

Capítulo 26: EVOLUCIÓN EN POBLACIONES EXPERIMENTALES DE VIRUS DE RNA

Santiago F. Elena

INSTITUT CAVANILLES DE BIODIVERSITAT I BIOLOGIA EVOLUTIVA. UNIVERSITAT DE VALÈNCIA.
Edifici d'Instituts d'Investigació. Apartado 22085, 46071-Valencia. E-mail: santiago.elena@uv.es

En este capítulo reviso evidencias experimentales que ayudan a entender los procesos evolutivos mediante los cuales los virus de RNA (1) han llegado a ser unos parásitos celulares tan extendidos entre toda la diversidad biológica y (2) son tan difíciles de controlar tanto desde un punto de vista epidemiológico como por el sistema inmunitario de un individuo infectado. En el primer apartado describo algunas de las propiedades biológicas comunes a todos los virus de RNA y que les distinguen de otros parásitos basados en DNA, recalcando sus enormes tasas de mutación y elevadas frecuencias de recombinación. En el segundo apartado introduzco la noción de evolución experimental como herramienta para comprobar *in vitro* los distintos mecanismos genético-poblacionales que generan y mantienen la variabilidad genética que resulta en adaptación. A lo largo del siguiente apartado voy describiendo distintos resultados experimentales, comenzando con aquellos que tienen que ver con la acumulación de mutaciones deletéreas, sus propiedades biológicas y cómo afectan a la efectividad viral. Se continúa con las dinámicas de adaptación y diversificación viral, ejemplificándolas con la adaptación a distintos hospedadores simultáneos y la aparición de resistencias a fármacos antivirales. En el siguiente apartado se presentan las evidencias sobre tres fenómenos relacionados con la competencia que ocurre entre variantes genéticas que transitoriamente coexisten durante el proceso evolutivo: las dinámicas de Reina Roja, el principio de exclusión competitiva y la interferencia clonal. Por último se infieren las conclusiones de todo lo expuesto en los apartados anteriores. Los virus de RNA (ribovirus) constituyen el grupo más importante de parásitos celulares, ya que infectan organismos a lo largo y ancho de toda la escala biológica, desde mamíferos hasta bacterias. Un análisis comparativo de su estructura, organización genética y modo de replicación muestra que utilizan estrategias muy diferentes para llevar a cabo con éxito su multiplicación intracelular así como asegurar su estabilidad como partículas libres en el medio extracelular. Reflejo de este éxito son los problemas que existen para su erradicación mediante el diseño de nuevas vacunas y la aplicación de planes de salud pública. Alrededor de 50 nuevos virus han sido reconocidos como emergentes en las últimas décadas, la mayoría de ellos son de RNA y pertenecen a familias tan variadas como *Arenaviridae* (virus de Lassa o de Machupo), *Bunyaviridae* (virus de Hantaan o de la fiebre del Rift Valley), *Filoviridae* (virus de Ébola o de Marburgo), *Flaviviridae* (virus de la fiebre amarilla o del Dengue), *Orthomyxoviridae* (virus de la gripe) y *Retroviridae* (virus de la inmunodeficiencia humana). La aparición de nuevos patógenos virales se encuentra favorecida tanto por su variabilidad como por la colonización humana de nuevos hábitats, lo que brinda la posibilidad a las especies virales de ponerse en contacto con multitud de potenciales nuevos hospedadores. Virus, viroides, virusoides, satélites de RNA y retroelementos celulares constituyen un mundo de RNA dinámico que depende y coexiste con un mundo de DNA mucho más estático. Al parecer, la especie humana tiene un enemigo natural igual de destructivo y colonizador que ella misma, pero que evoluciona y se adapta mucho más rápidamente. En este trabajo vamos a revisar algunas de las bases evolutivas que han permitido a los virus de RNA su enorme éxito biológico.

Introducción: los virus de RNA como modelo experimental para comprobar teorías evolutivas

El hecho de que muy pocos patógenos virales puedan llegar a ser controlados de forma efectiva es una muestra evidente de la necesidad urgente de entender los mecanismos que les confieren la capacidad de superar

los procedimientos que intentan impedir su replicación. Esta capacidad de supervivencia debe incluir una primera fase de generación frecuente de mutaciones, seguida por una competición intensa entre distintas variantes genéticas y, por último, la selección de aquellas mejor adaptadas a cada situación. Por lo tanto, los estudios del comportamiento de las poblaciones virales resultan ser im-

portantes no solamente desde un punto de vista académico sino también clínico. Desde el punto de vista adaptativo, se ha comprobado que el grado de variabilidad observado en ribovirus y retrovirus es órdenes de magnitud superior al detectado en organismos de DNA. Esto es debido a su alta tasa de mutación y al mayor número de generaciones por unidad de tiempo. Estas características, junto con los altos tamaños poblacionales obtenidos durante los procesos infecciosos, nos permiten llevar a cabo estudios evolutivos que serían impracticables con otros organismos clásicamente empleados en experimentos de evolución, lo que nos revela a los ribovirus como una herramienta de trabajo inmejorable para la Genética de Poblaciones. En el aspecto clínico, la variabilidad viral es un factor importante en la patogenia. Gracias a esta variabilidad, los virus consiguen evadirse del sistema inmune del hospedador y hacer frente a drogas antivirales y vacunas. Esta plasticidad también les permite invadir nuevos tejidos, a medida que se va desarrollando la enfermedad, y colonizar nuevos hospedadores, propiciando la aparición de nuevas enfermedades.

Dos son los mecanismos que generan y mantienen la elevada variabilidad genética de estos organismos: la recombinación y la mutación.

La recombinación sirve dos propósitos: (i) Explora nuevas combinaciones de regiones genómicas de origen distinto. Por ejemplo, el virus de la encefalitis equina del oeste (WEEV) parece ser el resultado de la recombinación entre un virus tipo Sindbis y una cepa del virus de la encefalitis equina del este (EEEV) (Hahn et al. 1988). (ii) Recuperación de genomas viables a partir de genomas parentales debilitados (Lai 1992). La recombinación ocurre con una alta frecuencia en poliovirus; se han detectado recombinantes después de la administración de la vacuna oral trivalente, compuesta por virus atenuados de los tres serotipos de poliovirus (Wimmer et al. 1993), y parece ser una fuerza evolutiva importante causante de la rápida expansión de los virus de la inmunodeficiencia humana (Robertson et al. 1995). Resulta significativo comprobar que muchos virus emergentes pertenecen a grupos donde la recombinación juega un papel importante. Sin embargo, la ausencia de recombinación en virus con alto potencial adaptativo y variabilidad, incluidos los *Rhabdoviridae* como el virus de la estomatitis vesicular (VSV), sugiere que la recombinación no es un requisito imprescindible para la adaptabilidad y evolución de los virus de RNA.

Sin embargo, el factor más significativo y que marca la diferencia entre los organismos de DNA y los genomas de RNA, favoreciendo la gran adaptabilidad de los últimos, es su alta tasa de mutación; entendida como el proceso bioquímico que tiene lugar durante la replicación enzimática del genoma y por el cual se incorpora un nucleótido incorrecto a la cadena nascente. Esta tasa ha sido estimada utilizando diversos métodos genéticos y bioquímicos en un rango de 10^{-3} a 10^{-5} sustituciones por nucleótido y ronda de replicación (s/n/r) (Drake y Holland 1999). A título informativo, podemos citar valores de $1,5 \times 10^{-3}$ s/n/r para el bacteriófago Q β , $2,5 \times 10^{-4}$ s/n/r para

VSV y $1,3 \times 10^{-5}$ s/n/r para el poliovirus. Estos valores de hipermutabilidad contrastan enormemente con los que se han estimado en organismos de DNA, que pueden variar entre 10^{-7} y 10^{-11} s/n/r. La principal causa molecular responsable de esta elevada tasa de mutación es la limitada fidelidad de copia de las polimerasas virales. La ausencia, o baja eficacia, de las funciones de corrección y reparación de estas enzimas ha sido demostrada tanto a nivel bioquímico por Steinhauer et al. (1992) como estructural por Sousa (1996). Este último autor, comparando estructuras cristalinas de transcriptasas reversas y RNA-polimerasas dependientes de RNA, no encontró evidencias de la presencia del dominio encargado de la actividad exonucleasa 3' \rightarrow 5' que sí se encuentra en las DNA-polimerasas bacterianas.

Teniendo en mente lo arriba expuesto, supongamos un genoma viral de 10.000 nucleótidos que mutase con una tasa de 10^{-4} s/n/r. Esto implicaría que se producirá, en promedio, una mutación por cada nueva molécula de RNA sintetizada. Esto quiere decir que si una célula infectada acumula alrededor de 10^5 moléculas de RNA viral preparadas para ser encapsadas y salir de la célula, la mayoría de ellas tendrá una mutación. Por supuesto, durante un proceso infeccioso no es infectada una única célula, sino cientos de ellas. Si se asume una cascada de infecciones celulares a partir de la progenie anterior, después de tan sólo 10 rondas de replicación tendríamos una población viral que contendrá, en promedio, 10 mutaciones por genoma. El resultado de esta elevada tasa de mutación acompañada de una rápida expansión poblacional es que cuando hagamos referencia a un virus nunca nos referiremos a una entidad definida y concreta sino más bien a una población altamente heterogénea caracterizada por una distribución de genomas distintos centrados en torno a uno mayoritario.

Las poblaciones virales se encuentran entre dos fuegos. Por un lado tienen que mantener un nivel de variabilidad genética suficiente como para optimizar su adaptación ante cualquier cambio en el entorno; por otro lado, no deben comprometer su eficacia biológica en su entorno más habitual con una superproducción de mutaciones deletéreas en su mayoría (como veremos a continuación), ya que esto llevaría a una pérdida de eficacia biológica por efecto del trinquete de Müller (ver más adelante) (Müller 1964, Chao 1990, Duarte et al. 1992). Estudios de carácter teórico han mostrado que para mantener un mínimo de nivel informativo en el mensaje genético codificado en la secuencia de nucleótidos, es imprescindible una cierta fidelidad de copia por debajo de la cual se produce el cruce del denominado umbral de error y la consiguiente pérdida de la información genética en un proceso conocido como catástrofe de error (Eigen y Biebricher 1988). Evidencias experimentales (Holland et al. 1990) sugieren que los virus de RNA se encuentran replicando cerca de su umbral de error y a pesar de la aparición de genomas deletéreos, el tamaño poblacional elevado garantizará la existencia de un suficiente número de genomas viables para el mantenimiento de la población.

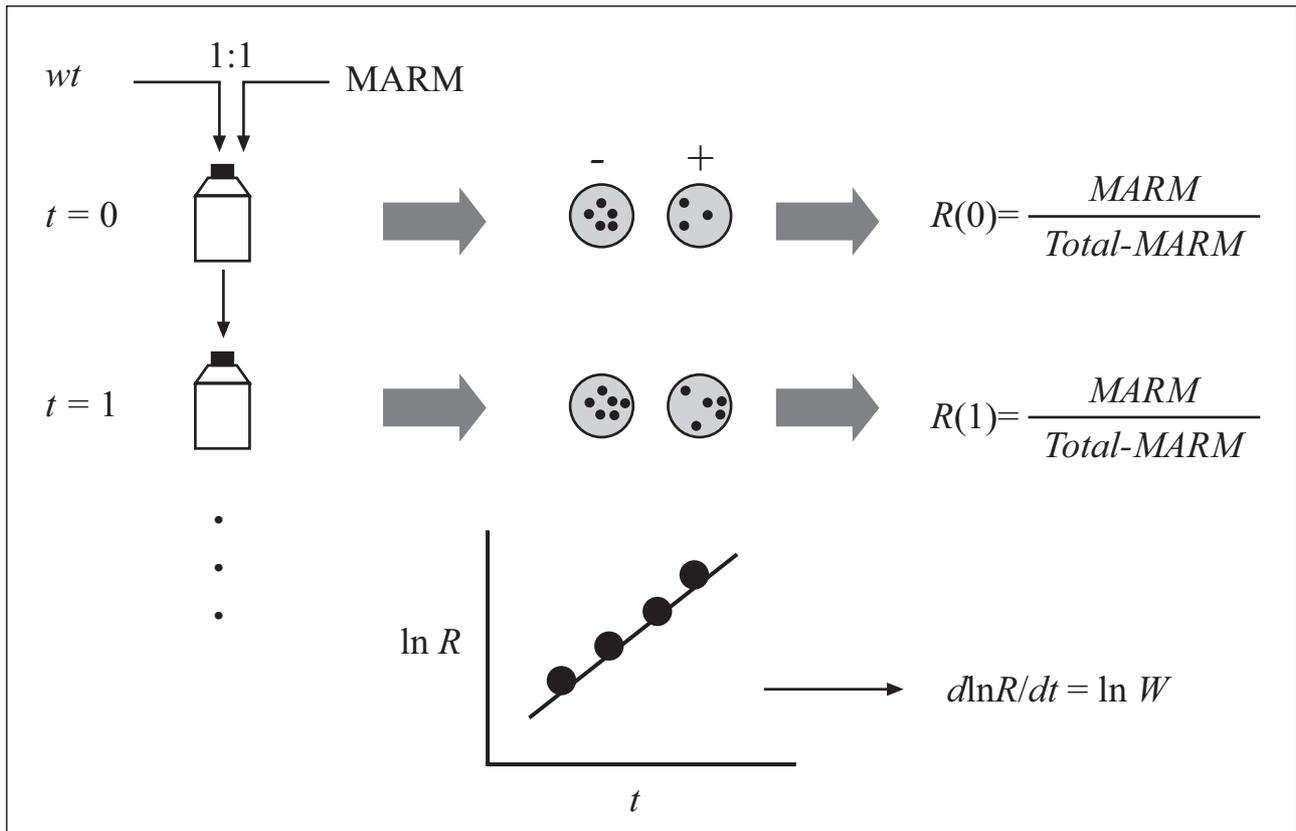


Figura 1. Esquema de un experimento de competencia entre dos variantes virales, una de las cuales es resistente al AcM I_1 (MARM) y la otra no (wt). El protocolo experimental se describe detalladamente en el texto.

Una aproximación experimental a la evolución viral

Determinación de la eficacia biológica de un clon viral: experimentos de competencia

La variación de las frecuencias de dos alelos, a lo largo de un proceso de competencia entre ambos, nos servirá para estimar la eficacia biológica relativa de éstos. Holland et al. (1991) adaptaron este sistema de competencias al caso particular de los ribovirus, midiendo los cambios en la proporción de dos variantes virales, una de las cuales tenía un marcador fenotípico que le hacía fácilmente distinguible del otro (MARM): la capacidad de crecer en presencia de concentraciones del anticuerpo monoclonal I_1 (AcM I_1) que completamente neutralizaban a la otra variante (wt). El protocolo seguido está esquematizado en la Figura 1. Brevemente se resume en los siguientes pasos:

1. Se mezclan, cuidadosamente, cantidades conocidas de ambos competidores en una proporción lo más próxima posible a 1:1. Para ello, previamente, se habrán cuantificado ambos competidores. Esta mezcla la consideraremos como el tiempo cero de nuestro experimento de competencia.

2. Se utilizará la mezcla $t=0$ para, en paralelo, infectar una botella que contiene una monocapa de células y cuantificarla en presencia y ausencia del AcM I_1 . De la cuantificación en ausencia de anticuerpo podremos inferir el número total de partículas virales en la mezcla, mien-

tras que de la hecha en presencia de anticuerpo deduciremos la cantidad de virus MARM en la misma. La diferencia entre ambos recuentos nos dará el número de virus wt en la mezcla.

3. Una vez completada la lisis celular en la botella, se tomará una muestra de la población viral resultante ($t=1$) que se empleará para infectar una nueva botella y también para cuantificarla en presencia y ausencia del AcM I_1 .

4. El paso 3 se repetirá un número variable de veces.

Hay que hacer notar que con este método se miden diferencias totales en la eficacia de los competidores, independientemente del momento en el ciclo vital del virus en el que aparezcan (entrada en la célula, replicación, encapsidado, estabilidad de las partículas...).

A partir de los recuentos obtenidos a distintos pases de competencia se procedió de la siguiente manera para estimar la eficacia de (por ejemplo) MARM relativa a wt . En primer lugar, los datos de frecuencia de MARM en cada instante, $p(t)$, se transformaron de acuerdo con la

expresión $R(t) = \ln \frac{p(t)}{1-p(t)}$. Para organismos haploides,

la relación entre $R(t)$ y la eficacia biológica relativa (W) de los competidores en el instante t viene dada por la ecuación $R(t) = R(0) + t \ln W$. De este modo, el antilogaritmo de la pendiente de la recta de regresión de $R(t)$ con el número de pase de competencia nos dará una medida de la eficacia de MARM relativa a wt . Nótese que este valor

de eficacia, en realidad una tasa de selección, tiene como unidades la inversa del tiempo. No obstante su sentido biológico es inmediato. Por ejemplo, $W = 1.1$ significará que si mezclamos a partes iguales MARM y *wt*, al cabo de un ciclo de competencia MARM será 10% más abundante que *wt*. No obstante, convertir esta medida de eficacia en una cantidad sin dimensiones (W^*) es inmediato con sólo tener en cuenta el factor de dilución empleado entre pases de competencia consecutivos (D):

$$W^* = 1 + \ln W / \ln D .$$

Consideraciones dinámicas

Es de esperar que en poblaciones experimentales de virus de RNA las dinámicas evolutivas sean un tanto distintas de aquellas observadas en otros sistemas modelos, tales como *Drosophila*, que habitualmente se han empleado en investigaciones de la Genética de Poblaciones. Las dos diferencias principales son que los virus de RNA se reproducen asexualmente y que la variabilidad genética inicial es nula ya que habitualmente los experimentos se inician con clones. Así pues, la variabilidad tendrá que ser generada *de novo* a lo largo del experimento.

Como una consecuencia de la asexualidad, dos o más mutaciones que confieran cierto efecto beneficioso podrán ser incorporadas a la población en evolución únicamente si ambas ocurren en el mismo linaje. Por el contrario, en poblaciones de organismos sexuales, estas mutaciones podrán ocurrir en linajes distintos y sufrir un proceso de recombinación que las junte en un nuevo linaje que se beneficiaría del efecto combinado de ambas. Cada mutación selectivamente beneficiosa que se vaya a fijar en una población asexual deberá eliminar en su camino todas aquellas otras mutaciones (deletéreas, neutrales o beneficiosas) que hayan aparecido en otros linajes, aunque otras mutaciones puedan ir acumulándose en el linaje triunfador. Este proceso de eliminación de variabilidad genética en poblaciones asexuales, producido por la sustitución de alelos beneficiosos, se le conoce habitualmente como selección periódica.

Debido a la homogeneidad genética inicial y a los sucesivos eventos de selección periódica, la adaptación por selección natural depende de la continua producción de variantes por mutación. En poblaciones grandes, cualquier mutación favorable es, por definición, rara y con una frecuencia $1/N$. La selección natural es, esencialmente, un crecimiento diferencial entre poblaciones y por tanto, al igual que el crecimiento poblacional en sí mismo, es un proceso intrínsecamente exponencial. Sólo cuando el alelo beneficioso alcance una cierta frecuencia en la población afectará de modo apreciable a la eficacia media de ésta. Así pues, se esperará que las dinámicas de adaptación en poblaciones asexuales tengan un aspecto escalonado a medida que sucesivos alelos beneficiosos aumenten su frecuencia por acción de la selección natural (hasta ese momento, cada uno estará efectivamente oculto a nuestra percepción). No obstante, muchos de estos alelos se perderán por acción de la deriva en los primeros momentos tras su aparición.

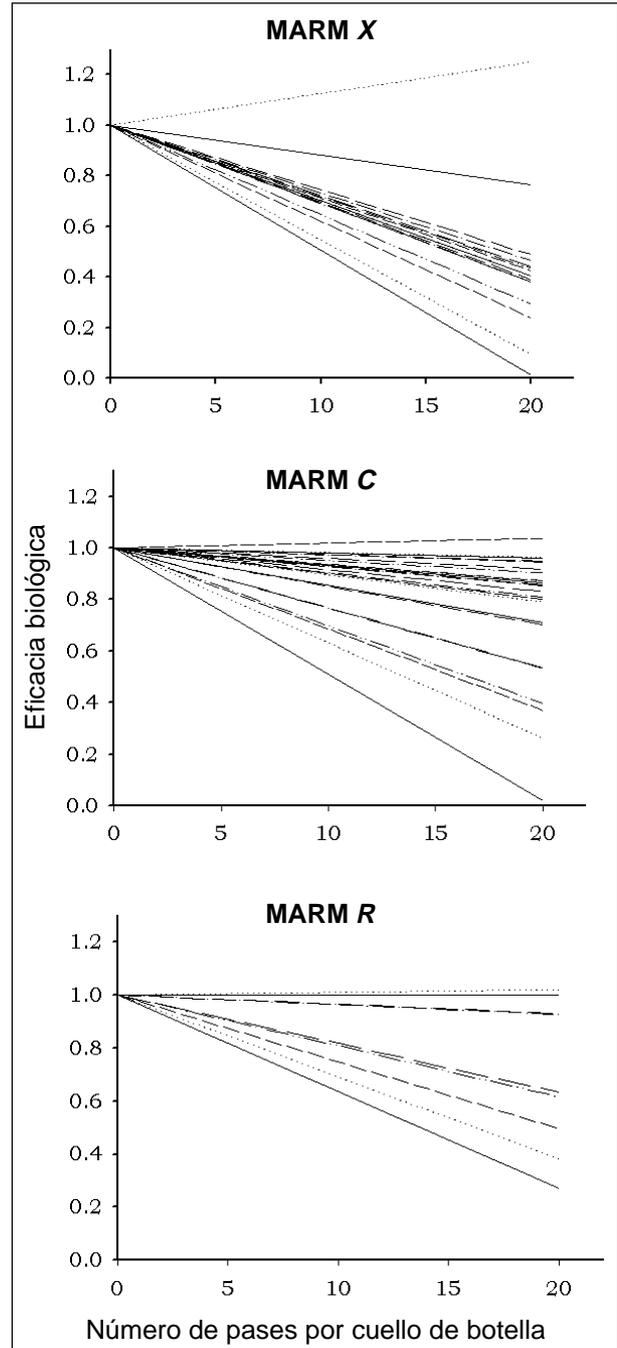


Figura 2. Cambios de eficacia asociados a la acumulación de mutaciones deletéreas por efecto del trinquete de Müller en poblaciones experimentales de VSV. Cada línea representa un experimento independiente realizado con uno de tres genotipos de VSV que diferían en su eficacia inicial. (Datos recopilados en Elena y Moya 1999).

Algunos resultados experimentales de evolución viral

Deriva genética y acumulación de mutaciones deletéreas: el trinquete de Müller

Si la tasa de mutación es grande y el tamaño de la población pequeño o sufre colapsos periódicos (cuellos de botella genéticos), los individuos cuyo genoma se encuentra libre de mutaciones son escasos y pueden ser per-

Tabla 1

Efecto de la eficacia inicial en el tamaño del cuello de botella requerido para detener el efecto del Trinquete de Müller. Las eficacias finales fueron medidas después de someter a la población viral a 20 cuellos de botella consecutivos y del tamaño indicado. (Datos de Novella et al. 1995c). Los valores finales e iniciales se compararon mediante una prueba de la t de Student.

Genotipo VSV	Eficacia inicial	Tamaño de cuello de botella (PFU)	Eficacia final	P (1-cola)
X	3.05 ± 0.03	5	1.7 ± 0.2	0.001
		30	3.0 ± 0.4	0.439
U	1.0 ± 0.2	5	1.3 ± 0.2	0.226
C	0.91 ± 0.03	5	1.2 ± 0.2	0.126
N	0.38 ± 0.01	5	0.55 ± 0.05	0.986
		2	0.38 ± 0.01	0.398

Tabla 2

Parámetros describiendo la distribución de los efectos mutacionales deletéreos acumulados después de 20 pases por cuellos de botella de tamaño 1. La tasa de mutación deletérea (U) y el efecto deletéreo promedio (\bar{s}) se estimó asumiendo que la distribución de efectos deletéreos se ajustaba a una función de probabilidad compuesta por un término gamma y otro uniforme en el intervalo (0, 1). (Datos de Elena y Moya 1999).

Genotipo VSV	Eficacia media	Desviación típica	Asimetría	Aplastamiento	U	\bar{s}
X	0.4287	0.2756	1.713 ± 0.564	5.101 ± 1.091	3.149 ± 1.118	-0.002 ± 0.001
C	0.7400	0.2565	-1.409 ± 0.472	1.437 ± 0.918	1.768 ± 0.108	-0.0018 ± 0.0001
R	0.6971	0.2811	-0.227 ± 0.717	-1.613 ± 1.400	2.320 ± 0.106	-0.0016 ± 0.0001

didados simplemente por deriva genética. En poblaciones asexuales esta pérdida será irreversible y el número promedio de mutaciones por genoma aumentará con la sucesiva pérdida de los individuos portadores de los genomas menos mutados. Esta pérdida irreversible y paulatina es lo que se conoce como el trinquete de Müller (Müller 1964). Las condiciones necesarias para la puesta en marcha del trinquete parecen ser comunes en las poblaciones de ribovirus: grandes oscilaciones en el tamaño poblacional como consecuencia de los procesos de transmisión de un número limitado de partículas virales entre hospedadores, grandes tasas de mutación y, generalmente, reproducción de tipo asexual. Luego, *a priori*, es de esperar que el trinquete de Müller juegue algún papel en la evolución de estos virus. Chao (1990) proporcionó la primera evidencia experimental de la acción del trinquete de Müller en virus de RNA. Observó que al someter al bacteriófago $\phi 6$ a una dinámica demográfica caracterizada por consecutivos cuellos de botella, desde varios miles de individuos a tan sólo uno, la eficacia de la población viral resultante se redujo en aproximadamente un 22%. Esta observación fue posteriormente extendida al VSV (Elena et al. 1996) (Figura 2); al virus de la fiebre aftosa (FMDV) (Escarmís et al. 1996); al virus del SIDA (HIV-1) (Yuste et al. 1999) y al bacteriófago MS2 (De la Peña et al. 2000). En general, todos estos datos muestran un patrón común de pérdidas de eficacia biológica a igualdad de condiciones demográficas. Pero tanto la magnitud de la pérdida media como, más aún, la varianza entre las pérdidas observadas en distintas réplicas experimentales, dependía enormemente del virus estudiado. Mientras que las pérdi-

das sufridas por el VSV o el MS2 oscilaban entre la total extinción y pérdidas menores del 1%, las pérdidas sufridas por el FMDV fueron, en promedio, mayores, oscilando entre la extinción y el 14%. Tal vez el caso del HIV-1 sea más particular, ya que las pérdidas promedio siempre fueron mucho mayores (entre la completa extinción y un 89% de pérdida) pero con una varianza mucho menor.

No importa hasta donde se expandiese el tamaño de una población viral después de sufrir un cuello de botella de tamaño uno, el efecto negativo de la deriva genética era suficientemente intenso como para reducir la eficacia biológica (Duarte et al. 1993). Ahora bien, ¿existe algún tamaño mínimo de cuello de botella que garantice el mantenimiento de la eficacia biológica inicial? Novella et al. (1995c) hicieron una observación de gran interés: el tamaño mínimo de cuello de botella necesario para detener el efecto del trinquete de Müller dependía del genotipo de VSV empleado en los experimentos. Mientras que para un genotipo que inicialmente presentaba una alta eficacia biológica un tamaño de cuello de botella de cinco partículas virales aún producía pérdidas significativas de eficacia, el mismo tamaño no tenía efecto negativo con genotipos de eficacia unidad o incluso ligeramente deletéreos. Fue necesario aumentar el tamaño del cuello de botella hasta 30 partículas virales para detener el efecto del trinquete de Müller en genotipos de alta eficacia. Por el contrario, para un clon que de partida mostraba eficacias bajas o unitarias, incluso un cuello de botella de tamaño dos fue insuficiente para provocar pérdidas de eficacia biológica (Tabla 1).

Propiedades de la distribución de efectos deletéreos

Recientemente, Elena y Moya (1999) analizaron todos los datos de acumulación de mutaciones obtenidos en los experimentos realizados con VSV y que se indicaban arriba. El objetivo de estos nuevos análisis era triple; en primer lugar estimar el efecto deletéreo promedio asociado a una mutación, ¿cómo afecta a la eficacia biológica de un virus algo tan frecuente como mutar? En segundo lugar, estimar la tasa de aparición de mutaciones deletéreas, ¿cuál es la probabilidad de que un virus mute para empeorar? Y en tercer lugar, tener una idea de la distribución de probabilidad de efectos deletéreos, ¿con qué probabilidad aparecerá una mutación de un determinado efecto sobre la eficacia biológica? Como era de esperar, la forma de la distribución de efectos deletéreos dependió del genotipo de VSV examinado. No obstante, se pudo observar un patrón común entre los distintos genotipos: las distribuciones de efectos estaban significativamente sesgadas hacia mutaciones con efectos pequeños, o dicho en otras palabras, los efectos pequeños son mucho más frecuentes que los grandes (Tabla 2). Las distribuciones también eran significativamente leptocúrticas, o lo que es lo mismo, la mayoría de los efectos deletéreos son o bien próximos a la media de la distribución o bien muy extremos, pero se observan muy pocos valores intermedios. La tasa de mutación deletérea que estimamos a partir de los datos fue de aproximadamente dos mutaciones por genoma y ronda de replicación (Tabla 2), un valor que coincidía muy bien con las estimas de tasa de mutación genómica total obtenidas a partir de otros métodos (Drake y Holland 1999). Por último, el efecto deletéreo promedio asociado a una mutación fue pequeño, alrededor del 0,1% (Tabla 2). Como conclusión de este estudio se puede afirmar que las enormes pérdidas de eficacia observadas eran consecuencia de la acumulación de muchas mutaciones de efecto pequeño. ¿Cuáles son las implicaciones evolutivas de este hallazgo? El influjo que la acumulación de mutaciones tiene en la supervivencia a largo plazo de una población es mucho más profundo cuanto menor sea el efecto deletéreo que éstas llevan asociado. Evidentemente, la selección natural será muy eficiente eliminando mutaciones de efecto grande, pero no lo será para eliminar aquellas mutaciones que afecten muy poco a la habilidad de un organismo para sobrevivir y reproducirse, transmitiéndolas a la siguiente generación. Así pues, las mutaciones tienden a acumularse en el genoma de VSV en ausencia de selección y reproducción sexual, cuando la dinámica demográfica imperante impone frecuentes colapsos poblacionales como consecuencia de los eventos de transmisión entre hospedadores.

Aditividad y epistasia entre mutaciones deletéreas

Los experimentos anteriormente descritos muestran como, en ausencia de selección, las mutaciones deletéreas deben acumularse en las poblaciones virales, con la consiguiente pérdida de eficacia. Hace algún tiempo, Chao (1991) propuso que la segmentación y la mezcla de seg-

mentos entre distintos clones virales evolucionó como una respuesta adaptativa a la acumulación de mutaciones deletéreas. De hecho, la segmentación del genoma viral no es más que un caso particular de un problema evolutivo más general, el del origen y mantenimiento de la reproducción sexual (Maynard Smith 1978). Se ha demostrado teóricamente que la reproducción sexual aporta una ventaja sobre la asexual únicamente cuando las mutaciones deletéreas interactúan de un modo sinérgico, esto es, cuando el efecto conjunto de dos mutaciones deletéreas es mayor que la suma de sus efectos por separado. Elena (1999) analizó datos de acumulación de mutaciones obtenidos por Escarmís et al. (1996) en FMDV con la intención de inferir la presencia de interacciones sinérgicas entre las mutaciones deletéreas acumuladas. Escarmís et al. (1996) no solamente estimaron la eficacia de clones de FMDV que habían sido sometidos al efecto del trinquete de Müller sino que también secuenciaron aproximadamente un 40% del genoma de estos clones. Así pues, se disponía tanto de los datos de eficacia como de los cambios moleculares responsables de estos cambios de eficacia. Los análisis mostraban que las pérdidas de eficacia aumentaban linealmente con la cantidad de mutaciones acumuladas, lo que es un reflejo de la falta de interacciones sinérgicas entre estas mutaciones.

La conclusión que se puede sacar de estos trabajos es que la segmentación del genoma de RNA, común en algunos grupos de virus (especialmente de plantas), no es posible que haya evolucionado únicamente como una respuesta a la acumulación de mutaciones deletéreas, sino que hay que tener en cuenta factores adicionales, tales como la selección entre unidades coinfectantes (Nee 1989). La falta de una tendencia hacia la existencia de fuertes sinérgismos entre mutaciones deletéreas no parece ser una peculiaridad de los genomas de RNA, sino que parece ser algo más profundo, propio de la arquitectura de los genomas, ya que resultados similares han sido también descritos para *Escherichia coli* (Elena y Lenski 1997), *Chlamydomonas moewusii* (de Visser et al. 1996), *Aspergillus niger* (de Visser et al. 1997) o plantas superiores (de Visser y Hoekstra 1998).

Dinámicas de adaptación y diversificación durante experimentos de evolución a largo plazo

La aparición de mutaciones beneficiosas y el desplazamiento de un genotipo ancestral por otro portador de alguna mutación beneficiosa dirige la evolución a largo plazo de los ribovirus. A pesar del carácter aleatorio de las mutaciones, un patrón de evolución común ha venido siendo observado en distintos experimentos realizados con VSV (Novella et al. 1995b, Elena et al. 1998), FMDV (Escarmís et al. 1999) y $\phi 6$ (Burch y Chao 1999). Como se aprecia en la Figura 3a, este patrón se caracteriza por aumentos exponenciales de la eficacia biológica en períodos relativamente cortos de tiempo (días). No obstante, estos aumentos exponenciales no ocurrían uniformemente a lo largo del tiempo que duraban los experimentos sino que después de un período inicial de rápido aumen-

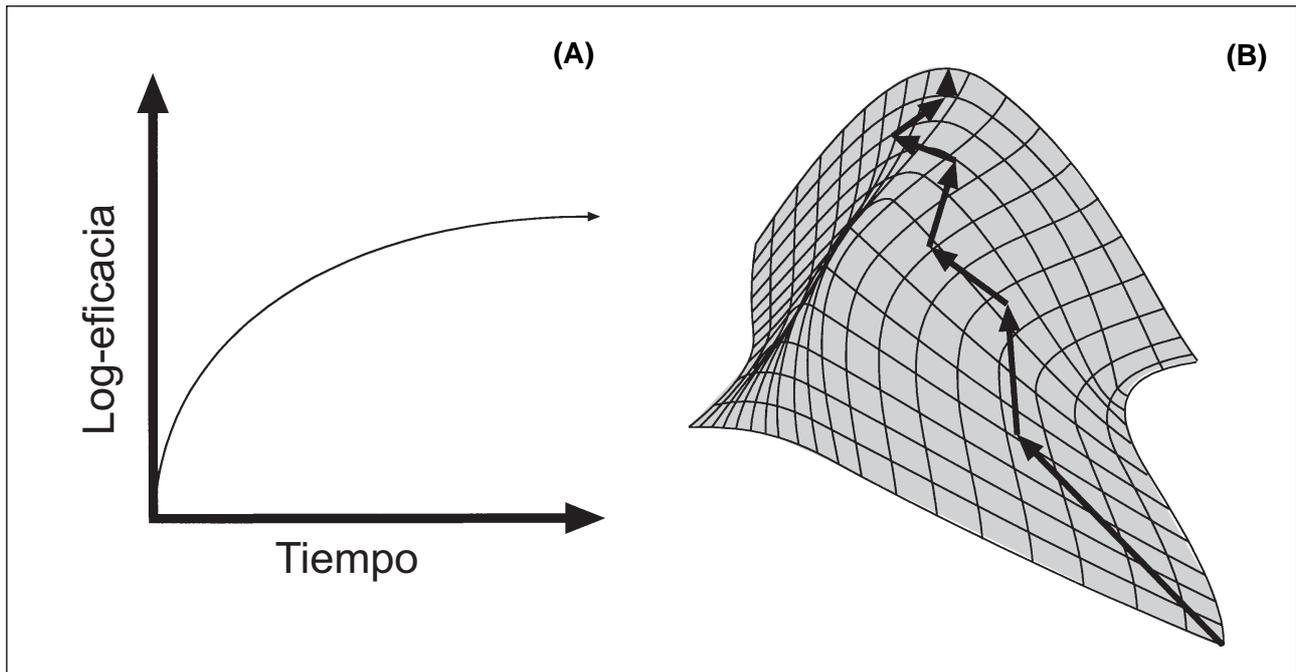


Figura 3. Aumentos de eficacia en poblaciones experimentales de VSV sometidas a transmisión de un gran número de partículas virales. El panel (A) muestra la trayectoria log-hiperbólica generalmente observada en varios experimentos de evolución hechos con distintos virus (Novella et al. 1995b, Elena et al. 1998, Escarmís et al. 1999). El panel (B) muestra la explicación para la forma hiperbólica de las curvas basándose en un modelo de paisajes adaptativos (Wright 1988).

to, siempre seguía una deceleración en la tasa de adaptación para, finalmente, alcanzarse una situación de equilibrio en la que ya no se observaban más aumentos en la eficacia biológica (Figura 3a): el virus se había adaptado perfectamente a la nueva situación. Una buena descripción matemática de este proceso es una función hiperbólica del tiempo en una escala logarítmica de eficacias biológicas. La razón para esta deceleración en la velocidad de adaptación es fácilmente entendible en el contexto de los paisajes adaptativos de Wright (1988) y tiene que ver con la disponibilidad de mutaciones beneficiosas, y la magnitud del efecto beneficioso asociado con cada posible mutación disponible. Al principio del proceso, cuando la población viral se encuentra lejos del óptimo adaptativo (Figura 3b), existen muchas características fenotípicas que mejorar y prácticamente cualquier cambio que ocurra provocará un aumento en la eficacia biológica, conduciendo rápidamente a la población hacia el óptimo; son lo que podríamos definir como mutaciones para ajustes groseros. A medida que la población se aproxima al óptimo adaptativo, mutaciones cada vez más específicas, las que podríamos denominar de ajuste fino (Figura 3b), son necesarias y, obviamente, estas mutaciones son más infrecuentes que las primeras (Burch y Chao 1999). Una vez que la población viral se encuentra perfectamente adaptada a la nueva situación, no se producirán más cambios, a no ser, claro está, que ocurra alguna alteración ambiental que exija un reajuste en el fenotipo viral.

Todas las evidencias anteriores sobre la rápida evolución de los ribovirus plantean dos cuestiones importantes desde el punto de vista epidemiológico: ¿será fácil que se adapten a nuevos hospedadores?, y ¿podrán adaptarse a

replicar en presencia de nuevos fármacos antivirales? Obvia y desgraciadamente, la respuesta a ambas preguntas es afirmativa.

Adaptación a hospedadores celulares cambiantes

De nuevo, experimentos con VSV dieron algo de luz a estas dos cuestiones (Holland et al. 1991, Weaver et al. 1999, Turner y Elena 2000). Clones de VSV mantenidos durante años en cultivos de fibroblastos de riñón de hámster (células BHK) rápidamente se adaptaron a vivir en nuevos tipos celulares de muy diversa procedencia, tales como las células epiteliales caninas (MDCK), células cancerosas humanas (HeLa), tejido conectivo de ratón (L929) o incluso a células no de mamífero, como fueron las del mosquito *Lutzomyia longipalpis* (LL-5). Interesantemente, la adaptación a estos nuevos ambientes celulares, y el consecuente aumento en eficacia biológica en ellos, no llevó asociado un aumento paralelo en la eficacia biológica en el hospedador original BHK, o en ningún hospedador nuevo alternativo (Figura 4; Turner y Elena 2000). Esta observación sugirió la existencia de un coste, en términos de eficacia biológica, asociado con la ampliación en el rango de posibles hospedadores (Figura 4a).

No obstante, si la evolución tenía lugar en un ambiente fluctuante, en el que la célula hospedadora podía cambiar con cierta periodicidad entre dos tipos distintos posibles, se seleccionaban virus con eficacias biológicas aumentadas en ambos, como se demostró con el VSV (Weaver et al. 1999, Turner y Elena 2000) y con el EEEV (Weaver et al. 1999). Weaver et al. (1999) hicieron evolucionar clones de VSV y de EEEV en cultivos celulares

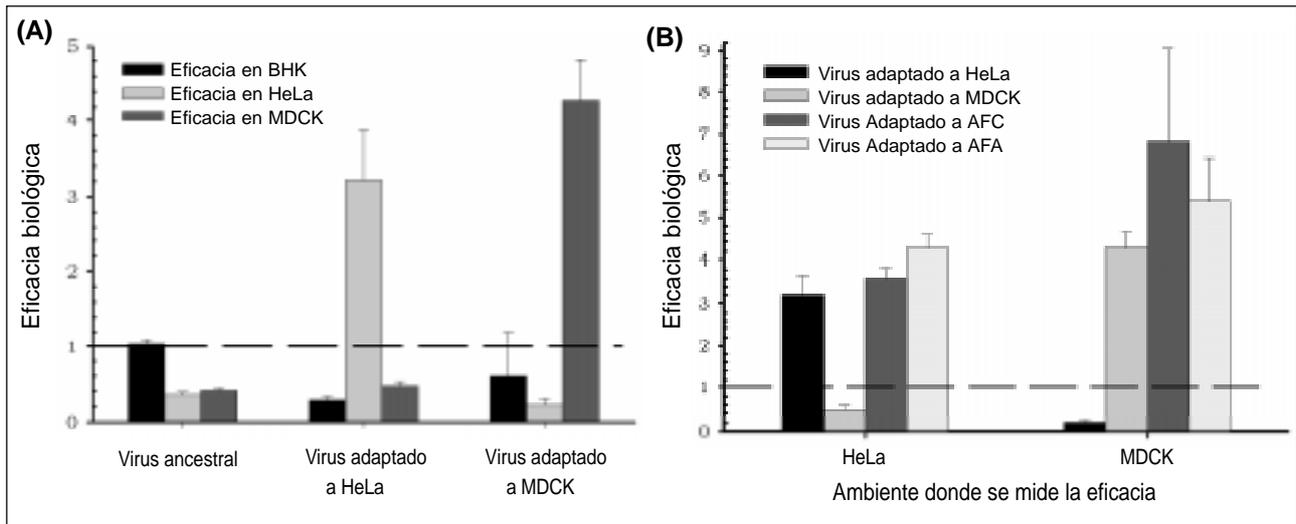


Figura 4. Adaptación de VSV a distintos tipos celulares. El panel (A) muestra el coste de la adaptación a un nuevo tejido en términos de la eficacia en el hospedador ancestral. El panel (B) muestra el compromiso al que se llega cuando el virus periódicamente alterna el tipo de hospedador. Los tratamientos experimentales AFA y AFC se caracterizaron, respectivamente, por presentar fluctuaciones aleatorias y correlacionadas en el hospedador. (Datos de Turner y Elena 2000).

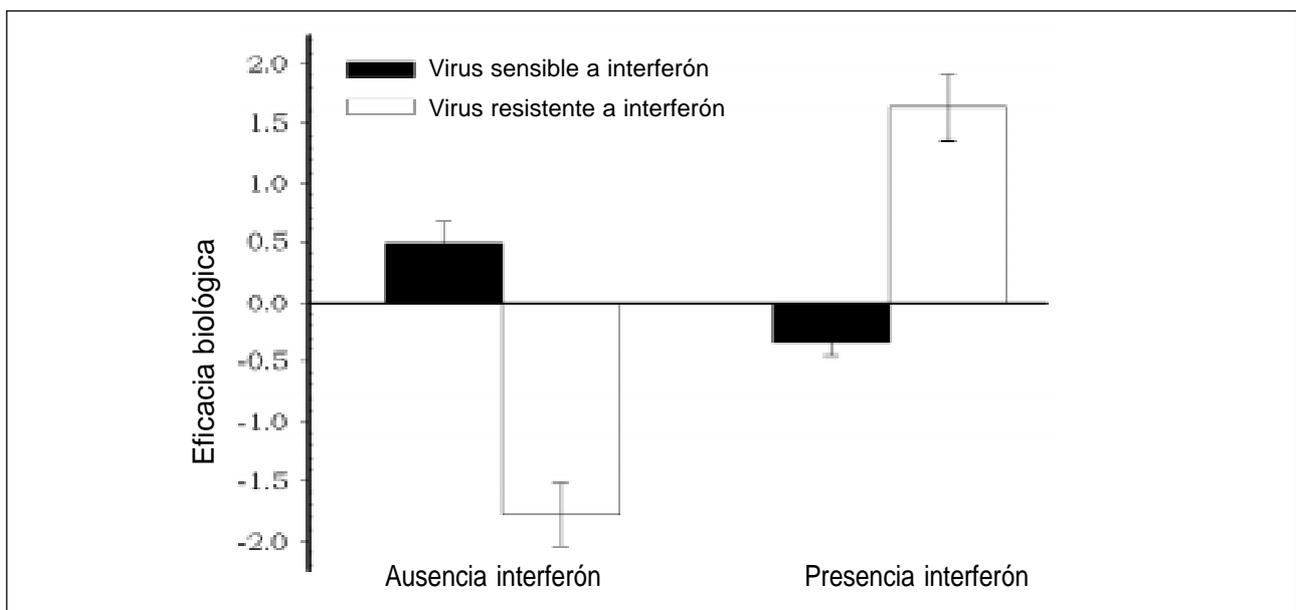


Figura 5. Adaptación de VSV a replicar en presencia del α -interferón. Nótese el coste que en habilidad replicativa que suponen las mutaciones que confieren resistencia al α -interferón. Cuando el fármaco se elimina el virus replica mucho peor que el virus sensible al mismo. (Datos de Novella et al. 1996).

que diariamente alternaban entre células BHK y C6/36 originarias de *Aedes albopictus*. Ambos virus son *Arbovirus*, lo que significa que emplean insectos como vectores de transmisión entre sus hospedadores mamíferos. Así pues, este experimento refleja una propiedad biológica inherente al ciclo vital de estos virus. Al final de su experimento, midieron la eficacia biológica del virus resultante en BHK y en células de mosquito y compararon estos resultados con los obtenidos para virus que habían evolucionado en un tipo celular único. Mientras que los virus evolucionados únicamente en un tipo celular mostraban una alta eficacia biológica en ese tipo, pero una muy baja en el tipo alternativo, los virus que habían evo-

lucionado a la vez en sendos tipos, mostraban valores elevados de eficacia en ambos tipos celulares. Resultados similares fueron obtenidos por Turner y Elena (2000) cuando alternaban entre células MDCK y HeLa: mientras que, como vimos antes, el virus adaptado a cualquiera de estos dos tipos celulares replicaba pobremente en el otro (Figura 4b), el virus que evolucionó en un medio celular fluctuante alcanzaba altos valores de eficacia en ambos tipos celulares (Figura 4b), independientemente de que las fluctuaciones ocurrieran de un modo aleatorio o de un modo predecible. Tomados en conjunto, estos resultados indican la falta de un compromiso en el grado de adaptación simultánea a más de un hospedador. Un compromiso

Tabla 3

El efecto de la Reina Roja en el VSV. Después de un prolongado período de competencia, un competidor siempre excluye a su contrincante. No obstante, en el momento justo anterior al desplazamiento, aunque la eficacia relativa de una pareja de competidores no haya variado, la de ambos aumentó con respecto a sus ancestros. Todos los valores fueron significativamente mayores que 1. (Datos de Clarke et al. 1995).

Experimento	Eficacia respecto al ancestro correspondiente	
	Perdedor de la competencia	Ganador de la competencia
I	2.518 ± 0.080	3.215 ± 0.140
II	1.066 ± 0.037	1.669 ± 0.043

de este tipo implicaría que es mejor replicar moderadamente bien en cualquier posible hospedador que hacerlo muy bien hoy en uno y mañana extinguirse por no poder hacerlo en otro.

¿Es reversible la adaptación a un nuevo hospedador? Clones de VSV que habían sido adaptados a replicar en infecciones persistentes de células LL-5 y, consecuentemente, mostraban eficacias biológicas bajísimas en células BHK siendo, además, incapaces de inducir mortalidad en infecciones intracraneales de ratones, recuperaron eficacia biológica en mamíferos después de tan sólo siete días de replicación en BHK (Novella et al. 1995a). Este virus readaptado a BHK también recuperó su neurovirulencia en ratones.

Adaptación a fármacos antivirales: el coste de la adaptación

Habitualmente, el VSV muestra una escasa habilidad para replicar en células tratadas con concentraciones altas de α -interferón, un fármaco de uso habitual en el tratamiento de enfermedades virales, como por ejemplo la hepatitis C. No obstante, clones de VSV evolucionados en presencia de α -interferón desarrollaron resistencia a este fármaco antiviral. Estos clones de VSV presentaban eficacias biológicas altas en presencia del antiviral pero, sorprendente e interesantemente, cuando el antiviral era eliminado del medio, los virus resistentes eran notablemente peores que los virus sensibles al antiviral (Novella et al. 1996). Estos resultados ponen de manifiesto dos cosas. En primer lugar, el desarrollo de resistencias a fármacos antivirales es fácilmente generable por los virus de RNA. En segundo lugar, existe un coste, en términos de eficacia biológica, en ausencia del fármaco (Figura 5), lo que abre interesantes perspectivas para el control de enfermedades virales y, sobre todo, para evitar la dispersión de estirpes virales resistentes al total de la población.

Competencia entre variantes virales

La Reina Roja y el Principio de Exclusión Competitiva

Hay un principio en Biología Evolutiva que afirma que dos especies compitiendo por un mismo recurso limi-

tado experimentan una “carrera de armamentos”: su eficacia relativa mejora con respecto a sus antecesores pero con respecto a su competidor actual se mantiene en la misma situación. Es lo que, empleando el símil de Alicia en el País de las Maravillas, se llamó el efecto de la Reina Roja (van Valen 1973): habrá que correr mucho para estar siempre en el mismo lugar. Dos clones de VSV pueden coexistir durante largos períodos de tiempo sin ser desplazados por su respectivo competidor (ésto es, son igual de eficaces), pero comparados con sus respectivos antepasados, muestran aumentos significativos en su eficacia (Tabla 3; Clarke et al. 1995). Ciertas mutaciones beneficiosas han podido aparecer en ambos genotipos, mejorando sus eficacias biológicas respectivas. Si el efecto en la eficacia biológica asociado con las mutaciones que han aparecido en cada genotipo es similar, ninguno de los genotipos mostrará una ventaja clara sobre el otro. No obstante, después de períodos de coexistencia suficientemente largos, una mutación beneficiosa de efecto grande eventualmente aparecerá en uno de los genotipos pero no en el otro. Cuando ésto ocurra, el primero tendrá una clara ventaja sobre el segundo, al que desplazará de la población. Este desplazamiento obligatorio por el recién creado genotipo más eficaz es un reflejo de otro principio general de la Biología Evolutiva, el de Exclusión Competitiva (Clarke et al. 1995).

La Interferencia Clonal impone un límite a la tasa de adaptación viral

A pesar de las evidencias anteriores de una rápida adaptación atribuible a la habilidad viral para generar una enorme cantidad de variabilidad genética, una porción de la cual será beneficiosa y responsable de la adaptación. Un reciente descubrimiento ha puesto de manifiesto que la presencia de tanta variabilidad beneficiosa es un arma de doble filo, que puede reducir la tasa de adaptación.

Gerrish y Lenski (1998) formularon matemáticamente la siguiente idea. En una población asexual de tamaño grande, dos o más linajes contemporáneos pueden ser creados por diferentes mutaciones beneficiosas. Cuando ésto ocurre, el linaje portador de la mutación más beneficiosa, eventualmente, desplazará a todos los demás. Esta interferencia entre linajes reduce la probabilidad de fijación de cualquier mutación beneficiosa, incrementa la magnitud del cambio en la eficacia, y aumenta el tiempo transcurrido entre la fijación consecutiva de mutaciones beneficiosas. Este modelo es conocido como Interferencia Clonal.

Recientemente se ha demostrado que las predicciones del modelo de Interferencia Clonal se cumplían en poblaciones experimentales de VSV (Miralles et al. 1999). Cuanto más grande era la población viral, mayor fue el efecto beneficioso asociado a la mutación que se fijaba en la población (Figura 6a). En otras palabras, aumentar la cantidad de competencia que tiene lugar entre variantes genéticas pertenecientes a una misma población viral, garantizó que únicamente el mejor genotipo posible se

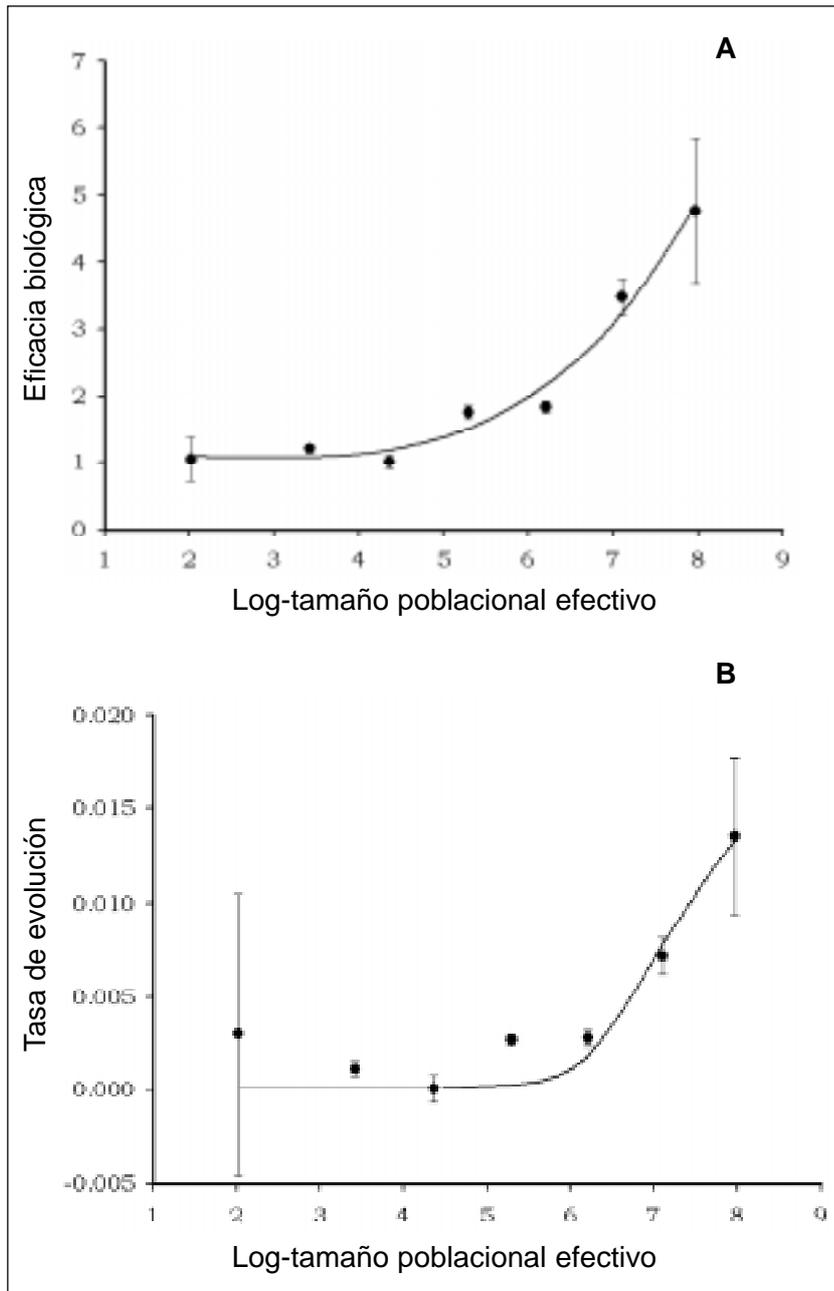


Figura 6. Efecto de la interferencia clonal en la evolución de VSV. El panel (A) muestra la relación entre el efecto beneficioso necesario para alcanzar la fijación y el logaritmo del tamaño poblacional efectivo. El panel (B) muestra la relación entre la tasa de adaptación y el logaritmo del tamaño poblacional efectivo. La curva corresponde con un modelo hiperbólico que se caracteriza por la existencia de un máximo para la tasa de evolución. (Datos de Miralles et al. 1999).

fijara. Más importante aún, la tasa de adaptación disminuyó al aumentar el tamaño poblacional como una consecuencia de la necesidad de tiempos más largos hasta que una mutación ganaba su competencia contra un número cada vez mayor de otras variantes genéticas, también beneficiosas, pero menos (Figura 6b).

Los datos de estos experimentos permitieron estimar la frecuencia con que las mutaciones beneficiosas se generan, así como el efecto beneficioso promedio de cualquiera de estas mutaciones (Miralles et al. 1999). Alrededor de una en cada 100 millones de mutaciones produci-

das puede ser considerada como beneficiosa. El efecto en la eficacia de un virus que porte alguna de las mutaciones beneficiosas producidas (aunque no necesariamente fijadas) se estima que es aproximadamente del 30%. Es interesante comparar estos números con los que Elena y Moya (1999) obtuvieron para las mutaciones deletéreas: casi todas las mutaciones producidas serán deletéreas con efectos pequeños sobre la eficacia biológica, pero las muy raramente producidas mutaciones beneficiosas, con el enorme efecto asociado a ellas, se aseguran su fijación en la población. Estas estimas de la tasa de mutación beneficiosa y del efecto medio asociado a una mutación beneficiosa han sido las primeras jamás obtenidas para este tipo de mutaciones, no solamente en virus, sino para cualquier organismo.

El modelo de la Interferencia Clonal permite inferir algunas conclusiones importantes para entender la evolución de los ribovirus:

El reemplazamiento de una variante viral mayoritaria por otra recientemente generada por mutación es un suceso discreto, independientemente del tamaño poblacional o de la tasa de mutación beneficiosa. No ocurre simplemente como consecuencia de un único evento mutacional, sino que representa al mejor de todos los posibles candidatos. Este hecho tiene trascendencia para entender las dinámicas de aparición de resistencias a antivirales.

Como la tasa de adaptación no está positivamente afectada por un aumento en la disponibilidad de mutaciones, es cuestionable si la elevada tasa de mutación que muestran los ribovirus ha evolucionado como consecuencia del potencial adaptativo que ésta pudiese conferir, como ha sido postula-

do por algunos autores. Más aún, una reducción en la tasa de mutación podría beneficiar a las poblaciones virales, al reducir la tasa con que se acumulan mutaciones deletéreas y así frenar el efecto del trinquete de Müller. Así pues, pensamos que es más creíble que esta tasa de mutación es una consecuencia de una necesidad impuesta por su modo parasítico de vida: mantener un genoma lo más reducido posible, fácil y rápidamente replicable, frente a la alternativa de un genoma complejo que codifique la maquinaria enzimática necesaria para detectar y corregir los errores producidos durante la replicación.

Una población viral residente en un determinado lugar estará protegida contra la invasión por una variante externa más beneficiosa simplemente por su ventaja numérica. Si la variante viral invasora se encuentra inicialmente en una muy baja frecuencia, es probable que alguna mutación beneficiosa aparezca en el genotipo más frecuente, mejorando su eficacia e interfiriendo con el invasor, con el potencial resultado final de la eliminación de éste.

Conclusiones

Adaptación por selección natural

Un problema con el que frecuentemente se enfrentan los biólogos evolutivos es la inherente dificultad para hacer inferencias a partir de la comparación de datos históricos. Es especialmente difícil cuantificar los efectos de los distintos procesos genético-poblacionales –selección natural, deriva, mutación, recombinación y migración– a partir de patrones de parecidos y diferencias fenotípicas o genotípicas. Incluso decidir qué características de un organismo son adaptaciones *per se* (en oposición a ser producto de la selección en algún otro carácter correlacionado, de la deriva, o derivados de algún carácter que actualmente carece de importancia) es un asunto controvertido (Harvey y Pagel 1991).

Todos los estudios experimentales que hemos repasado aquí inequívocamente demuestran no sólo el resultado, sino también los procesos genéticos de adaptación por selección natural. Más aún, en estos experimentos con virus, las dinámicas de cambio evolutivo dependen de las mutaciones que han aparecido a lo largo del experimento, en contraste con lo que ocurre en experimentos hechos con otros organismos modelo (p. ej. *Drosophila*), en los que se presume que la selección opera sobre la variación preexistente en la población original. Así pues, los ribovirus (y los microorganismos en general) proporcionan un sistema experimental muy conveniente para el estudio del origen y el destino de la variación genética y las novedades fenotípicas, las cuales son las determinantes del curso de la evolución en el mundo real.

Cambio ambiental y evolución adaptativa

Los experimentos que hemos repasado demuestran el papel del cambio ambiental en la aceleración del ritmo de la evolución adaptativa. Durante los experimentos de evolución a largo plazo (Novella et al. 1995b, Elena et al. 1998, Escarmís et al. 1999) en un ambiente definido, los virus se adaptaron mucho más rápidamente al principio de lo que lo hicieron al final. A diferencia de lo que ocurre con los experimentos de selección en organismos superiores, esta deceleración no puede ser atribuible a la eliminación de la variabilidad genética que estaba presente en la población original, ya que toda la variabilidad genética en los experimentos con ribovirus fue generada *de novo* por mutación, que es un proceso constante. En su

lugar, la rápida evolución inicial es una consecuencia de una intensa selección desencadenada al poner un virus en un ambiente arbitrario y esencialmente nuevo. La posterior deceleración implica que el virus ha alcanzado un conjunto de soluciones genéticas al problema impuesto por este nuevo ambiente y que resulta cada vez más difícil de mejorar.

Las dianas fenotípicas de la selección natural y las bases moleculares de la adaptación

Los virus de RNA ofrecen ciertas ventajas para el estudio de las dinámicas del cambio evolutivo, incluyendo su corto tiempo de generación y sus enormes tamaños poblacionales, la posibilidad de almacenar los genotipos derivados junto a sus ancestros indefinidamente y la enorme facilidad para manipular tanto su ambiente como su genoma. Es interesante, no obstante, señalar que el *modus operandi* en el estudio de la adaptación en experimentos con virus es casi el inverso del empleado por los biólogos evolutivos que hacen trabajo de campo. Por ejemplo, los investigadores que estudian los pinzones de Darwin en las islas Galápagos comienzan por la observación de la variabilidad de ciertos caracteres fenotípicos, como el tamaño y forma del pico. Para demostrar que estas diferencias fenotípicas tienen alguna importancia en la adaptación de los pinzones, los investigadores tienen que demostrar que: (1) estas diferencias tienen una base genética, y (2) que afectan de modo diferencial al éxito reproductor de los individuos. Si cualquiera de estos dos requisitos no se cumple, entonces la variación fenotípica observada no tiene importancia adaptativa. Por el contrario, es muy simple demostrar que una población viral se ha adaptado a un ambiente particular: basta con medir su eficacia en ese ambiente y comprobar que sus descendientes también son igualmente eficaces. Además, es muy sencillo caracterizar las bases moleculares de esta adaptación; es sólo cuestión de secuenciar el genoma completo del virus y compararlo con la secuencia de su antepasado.

La especificidad de la adaptación con respecto a las condiciones ambientales

Uno de los más notorios resultados de estos estudios es el alto grado de especificidad de la adaptación. VSV aumentó su eficacia replicativa a lo largo de cientos de generaciones de evolución en un determinado tipo celular o en presencia de un determinado agente antiviral. No obstante, esta ventaja desaparecía si el medio celular era cambiado (Novella et al. 1995a, Turner y Elena 2000) o el agente antiviral eliminado (Novella et al. 1996).

Esta especificidad claramente demuestra el potencial de las poblaciones virales para estudiar evolución al demostrar el valor de ser capaces de experimentalmente controlar y manipular factores ecológicos y genéticos relevantes. No hay razones de peso para suponer que en el mundo real las adaptaciones sean menos específicas que las observadas en estos experimentos. En el mundo real, no obstante, la infinidad de complejidades y cambios en

el contexto ecológico o genético hace difícil esclarecer la especificidad de la adaptación.

¿Cómo de reproducible es la adaptación viral? Paralelismo y divergencia entre réplicas experimentales

La evolución depende de una mezcla de fuerzas aleatorias y deterministas. Algunas veces, los biólogos evolutivos caemos en la trampa de pensar en estas fuerzas como en algo independiente, recurriendo a la deriva y la mutación para explicar la variación a nivel molecular mientras que invocamos a la selección natural para explicar las diferencias fenotípicas. Los incrementos en la eficacia de las poblaciones virales que hemos repasado aquí claramente indican el papel de la selección natural, pero estos cambios adaptativos dependían de la generación de nuevas variantes genéticas por mutación (y en evitar su pérdida por deriva cuando aparecieron). A pesar de la especificidad observada en la adaptación al ambiente impuesto, las réplicas de los experimentos (iniciadas a partir del mismo antecesor y mantenidas en condiciones idénticas) mostraron cierto grado de divergencia entre ellas que, aunque ciertamente no importantes en su ambiente inmediato, podrían tener profundas implicaciones si el ambiente cambiase. Por ejemplo, no todas las poblaciones adaptadas a células MDCK mostraban el mismo coste adaptativo en BHK (Turner y Elena 2000), mientras que algunas seguían replicando relativamente bien en BHK, otras mostraban un coste mucho mayor.

Así pues, la especificidad de la adaptación a un desafío ambiental puede alcanzarse a través de diversos cambios genéticos, que pueden tener diferentes consecuencias en su éxito ecológico y evolutivo futuro. Algunas poblaciones podrán, fortuitamente, estar preadaptadas a futuros desafíos, mientras que otras (igualmente adaptadas a las condiciones presentes) pueden haber sido condenadas a una futura extinción debido a las circunstancias genéticas, accidentales, responsables de su actual adaptación. Esta combinación de fuerzas aleatorias y deterministas es lo que da a la evolución su carácter caprichoso (la falta de correlación entre el éxito pasado y futuro) pero hasta cierto punto predecible (el ajuste de los organismos a su ambiente), lo que en conjunto provoca la singularidad de la historia evolutiva.

Agradecimientos

Los trabajos aquí presentados son el resultado de una larga cooperación con los doctores Andrés Moya, Esteban Domingo y John J. Holland, quienes me introdujeron en este apasionante tema y de quienes todo lo aprendí. Además, también quiero agradecer los buenos comentarios e inestimable ayuda de los doctores Rosario Miralles, Paul E. Turner, Isabel S. Novella, Philip J. Gerrish y Fernando González Candelas. Esta investigación está ahora siendo sufragada por los proyectos PM97-0060-C02-02 del MEC y FEDER 1FD1997-2328.

Bibliografía

- BURCH, C.L. y CHAO, L. 1999. Evolution by small steps and rugged landscapes in the RNA virus $\phi 6$. *Genetics* 151: 921-927.
- CHAO, L. 1990. Fitness of RNA virus decreased by Müller's ratchet. *Nature* 348: 454-455.
- CHAO, L. 1991. Levels of selection, evolution of sex in RNA viruses, and the origin of life. *J. Theor. Biol.* 153: 229-246.
- CLARKE, D.K., DUARTE, E.A., MOYA, A., ELENA, S.F., DOMINGO, E. y HOLLAND, J.J. 1995. The Red Queen reigns in the kingdom of RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4821-4824.
- DE LA PEÑA, M., ELENA, S.F. y MOYA, A. 2000. Effect of deleterious mutatio-accumulation on the fitness of RNA bacteriophage MS2. *Evolution* 54: 686-691.
- DE VISSER, J.A.G.M., HOEKSTRA, R.F. y VAN DEN ENDE, H. 1996. The effect of sex and deleterious mutations on fitness in *Chlamydomonas*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 263: 193-200.
- DE VISSER, J.A.G.M., HOEKSTRA, R.F. y VAN DEN ENDE, H. 1997. Test of interaction between genetic markers that affect fitness in *Aspergillus nidulans*. *Evolution* 51: 1499-1505.
- DE VISSER, J.A.G.M. y HOEKSTRA, R.F. 1998. Synergistic epistasis between loci affecting fitness: evidence in plants and fungi. *Genet. Res., Camb.* 71: 39-49.
- DRAKE, J.W. y HOLLAND, J.J. 1999. Mutation rates among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 13910-13913.
- DUARTE, E.A., CLARKE, D.K., MOYA, A., ELENA, S.F., DOMINGO, E. y HOLLAND, J.J. 1993. Many-trillionfold amplification of single RNA virus particle fails to overcome the Müller's ratchet effect. *J. Virol.* 67: 3620-3623.
- ELENA, S.F. 1999. Little evidence for synergism among deleterious mutations in a nonsegmented RNA virus. *J. Mol. Evol.* 49: 703-707.
- ELENA, S.F., DÁVILA, M., NOVELLA, I.S., HOLLAND, J.J., DOMINGO, E. y MOYA, A. 1998. Evolutionary dynamics of fitness recovery from the debilitating effects of Müller's ratchet. *Evolution* 52: 309-314.
- ELENA, S.F., GONZÁLEZ-CANDELAS, F., NOVELLA, I.S., DUARTE, E.A., CLARKE, D.K., DOMINGO, E., HOLLAND, J.J. y MOYA, A. 1996. Evolution of fitness in experimental populations of vesicular stomatitis virus. *Genetics* 142: 673-679.
- ELENA, S.F. y LENSKI, R.E. 1997. Test of synergistic interactions among deleterious mutations in bacteria. *Nature* 390: 395-398.
- ELENA, S.F. y MOYA, A. 1999. Rate of deleterious mutation and the distribution of its effects on fitness in vesicular stomatitis virus. *J. Evol. Biol.* 12: 1078-1088.
- EIGEN, M. y BIEBRICHER, C.K. 1988. Sequence space and quasispecies distribution. En E. Domingo, J.J. Holland y P. Ahlquist (ed.): *RNA Genetics III*. Pp. 211-245. CRC Press, Boca Raton.
- ESCARMÍS, C., DÁVILA, M., CHARPENTIER, N., BRACHO, M.A., MOYA, A. y DOMINGO, E. 1996. Genetic lesions associated with Müller's ratchet in an RNA virus. *J. Mol. Biol.* 264: 255-267.
- ESCARMÍS, C., DÁVILA, M. y DOMINGO, E. 1999. Multiple molecular pathways for fitness recovery of an RNA virus debilitated by operation of Müller's ratchet. *J. Mol. Biol.* 285: 495-505.
- GERRISH, P.J. y LENSKI, R.E. 1998. The fate of competing beneficial mutations in an asexual population. *Genetica* 102/103: 127-144.
- HAHN, C.S., LUSTING, S., STRAUSS, E.G. y STRAUSS, G.H. 1988. Western equine encephalitis virus is a recombinant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5997-6001.
- HARVEY, P.H. y PAGEL, M.D. 1991. *The comparative method in evolutionary biology*. Oxford University Press, Oxford.

- HOLLAND, J.J., DOMINGO, E., DE LA TORRE, J.C. y STEINHAUER, D.A. 1990. Mutation frequencies at defined single codon sites in vesicular stomatitis virus can be increased only slightly by chemical mutagenesis. *J. Virol.* 64: 3960-3962.
- HOLLAND, J.J., DE LA TORRE, J.C., STEINHAUER, D.A., CLARKE, D.K. y DUARTE, E.A. 1991. Quantitation of relative fitness and great adaptability of clonal populations of RNA viruses. *J. Virol.* 65: 2960-2967.
- LAI, M.M.C. 1992. Genetic recombination in RNA viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 176: 21-32.
- MAYNARD SMITH, J. 1978. *The evolution of sex.* Cambridge University Press, Cambridge.
- MIRALLES, R., GERRISH, P.J., MOYA, A. y ELENA, S.F. 1999. Clonal interference and the evolution of RNA viruses. *Science* 285: 1745-1747.
- MÜLLER, H.J. 1964. The relation of recombination to mutational advance. *Mut. Res.* 1: 2-9.
- NEE, S. 1989. On the evolution of sex in RNA viruses. *J. Theor. Biol.* 138: 407-412.
- NOVELLA, I.S., CLARKE, D.K., QUER, J., DUARTE, E.A., LEE, C.H., WEAVER, S.C., ELENA, S.F., MOYA, A., DOMINGO, E. y HOLLAND, J.J. 1995a. Extreme fitness differences in mammalian and insect hosts after continuous replication of vesicular stomatitis virus in sanfly cells. *J. Virol.* 69: 6805-6809.
- NOVELLA, I.S., DUARTE, E.A., ELENA, S.F., MOYA, A., DOMINGO, E. y HOLLAND, J.J. 1995b. Exponential fitness increases of RNA virus fitness during large population transmissions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5841-5844.
- NOVELLA, I.S., ELENA, S.F., MOYA, A., DOMINGO, E. y HOLLAND, J.J. 1995c. Size of genetic bottlenecks leading to virus fitness loss is determined by mean initial population fitness. *J. Virol.* 69: 2869-2872.
- NOVELLA, I.S., CILNIS, M., ELENA, S.F., KOHN, J., MOYA, A., DOMINGO, E. y HOLLAND, J.J. 1996. Large-population passages of vesicular stomatitis virus in interferon-treated cells select variants of only limited resistance. *J. Virol.* 70: 6414-6417.
- ROBERTSON, D.K., SHARP, P.M., MCCUTCHAN, F.E. y HAHN, B.H. 1995. Recombination in HIV-1. *Nature* 374: 124-126.
- SOUSA, R. 1996. Structural and mechanistic relationships between nucleic acid polymerases. *TIBS* 21: 186-190.
- STEINHAUER, D.A., DOMINGO, E. y HOLLAND, J.J. 1992. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene* 122: 281-288.
- TURNER, P.E. y ELENA, S.F. 2000. Cost of host radiation in an RNA virus. *Genetics* 156: 1465-1470.
- VAN VALEN, L. 1973. A new evolutionary law. *Evol. Theory* 1: 1-30.
- WEAVER, S.C., BRAULT, A.C., KANG, W. y HOLLAND, J.J. 1999. Genetic and fitness changes accompanying adaptation of an arbovirus to vertebrate and invertebrate cells. *J. Virol.* 73: 4316-4326.
- WIMMER, E., HELLEN, C.U.T. y CAO, X. 1993. Genetics of poliovirus. *Annu. Rev. Genet.* 27: 353-436.
- WRIGHT, S. 1988. Surfaces of selective value revisited. *Am. Nat.* 131: 115-123.
- YUSTE, E., SÁNCHEZ-PALOMINO, S., CASADO, C., DOMINGO, E. y LÓPEZ-GALÍNDEZ, C. 1999. Drastic fitness loss in human immunodeficiency virus type 1 upon serial bottleneck events. *J. Virol.* 73: 2745-2751.

Lecturas recomendadas

- (1) DOMINGO, E., WEBSTER, R. Y HOLLAND, J.J. 1999. *Origin and Evolution of Viruses.* Academic Press, London. Excelente libro en el que expertos en distintos grupos de virus repasan las ideas que sobre su evolución se tienen. A diferencia de otros libros con objetivos similares, este incluye unos primeros temas generales en los que se introducen conceptos teóricos básicos necesarios para entender mejor las observaciones que se ilustran en los capítulos posteriores.
- (2) EWALD, P.W. 1996. *Evolution of Infectious Diseases.* Oxford University Press, Oxford. El autor propone dar un enfoque evolutivo al control de las enfermedades infecciosas en el que los virus no sean simplemente considerados como agentes patógenos sino también como especies que luchan por sobrevivir. El autor sugiere que, en lugar de intentar simplemente detener las epidemias, los científicos deberían entender como conducir la evolución de estos microorganismos hacia formas más benignas. Este es un libro interesante para profesionales y estudiantes de ciencias de la salud, epidemiología y biología evolutiva, pero también, por lo claro de su exposición, para el lector general.
- (3) MORSE, S.S. 1996. *Emerging Viruses.* Oxford University Press, Oxford. En este libro se presentan los condicionantes ecológicos y genéticos que justifican porqué estamos asistiendo a la aparición de nuevos, y cada vez más virulentos, virus. Al final del libro se pretenden dar una serie de recomendaciones, basadas en criterios argüidos por un biólogo evolucionista, a seguir por las autoridades para contener la aparición de estos patógenos.
- (4) NOWAK, M.A. y MAY, R.M. 2000. *Virus Dynamics.* Oxford University Press, Oxford. Texto destinado a aquellos lectores especialmente interesados en el desarrollo de modelos matemáticos para describir las dinámicas poblacionales de los virus. También se presentan modelos de la interacción de virus con el sistema inmunitario del hospedador. En algunos momentos recurre a un formalismo matemático demasiado complejo que llega a oscurecer las ideas biológicas, generalmente básicas, subyacentes pero, la mayor parte del tiempo, es perfectamente accesible para lectores con conocimientos básicos de cálculo diferencial y álgebra matricial.