquierda se observa una célula tumoral a la que se le administran citocinas, antígenos tumorales o CPA que potencien su inmunogenicidad y atraiga a células efectoras. Del lado derecho se representa a una célula del sistema inmune a la cual se le incrementa su producción de citocinas y moléculas coestimuladoras potenciando así su actividad antitumoral.

Conclusión

A pesar de las características y aparentes limitaciones que deja ver cada posible vector viral, gracias a la perseverancia e ingenio de los investigadores se ha logrado resolver gran parte de los obstáculos y aprovechar al máximo el potencial de cada virus expuesto en esta tesis; aunque siguen existiendo limitaciones, esto no ha evitado que se desarrollen productos eficaces contra distintas enfermedades.

La presente revisión bibliográfica ha permitido constatar que los vectores virales poseen una alta capacidad inmunogénica que le permite promover respuestas tanto humorales como celulares en la mayoría de los casos e incluso activar respuestas mucosales y lactogénicas; además, en algunos casos permite ser administrado vía oral lo que trae beneficios por la facilidad de administración, disminución de costos y permitir inmunizar fauna silvestre. En varios candidatos virales tenemos problemas de premunidad, como a poxvirus, paramyxovirus, herpesvirus y adenovirus. Esto puede suceder cuando lo aplicamos a su hospedero natural, pero se ha mejorado la eficacia con técnicas de pseudotipado, intercalado de serotipos y vacunación heteróloga, ya que esto permite cambiar o limitar el tropismo celular y espectro de hospederos que infecta al modificar sus proteínas de superficie; asimismo, se puede aprovechar el tropismo celular natural de cada virus en beneficio de la terapia que se busque implementar.

La mayoría de los vectores virales posee una capacidad de inserto bastante aceptable en comparación al tamaño de su genoma, como los alphavirus y los flavivirus, sin embargo, también destacan los poxvirus, herpesvirus, baculovirus y coronavirus por tener una capacidad muy superior de inserto; aunque si fueran virus muy citotóxicos, se prefiere manejarlos como no replicantes.

Los adenovirus, lentivirus y AAV, tienen problemas para generar títulos suficientemente altos; los problemas relacionados a la reversión de la virulencia se centran en coronavirus y retrovirus. La integración al genoma está dada

principalmente por los retrovirus y el AAV1 y por lo tanto la posibilidad de mutagénesis insercional se restringe a estos. La recombinación genética entre cepas silvestres y vectores virales rara vez ocurre y es posible contrarrestarla, excepto en coronavirus.

Aunque cada virus puede modificarse y adaptarse hacia distintas terapias, son especialmente más provechosos en un tipo preciso de terapia. Por ejemplo, los retrovirus, herpesvirus, alfavirus y rhabdovirus son especialmente útiles para implementar terapias oncolíticas; mientras que, en vacunación, los baculovirus, paramyxovirus, poxvirus y adenovirus resultan excelentes candidatos para inducir respuestas inmunogénicas sistémicas y protectoras. En cambio, para implementar terapias génicas, los AAV, el herpesvirus y los lentivirus son mejores candidatos. Por otra parte, los Bunyavirus y alphavirus se encuentran en fases experimentales para desarrollar vacunas y como posible anticancerígeno en alphavirus.

Además, se espera que el uso de esta novedosa herramienta ayude a mejorar los pronósticos de enfermedad tanto en animales como en humanos, la calidad de vida del individuo, así como los índices productivos y por ende los económicos.

Finalmente, podemos concluir que los vectores virales son herramientas biotecnológicas útiles para desarrollar eficazmente terapias génicas, oncológicas y/o vacunales. Además, no solo se ha quedado en fases experimentales, sino que existen productos disponibles para su uso, por lo que ya es una realidad en constante evolución y es por ello que este conocimiento debe estar disponible para la formación de futuros profesionistas. Este es el primer documento en español que recopila a profundidad aspectos esenciales para la comprensión de la vectorología viral con enfoque a ciencias veterinarias.

Perspectivas

La gran variedad de virus existentes otorgan una amplia gama de posibilidades y características que nos conviene estudiar para desarrollar el máximo potencial de esta herramienta y así generar terapias y fármacos útiles contra distintas enfermedades, e incluso, podría aplicarse para el transporte de biomateriales, polímeros, diagnósticos radiológicos, entre otras aplicaciones, incluso fuera de la biomedicina. Sin embargo, aún persisten ciertas limitaciones que deben mejorar, por ejemplo el limitado tamaño de inserto que puede resolverse haciendo uso de la heterodimerización, o bien, el uso de otros sistemas de expresión como los minigenomas.

Asimismo, se requiere profundizar más en el estudio de vectores bunyavirales e investigar a cada candidato de esta familia como un prototipo diferente, ya que operan de formas variadas, aunque se les visualiza como candidatos vacunales.

La habilidad de insertarse en el genoma puede actuar como un arma de doble filo: por un lado, permite que un transgen se exprese por mucho más tiempo, y por el otro, puede derivar en una mutagénesis insercional como con los retrovirus y AAV1, por lo que lo que más nos conviene es que se mantenga en forma de concatámeros o de manera episomal como en los Adenovirus.

Por otro lado, la principal preocupación de la comunidad científica es la probabilidad de que el vector viral se integre al genoma del hospedero (mutagénesis insercional), sin embargo, para que esto ocurra se requiere de un sitio de inserción, promotores, transposones, integrasas y ligasas apropiados que dirijan la correcta integración en el genoma, y solo los retrovirus y el AAV1 son los únicos capaces de realizar esta acción, que incluso puede corregirse modificando ciertos genes.

El problema de la premunidad de un virus ocurre principalmente cuando lo aplicamos a su hospedero natural, pero se resuelven fácilmente con técnicas de pseudotipaje, al intercalar serotipos, o haciendo un protocolo de vacunación heteróloga. Por ello, hace falta investigar más a fondo los genomas virales y las

interacciones con el huésped, así como durante todo el trayecto hasta la célula diana, con la posterior transcripción y expresión del transgén. Así como explorar nuevas estrategias que permitan lograr el desempeño óptimo del vector, extrapolar y/o fusionar técnicas que funcionaron en otros vectores virales para mejorar el diseño y producción de otros, así como hacer uso de la heterodimerización para conservar las características más sobresalientes de cada virus.

Como se ha visto a lo largo de esta tesis, la vectorología es una ciencia novedosa que ha permitido el diseño y construcción de virus con diversos fines, siendo las vacunas las más popularizadas, esto representa una oportunidad de desarrollo tecnológico y económico. Es por ello que dar a conocer esta temática a nivel licenciatura es necesario con la finalidad de abrir el panorama a una nueva ciencia para el gremio veterinario.

Referencias

1. Koscinczuk, P. Domesticación, bienestar y relación entre el perro y los seres humanos. *Argentina Rev. Vet. ISSN* **28**, 1669 (2017).
2. Larson, G. & Fuller, D. Q. The Evolution of Animal Domestication. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110512-135813> **45**, 115-136 (2014).
3. Jesús, A. & Mariezkurrena, K. Orígenes y evolución de la domesticación en el país vasco iconografía europea de animales domésticos. *Dep. Cult. y Polit. Linguist. Gobierno v*, (2017).
4. Vigne, J.-D. The origins of animal domestication and husbandry: A major change in the history of humanity and the biosphere. *CR Biologies* 171-181 (2011).
5. Dator, J. Humans from the Holocene to Anthropocene Epochs. in *Beyond Identities: Human Becomings in Weirding Worlds* 107-113 (Springer Cham, 2022). doi:10.1007/978-3-031-11732-9_10.
6. Ayala, V. C. Importancia nutricional de la carne. *Rev. Investig. e Innovación Agropecu. y Recur. Nat.* **3**, 54-61 (2018).
7. Suresh Kumar Gahlawat, Joginder Singh Duhan, Raj Kumar Salar, Priyanka Siwach, Suresh Kumar, P. K. *Advances in Animal Biotechnology and its Applications*. (Springer, 2018). doi:10.1007/978-981-10-4702-2.
8. Grande, M. M. Vacunas Veterinarias. *Fac. Vet. Trab. FIN GRADO* 6-34 (2016).
9. Aslam, B. *et al.* Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect. Drug Resist.* **11**, 1645 (2018).
10. Alberts, B., Johnson, A. & Lewis, J. *Molecular Biology of the Cell. Isolating, Cloning, and Sequencing DNA*. (Garland Science, 2002).
11. Lacal, C. T. *Principles of molecular virology*. (Delve Publishing, 2019).
12. Vannucci, L., Lai, M., Chiuppesi, F., Ceccherini-Nelli, L. & Pistello, M. Viral vectors: A look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol.* **36**, 1-22 (2013).
13. Pellett, P. E., Mitra, S. & Holland, T. C. Basics of virology. in *Handbook of Clinical Neurology* 23 (Elsevier B.V., 2014). doi:10.1016/B978-0-444-53488-0.00002-X.
14. Del, L. *et al.* TRANSCRITOS RELACIONADOS CON LATENCIA (RL) Bovine Herpesvirus-1 : The Role of Latency-Related Genes. *Acta Biol. Colomb.* **13**, 3-22 (2008).
15. Le Bec, C. & Douar, A. M. Gene Therapy Progress and Prospects-Vectorology: design and production of expression cassettes in AAV vectors. *Gene Ther.* **13**, 805-813 (2006).
16. Chinea Rodríguez, B. E. & Blanes, Ó. E. Terapia Génica: Vectores Virales y sus Aplicaciones Gene therapy: Viral vectors and applications. *Psychol. Lat. Copyr. Especial*, 67-69 (2018).
17. J, M. *et al.* Oral vaccination of wildlife using a vaccinia-rabies-glycoprotein

- recombinant virus vaccine (RABORAL V-RG®): a global review. *Vet. Res.* **48**, (2017).
18. C, L. *et al.* Vaccination of calves using the BRSV nucleocapsid protein in a DNA prime-protein boost strategy stimulates cell-mediated immunity and protects the lungs against BRSV replication and pathology. *Vaccine* **26**, 4840-4848 (2008).
 19. EJ, W., PL, M., M, C. & C, J. Postmarketing safety surveillance of trivalent recombinant influenza vaccine: Reports to the Vaccine Adverse Event Reporting System. *Vaccine* **35**, 5618-5621 (2017).
 20. Logunov, D. Y. *et al.* Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet* **397**, 671-681 (2021).
 21. W, L. *et al.* Feline foamy virus-based vectors: advantages of an authentic animal model. *Viruses* **5**, 1702-1718 (2013).
 22. Nacional, C. Desarrollo De Vacuna Mexicana “ Patria ” Para Covid -19. *Gob. México* (2021).
 23. Scher, G. & Schnell, M. J. Rhabdoviruses as vectors for vaccines and therapeutics. *Curr. Opin. Virol.* **44**, 169-182 (2020).
 24. Brun, A. *et al.* Antigen delivery systems for veterinary vaccine development. Viral-vector based delivery systems. *Vaccine* **26**, 6508-6528 (2008).
 25. Pires, D. P., Cleto, S., Sillankorva, S., Azeredo, J. & Lu, T. K. Genetically Engineered Phages: a Review of Advances over the Last Decade. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80**, 523-543 (2016).
 26. Baraibar, J. A. Algunos conceptos sobre vacunas bacterianas y virales. *Vet.* **41**, 35-42 (2006).
 27. Waehler, R., Russell, S. J. & Curiel, D. T. Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 573-587 (2007).
 28. Alvarado, Arcelia; Tenorio, V. G. Promesas y limitaciones de las vacunas génicas Promises and limitations of dna vaccines. *Rev. Mej. Ciencias Farm.* **37**, 26-37 (2006).
 29. Wong, D. W. *The ABCs of gene cloning.* (Springer, 2018).
 30. Salazar Montes, A., Sandoval Rodríguez, A. & Armendáriz Borunda, J. *Biología molecular : fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud.* (McGraw-Hill Education, 2013).
 31. Larry Snyder, Joseph E. Peters, and T. M. H. Plasmids. in *Molecular Genetics of bacteria* (ed. Champness, W.) 183-218 (ASM Press, 2013).
 32. Gonzáles Ángel. *Biología molecular: Principios y aplicaciones.* (2019).
 33. Mena-Enriquez, M., Flores-Contreras, L. & Armendáriz-Borunda, J. Adeno-associated viral vectors: methods for production and purification for gene therapy applications. *Rev. Investig. Clínica* **64**, 487-494 (2012).
 34. Gong, Y. *et al.* A highly efficient recombinant canarypox virus-based vaccine against canine distemper virus constructed using the CRISPR/Cas9 gene editing method. *Vet. Microbiol.* **251**, 108920 (2020).

35. Bleiziffer, O., Eriksson, E., Yao, F., Horch, R. E. & Kneser, U. Gene transfer strategies in tissue engineering: Tissue Engineering Review Series. *J. Cell. Mol. Med.* **11**, 206-223 (2007).
36. MacLanchlan, N. J. & E. J. D. *Fenner's Veterinary virology*. (ELSEVIER, 2011).
37. Lefkowitz, E. J., Wang, C. & Upton, C. Poxviruses: Past, present and future. *Virus Res.* **117**, 105-118 (2006).
38. Yang, Z., Gray, M. & Winter, L. Why do poxviruses still matter? *Cell Biosci.* **11**, (2021).
39. M, M., GL, S. & B, M. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 7415-7419 (1982).
40. Moss, B. Poxvirus DNA replication. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, (2013).
41. G, S. & C, S. Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery. *Curr. Drug Targets. Infect. Disord.* **3**, 263-271 (2003).
42. J, T. *et al.* NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* **188**, 217-232 (1992).
43. Brochier, B., Costy, F. & Pastoret, P. P. Elimination of fox rabies from Belgium using a recombinant vaccinia-rabies vaccine: an update. *Vet. Microbiol.* **46**, 269-279 (1995).
44. ML, van der L. *et al.* Evaluation of swinepox virus as a vaccine vector in pigs using an Aujeszky's disease (pseudorabies) virus gene insert coding for glycoproteins gp50 and gp63. *Vet. Rec.* **134**, 13-18 (1994).
45. Spibey, N. *et al.* Papers: Novel bivalent vectored vaccine for control of myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease. *Vet. Rec.* **170**, 309 (2012).
46. S, R. *et al.* Novel Trivalent Vectored Vaccine for Control of Myxomatosis and Disease Caused by Classical and a New Genotype of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus. *Vaccines* **8**, 1-15 (2020).
47. CH, R. *et al.* Recombinant capripoxvirus expressing the hemagglutinin protein gene of rinderpest virus: protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease viruses. *Virology* **204**, 425-429 (1994).
48. Rerks-Ngarm, S. *et al.* Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0908492> **361**, 2209-2220 (2009).
49. Zheng, M. *et al.* Construction and immunogenicity of a recombinant fowlpox virus containing the capsid and 3C protease coding regions of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol. Methods* **136**, 230-237 (2006).
50. Shen, G. *et al.* Immune responses of pigs inoculated with a recombinant fowlpox virus coexpressing GP5/GP3 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine IL-18. *Vaccine* **25**, 4193-4202 (2007).
51. CL, Q. *et al.* Protection of chickens against highly lethal H5N1 and H7N1 avian influenza viruses with a recombinant fowlpox virus co-expressing H5 haemagglutinin and N1 neuraminidase genes. *Avian Pathol.* **32**, 25-31 (2003).
52. Ramírez, J. C., Gherardi, M. M., Rodríguez, D. & Esteban, M. Attenuated

- Modified Vaccinia Virus Ankara Can Be Used as an Immunizing Agent under Conditions of Preexisting Immunity to the Vector. *J. Virol.* **74**, 7651 (2000).
53. Viner, K. M., Girgis, N., Kwak, H. & Isaacs, S. N. B5 deficient vaccinia virus as a vaccine vector for the expression of a foreign antigen in vaccinia immune animals. *Virology* **361**, 356 (2007).
 54. Moss, B. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 11341-11348 (1996).
 55. Rziha, H.-J. *et al.* Genomic Characterization of Orf Virus Strain D1701-V (Parapoxvirus) and Development of Novel Sites for Multiple Transgene Expression. *Viruses* **11**, (2019).
 56. M, B. *et al.* Development and use of fowlpox vectored vaccines for avian influenza. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1081**, 193-201 (2006).
 57. Weli, S. C. & Tryland, M. *Avipoxviruses: infection biology and their use as vaccine vectors*. <http://www.virologyj.com/content/8/1/49> (2011) doi:10.1186/1743-422X-8-49.
 58. Hunter, J. E., Ramos, L. & Wolfe, J. H. Viral Vectors in the CNS. *Curated Ref. Collect. Neurosci. Biobehav. Psychol.* 179-188 (2017) doi:10.1016/B978-0-12-809324-5.02446-9.
 59. Reinhard, W., Stephen J, R. & T. Curiel, D. Gene delivery and gene therapy with herpes simplex virus-based vectors. *Gene* **264**, 1-9 (2001).
 60. Kamel, M. & El-Sayed, A. Utilization of herpesviridae as recombinant viral vectors in vaccine development against animal pathogens. *Virus Research* vol. 270 197648 (2019).
 61. Lentz, T. B., Gray, S. J. & Samulski, R. J. Viral vectors for gene delivery to the central nervous system. *Neurobiol. Dis.* **48**, 179-188 (2012).
 62. Robbins, P. D. & Ghivizzani, S. C. Viral Vectors for Gene Therapy. *Pharmacol. Ther.* **80**, 35-47 (1998).
 63. Vrba, S. M., Kirk, N. M., Brisse, M. E., Liang, Y. & Ly, H. Development and Applications of Viral Vectored Vaccines to Combat Zoonotic and Emerging Public Health Threats. *Vaccines* **8**, 31 (2020).
 64. Kay, M. A. & Woo, S. L. C. Gene therapy for metabolic disorders. *Trends Genet.* **10**, 253-257 (1994).
 65. Kamel, M. & El-Sayed, A. Utilization of herpesviridae as recombinant viral vectors in vaccine development against animal pathogens. *Virus Research* vol. 270 (2019).
 66. Kamel, M. & El-Sayed, A. Utilization of herpesviridae as recombinant viral vectors in vaccine development against animal pathogens. *Virus Res.* **270**, 197648 (2019).
 67. Giry-Laterrière, M., Verhoeyen, E. & Salmon, P. Viral vectors for gene therapy Methods and protocols. in *Viral vectors for gene therapy Methods and protocols* (eds. Merten, O.-W., Généthon, Evry, F. & Al-Rubeai, M.) 458 (Humana Press, 2011).

68. Akli, S. *et al.* Transfer of a foreign gene into the brain using adenovirus vectors. *Nat. Genet.* 1993 33 **3**, 224-228 (1993).
69. Epifanova, E. A., Borisova, E. V., Salina, V. A. & Babaev, A. A. Viral vectors for delivering gene material into cells and their application in neurobiology (Review). *Sovrem. Tehnol. v Med.* **9**, 162-173 (2017).
70. Ghasemiyeh, P., Mohammadi-Samani, S., Firouzabadi, N., Dehshahri, A. & Vazin, A. A focused review on technologies, mechanisms, safety, and efficacy of available COVID-19 vaccines. *Int. Immunopharmacol.* **100**, 108162 (2021).
71. Martínez-Flores, F., Fausto Alejandro, J.-O. & Villegas-Castrejón, H. Biología molecular de los vectores adenovirales. *Acad. Mex. Cirugia, A.C* **74**, 483-493 (2006).
72. Legorreta-herrera, M., Martínez-flores, F., Sánchez Hernández, F. & Zentella-dehesa, A. Los Vectores Virales Y La Transgénesis. *VERTIENTES Rev. Espec. en Ciencias la Salud* **15**, 5-14 (2012).
73. Sierra Delgado, J., Bautista Nino, P., Vargas Castellanos, C., Serrano Diaz, N. & Rincón, M. Respuesta inmune contra los virus adenoasociados Características de los virus adenoasociados. *Med. (Buenos Aires)* **79**, 493-501 (2019).
74. Monahan, P. E. & Samulski, R. J. Adeno-associated virus vectors for gene therapy: More pros than cons? *Mol. Med. Today* **6**, 433-440 (2000).
75. Kantor, B., Bailey, R. M., Wimberly, K., Kalburgi, S. N. & Gray, S. J. *Methods for gene transfer to the central nervous system. Advances in Genetics* vol. 87 (Elsevier, 2014).
76. Tal, J. Adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *J. Biomed. Sci.* **7**, 279-291 (2000).
77. Targovnik, María Martínez-Solís, Salvador Herrero, A. M. Engineering of the baculovirus expression system for optimized protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology* vol. 103 113-123 (2019).
78. Salem, T. Z. *et al.* The Influence of SV40 polyA on Gene expression of baculovirus expression vector systems. *PLoS One* **10**, 1-17 (2015).
79. F, R. G. The baculovirus replication cycle: Effects on cells and insects. *Baculovirus Mol. Biol.* (2013).
80. Schaly, S., Ghebretatios, M. & Prakash, S. Baculoviruses in Gene Therapy and Personalized Medicine Introduction to Gene Therapy Using Viral Vectors. 115-132 (2021).
81. Targovnik, A. M. *et al.* MINI-REVIEW Solutions against emerging infectious and noninfectious human diseases through the application of baculovirus technologies. **1**, 3.
82. Rohrmann, G. Baculovirus Molecular Biology. *Baculovirus Mol. Biol.* 1-2 (2008).
83. Guti, L. M., Villase, F. & Contreras, O. Baculovirus, un patógeno versátil. 26-33.
84. Ono, C., Okamoto, T., Abe, T. & Matsuura, Y. Baculovirus as a tool for gene

- delivery and gene therapy. *Viruses* **10**, 12 (2018).
85. Kitajima, M. & Takaku, H. Induction of antitumor acquired immunity by baculovirus Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus infection in mice. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**, 376-378 (2008).
 86. Felberbaum, R. S. The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnol. J.* **10**, 702-704 (2015).
 87. Palomares, L. A., Realpe, M. & Ramírez, O. T. An Overview of Cell Culture Engineering for the Insect Cell-Baculovirus Expression Vector System (BEVS). 501-519 (2015) doi:10.1007/978-3-319-10320-4_15.
 88. Joseph Loscalzo, Anthony Fauci, Dennis Kasper, Stephen Hauser, Dan Longo, J. L. J. *Principios de Medicina Interna*. (McGraw Hill Medical, 2020).
 89. Talavera, A. & Sánchez, H. NUEVOS SISTEMAS VIRALES EN TERAPIA GÉNICA. **25**, 36-42 (2002).
 90. Biasco, L., Baricordi, C. & Aiuti, A. Retroviral Integrations in Gene Therapy Trials. *Mol. Ther.* **20**, 709-716 (2012).
 91. Schambach, A., Meetzing, T. & Baum, C. Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies. in (ed. Smyth Templeton, N.) 1135 (CRC Press Taylor & Francis Group, 2009).
 92. Cornetta, K. SAFETY ASPECTS OF GENE THERAPY. *Br. J. Haematol.* **80**, 421-426 (1992).
 93. Roth, J. A. & Cristiano, R. J. Gene therapy for cancer: What have we done and where are we going? *J. Natl. Cancer Inst.* **89**, 21-39 (1997).
 94. Escors, D., Breckpot, K. & Hirszfeld, Ó. L. Lentiviral Vectors in Gene Therapy: Their Current Status and Future Potential. (2010) doi:10.1007/s00005-010-0063-4.
 95. Bonci, D. *et al.* 'Advanced' generation lentiviruses as efficient vectors for cardiomyocyte gene transduction in vitro and in vivo. *Gene Ther.* **10**, 630-636 (2003).
 96. Ershler, M. A., Drize, N. I., Nifontova, I. N., Terskikh, A. V. & Chertkov, I. L. Lentivirus vector can integrate in the genome and exist and replicate in the cell as an episome. *Bull. Exp. Biol. Med.* **135**, 164-166 (2003).
 97. Tercero, B. & Makino, S. Reverse genetics approaches for the development of bunyavirus vaccines. *Curr. Opin. Virol.* **44**, 16-25 (2020).
 98. Ren, F. *et al.* Recent Advances in Bunyavirus Reverse Genetics Research: Systems Development, Applications, and Future Perspectives. *Front. Microbiol.* **12**, (2021).
 99. Schmidt, K. M. & Mühlberger, E. Marburg Virus Reverse Genetics Systems. *Viruses* **8**, 17 (2016).
 100. Huang, Y. *et al.* Genome-Wide Search for Competing Endogenous RNAs Responsible for the Effects Induced by Ebola Virus Replication and Transcription Using a trVLP System. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* | www.frontiersin.org **7**, 479 (2017).

101. Boyer, J. C. & Haenni, A. L. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology* **198**, 415-426 (1994).
102. Hu, Z., Ni, J., Cao, Y. & Liu, X. Newcastle disease virus as a vaccine vector for 20 years: A focus on maternally derived antibody interference. *Vaccines* **8**, (2020).
103. Bukreyev, A. *et al.* Recovery of infectious respiratory syncytial virus expressing an additional, foreign gene. *J. Virol.* **70**, 6634-6641 (1996).
104. Sasso, E. *et al.* New viral vectors for infectious diseases and cancer. *Semin. Immunol.* **50**, 101430 (2020).
105. Matveeva, O. V., Guo, Z. S., Shabalina, S. A. & Chumakov, P. M. Oncolysis by paramyxoviruses: Multiple mechanisms contribute to therapeutic efficiency. *Mol. Ther. - Oncolytics* **2**, 15011 (2015).
106. Fulber, J. P. C. & Kamen, A. A. Development and Scalable Production of Newcastle Disease Virus-Vectored Vaccines for Human and Veterinary Use. *Viruses* **14**, 975 (2022).
107. Song, Q. *et al.* Artificial Recombination May Influence the Evolutionary Analysis of Newcastle Disease Virus. *J. Virol.* **85**, 10409-10414 (2011).
108. Meng, C. *et al.* Potential of genotype VII Newcastle disease viruses to cause differential infections in chickens and ducks. *Transbound. Emerg. Dis.* **65**, 1851-1862 (2018).
109. Walker, P. J., Dietzgen, R. G., Joubert, D. A. & Blasdell, K. R. Rhabdovirus accessory genes. *Virus Res.* **162**, 110-125 (2011).
110. Rojas, M. S. Presencia de anticuerpos contra el vmvs de la rabia y el virus lpm (familias: rhabdoviridae y paramyxoviridae) en murciélagos no hematófagos (orden: chiroptera.) De dos localidades del estado de colima, mexico. (UNAM, 2002).
111. Okumura, A. & Harty, R. N. Rabies Virus Assembly and Budding. *Adv. Virus Res.* **79**, 23-32 (2011).
112. Davis, B. M., Rall, G. F. & Schnell, M. J. Everything You Always Wanted to Know About Rabies Virus (But Were Afraid to Ask). *Annu. Rev. Virol* **2**, 451-471 (2015).
113. Faber, M. *et al.* A single immunization with a rhabdovirus-based vector expressing severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) S protein results in the production of high levels of SARS-CoV-neutralizing antibodies. *J. Gen. Virol.* **86**, 1435-1440 (2005).
114. Manuel Ribes Fernández, J. Desarrollo y aplicación experimental de vectores virales basados en genomas de coronavirus para prevenir infecciones por rotavirus. *Universitat de Valencia* (Universidad de Valencia, 2009). doi:10.1038/132817a0.
115. Planells, C. J. R. Expresión de proteínas de fusión viral en células tumorales como mecanismo para inducir una respuesta antitumoral Tesis. (Universidad de Chile, 2018).
116. Rose, J. K. & Clarke, D. K. Rhabdoviruses as vaccine vectors: From initial development to clinical trials. *Biol. Pathog. Rhabdo- Filoviruses* 199-230

- (2014) doi:10.1142/9789814635349_0009.
117. Martina Bécares Palacios. Diseño de vectores basados en genomas de coronavirus: estabilidad y modulación de la respuesta inmune innata. (Universidad autónoma de Madrid, 2015).
 118. Rahman, M. M., Talukder, A., Chowdhury, M. M. H., Talukder, R. & Akter, R. Coronaviruses in wild birds - A potential and suitable vector for global distribution. *Vet. Med. Sci.* **7**, 264-272 (2021).
 119. Enjuanes, L., Sola, I., Alonso, S, Escors, D & Zfflaeiga, S. Coronavirus Reverse Genetics and Development of Vectors for Gene Expression. *CTMI* **287**, 161-197 (2005).
 120. Enjuanes, L. *et al.* Coronavirus derived expression systems. *J. Biotechnol.* **88**, 183-204 (2001).
 121. Shen, H. *et al.* Towards construction of viral vectors based on avian coronavirus infectious bronchitis virus for gene delivery and vaccine development. *J. Virol. Methods* **160**, 48-56 (2009).
 122. Almazán, F. *et al.* Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5516-5521 (2000).
 123. Horne, K. M. E. & Vanlandingham, D. L. Bunyavirus-vector interactions. *Viruses* **6**, 4373-4397 (2014).
 124. Smith, D. R. *et al.* Attenuation and efficacy of live-attenuated Rift Valley fever virus vaccine candidates in non-human primates. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **12**, 22 (2018).
 125. Stobart, C. C. & Moore, M. L. RNA virus reverse genetics and vaccine design. *Viruses* **6**, 2531-2550 (2014).
 126. Cheng, B. Y. H., Nogales, A., de la Torre, J. C. & Martínez-Sobrido, L. Development of live-attenuated arenavirus vaccines based on codon deoptimization of the viral glycoprotein. *Virology* **501**, 35-46 (2017).
 127. Chen, R. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae ICTV VIRUS TAXONOMY PROFILES. *J. Gen. Virol.* (2019) doi:10.1099/jgv.0.001072.
 128. Baxter, V. K. & Heise, M. T. Immunopathogenesis of alphaviruses. *Adv. Virus Res.* **107**, 315 (2020).
 129. Lundstrom, K. Alphavirus Vectors as Tools in Cancer Gene Therapy. <http://dx.doi.org/10.1177/153303460200100111> **1**, 83-88 (2016).
 130. Bonaldo, M. C., Caufour, P. S., Freire, M. S. & Galler, R. The yellow fever 17D vaccine virus as a vector for the expression of foreign proteins: development of new live flavivirus vaccines. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **95**, 215-223 (2000).
 131. Beck, A. S. & Barrett, A. D. T. Current status and future prospects of yellow fever vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **14**, 1479-1492 (2015).
 132. Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R. & Rice, C. M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**, 649-688 (1990).
 133. Serena, M. S. & Metz, G. E. Microbiología veterinaria. in (Intermédica, 2019).

134. Bonaldo, M. C., Sequeira, P. C. & Galler, R. The yellow fever 17D virus as a platform for new live attenuated vaccines. *Hum. Vaccines Immunother.* **10**, 1256-1265 (2014).
135. Bredenbeek, P. J. *et al.* A recombinant Yellow Fever 17D vaccine expressing Lassa virus glycoproteins. *Virology* **345**, 299-304 (2006).
136. Hansen, C. A. & Barrett, A. D. T. The Present and Future of Yellow Fever Vaccines. *Pharmaceuticals* **14**, 26 (2021).
137. Castaño Castrillón, J. J. Las Vacunas. *Arch. Med.* **21**, (2021).
138. Baraibar, J. A. Vacunas y Anacultivos. *Sitio Argentino Prod. Anim.* **41**, 35-42 (2006).
139. Rubio, A. *et al.* Vaccination guidelines for dogs (canine) and cats (feline) in Peru. *Rev. Investig. Vet. del Peru* **29**, 1463-1474 (2018).
140. Salleras, L. Tecnologías de producción de vacunas (III) . Vacunas génicas. 145-149 (2002).
141. Castelán, D. C. A tres siglos de la primera vacuna , ¿ qué tan cerca estamos de una para la COVID-19? Parte I. 1-9.
142. López, M., Mallorquín, P., Pardo, R. & Vega, M. *Vacunas de nueva generación Informe de Vigilancia Tecnológica.* (2004).
143. Monserrat Sanz, J., Gómez Lahoz, A. M., Sosa Reina, M. D. & Prieto Martín, A. Introducción al sistema inmune. Componentes celulares del sistema inmune innato. *Med.* **12**, 1369-1378 (2017).
144. Zenteno-Savín1, T., , Carlos A. Reyes-Ramos, Taryn E. Symon, L. J. R.-J., Bitzer-Quintero, O. K. & Gaxiola-Robles, R. Bases del Funcionamiento del Sistema Inmune. *Recursos naturales y sociedad* 55-66 (2020).
145. Luis, F. & Moncayo, G. Principios de producción de vacunas veterinarias. in *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2018* 16 (2018).
146. Kushnir, N., Streatfield, S. J. & Yusibov, V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine* **31**, 58-83 (2012).
147. Shao, M., Fan, Y., Zhang, K., Hu, Y. & Xu, F.-J. One nanosystem with potent antibacterial and gene-delivery performances accelerates infected wound healing. *Nano Today* **39**, 101224 (2021).
148. Zhang, L. *et al.* Construction of a full-length antibody phage display vector. *J. Immunol. Methods* **494**, 113052 (2021).
149. Clévio, N., Mendonça, L. & Matos, C. A. *A handbook of gene and cell therapy.* (Springer, 2020). doi:10.1007/978-3-030-41333-0.
150. Kramps, T. & Probst, J. Messenger RNA-based vaccines: progress, challenges, applications. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **4**, 737-749 (2013).
151. Mishra, S. K. & Tripathi, T. One year update on the COVID-19 pandemic: Where are we now? *Acta Trop.* **214**, 105778 (2021).
152. Scollay, R. Gene therapy: A brief overview of the past, present, and future.

- Ann. N. Y. Acad. Sci.* **953**, 26-30 (2001).
153. Aida, V. *et al.* Novel Vaccine Technologies in Veterinary Medicine: A Herald to Human Medicine Vaccines. *Front. Vet. Sci.* **8**, 654289 (2021).
 154. Silva, G. E. Avances en terapia génica en humanos: algunos conceptos básicos y un recorrido histórico. *Rev. Médica Clínica Las Condes* **33**, 109-118 (2022).
 155. Josefa A. Rodríguez*, Lina M. Martínez, N. C. y A. L. C. Terapia genica para el tratamiento del cáncer. *Rev. Colomb. Cancerol.* **18**, 27-40 (2014).
 156. L. B. Brønden, A. F. and A. T. K. Veterinary cancer registries in companion animal cancer: a review | Enhanced Reader. *Vet. Comp. Oncol.* **5**, 133-144 (2007).
 157. Ren, S. P. *et al.* Adenoviral-mediated transfer of human wild-type p53, GM-CSF and B7-1 genes results in growth suppression and autologous anti-tumor cytotoxicity of multiple myeloma cells in vitro. *Cancer Immunol. Immunother.* **55**, 375-385 (2006).
 158. Mushtaq, M., Gaza, H. V. & Kashuba, E. V. Role of the RB-Interacting Proteins in Stem Cell Biology. *Adv. Cancer Res.* **131**, 133-157 (2016).
 159. Zhang X, Multani AS, Zhou JH, Shay JW, McConkey D, Dong L, Kim CS, Rosser CJ, Pathak S, B. W. Adenoviral-mediated retinoblastoma 94 produces rapid telomere erosion, chromosomal crisis, and caspase-dependent apoptosis in bladder cancer and immortalized human urothelial cells but not in normal urothelial cells. *Cancer Res.* **63**, 760 (2003).
 160. Rodríguez, J. A., Martínez, L. M., Cruz, N. & Cómbita, A. L. Terapia génica para el tratamiento del cáncer. *Rev. Colomb. Cancerol.* **18**, 27-40 (2014).
 161. Maatta, A.-M., Samaranayake, H., Pikkariainen, J., Wirth, T. & Yla-Herttuala, S. Adenovirus mediated herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir gene therapy for resectable malignant glioma. *Curr. Gene Ther.* **9**, 356-367 (2009).
 162. Dorer, D. E. & Nettelbeck, D. M. Targeting cancer by transcriptional control in cancer gene therapy and viral oncolysis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 554-571 (2009).
 163. Heise, C. *et al.* An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat. Med.* **6**, 1134-1139 (2000).
 164. Bischoff, J. R. *et al.* An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science (80-)*. **274**, 373-376 (1996).
 165. Adhim, Z. *et al.* E10A, an adenovirus-carrying endostatin gene, dramatically increased the tumor drug concentration of metronomic chemotherapy with low-dose cisplatin in a xenograft mouse model for head and neck squamous-cell carcinoma. *Cancer Gene Ther.* **2012** **192** **19**, 144-152 (2011).
 166. Jin, X. *et al.* Evaluation of endostatin antiangiogenesis gene therapy in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther.* **8**, 982-989 (2001).
 167. Legorreta-herrera, M., Martínez-flores, F., Sánchez Hernández, F. & Zentella-dehesa, A. Los Vectores Virales Y La Transgénesis. *VERTIENTES Rev. Espec. en Ciencias la Salud* **15**, 5-14 (2012).

Bibliografía

- I-II; XXXVIII** Ian R. Tizard. Introducción a la inmunología veterinaria. (ElsevierSaunders, Evolve, 2009).
- III-VII; XIV; XV; XVIII** Salazar Montes, A., Sandoval Rodríguez, A. & Armendáriz Borunda, J. Biología molecular: fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. (McGraw-Hill Education, 2013)
- VIII** Houdebine, L.-M. Animal Transgenesis and Cloning. *Animal Transgenesis and Cloning* vol. **8** (2003).
- IX** F. Galán-Sánchez, C. F.-G. del Á. y M. R.-I. Infecciones víricas. *Medicine (Baltimore)*. **49**, 9 (2014).
- X** Leitinger, B. Discoidin Domain. *Receptor Functions in Physiological and Pathological Conditions. International Review of Cell and Molecular Biology* 39-87 (Academic Press, 2014).
- XI** María del Mar Blanco Gutiérrez, Ana Dómenech Gómez, E. G.-L. D. *Manual gráfico de inmunología y enfermedades infecciosas del perro y el gato*. (SERVET, 2014).
- XII** Legorreta-herrera, M., Martínez-flores, F., Sánchez Hernández, F. & Zentelladehesa, A. Los vectores virales y la transgénesis. *VERTIENTES Rev. Espec. en Ciencias la Salud* **15**, 5-14 (2012).
- XIII** Miller, J. Cis-trans configurations. in *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (ed. Hughes, S. M. and K.) 383 (Elsevier, 2001).
- XVI-XVII** Brun, A. *et al.* Antigen delivery systems for veterinary vaccine development. Viral-vector based delivery systems. *Vaccine* **26**, 6508-6528 (2008).
- XIX** Audesirk, B. *Biología: la vida en la tierra con fisiología*. (Pearson, 2013).
- XX** Kantor, B., Bailey, R. M., Wimberly, K., Kalburgi, S. N. & Gray, S. J. Methods for gene transfer to the central nervous system. *Advances in Genetics* vol. **87** (Elsevier, 2014).
- XXI** Monahan, P. E. & Samulski, R. J. Adeno-associated virus vectors for gene therapy: More pros than cons? *Mol. Med. Today* **6**, 433-440 (2000).
- XXII; XXXIII** Richard Cammack , Teresa Atwood , Peter Campbell , Howard Parish , Anthony Smith , Frank Vella, and J. S. Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology. (Oxford University Press, 2008).
- XXIII-XXVI** Targovnik, A. M. *et al.* MINI-REVIEW Solutions against emerging infectious and noninfectious human diseases through the application of baculovirus technologies. **1**, 3.
- XXVII** Marín Sánchez, O. *et al.* Rol de los interferones tipo I y tipo III: Una revisión de conceptos. *Rev. Científica Ágora* **6**, (2019)
- XXVIII** Santolaya de P, María Elena. Superantígenos y su rol en enfermedades

- infecciosas. *Revista médica de Chile*, 126(7), 846-854, (1998).
- XXIX** Asadi, K. & Gholami, A. Virosome-based nanovaccines; a promising bioinspiration and biomimetic approach for preventing viral diseases: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **182**, 648-658 (2020)
- XXX** Planells, C. J. R. Expresión de proteínas de fusión viral en células tumorales como mecanismo para inducir una respuesta antitumoral. Tesis. (Universidad de Chile, 2018).
- XXXI** Kaur, K. & Prabha, V. Immunocontraceptives: New Approaches to Fertility Control. *Biomed Res. Int*, 1-15 (2014).
- XXXII** Shen, H. *et al.* Towards construction of viral vectors based on avian coronavirus infectious bronchitis virus for gene delivery and vaccine development. *J. Virol. Methods* **160**, 48-56 (2009).
- XXXIV** Nguyen, M. & Haenni, A.-L. *Expression strategies of ambisense viruses. Elsevier* **93**, 141-150 (2003).
- XXXV** Rubio, V. G. G. Manual de prácticas Epidemiología. UAEM Amecameca, (2021).
- XXXVI** M. Bar-Joseph, W. Dawson. Citrus Tristeza Virus, *Encyclopedia of Virology*. Academic Press, (Third Edition) 520-525 (2008).
- XXXVII** Castaño Castrillón, J. J. Las Vacunas. *Arch. Med.* **21**, (2021).
- XXXIX - XL** Scollay, R. Gene therapy: A brief overview of the past, present, and future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **953**, 26-30 (2001)
- XLI - XLII** Silva, G. E. Avances en terapia génica en humanos: algunos conceptos básicos y un recorrido histórico. *Rev. Médica Clínica Las Condes* **33**, 109-118 (2022).
- XLIII** Dupont, C., Armant, D. R. & Brenner, C. A. Epigenetics: Definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin. Reprod. Med.* **27**, 351-357 (2009).
- XLIV-XLV** Francisco J. Trigo Tavera, G. V. E. *Patología General Veterinaria. D.R.© Univ. Nac. Auton. Mex.* **53**, 1689-1699 (2004)
- XLVI-XLVII** Ren, S. P. *et al.* Adenoviral-mediated transfer of human wild-type p53, GM-CSF and B7-1 genes results in growth suppression and autologous anti-tumor cytotoxicity of multiple myeloma cells in vitro. *Cancer Immunol. Immunother.* **55**, 375-385 (2006).
- XLVIII** Rodríguez, J. A., Martínez, L. M., Cruz, N. & Cómbita, A. L. Terapia génica para el tratamiento del cáncer. *Rev. Colomb. Cancerol.* **18**, 27-40 (2014)

Proceso de diseño y construcción de vectores virales

Resumido de A Handbook of gene and cell therapy¹⁴⁹ y Biología molecular: fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud⁸⁰.

Diseño de vectores virales

Antes de construir un vector primero hay una serie de factores que debemos considerar en conjunto, ya que están altamente relacionados entre ellos de tal manera que omitir uno afectará negativamente el resultado final.

1. Objetivo:

Es necesario conocer la patofisiología de la enfermedad para elegir adecuadamente la terapia, ésta puede ir enfocada a terapia génica, terapia oncológica, o vacunal y según la elegida deberá cumplir ciertos requisitos para poder ser implementadas correctamente.

- Terapia génica: busca transferir una copia de un gen saludable para reparar la falta o disfunción de este en un individuo.
- Terapia oncológica: su objetivo es estimular la respuesta inmune únicamente contra las células cancerígenas e ignorando a las células sanas.
- Terapia vacunal: se busca estimular la respuesta inmune contra uno o varios antígenos específicos.

2. Selección e identificación del gen y la célula blanco

Escoger y determinar los genes y la célula blanco donde se debe expresar nuestra proteína de interés, es fundamental para llevar a cabo una terapia exitosa y debe seleccionarse según las características propias de la etiología hacia la que va dirigida; para esto, debemos conocer la célula blanco, y las proteínas y elementos con los que interactúa para dirigir y permitir la entrada del vector únicamente a las células blanco.

3. Ruta de administración

La ubicación de la célula o gen de interés y el tipo de vehículo de administración del gen (vector) es determinante para decidir la ruta más eficiente de administración. Existen dos tipos de administración de genes como se ve en la **figura 14** la administración directa de genes en el organismo mediante terapia *in vivo* es la entrega directa a las células y órganos o a todo el cuerpo sin embargo, tiene más probabilidades de no concretar su efecto biológico, además, de tener mayor remanencia tóxica; la administración indirecta a células mediante terapia *ex vivo* es tratada fuera del cuerpo y luego trasplantada a los pacientes, dando más control a las células tratadas, pero es técnicamente más complejo (**cuadro 35**)¹⁴⁹.

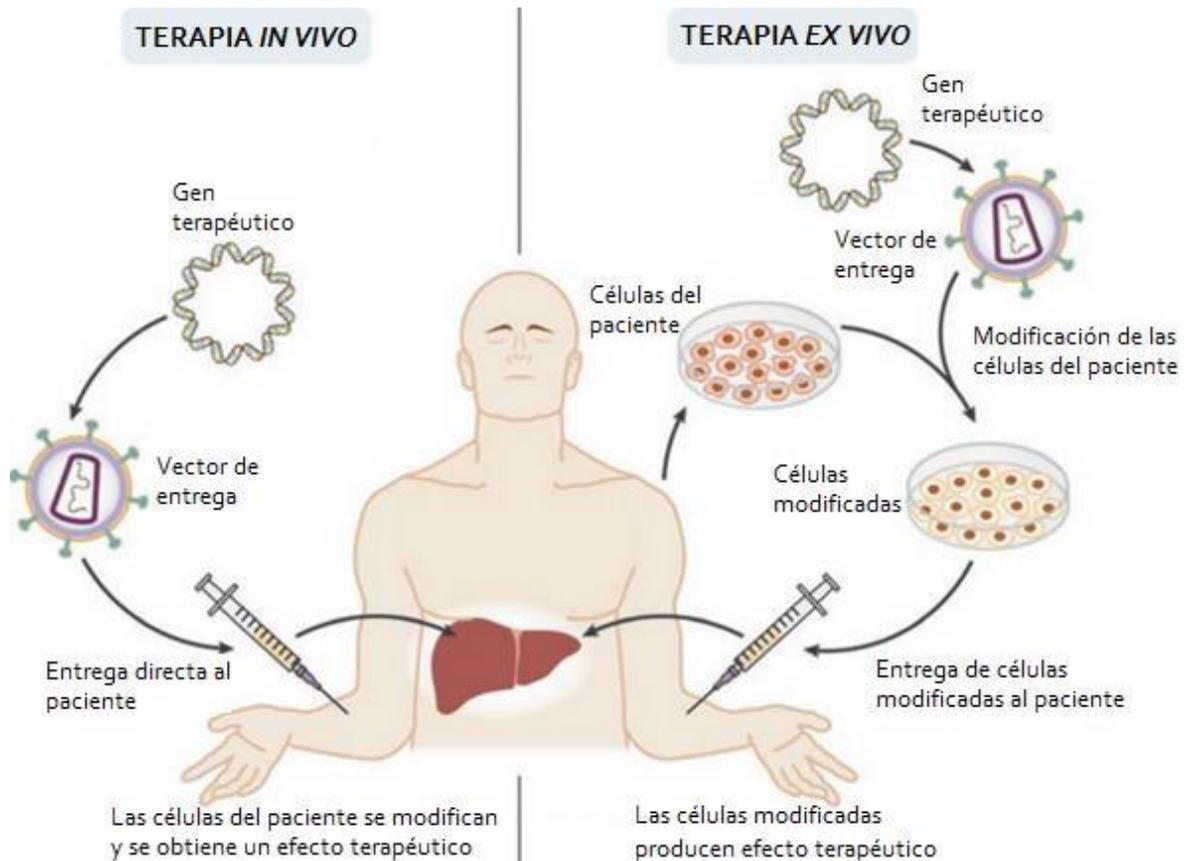


Figura 14. Terapia in vivo y ex vivo ¹⁴⁹. A la izquierda se ejemplifica la terapia *In vivo* donde el gen terapéutico después de ser insertado en el vector viral se administra directamente en el individuo; en el lado derecho se observa de igual forma el gen terapéutico insertado dentro del vector viral, pero en esta ocasión es administrado dentro de células cultivadas fuera del individuo, cuando el vector es internalizado y el gen transferido y expresado dentro de estas células es administrado al individuo donde se busca el efecto.

Dependiendo del tipo celular puede ser complicada su administración (problemas de compatibilidad, células defectuosas).

Cuadro 35. Comparación de las rutas de administración ex vivo e in vivo en terapia génica ¹⁴⁹

| <i>In vivo</i> | <i>Ex vivo</i> |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Administración directa. | Administración de células basales. |
| Menos invasivo. | Más invasivo. |
| Técnicamente más simple. | Técnicamente más complejo. |
| Vectores introducidos directamente. | No se introducen vectores directamente. |
| El control de seguridad es más difícil. | Mayor control de la seguridad. |
| Control reducido de las células tratadas. | Mayor control de las células tratadas. |
| Se puede aplicar a un gran número de enfermedades. | Se aplica solo a una pequeña cantidad de enfermedades. |
| Más definitivo (según el sistema de administración). | Podría ser transitorio. |
| Difícil de alcanzar algunas células/tejidos. | Posibilidad de acumulación de mutaciones. |
| Mayores efectos fuera del objetivo. | Especificidad por las células tratadas. |

4. Elección del sistema de entrega o vector

La entrega de material genético exógeno dentro de una célula o tejido no es un camino recto ni un proceso fácil, ya que los organismos tienen diversas estrategias y barreras para prevenir que esto pase, como se muestra en la **figura 15**, existen tres barreras principales que se deben salvar para lograr la transferencia del material genético. La primera barrera es la permeabilidad de la membrana, la segunda es la internalización selectiva y la tercera es la entrada al núcleo celular. Estos obstáculos se pueden salvar utilizando técnicas como la biobalística, la microinyección, el dimetil sulfóxido, la electroporación,

la lipofección con liposomas y la infección viral. Las flechas punteadas indican que el proceso de internalización al núcleo no es directo disminuyendo su eficiencia¹⁶⁷.

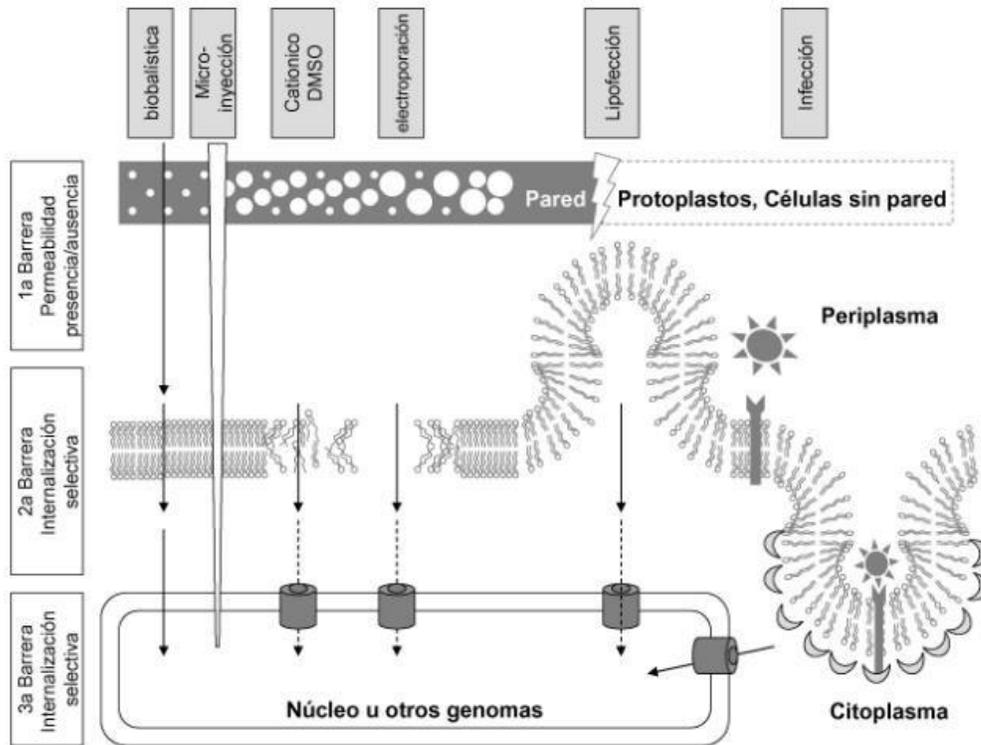


Figura 15. Diferentes formas de introducir material genético extraño en una célula ¹⁴⁹. En el eje horizontal observamos los diversos métodos para introducir material genético dentro de una célula con y sin pared celular y en el eje vertical las tres principales barreras que se deben atravesar para llegar al núcleo y permitir la traducción del material genético. Las flechas rectas indican la facilidad de ingreso del material mientras que las flechas punteadas indican que hay mayor dificultad de penetración. Un caso particular es la microinyección que deposita directamente el gen en el núcleo celular

Existen dos grandes grupos de sistemas de entrega que son los sistemas virales y los sistemas no virales.

Para elegir el sistema ideal de entrega se deben considerar estas variables incluyendo el tamaño del gen que buscamos expresar, el efecto esperado, la toxicidad, seguridad, facilidad de fabricación, costo, entre otras.

5. Expresión y persistencia de la terapia

Es casi imposible introducir una sola copia del transgén en las células diana por lo que debemos estar al tanto de los niveles de expresión de la secuencia del transgén insertado. Además, el número de copias suele ser diferente entre las

células diana y los niveles de expresión aumentados en relación con las condiciones basales.

Una terapia génica debe garantizar un control muy estricto y consistente de la expresión transgénica lo que podría lograrse utilizando promotores regulables. Un sistema de regulación de genes adecuado debe mostrar varias características que incluyen una baja expresión basal del transgén, la expresión debe desencadenarse por la administración de una molécula y responder a una amplia gama de dosis, ser específico al objetivo celular u órgano blanco, no interferir con la expresión genética endógena y permitir una rápida y efectiva inducción o represión de expresión transgénica.

Los sistemas de regulación genética pueden ser categorizados en sistemas regulados exógenamente: utilizan compuestos exógenos para regular la expresión génica y que son los más utilizados en aplicaciones de terapia génica. Sistema de regulación de tetraciclina (Tet) la cual es la más utilizada para controlar la expresión génica.

Sistemas controlados endógenos: se basan en estímulos internos para controlar la expresión transgénica. El promotor es sensible a los parámetros y condiciones fisiológicos, con los niveles de glucosa o la hipoxia. Sin embargo, esta regulación endógena es difícil de conseguir.

6. Respuesta inmune a la terapia:

La respuesta inmunitaria es un problema en la terapia génica (excepto si el objetivo es la vacunación o lisis tumoral), especialmente si se usan vectores virales¹⁴⁹.

En este caso habrá que enmascarar a nuestro vector viral o disminuir su antigenicidad para no llamar la atención del sistema inmune y evitar así que el vector sea eliminado antes de la entrega génica.¹⁴⁹

Construcción de vectores virales

Clonación

En nuestro caso particular de construcción de vectores virales prácticamente nos referimos a incrustar genes que deseamos (molécula recombinante) dentro del genoma de un virus (vector viral) mediante clonación y nuestro objetivo es obtener millones de copias del genoma del virus elegido que a su vez contenga el gen o los genes recombinantes que deseamos para posteriormente pasar a su purificación y usarlo con un propósito ya establecido, para lograr esto nos ayudamos de varias herramientas moleculares derivadas de procesos genéticos que la microbiota bacteriana lleva a cabo de forma natural acompañado de otras técnicas³⁰.

Para llevar a cabo la clonación se necesita principalmente de un vector que puede ser de clonación o de expresión y de un inserto que puede ser ADN obtenido de cualquier organismo, puede permanecer como ADN genómico, ADN complementario que es, producto de una retro-transcripción del ARN, producto de PCR o un ARN obtenido por transcripción in vitro.

Los vectores de clonación tienen la finalidad de almacenar secuencias y la obtención de grandes cantidades de ADN insertado o de la molécula recombinante. Para este propósito se suelen utilizar plásmidos, fagos, fagémidos, cósmidos y cromosomas artificiales bacterianos o de levadura³⁰.

Los vectores de expresión son aquellos que buscan producir un transcrito (ARN) o producir la proteína codificada (proteína recombinante) de esa secuencia génica, en este caso se utilizan plásmidos, fagos³⁰ o vectores virales.

El vector debe contar con ciertos elementos básicos (ver **figura 16**):

Origen de replicación: (ORI) es una secuencia en el ADN del vector que provee un sitio único de reconocimiento a las proteínas que identifican el sitio de inicio de la replicación. Para esto los plásmidos tienen un solo sitio ORI por lo que realizan una replicación unidireccional.

Marcador de selección: es un gen que confiere resistencia a un antibiótico o genera un fenotipo particular que ayude a identificar a las células que internalizaron al vector. Los genes de selección más comunes son ampicilina y kanamicina, otro marcador es el gen lacZ y el GFP.

Sitio de clonación múltiple: es un fragmento de ADN que contiene una serie de sitios únicos de reconocimiento para enzimas de restricción, muy cercanos entre sí y que puede insertar cualquier fragmento de ADN que contenga la secuencia específica. Los sitios de restricción más comunes presentes en el sitio de clonación múltiple de muchos vectores son para las enzimas: *EcoR* I, *Hind* III, *Bam*H I, *Xho* I, y *Kpn* I.

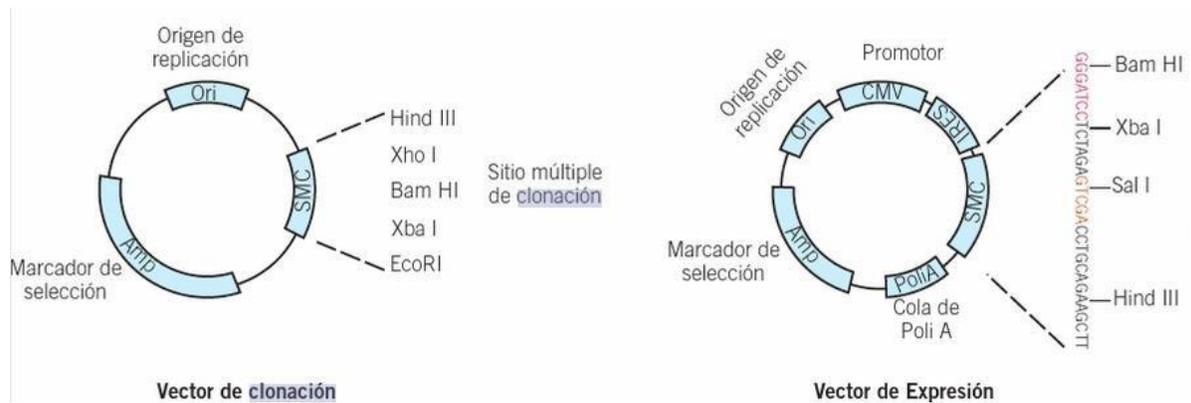


Figura 16. Estructura general de un vector de clonación y un vector de expresión ³⁰ El vector de clonación cuenta con un ORI Origen de replicación, SMC Sitios múltiples de clonación más frecuentes. Amp (ampicilina). El vector de expresión aparte de los elementos anteriores cuenta con un promotor, IRES Sitio de unión ribosomal y PoliA que es una cola de Poli A.

Los vectores de expresión además, de los elementos antes mencionados deben contar con:

Al menos un **promotor** potente que induce la expresión de un gen.

Secuencias de terminación de la transcripción y adición de la **cola de poliadenilación** para proteger al transcrito de la degradación de las nucleasas lo que permitirá extender su vida media.

Sitio de unión al ribosoma (IRES) esta es la llamada secuencia Shine-Dalgarno que precede el codón de inicio AUG para iniciar la traducción en los ARNm procariotes. Esta secuencia es complementaria con el extremo 3' del

ARNr 16s cuya hibridación permite ensamblar la maquinaria de inicio de la traducción.

Ejemplos de vectores de expresión pcADN3.1 (ver **figura 17**), pET161 y pDEST10.

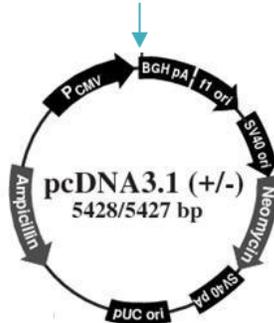


Figura 17. Mapa genético del plásmido pcDNA3.1. Consta de 5428 a 5427 pb de longitud, P_{CMV} Promotor CMV, Promotor T7/sitio de cebado (la flecha azul indica su ubicación), SMC Sitios múltiples de clonación, Sitio de cebado inverso de pcDNA3.1/BGH, F1 Sitio de Origen de replicación, Promotor temprano de SV40, Gen de resistencia a neomicina, Señal de poliadenilación temprana de SV40, Origen pUC, Gen de resistencia a ampicilina, Sitio de unión al ribosoma, Promotor bla P₃.

Obtenido de: <https://www.addgene.org/111456/> Invitrogene

Proceso de clonación

Para comenzar a construir un vector viral aparte de seleccionar el gen a clonar, es necesario definir el vector de clonación que más nos convenga en el caso de vectores virales suelen ser los plásmidos, bacteriófagos, cromosomas artificiales (BAC) o una combinación de estos, que en conjunto colaboran para incrustar el inserto en el genoma del virus.

Los vectores de clonación más populares son los plásmidos, que son pequeñas moléculas circulares de ADN de manera natural constituyen el material genético

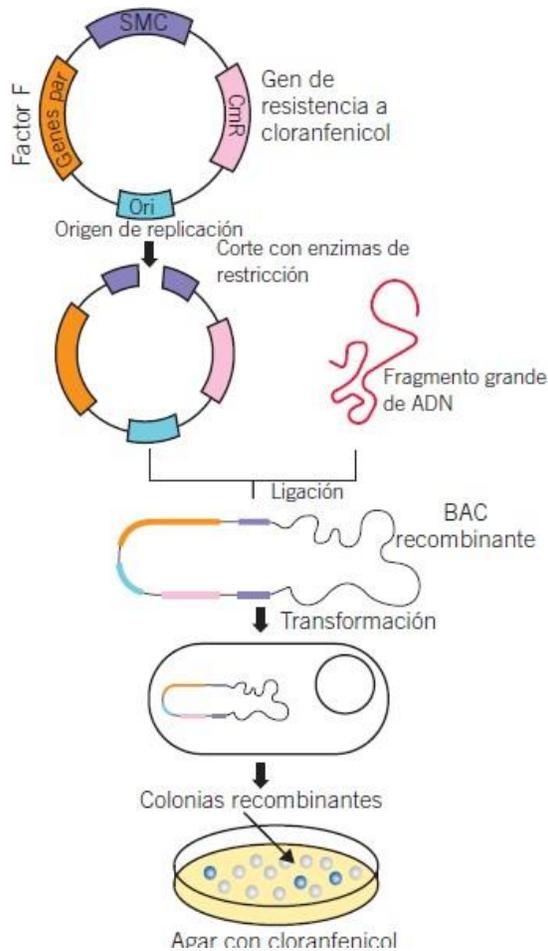


Figura 18. Mecanismo de clonación en el plásmido ³⁰. Se muestra un plásmido con gen de resistencia al cloranfenicol posteriormente se corta con enzimas de restricción y se liga a un cromosoma artificial (fragmento de ADN) obteniendo BAC recombinantes, posteriormente se transforma dentro de una célula y se incuba en un medio de agar con cloranfenicol, las colonias sobrevivientes serán solo las que hayan internalizado el BAC recombinante.

móvil de las bacterias que se replican y permanecen de manera episomal además, puede haber múltiples copias del mismo plásmido. Estos pueden contener información de resistencia a antibióticos y la transmiten ya sea mediante su reproducción o a través de la conjugación mediante sus pili entre bacterias.

Para poder utilizar estos plásmidos a nuestro favor se les ha modificado genéticamente para mantener características deseables y añadirle otras además, de eliminar el ADN innecesario. Por lo general constan solo de 2 a 5kb de ADN lo que facilita el análisis de los insertos incorporados en él y pueden transportar hasta 15000pb.

Otros vectores de clonación también utilizados son los bacteriófagos (ver capítulo II) que se tratan en su respectivo capítulo y los cromosomas

artificiales bacterias (BAC) o levaduras (YAC) los cuales tienen la capacidad de aceptar la inserción de fragmentos de ADN de gran tamaño (cientos de kilo pares de bases), se replican como un cromosoma independiente dentro de las respectivas células (ver **figura 18**) y son útiles para estudios de mapeo de cromosomas por su capacidad de almacenar fragmentos de gran tamaño. Un

BAC es un constructo derivado del plásmido F capaz de regular la distribución equitativa de plásmidos después de la división bacteriana, acepta insertos de 150 a 350kpb que pueden extenderse hasta 700kpb. Los YAC tienen una capacidad de clonación de 100 a 1000kpb.

1. Preparación del inserto que se va a clonar

Selección de Enzimas de restricción

Son enzimas que reconocen una secuencia específica de nucleótidos y corta en ese punto cada una de las cadenas de ADN, estos cortes pueden ser cohesivos (escalonados) donde se obtiene una secuencia complementaria de 1 sola cadena o cortes romos (corte liso) (**figura 19**).

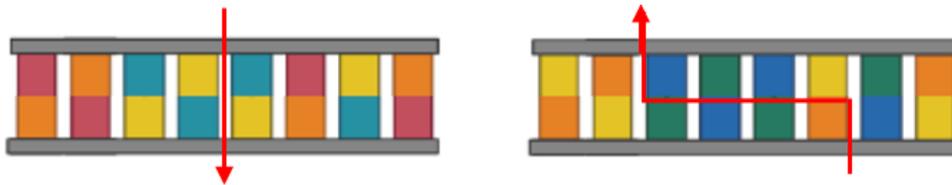


Figura 19. Cortes generados por enzimas de restricción. Corte romo/liso a la izquierda corte cohesivo/escalonado a la derecha. Grecia Ayala Mondragón (Biorender)

Las enzimas de restricción se usan para liberar el fragmento de interés de la molécula de ADN, se prefiere que las enzimas de restricción tengan el mismo sitio de corte tanto en el fragmento de interés como en el sitio donde será clonado, con el fin de que los extremos generados en el inserto coincidan con los extremos del vector.

El inserto producto de la digestión enzimática se purifica y separa de la molécula de ADN mediante una electroforesis en gel de agarosa.

Se identifica la banda que corresponde al inserto mediante su peso molecular posteriormente se escinde del gel se extrae y se purifica mediante técnicas convencionales.

2. Preparación del vector para la clonación

En este caso el plásmido funcionará para nosotros como un primer vector o vector de clonación, el cual para únicamente transportará el gen de interés

hacia una célula hospedera que puede ser una bacteria (*E.coli*) o una célula eucariota.

Corte del vector: se corta con las mismas enzimas de restricción con las que se digirió el inserto, principalmente se busca generar extremos con secuencias complementarias a los extremos del inserto a clonar.

Desfosforilación del vector: para impedir la autoligación del vector se realiza usando la fosfatasa alcalina bovina de origen intestinal o la fosfatasa bacteriana que elimina los grupos fosfato 5' de una cadena de ADN.

Purificación del vector: consiste en eliminar las partículas de agarosa, restos de enzimas inactivadas y las sales provenientes de la reacción de digestión esto se realiza usando columnas de resinas con alta afinidad al ADN en presencia de altas concentraciones de sales caotrópicas (**Figura 20**).

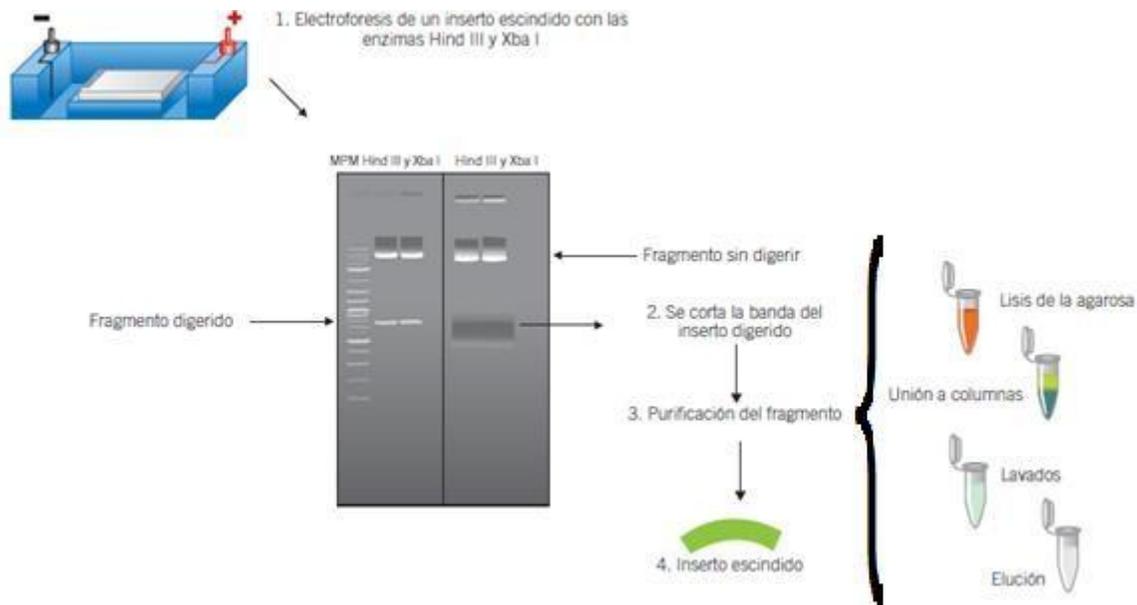


Figura 20. Purificación del inserto ³⁰. (1) Electroforesis de un inserto escindido con las enzimas Hind III y Xba I, (2) cortar banda del inserto, (3) purificación del fragmento digerido, lisis de la agarosa, unión a columnas, lavados, elución, (4) inserto escindido.

3. Ligación del inserto y vector

Para ligar al inserto con nuestro vector en este caso el plásmido se requiere que se formen enlaces fosfodiéster del extremo 5' y residuos hidroxilo 3' este proceso se lleva a cabo mediante la enzima ligasa usando ATP como fuente de

energía. Los extremos cohesivos se forman por apareamiento de bases mientras que los romos solo se sellan (con menor eficacia) para finalmente formar un ADN recombinante.

4. Preparación de células competentes

Para que el vector pueda replicarse requiere estar dentro de una célula y para permitir la entrada del vector esta debe volverse permeable por lo que el primer paso es volver a las células competentes para aceptar el ingreso del vector.

5. Generación de células competentes:

Esto puede inducirse mediante procesos, físicos y químicos uno de los métodos más utilizados es tratar a las bacterias con una solución de cloruro de calcio que ayuda a formar poros en la membrana bacteriana y permitir el ingreso del vector.

Otro método es someter a las bacterias a lavados consecutivos 4 a 5 veces con una solución de glicerol al 18%, obtener células libres de iones y proteger a la membrana del daño de la electroporación.

Es importante que las células se encuentren en fase logarítmica de crecimiento 5×10^7 cl/ml.

6. Transformación celular de la bacteria

La transformación bacteriana es la introducción de ADN exógeno, y tiene como propósito la transformación celular, es decir, que el material genético se incorpore de manera extra cromosómica, se transcriba y traduzca empleando la maquinaria enzimática de la célula huésped.

La transformación se refiere a la introducción de material genético a través de vectores a las bacterias; si el vector es un virus se le llama transducción y el termino transfección implica la introducción del material genético en células eucariotas esto puede llevarse a cabo por medio de métodos físicos o químicos los métodos más comunes son la transformación química y la electroporación.

Métodos físicos:

- Electroporación (más eficiente): usado en plásmidos grandes, y células eucariotas, se aplican descargas eléctricas en forma de pulsos breves de alto voltaje consiguiendo la apertura de poros.
- Transfección: vectores de tipo vírico que siguen una vía natural de infección introduciendo a una célula (bacteria) huésped su ADN.
- Lipofección: se usan liposomas que tienen la facilidad de fusionarse en la membrana celular y liberar su contenido en el interior.
- Microinyección: se emplea cuando se requiere mayor contenido de ADN.
- Biolística: usa pistolas de genes con las cuales se bombardea a las células con microesferas recubiertas con ADN recombinante.

Métodos o transformación química

- Polietilenglicol que aumenta la permeabilidad de la membrana.
- Incubación en cloruro de calcio:

Las células bacterianas y el ADN plasmídico se incuban en una solución hipotónica de cloruro de calcio mientras se les aplica un choque térmico (42°C por 90s) para incrementar la permeabilidad de la membrana y permitir que el plásmido pueda entrar a la bacteria. Posteriormente se adiciona medio LB para nutrir a las células bacterianas y hacer que se repliquen. Al final se siembran en agar con antibiótico (que contenga el plásmido) se incuba y se obtienen las colonias resistentes al antibiótico que contienen el vector recombinante, esto se observará gracias al marcador de selección incluido en el plásmido.

7. Identificación de las colonias celulares que contienen el vector recombinante

Para identificar las bacterias transformadas se utilizan marcadores de selección proporcionados por los vectores de clonación (plásmido). Los más utilizados son los genes de resistencia antibióticos: ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol y kanamicina. Después de la transformación las bacterias se siembran en cajas de Petri con agar suplementado con el antibiótico para el cual el plásmido es resistente. Si la transformación es exitosa las bacterias serán capaces de

metabolizar el antibiótico y sobrevivirán lo que indicará que incorporaron exitosamente el vector.

Todo el proceso de clonación se resume en la **figura 21**.

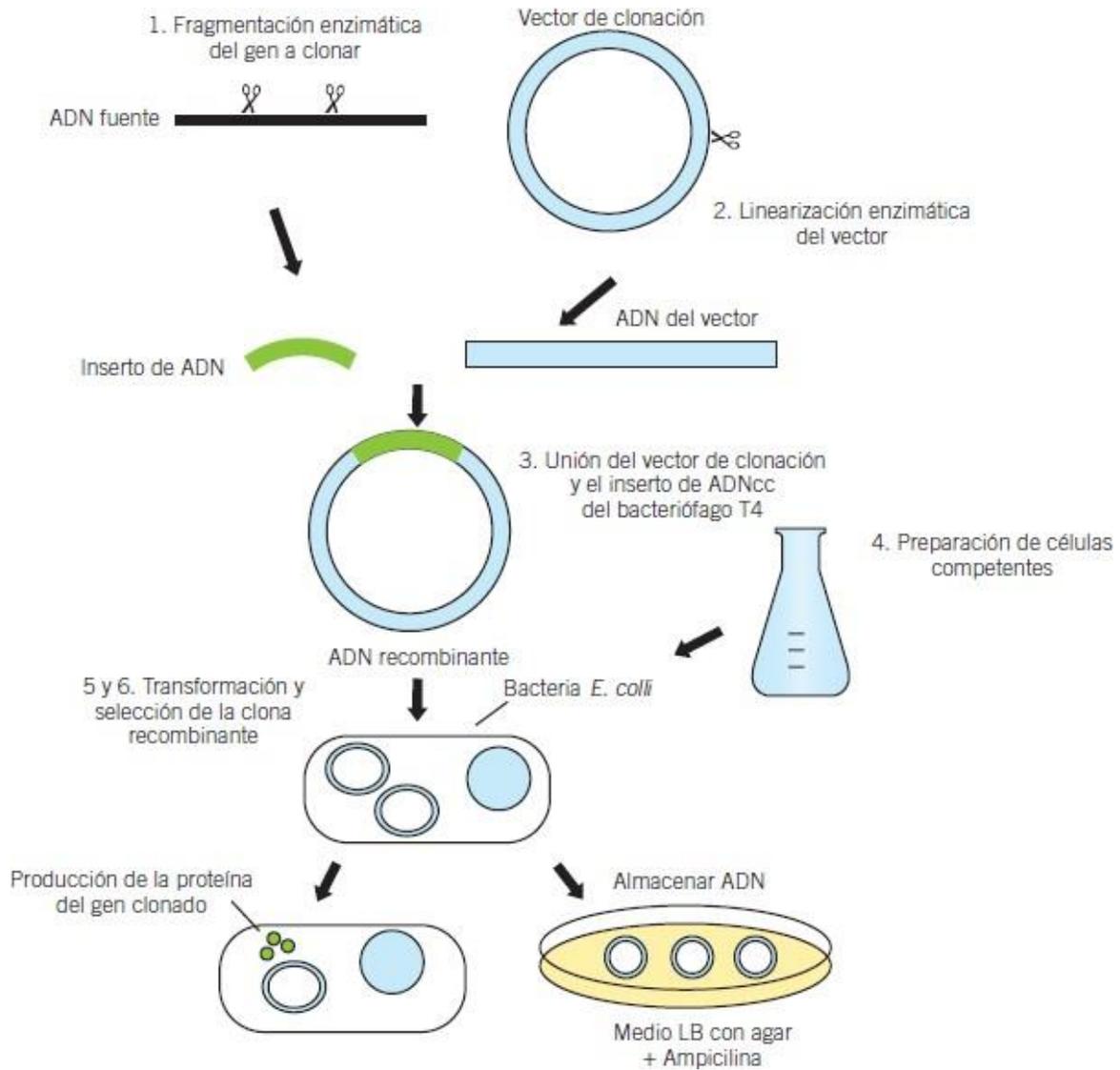


Figura 21. Estrategia de clonación general³⁰. (1) se corta el fragmento de ADN a clonar con enzimas de restricción al igual que el vector de clonación (2) estos posteriormente se ligan (3). (4) se preparan células competentes en este caso *Escherichia coli* (5) y (6) ocurre la transformación y selección de la clona recombinante, así como la producción de la proteína que codifica para el gen clonado, estos son cultivados en medio LB con agar y ampicilina.