

Cuasiespecies y evolución molecular de virus

E. Domingo, E. Baranowski, J.I. Nuñez, C.M. Ruiz-Jarabo, S. Sierra, N. Molina & F. Sobrino

Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, España; Centro de Investigación en Sanidad Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Ctra. Algete-Alcalázar, Km. 6,5, 28130 Valdeolmos, España

Resumen

Los virus con ácido ribonucleico (RNA) evolucionan como distribuciones complejas de variantes distintos pero estrechamente relacionados genéticamente, que se denominan cuasiespecies víricas. En las cuasiespecies no existe un genoma definido de modo preciso, ya que el genoma consenso es un promedio de variantes. La dinámica de cuasiespecies tiene un considerable número de implicaciones para entender la adaptabilidad de virus, su poder patogénico y de persistencia, así como para el diseño de estrategias para la prevención y control de las enfermedades que ocasionan. Los autores resumen el estado actual de conocimientos sobre la estructura en cuasiespecies y sus implicaciones biológicas.

Palabras clave

Aptitud biológica – Competición – Cuasiespecies – Enfermedades emergentes – Escape viral – Mutación – Selección – Virus – Zoonosis.

Origen del concepto de cuasiespecies e impacto de esta estructura poblacional de los virus RNA

Los virus con ácido ribonucleico (RNA) como material genético son los más abundantes en la biosfera y están asociados a un importante número de enfermedades del hombre, de animales y de plantas. Su material genético puede ser un RNA de cadena sencilla o de doble hebra, de una sola cadena o segmentado en varios fragmentos. Su complejidad, medida por la longitud de su genoma, está comprendida entre 3 y 30 kilobases (kb). En la década de 1970 se obtuvo el primer indicio de que los virus RNA podrían tener una estructura poblacional distinta de lo que se creía hasta entonces. El indicio tuvo un origen teórico y otro experimental, totalmente independientes. En 1971, Eigen publicó un artículo acerca de la evolución de macromoléculas simples con capacidad replicativa que posteriormente fueron denominadas "replicones". Este tratamiento teórico fusionó conceptos de evolución darwiniana, en particular el de mutación y selección entre formas variantes del replicón inicial, con conceptos de teoría de la información (15). Su

objetivo fue entender las bases moleculares de la adaptación de macromoléculas sencillas que probablemente fueron las precursoras de formas más complejas de vida en la Tierra, hace unos 4.000 millones de años. Al profundizar en el origen y cuantificación de las mutaciones, Eigen y Schuster (16) desarrollaron el concepto de cuasiespecies para describir una distribución ordenada y estable de mutantes dominados por un genoma principal, denominado secuencia maestra. Ésta puede ser minoritaria en una población de replicones, en cuyo caso la población está formada esencialmente por una nube de mutantes.

El origen experimental del concepto de cuasiespecies procedió de los estudios de Weissmann y sus colaboradores con un bacteriófago que infecta algunas estirpes de *Escherichia coli*, denominado fago Q β , también desarrollados durante la década de 1970. Con este virus RNA sencillo se realizaron dos observaciones que en años posteriores resultaron de gran relevancia para virus RNA patógenos de organismos diferenciados:

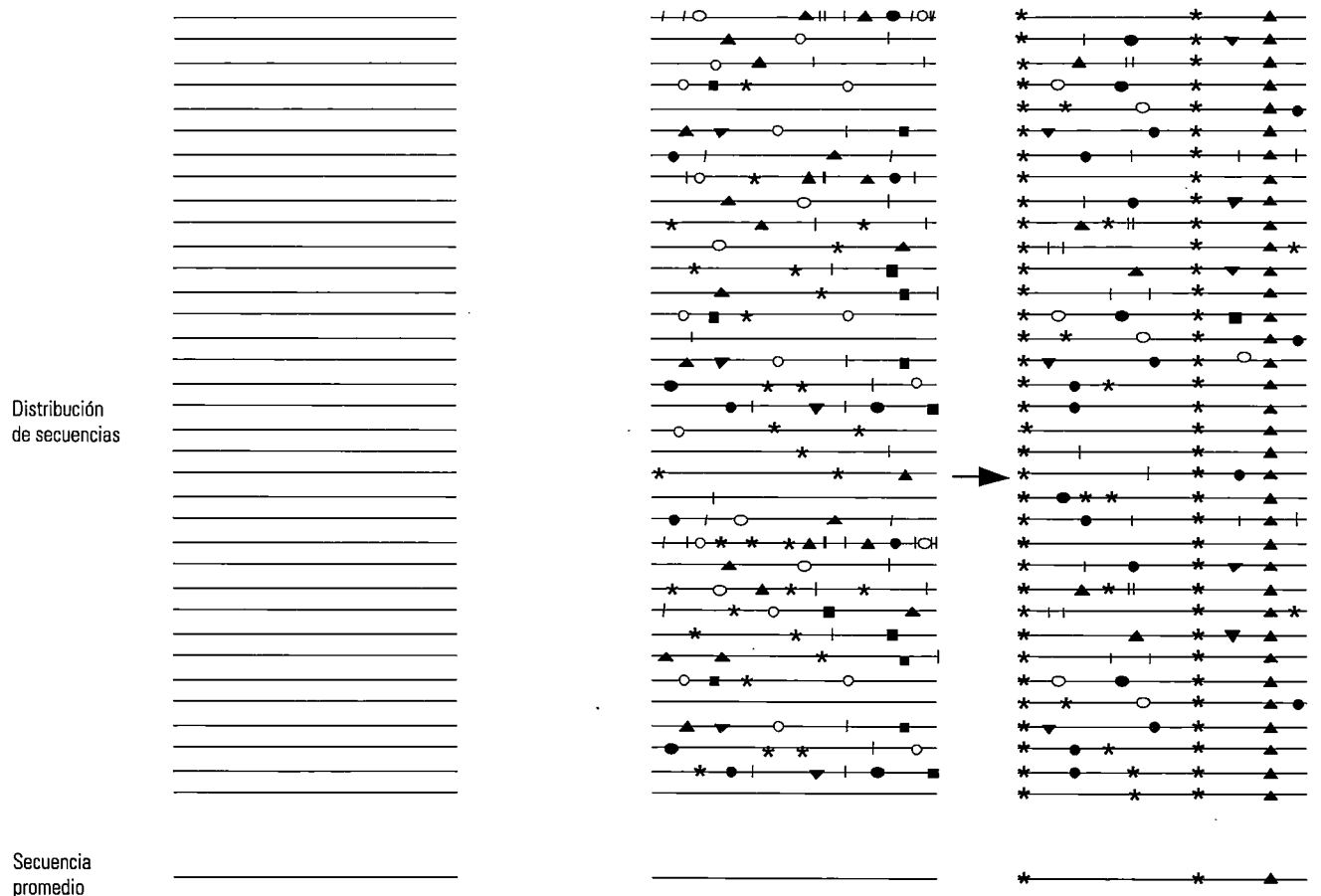
- a) Una mutación específica del RNA genómico ocurría con una tasa de 10^{-4} incorporaciones erróneas por nucleótido copiado y ronda de copia (2, 8).
- b) Las poblaciones del fago eran genéticamente heterogéneas en el sentido de que la secuencia de nucleótidos de cada genoma de la población difería de los restantes genomas en

una o dos posiciones; de hecho, el genoma más abundante en las poblaciones analizadas representaba tan solo el 15% del total (9).

Estas dos observaciones establecían que las tasas de error durante la replicación del fago alcanzaban valores que eran unas cien mil veces mayores que los estimados para la replicación de células y virus con ácido desoxiribonucleico (DNA) como material genético (12, 13) y, además, que las poblaciones de fago contenían una distribución de mutantes del mismo tipo que las predichas por el concepto teórico de cuasiespecies (Fig. 1). Los orígenes del concepto de cuasiespecies en sus vertientes teórica y experimental han sido revisados en algunos artículos en los que el lector encontrará más información y bibliografía complementaria (7, 11).

El concepto de cuasiespecies adquirió una nueva dimensión con la demostración, obtenida muy pocos años después de los estudios con el fago Q β , de que dos virus animales patógenos

también debían ser descritos como distribuciones de mutantes en vez de genomas con una información genética definida. Se trata del virus de la fiebre aftosa (VFA, o virus de la glosopeda) y el virus de la estomatitis vesicular (VEV), dos virus de la mayor importancia en medicina veterinaria. Con el VFA se estableció que virus aislados durante un brote de enfermedad, aún perteneciendo al mismo subtipo y siendo serológicamente indistinguibles con los métodos de diagnóstico al uso, eran genéticamente distintos unos de otros; además se demostró que dentro de un mismo animal infectado replicaban virus ligeramente distintos, lo que hizo proponer una estructura en cuasiespecies *in vivo* para este importante patógeno (10). Estas observaciones se complementaron con otras sobre la continua aparición de mutantes durante la multiplicación de clones de VFA en cultivos celulares (38). Con el VEV se observó una dinámica de producción y selección de mutantes durante infecciones persistentes en cultivos celulares promovidas por partículas defectivas interferentes (21, 22). Cuando células en cultivo se



Los genomas individuales se representan por rayas horizontales y los símbolos sobre las rayas representan mutaciones. La distribución de la izquierda es genéticamente homogénea mientras que la del centro y la de la derecha son distribuciones genéticamente heterogéneas tal como se hallan en las cuasiespecies víricas. Las tres líneas inferiores, algo separadas del resto de la distribución, representan la secuencia consenso o promedio de la población, aquella que se obtiene al asignar a cada posición el residuo (nucleótido o aminoácido) más frecuente en esa posición en la distribución. Obsérvese que, a pesar de su elevada heterogeneidad, la distribución del centro tiene la misma secuencia consenso que la de la izquierda. Al conjunto de mutantes se le denomina espectro de mutantes de la cuasiespecie. La flecha indica la replicación de una sola molécula de la distribución central que da lugar a una nueva cuasiespecie con una secuencia consenso distinta, debido a las mutaciones arrastradas del genoma parental. La flecha puede representar un muestreo aleatorio de un genoma (como acontece probablemente en muchos casos de transmisión de un virus) o un proceso selectivo en el que replica un genoma con preferencia a los demás.

Fig. 1
Representación esquemática de cuasiespecies víricas

infectan con VEV a altas multiplicidades de infección (varias partículas víricas por cada célula), se produce una acumulación de RNAs defectivos que requieren VEV infeccioso para su multiplicación. Estos defectivos interfieren con la replicación del VEV infeccioso y promueven la selección de VEV mutantes resistentes a la acción inhibitoria de los defectivos. Así se establece una dominancia cíclica de sucesivas ondas de VEV mutantes y sus correspondientes defectivos, lo que J. Holland expresó con el ilustrativo título de uno de sus trabajos de revisión sobre el tema: "Un continuo de variación en genomas RNA víricos" (20).

A estos estudios siguieron otros muchos con virus RNA humanos, de animales y plantas que han establecido de modo firme la estructura en cuasiespecies para virus RNA. Tomando como criterio de comportamiento de una cuasiespecie la presencia de un espectro de mutantes y cambios en la secuencia consenso en función de la replicación viral (Fig. 1), se ha demostrado adherencia a una dinámica de cuasiespecies en unos cincuenta virus distintos, entre ellos varios de interés veterinario (Cuadro I). Hasta ahora no se ha descartado una dinámica de cuasiespecies para ningún virus RNA estudiado desde un punto de vista poblacional. Para que un virus no siguiera una dinámica de cuasiespecies, las frecuencias de error deberían ser órdenes de magnitud inferiores a las determinadas hasta ahora o, alternativamente, el virus debería mostrar una intolerancia casi completa a las mutaciones surgidas durante su replicación. Ninguna de estas dos condiciones ha podido ser demostrada para ningún virus RNA. La conclusión es que la dinámica de cuasiespecies tiene una amplia aplicación en las poblaciones de virus RNA.

Cuadro I
Algunas enfermedades de interés veterinario causadas por virus RNA para los que se ha demostrado una dinámica de cuasiespecies

Virus	Enfermedades
Virus RNA de polaridad positiva	Fiebre aftosa Infección par calicivirus felino Encefalomielitís equina Arteritis equina Hepatitis murina Gastroenteritis transmisible del cerdo
Virus RNA de polaridad negativa	Gripe Rabia Coriomeningitis linfocitaria Estomatitis vesicular Septicemia hemorrágica de peces
Retrovirus	Visna Anemia infecciosa equina Inmunodeficiencia de simio Leucemia felina

Definición actualizada de cuasiespecie vírica

El concepto teórico de cuasiespecie, en su formulación inicial, suponía una distribución estacionaria de mutantes, que alcanzaba un tamaño ilimitado (infinito) (16). En el transcurso de una infección de un organismo, un virus RNA

encuentra multitud de ambientes diferentes como son distintos tipos de células, tejidos, respuestas inmunes de intensidad variable, entre otros factores perturbadores. No es posible, en estas circunstancias, mantener distribuciones estacionarias de mutantes en equilibrio. Las distribuciones genómicas en poblaciones reales de virus son sumamente variables y los genomas dominantes tienen una existencia efímera. Las cuasiespecies víricas reales que evolucionan en organismos infectados pueden considerarse sucesiones de distribuciones estacionarias de duración infinitesimal. Las sucesivas distribuciones estacionarias varían respecto a las que les precedieron y a las que van a seguir, constituyendo un conjunto extraordinariamente complejo de enjambres de genomas fluctuantes en el espacio y en el tiempo. Ha sido necesario formular una definición ampliada de cuasiespecies víricas, que ha sido recogida en la última edición de la *Encyclopaedia of virology* (6): "Se denominan cuasiespecies víricas las distribuciones dinámicas de genomas víricos no idénticos pero estrechamente relacionados entre sí sometidos a un proceso continuo de variación genética, competición y selección y que actúan como una unidad de selección". Esta definición no se separa del concepto germinal de Eigen, Schuster y sus asociados y contempla la situación real de los virus en el proceso de infección de organismos o cultivos celulares (Fig. 1).

Implicaciones biológicas de la dinámica de cuasiespecies de los virus RNA

El comportamiento de los virus RNA como cuasiespecies tiene un número considerable de implicaciones que abarcan desde la descripción poblacional de los virus hasta la interpretación de su respuesta a factores selectivos durante procesos infecciosos, su adaptabilidad a ambientes cambiantes y el origen de nuevas enfermedades víricas (Cuadro II).

Estructura poblacional

No resulta obvio de modo inmediato que un espectro de mutantes como el representado en la Figura 1 implique una importante indeterminación respecto a describir con precisión una población viral. Los métodos de secuenciación de nucleótidos no permiten la determinación de una secuencia de nucleótidos de "una" molécula de RNA genómico, sino de una multitud de genomas que definirá un consenso (Fig. 1). Tan sólo mediante procedimientos de clonaje biológico o molecular (flecha en la Figura 1) se puede revelar el carácter heterogéneo de la distribución. Ante esta situación se plantea la cuestión de saber a qué genoma en particular debe asignarse un comportamiento biológico que estamos observando. En parte, este problema se resuelve con la definición biológica de cuasiespecies como "unidad de selección" (11, 16). Ante una presión selectiva que perturba la cuasiespecie, es el conjunto de genomas el que responde a la

Cuadro II
Algunas implicaciones de la dinámica de cuasiespecies de virus RNA

Tipo de implicaciones	Descripción
Relativas a su estructura poblacional	<ul style="list-style-type: none"> – Un genoma viral está definido como promedio estadístico de muchos genomas ligeramente distintos – El genoma promedio o consenso puede no tener una realidad física en el espectro de mutantes
Relativas al espectro de mutantes	<ul style="list-style-type: none"> – El espectro de mutantes es una reserva de mutantes genotípicos y fenotípicos
Relativas a la adaptación viral	<ul style="list-style-type: none"> – Una cuasiespecie vírica explora aceleradamente espacios de secuencias asequibles al virus – La optimización de una cuasiespecie a su ambiente es rápida y se refleja en ganancia de eficacia biológica
Relativas al control de enfermedades víricas	<ul style="list-style-type: none"> – Las vacunas deben ser multivalentes (múltiples epítomos B y T) – Las terapias con agentes antivíricos deben ser terapias de combinación – Deben explorarse nuevas estrategias antivirales, como la inducción de entrada en catástrofe de error
Relativas a ecología evolutiva y emergencia de enfermedades	<ul style="list-style-type: none"> – Un virus RNA tiene un potencial para infectar nuevas especies de hospedadores – No es recomendable el uso de virus RNA para el control de plagas

perturbación, modificando la distribución anterior. Quizás el ejemplo más significativo respecto al significado de un espectro de mutantes es que para frecuencias de mutación del orden de 10^{-3} sustituciones por nucleótido o mayores, la secuencia consenso o promedio de nucleótidos, que es la que se determina por los métodos actuales de secuenciación, puede no corresponder a ningún genoma presente en el espectro de mutantes. Llegamos a la sorprendente conclusión de que las poblaciones virales pueden ser muy complejas genéticamente, de modo que la secuencia consenso que define a la población no está representada en el espectro de mutantes.

El espectro de mutantes como reserva de variantes fenotípicos

Un creciente número de ejemplos han demostrado que los variantes presentes en el espectro de mutantes permiten al virus flexibilidad de comportamiento biológico y el escape a presiones selectivas que tienden a limitar su replicación. Así, la presencia de mutantes resistentes a anticuerpos neutralizantes o de mutantes capaces de escapar a células T citotóxicas parece contribuir a la persistencia en organismos de virus tan significativos como el virus de la inmunodeficiencia humana o el virus de la hepatitis C (3, 26). En un estudio muy interesante sobre composición clonal de aislados naturales del VEV, Marcus y col. (28) demostraron que aislados virales incapaces de inducir interferón ocultaban en su espectro de mutantes clones individuales capaces de una fuerte inducción de interferón. Asimismo, en numerosos laboratorios se ha establecido que el espectro de mutantes del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 contiene

mutaciones que confieren resistencia a inhibidores de la proteasa o de la retrotranscriptasa, en pacientes que nunca habían sido tratados con los inhibidores (31). Datos epidemiológicos y de distribución de los inhibidores descartaron totalmente que los pacientes pudieran haber sido infectados por virus que previamente hubiesen sido seleccionados en pacientes tratados. Otros ejemplos que demuestran que los espectros de mutantes constituyen reservas de variantes fenotípicas pueden hallarse en revisiones anteriores (6, 7, 11, 22, 26, 29).

Eficacia biológica y adaptación viral

Una de las implicaciones de cuasiespecies que actualmente recibe mucha atención es la continua variación de eficacia biológica que caracteriza a los virus. Se denomina eficacia biológica la capacidad replicativa que muestra un virus en unas condiciones ambientales determinadas. Es un valor necesariamente relativo que suele medirse mediante experimentos de infección competitiva en cultivos celulares o *in vivo* (24). Numerosos estudios han establecido una gran influencia del tamaño poblacional del virus en el mantenimiento, pérdida o ganancia de eficacia biológica (5, 6, 11, 14, 18, 32, 33). Así, los cuellos de botella poblacionales, en los que un solo genoma inicia la infección de modo repetitivo, suelen provocar pérdidas de eficacia biológica. Ello ha sido demostrado mediante pases seriados de virus placa a placa empleando el bacteriófago $\phi 6$, VEV, VFA y el virus de la inmunodeficiencia humana (5, 14, 18, 42). Por el contrario, si en un ambiente constante se permite la multiplicación del virus con tamaños poblacionales altos, suele producirse un aumento de eficacia de la población (32, 38). Así, si un virus se halla inicialmente muy debilitado, incluso tamaños pequeños de población son suficientes para mantener o incrementar su eficacia biológica. En cambio, si la eficacia inicial es alta, el tamaño poblacional necesario para mantenerla es también muy alto (33).

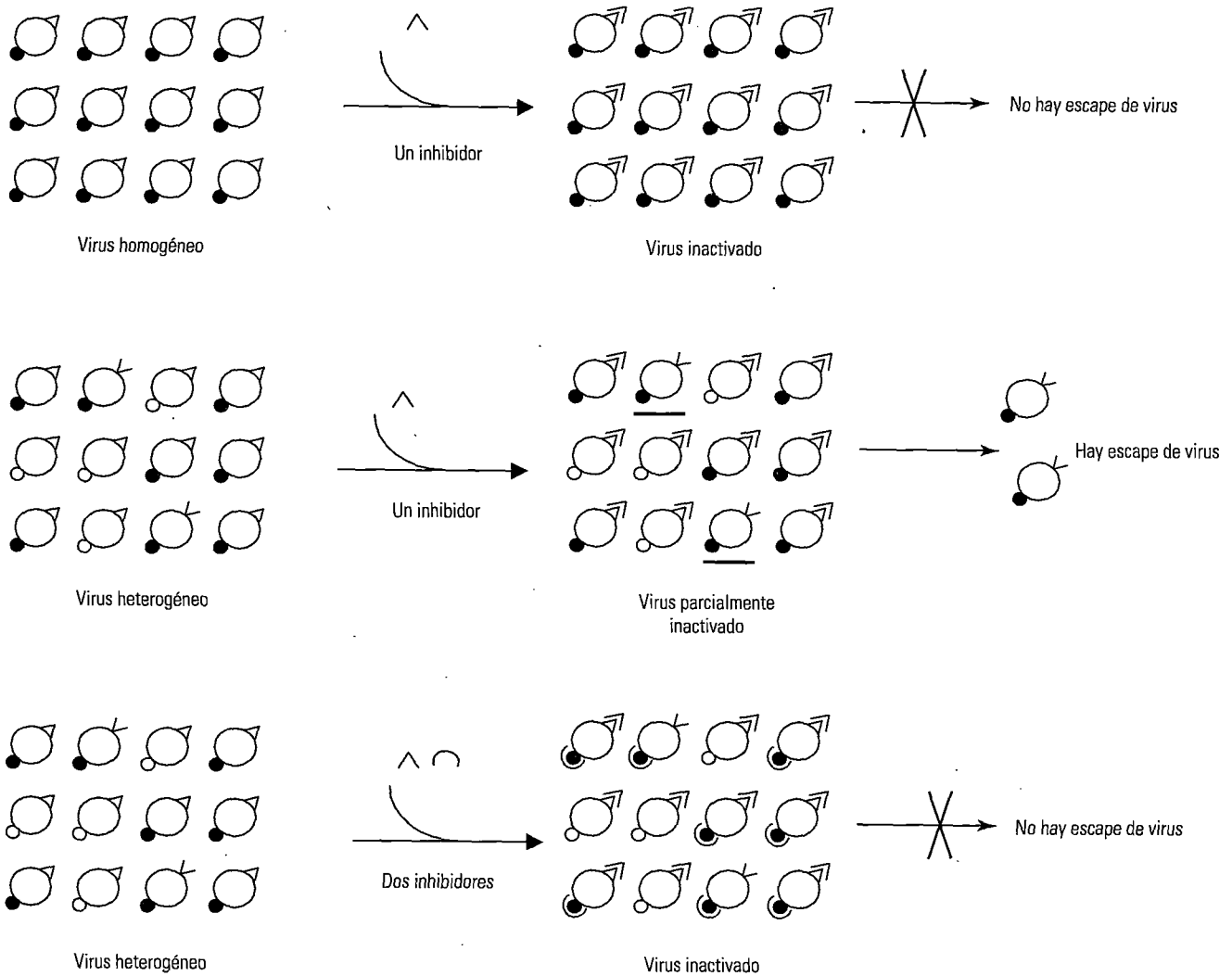
Un reciente estudio de infección de cerdos con VFA *in vivo* ha sido revelador de las variaciones de eficacia biológica de un virus *in vivo* (4). Se aisló un clon de VFA mutante en la etapa temprana de viremia durante la infección del cerdo. Este clon produjo en los animales un ciclo de infección adelantado respecto a la infección desencadenada por el clon parental. En experimentos de competición en los que cerdos fueron infectados con mezclas de clones, las lesiones contenían mezclas de genomas parentales y de clones tempranos. En cambio, cuando la competición se estableció entre el virus parental y clones tardíos, el virus parental dominó siempre la población encontrada en las lesiones (4).

Durante las infecciones virales se producen cambios de eficacia biológica como reflejo de la dinámica de una continua producción de mutantes y competición entre ellos, en respuesta a perturbaciones tanto de tipo ambiental como de tamaño poblacional (3-7, 9-11, 14, 17, 18, 20-24).

Estrategias para el control de enfermedades víricas

Por lo descrito hasta ahora podría parecer que cuasiespecies es un concepto con interés académico, algo así como un refinamiento en el modo de entender poblaciones víricas, pero con poca relevancia para la práctica médica o veterinaria; nada más lejos de la realidad. Si no se diera una estructura poblacional de los virus RNA como la descrita en párrafos anteriores, bastaría una elevada intensidad inhibitoria de la replicación viral, sea en forma de anticuerpos o de inhibidores, para detener la infección de modo eficiente y permitir al sistema inmune la resolución de la misma. Si la diana del inhibidor potente es susceptible de variación de modo que los variantes víricos muestren una menor afinidad por el inhibidor, entonces se producirá el escape del virus

debido a la heterogeneidad poblacional (Fig. 2). Si, por el contrario, se emplean dos inhibidores dirigidos a dianas independientes, la probabilidad de escape es menor ya que el escape está condicionado a la variación simultánea de las dos dianas. Obviamente, durante las infecciones víricas reales la situación es más compleja de lo que refleja la Figura 2, ya que el número de partículas víricas implicadas es muchísimo mayor (a veces hasta un total de 10^{12}) y existen varias formas variantes de las dianas de unión a inhibidores que modifican su sensibilidad a los mismos en distinto grado. El gran potencial de variación y adaptación de las cuasiespecies virales, condiciona también las estrategias de vacunación frente a diferentes enfermedades causadas por virus RNA. De esta manera, las vacunas atenuadas por acumulación de cambios genéticos presentan una probabilidad de reversión a



Arriba a la izquierda se representa una población homogénea de virus (círculos grandes) con dos dianas (triángulo blanco y punto negro) idénticas en cada partícula. En este caso un inhibidor potente puede ser suficiente para inactivar el virus y evitar su replicación (escape). En la fila del medio el virus es heterogéneo y cada diana tiene dos formas posibles. En este caso un solo inhibidor no puede inactivar todas las partículas y se produce escape de virus. La última fila ilustra que la misma distribución puede ser inactivada completamente por dos inhibidores administrados de modo simultáneo. Ello justifica el empleo de vacunas polivalentes y terapias de combinación con múltiples inhibidores para la prevención y control de enfermedades causadas por virus que siguen una dinámica de cuasiespecies. En el texto se dan referencias bibliográficas relevantes a este problema.

Fig. 2
Representación esquemática del efecto de la heterogeneidad viral en la supervivencia de un virus sometido a la acción de un inhibidor, sea una droga o un anticuerpo neutralizante

formas patógenas, que puede variar en función del sistema viral y del número de mutaciones implicadas en la atenuación. Este riesgo ha quedado patente a lo largo de los años en que la vacuna atenuada de poliovirus ha sido utilizada, habiéndose observado, aunque muy infrecuentemente, casos de aparición de la enfermedad asociados a vacunación (35). Por otra parte, la eficacia de vacunas sintéticas basadas en subunidades virales, que presentan una serie de ventajas potenciales importantes frente a las convencionales, se ve también afectada por las características de las cuasiespecies virales. Recientes estudios han puesto en evidencia que la selección de variantes antigénicas virales, capaces de escapar a la neutralización por los anticuerpos o al reconocimiento por linfocitos citotóxicos, puede contribuir a la limitada protección conferida por estas vacunas (3, 39). Este escape viral se da con mucha menor frecuencia cuando se emplea virus completo como vacuna, debido, probablemente, a que la respuesta inducida por los péptidos e inmunógenos sencillos estimula un repertorio considerablemente más restringido de mecanismos inmunes en el hospedador, lo que hace más probable la selección de variantes virales dentro de la cuasiespecie. Dada la heterogeneidad y continua producción de variantes durante la multiplicación de virus RNA, las vacunas deben ser multivalentes y las terapias con agentes antivirales deben ser terapias de combinación. De nuevo, este aspecto práctico derivado de la dinámica de cuasiespecies, fue subrayado en artículos anteriores (6, 7).

El modelo de cuasiespecies predice la existencia de un valor umbral de tasas de error por encima del cual no puede mantenerse la información genética del virus (17). Esta predicción teórica ha encontrado apoyo experimental en resultados obtenidos con poliovirus, VEV (23) y virus de la inmunodeficiencia humana (25). Con todos estos virus se observó que la presencia de mutágenos químicos que incrementaban las tasas de error por encima de las basales durante la replicación viral, producía una pérdida acusada de infectividad que se interpretó como resultado de violación del umbral de error y entrada del virus en catástrofe de error. En conclusión, la dinámica de cuasiespecies impone estrategias para la prevención y tratamiento de enfermedades víricas que no son las empleadas de modo general, y también abre la posibilidad de ensayar nuevas estrategias antivirales, como la entrada de virus en catástrofe de error, actualmente en curso de investigación.

Aspectos ecológicos y evolutivos

Las emergencias y reemergencias de enfermedades víricas tienen comúnmente un origen multifactorial en el que pueden intervenir influencias ecológicas, ambientales y demográficas (27, 29, 30, 36, 37). En los últimos 15 años se han descrito 40 virus humanos emergentes, varios de ellos con un origen zoonótico, además de un número parecido de virus emergentes que afectan a animales y plantas. Existe creciente evidencia de que la dinámica evolutiva de los virus puede jugar un papel importante en estas emergencias, en conjunción con los factores ambientales que pueden facilitar

contactos entre organismos infectados y nuevas especies de hospedadores potenciales.

Hay varios ejemplos que ilustran el efecto de la variación genética viral en la emergencia de una enfermedad. Una es la aparición de la encefalitis equina epizootica en algunas regiones de América del Sur. Estudios genéticos recientes con el alfavirus causal sugieren que un número limitado de sustituciones de aminoácido en dos proteínas víricas puede desencadenar la aparición de un virus epizootico a partir de una reserva enzoótica no patogénica (40). La aparición de varios brotes de gripe humana tipo A ha sido asociada a alteraciones del virus en forma de reordenamientos genéticos por los que virus humanos circulantes adquirieron los segmentos codificantes de la hemaglutinina y neuraminidasa, provenientes de virus de gripe animales (41). Así un virus H1N1 pasó a H2N2 y originó la gripe asiática de 1957, y un salto de H2N2 a H3N2 originó la gripe de Hong Kong de 1968. Estas sustituciones producen un "salto" antigénico en estas glicoproteínas de superficie que son clave para la respuesta de anticuerpos anti-virus, por lo que el nuevo virus halla una población humana sin anticuerpos protectores en la que puede expandirse de forma pandémica. Otro ejemplo bien documentado de emergencia vírica debida a un cambio genético en un virus circulante lo constituye la aparición del parvovirus canino (34). Ello ocurrió en los años 1970 como resultado de unas pocas sustituciones de aminoácidos en la cápsida de un parvovirus felino, sin que en este caso mediasen, aparentemente, circunstancias externas especiales de tipo ambiental u otras.

Esos ejemplos nos llevan a una serie de consideraciones acerca de la capacidad adaptativa de los virus, en particular los virus RNA o los virus DNA de poca complejidad genética, en relación con el peligro de emergencia de nuevas enfermedades víricas por expansión del rango de hospedador. Una de ellas es que si bien en muchos casos la variación genética del virus no puede demostrarse como causa de una emergencia viral, tampoco puede excluirse. Para ello debería aislarse un virus parental en un hospedador, el emergente en el nuevo hospedador y demostrarse que la secuencia consenso de nucleótidos de ambos virus es idéntica en todo el genoma. Por razones obvias resulta altamente improbable que dichas circunstancias puedan darse. Pero lo que sí sabemos es que los virus están diseñados como máquinas replicativas que esperan su oportunidad para explotar su capacidad de adaptación. Aunque las probabilidades de que un espectro de mutantes encuentre un nuevo hospedador en el que un mutante en particular pueda multiplicarse son bajas, no son nulas.

Existe una larga tradición de emplear virus patógenos para el control de plagas, como los baculovirus para aniquilar ciertas especies de insectos o el virus de la mixomatosis para controlar las poblaciones de conejos en Australia (19). Recientemente esta práctica se ha extendido al virus de la

enfermedad hemorrágica del conejo para disminuir las poblaciones de este mamífero en Australia y Nueva Zelanda. Todo lo que sabemos sobre dinámica poblacional y capacidad adaptativa de virus RNA desaconseja la liberación de virus virulentos, incluso si toda la evidencia experimental disponible sugiere que se trata de virus con una acusada especificidad de hospedador. Recientemente, hemos observado que la propagación del VFA en cultivos celulares ocasiona una ampliación de los tipos de células que pueden ser infectadas por el VFA en cultivos *in vitro* (1). Si ello ocurre en un ambiente biológico relativamente constante como es el proporcionado por un cultivo de una línea celular establecida, no puede descartarse una variación en el rango de hospedador durante la multiplicación de un virus en su hospedador natural. Los cambios de hospedador son acontecimientos aleatorios e impredecibles. Por lo tanto, no parece aconsejable limitar el tamaño poblacional de una especie animal presente como plaga en una zona geográfica empleando para ello un virus RNA patógeno que se multiplica extensamente en cada uno de los animales por eliminar.

Perspectivas

La complejidad poblacional de los virus RNA, insospechada hace tan solo dos décadas, ha abierto una serie de interrogantes que actualmente se hallan sin resolver: ¿hasta qué punto los métodos actuales de clonaje molecular y secuenciación permiten definir una población viral altamente heterogénea? ¿Qué determina las grandes variaciones en niveles de heterogeneidad genética entre unos virus y otros? ¿Qué relevancia tiene la variabilidad genética en patogenicidad viral? ¿Será posible, aún con vacunas polivalentes, lograr una

vacuna realmente eficaz contra virus altamente variables? ¿No deberían supervisarse más estrechamente las infecciones de animales en previsión de un posible salto a otras especies, incluida la humana? Estas son algunas preguntas amplisimas que no deben hacer olvidar otras más concretas que se están abordando en muchos laboratorios tanto al emplear virus humanos como virus animales de interés veterinario. Por ejemplo, ¿qué cambios de aminoácido en las proteínas de la superficie de las partículas víricas propician un cambio de reconocimiento de receptores celulares? ¿Qué cambios genéticos en los virus pueden propiciar aumentos de eficacia biológica y qué cambios propician su pérdida? ¿Qué cambios de aminoácido pueden conferir resistencia a anticuerpos neutralizantes o a células T citotóxicas? Estas y otras muchas cuestiones, todas ellas relacionadas con variabilidad genética de virus RNA, también inciden en nuestra capacidad para poder algún día controlar mejor las enfermedades virales. No debemos olvidar que hace tan solo tres décadas existía una profunda convicción en los estamentos científicos de que las enfermedades bacterianas se hallaban muy cerca de la erradicación total y de que las enfermedades virales precisaban tan sólo del desarrollo de algunos agentes antivirales. La realidad actual es completamente distinta y, al menos en parte, ello se debe a la dinámica evolutiva del mundo microbiano.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido subvencionado por la DGES PM97-0060-C02-01, CICYT BIO9-04000, UE FAIR5 PL97-3665 y la Fundación Ramón Areces.

Quasispecies and molecular evolution of viruses

E. Domingo, E. Baranowski, J.I. Nuñez, C.M. Ruiz-Jarabo, S. Sierra, N. Molina & F. Sobrino

Summary

Ribonucleic acid (RNA) viruses evolve as complex distributions of genetically different but closely related variants termed viral quasispecies. The precise genome of a quasispecies cannot be defined, since the consensus genome is an average of many variants. The dynamics of quasispecies has considerable implications for the understanding of the adaptability and pathogenic potential of viruses, and in addition, for the design of preventive and therapeutic measures for the diseases caused by these viruses. The authors summarise current knowledge on the structure of quasispecies, and the biological implications of this structure.

Keywords

Biological aptitude – Competition – Emerging diseases – Mutation – Quasispecies – Selection – Viral escape – Viruses – Zoonoses.

Les quasi-espèces et l'évolution moléculaire des virus

E. Domingo, E. Baranowski, J.I. Nuñez, C.M. Ruiz-Jarabo, S. Sierra, N. Molina & F. Sobrino

Résumé

Les virus à ARN évoluent comme des distributions complexes de variants différents entre eux mais étroitement liés génétiquement, que l'on appelle des quasi-espèces virales. Chez les quasi-espèces, il n'existe pas de génome que l'on puisse définir de manière précise, parce que le génome consensus est une moyenne de variants. La dynamique des quasi-espèces a un nombre considérable de conséquences pour la compréhension de l'adaptabilité des virus, de leur pouvoir pathogène et de leur persistance, ainsi que pour la mise en œuvre de stratégies de prévention et de contrôle des maladies virales. Les auteurs résument l'état actuel des connaissances sur la structure des quasi-espèces et sur leurs conséquences biologiques.

Mots-clés

Aptitude biologique – Compétition – Échappement viral – Maladies émergentes – Mutation – Quasi-espèces – Sélection – Virus – Zoonoses.

■

References

1. Baranowski E., Ruiz-Jarabo C.M., Sevilla N., Andreu D., Beck E. & Domingo E. (2000). – Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage. *J. Virol.* (en prensa).
2. Batschelet E., Domingo E. & Weissmann C. (1976). – The proportion of revertant and mutant phage in a growing population, as a function of mutation and growth rate. *Gene*, **1**, 27-32.
3. Borrow P. & Shaw G.M. (1998). – Cytotoxic T-lymphocyte escape viral variants: how important are they in viral evasion of immune clearance *in vivo*? *Immunol. Rev.*, **164**, 37-51.
4. Carrillo C., Borca M., Moore D.M., Morgan D.O. & Sobrino F. (1998). – *In vivo* analysis of the stability and fitness of variants recovered from foot-and-mouth disease virus quasispecies. *J. gen. Virol.*, **79**, 1699-1706.
5. Chao L. (1990). – Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet. *Nature*, **348**, 454-455.
6. Domingo E. (1999). – Quasispecies. In *Encyclopaedia of virology*, 2^a ed. (A. Granoff & R.G. Webster, edit.). Academic Press, Londres, 1431-1436.
7. Domingo E. (1999). – Vers une compréhension des virus comme systèmes complexes et dynamiques. *Ann. Méd. vét.*, **143** (4), 225-236.
8. Domingo E., Flavell R.A. & Weissmann C. (1976). – *In vitro* site-directed mutagenesis: generation and properties of an infectious extracistronic mutant of bacteriophage Q β . *Gene*, **1**, 3-25.
9. Domingo E., Sabo D.L., Taniguchi T. & Weissmann C. (1978). – Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell*, **13**, 735-744.
10. Domingo E., Dávila M. & Ortín J. (1980). – Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth disease virus. *Gene*, **11**, 333-346.
11. Domingo E., Holland J.J., Biebricher C. & Eigen M. (1995). – Quasispecies: the concept and the word. In *Molecular basis of virus evolution* (A. Gibbs, C. Calisher & F. García-Arenal, edit.). Cambridge University Press, Londres, 181-191.
12. Drake J.W. (1969). – Comparative rates of spontaneous mutation. *Nature*, **221**, 1132.
13. Drake J.W. (1991). – A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc. natl Acad. Sci. USA*, **88** (16), 7160-7164.
14. Duarte E., Clarke D., Moya A., Domingo E. & Holland J. (1992). – Rapid fitness losses in mammalian RNA virus clones due to Muller's ratchet. *Proc. natl Acad. Sci. USA*, **89** (13), 6015-6019.

15. Eigen M. (1971). – Self-organization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften*, **58** (10), 465-523.
16. Eigen M. & Schuster P. (1979). – The hypercycle. A principle of natural self-organization. Springer-Verlag, Berlin, 92 págs.
17. Eigen M. & Biebricher C. (1988). – Sequence space and quasispecies distribution. In *RNA genetics*, Vol. III (E. Domingo, J.J. Holland & P. Ahlquist, edit.). CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 211-245.
18. Escarmís C., Dávila M., Charpentier N., Bracho A., Moya A. & Domingo E. (1996). – Genetic lesions associated with Muller's ratchet in an RNA virus. *J. molec. Biol.*, **264**, 255-267.
19. Fenner F. (1995). – Classical studies of virus evolution. In *Molecular basis of virus evolution* (A. Gibbs, C. Calisher & F. García-Arenal, edit.). Cambridge University Press, Londres, 13-30.
20. Holland J.J. (1984). – Continuum of change in RNA virus genomes. In *Concepts in viral pathogenesis* (A.L. Notkins & M.B.A. Oldstone, edit.). Springer-Verlag, Nueva York, 137-143.
21. Holland J.J., Grabau E.A., Jones C.L. & Semler B.L. (1979). – Evolution of multiple genome mutations during long-term persistent infection by vesicular stomatitis virus. *Cell*, **16** (3), 495-504.
22. Holland J., Spindler K., Horodyski, F., Grabau E., Nichol S. & VandePol S. (1982). – Rapid evolution of RNA genomes. *Science*, **215**, 1577-1585.
23. Holland J.J., Domingo E., de la Torre J.C. & Steinhauer D.A. (1990). – Mutation frequencies at defined single codon sites in vesicular stomatitis virus and poliovirus can be increased only slightly by chemical mutagenesis. *J. Virol.*, **64**, 3960-3962.
24. Holland J.J., de la Torre J.C., Clarke D.K. & Duarte E. (1991). – Quantitation of relative fitness and great adaptability of clonal populations of RNA viruses. *J. Virol.*, **65**, 2960-2967.
25. Loeb L.A., Essigmann J.M., Kazazi F., Zhang J., Rose K.D. & Mullins J.I. (1999). – Lethal mutagenesis of HIV with mutagenic nucleoside analogs. *Proc. natl Acad. Sci. USA*, **96**, 1492-1497.
26. McMichael A.J. & Phillips R.E. (1997). – Escape of human immunodeficiency virus from immune control. *Annu. Rev. Immunol.*, **15**, 271-296.
27. Mahy B.W.J. (1997). – Human viral infections: an expanding frontier. *Antiviral Res.*, **22**, 47-52.
28. Marcus P.I., Rodríguez L.I. & Sekellick M.J. (1998). – Interferon induction as a quasispecies marker of vesicular stomatitis virus populations. *J. Virol.*, **72**, 542-549.
29. Morse S.S. (edit.) (1993). – *Emerging viruses*. Oxford University Press, Oxford, 340 págs.
30. Murphy F.A. & Nathanson N. (1994). – The emergence of new virus diseases: an overview. *Semin. Virol.*, **5**, 87-102.
31. Nájera I., Holguín A., Quiñones-Mateu M.E., Muñoz-Fernández M.A., Nájera R., López-Galíndez C. & Domingo E. (1995). – The *pol* gene quasispecies of human immunodeficiency virus. Mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy. *J. Virol.*, **69**, 23-31.
32. Novella I.S., Duarte E.A., Elena S.F., Moya A., Domingo E. & Holland J.J. (1995). – Exponential increases of RNA virus fitness during large population transmissions. *Proc. natl Acad. Sci. USA*, **92**, 5841-5844.
33. Novella I.S., Elena S.F., Moya A., Domingo E. & Holland J.J. (1995). – Size of genetic bottlenecks leading to virus fitness loss is determined by mean initial population fitness. *J. Virol.*, **69**, 2869-2872.
34. Parrish C.R. & Truyen U. (1999). – Parvovirus variation and evolution. In *Origin and evolution of viruses* (E. Domingo, R.G. Webster & J.J. Holland, edit.). Academic Press, San Diego, 421-439.
35. Sabin A.B. (1981). – Paralytic poliomyelitis: old dogmas and new perspectives. *Rev. infect. Dis.*, **3**, 543-564.
36. Scheld W.M., Armstrong D. & Hughes J.B. (edit.) (1998). – *Emerging infections, 1*. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, 277 págs.
37. Scheld W.M., Craig W.A. & Hughes J.B. (edit.) (1998). – *Emerging infections, 2*. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, 333 págs.
38. Sobrino F., Dávila M., Ortín J. & Domingo E. (1983). – Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology*, **128**, 310-318.
39. Taboga O., Tami C., Carrillo E., Núñez J.I., Rodríguez A., Saiz J.C., Blanco E., Valero M.L., Roig X., Camarero J.A., Andreu D., Mateu M.G., Giralt E., Domingo E., Sobrino F. & Palma E.L. (1997). – A large scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants. *J. Virol.*, **71**, 2606-2614.
40. Wang E., Barrera R., Bashell J., Ferro C., Freier J.C., Navarro J.C., Salas R., Vásquez C. & Weaver S.C. (1999). – Genetic and phenotypic changes accompanying the emergence of epizootic subtype IC Venezuelan equine encephalitis viruses from an enzootic subtype ID progenitor. *J. Virol.*, **73**, 4266-4271.
41. Webster R.G. (1999). – Antigenic variation in influenza viruses. In *Origin and evolution of viruses* (E. Domingo, R.G. Webster & J.J. Holland, edit.). Academic Press, San Diego, 377-390.
42. Yuste E., Sánchez-Palomino S., Casado C., Domingo E. & López-Galíndez C. (1999). – Drastic fitness loss in HIV-1 upon serial bottleneck events. *J. Virol.*, **73**, 2745-2751.