

Una aproximación experimental a la evolución viral: desentrañando los papeles de la mutación, la selección y el azar

Santiago F. Elena. *Profesor de Investigación. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Politécnica de Valencia.*

Los virus, y en particular aquellos que poseen al ARN (ácido ribonucleico) como material genético, son los parásitos más abundantes que infectan a animales, plantas y bacterias. A pesar de la tremenda inversión económica realizada por los distintos gobiernos y organismos supranacionales, el número de virus que han sido erradicados es muy limitado y, lo que es más preocupante, las perspectivas de nuevas erradicaciones en el futuro son menores que las de que aparezcan nuevos virus o nuevas variantes de virus ya conocidos. El hecho de que haya pocos virus que se puedan controlar de una manera eficiente con los fármacos más modernos, así como la constante aparición (o reaparición) de nuevos virus son consecuencia de dos factores: (1) la plasticidad evolutiva intrínseca a los genomas de ARN y (2) la irrupción y la alteración que el hombre hace en los ecosistemas en los que naturalmente viven los virus.

El interés por estudiar la evolución de los virus de ARN no está únicamente motivado por la necesidad de desarrollar nuevas y más racionales estrategias antivirales sino que, en manos de los biólogos evolucionistas, los virus de ARN son unas excelentes herramientas para abordar cuestiones básicas sobre los mecanismos de adaptación y diversificación que operan sobre todos los organismos vivos. Tres son las razones que hacen de los virus un sistema modelo excelente para el estudio de la evolución: en primer lugar su pequeño tamaño y simplicidad estructural que permiten atender al análisis de los cambios en su genoma que son responsables del proceso evolutivo; en segundo lugar, la gran velocidad con que se reproducen y los tremendos tamaños que sus poblaciones alcanzan durante la infección

de un huésped. Por último, el hecho de que las enzimas encargadas de replicar sus genomas carecen de los mecanismos necesarios para corregir las mutaciones que se generan durante la síntesis de la progenie. Se ha estimado que, generalizando, la tasa de mutación de un virus de ARN es tal que cada nuevo genoma producido será portador de una mutación. La combinación de una replicación rápida y alta tasa de mutación hace que, en cualquier momento, una población viral contenga una enorme cantidad de variantes genéticas, lo que subyace a la enorme plasticidad evolutiva antes mencionada.

Dinámicas adaptativas: el papel de la selección natural

Los biólogos evolucionistas emplean la metáfora de los paisajes adaptativos, originalmente propuesta por Sewall Wright en los años 30 del pasado siglo (Wright, 1932), para visualizar el proceso por el que un organismo se adapta a su entorno. En el paisaje adaptativo ilustrado en el panel central de la Figura 1, cada punto en la superficie se corresponde con un genotipo distinto y la altura del punto sobre el plano es el nivel de adaptación alcanzado por el organismo, lo que se conoce como su eficacia biológica¹. Las poblaciones de organismos se mueven en este paisaje mediante cambios en su genoma (mutaciones). Aquellos organismos que se encuentren más altos en el paisaje y, por tanto sean más eficaces, dejarán más descendientes y así aumentarán su frecuencia en la población. Este es el proceso conocido como selección direccional que garantiza que, en ausencia de otros factores, las poblaciones siempre se moverán cuesta arriba en el paisaje hasta alcanzar la cima de un pico adaptativo. Una vez en la cima, cualquier nueva mutación solo podrá mover al individuo que la porte cuesta abajo, lo que implica que tendrá una menor eficacia que sus congéneres y, por consiguiente, no perdurará en la población. A esta forma de selección se le llama purificadora.

Las mutaciones favorecidas por la selección direccional se denominan beneficiosas. Por el contrario, las mutaciones que elimina la selección

¹ La eficacia biológica es una medida relativa que representa cuantos descendientes deja un organismo en un ambiente dado respecto a cuantos deja otro organismo elegido como referente o respecto al número medio de descendientes dejados por todos los individuos de la población.

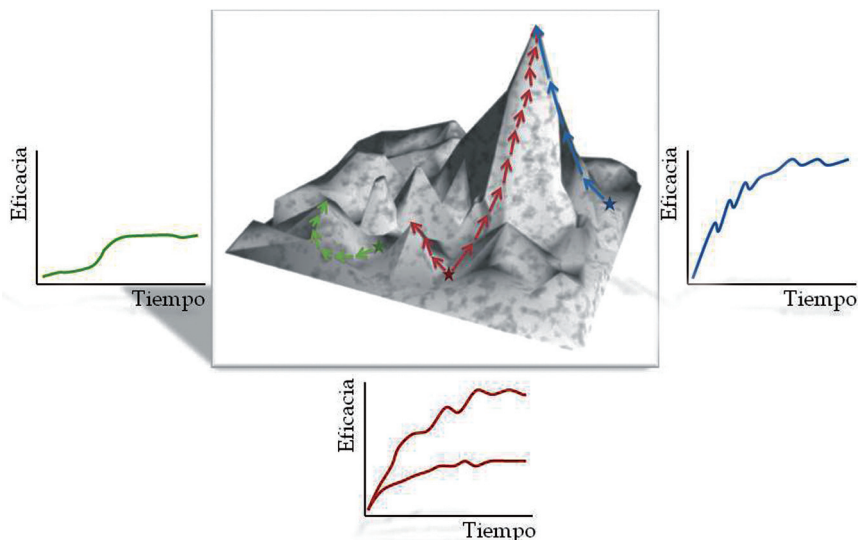


Figura 1. El panel central ilustra el concepto de **paisaje adaptativo**. En este caso, con distintos picos adaptativos. Las gráficas representan la trayectoria evolutiva seguida por poblaciones que se localizan en distintos puntos iniciales del paisaje.

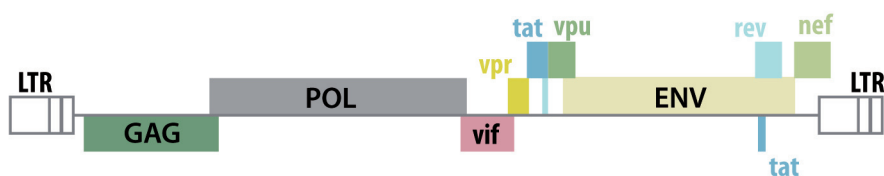
purificadora se conocen como deletéreas. Existen otro tipo de mutaciones, conocidas como neutrales, que no tienen efecto alguno sobre la eficacia y que, por consiguiente, no se ven afectadas por la selección. ¿Qué tipo de mutación es más frecuente? Es fácil responder intuitivamente a esta pregunta mediante un símil: si metemos la mano en un ordenador y cambiamos de sitio una pieza de la placa base, ¿qué es más probable, que el ordenador funcione mejor o que comience a dar problemas o incluso que deje de funcionar? Lo segundo. Los organismos los podemos ver como máquinas más o menos optimizadas para funcionar en su ambiente. Si una mutación les cambia algo, lo más probable es que solo haga que funcionen peor, en algunos casos el cambio no hará nada y en muy pocos casos servirá para que el organismo mejore su función. Incluso si un organismo no está perfectamente adaptado a su ambiente y puedan existir todavía mutaciones beneficiosas, la mayoría de las mutaciones serán deletéreas. Esta intuición se ha visto confirmada experimentalmente en el caso de varios virus. La fracción de mutaciones beneficiosas disminuirá a medida que el grado de adaptación al ambiente aumente. La selección amplificará rápidamente las pocas mutaciones beneficiosas que se generen y eliminará las deletéreas más abundantes.

Una primera observación muy común en experimentos de evolución con virus es que tras ser inoculados en un nuevo tipo de huésped, éstos no se adaptan de una manera continua e ilimitada. Por el contrario, tras un breve período de rápida adaptación, la velocidad con que la eficiencia en el nuevo ambiente cambia se reduce (gráficas de eficacia en la Figura 1). Este tipo de dinámica bifásica confirma la validez del concepto de paisaje adaptativo: la primera fase de rápida evolución corresponde con el proceso de escalar las pendientes de los picos adaptativos. La segunda fase de equilibrio corresponde con el tiempo que la población viral pasa en el alto de un pico adaptativo. Una segunda observación también muy común es que si se repite el experimento, aunque las trayectorias siempre presenten una forma bifásica similar, el nivel máximo de adaptación que se alcanza en cada caso no tiene porque ser el mismo. Esta divergencia evolutiva también se explica fácilmente con la metáfora de los paisajes adaptativos. Tal y como se ejemplifica con la trayectoria roja de la Figura 1, la mutación, que es un proceso completamente aleatorio, puede mover a la población inicial en una dirección que le aleje del pico más alto y le acerque a otro más pequeño. Esta primera decisión, aleatoria, determina que una población quede atrapada en un pico de menor altura y explica la divergencia entre réplicas de un experimento de evolución. La Figura 1 representa un paisaje particularmente rugoso, con muchos picos, pero si los paisajes adaptativos reales en los que se mueven las poblaciones virales son muy rugosos o, por el contrario, más suaves, es un campo muy activo de investigación.

Las bases moleculares de la adaptación: constricciones evolutivas

Uno de los objetivos fundamentales de la moderna biología evolutiva es comprender las bases moleculares del proceso adaptativo. Este objetivo es relativamente simple de conseguir con los virus de ARN ya que podemos caracterizar completamente la secuencia de nucleótidos que constituye su genoma así como integrar esta información con los conocimientos que se tienen de cómo las distintas proteínas virales interactúan entre ellas o con factores de las células en las que el virus replica. Tras evolucionar experimentalmente un virus en un nuevo huésped y comprobar que su eficacia en ese huésped ha aumentado significativamente, el

Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1



Virus del grabado del tabaco



Figura 2. **Dos ejemplos de genoma viral con genes solapantes o proteínas multifuncionales.** En el panel superior el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 y en el panel inferior el virus del grabado del tabaco.

siguiente paso es identificar qué cambios han ocurrido en el genoma del virus. Uno de los resultados más interesantes que se han observado con este tipo de estudios es el enorme grado de determinismo genético existente. En otras palabras, con mucha frecuencia, son las mismas mutaciones las que aparecen en distintas réplicas del experimento de evolución. Este paralelismo evolutivo también ha sido observado, por ejemplo, al caracterizar las poblaciones del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (HIV-1) presentes en distintos pacientes tratados con un mismo fármaco antiviral, donde no solamente aparecen las mismas mutaciones una y otra vez sino que, cuando se trata de más de una, lo hacen siempre en el mismo orden. Estas observaciones pueden ser interpretadas como consecuencia de la existencia de un número limitado de posibles caminos viables en el paisaje adaptativo o por la existencia de un único o de muy pocos picos adaptativos.

¿Qué limita el número de posibles caminos en el paisaje adaptativo? La respuesta más inmediata a esta pregunta la encontramos en el genoma tan compacto que caracteriza a los virus de ARN, codificando para muy pocas proteínas que, en muchos casos, realizan múltiples funciones o con regiones genómicas que codifican para más de una proteína. Como se ilustra en el panel superior de la Figura 2 para el HIV-1, las distintas

proteínas solapan en la secuencia de nucleótidos que las codifican. Así, por ejemplo las proteínas Tat y Rev se encuentran codificadas por la misma secuencia que la proteína Env. Esto significa que cualquier mutación que ocurra en la secuencia compartida afectaría a la vez a dos funciones del virus y si bien el efecto de dicha mutación podría ser beneficioso para una de las funciones, podría ser perjudicial para la otra, lo que resultaría en un virus con una eficacia biológica comprometida. El panel inferior de la Figura 2 muestra otro ejemplo, en este caso el del virus causante del grabado del tabaco (TEV). En este caso, no existen regiones solapantes como las descritas para el HIV-1, pero cada una de las proteínas sí realiza múltiples funciones. Así, por ejemplo la proteína HC-Pro es a la vez la encargada de mediar la transmisión entre plantas por el insecto vector, la responsable de suprimir ciertas defensas de la planta, está implicada en el procesamiento de otras proteínas virales y en el proceso de replicación del genoma viral. Este fenómeno hace que una misma mutación afecte a la vez a cada una de las funciones, y si bien podría mejorar una, el resto podrían estar afectadas negativamente, de nuevo produciendo un virus con una eficacia reducida².

Compromisos adaptativos y emergencia viral

Las constricciones funcionales arriba descritas son especialmente relevantes para entender el fenómeno de la emergencia viral. La emergencia de un nuevo patógeno viral implica que un virus adaptado a su huésped natural coloniza un nuevo huésped. Habitualmente la eficacia del virus en el nuevo huésped no será tan alta como en el original ya que la selección natural no ha tenido todavía oportunidad de optimizar al nuevo virus. Teniendo en la mente las consideraciones hechas en los apartados anteriores, la eficacia viral en el nuevo huésped comenzará a aumentar hasta alcanzar un nuevo estadio de equilibrio, pero lo hará a costa de acumular cambios que le resulten beneficiosos en este huésped que pueden ser, o no, perjudiciales en el huésped original. Si los cambios afectan negativamente a la eficacia del virus en el huésped original, esto es, existe un compromiso adaptativo, entonces diremos que el nuevo virus

² Este fenómeno es lo que se conoce en genética como pleiotropismo.

se ha especializado en su nuevo huésped. Si por el contrario los cambios no afectan negativamente a su eficacia en el huésped entonces diremos que ha evolucionado un virus generalista. La Figura 3 ilustra el concepto de compromiso adaptativo y cuáles deben ser los valores relativos de la eficacia biológica de virus especialistas y generalistas en cada huésped alternativo.

Son muchos los estudios que han confirmado experimentalmente la generalidad de la hipótesis del compromiso adaptativo en múltiples virus de ARN que infectan tanto a bacterias como a plantas y animales (Elena, *et al.* 2009). En todos estos experimentos un virus es obligado a evolucionar en un nuevo huésped. Tras cientos de generaciones de adaptación, la eficacia de los virus resultantes se mide en el nuevo huésped y se comprueba

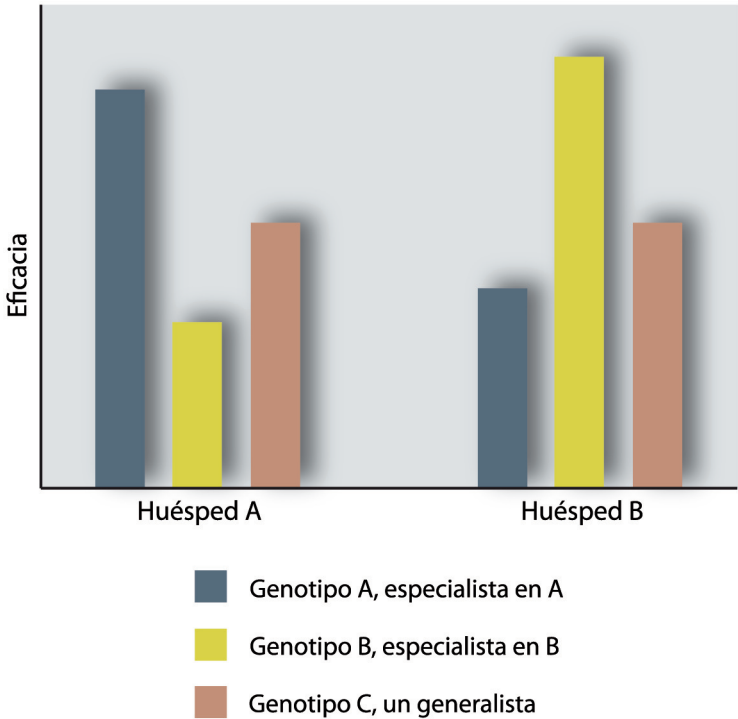


Figura 3. **Compromisos adaptativos.** La eficacia biológica de un virus especialista es alta en su huésped natural pero baja en cualquier otro, mientras que la eficacia de un virus generalista es aproximadamente la misma en cualquier huésped. Si existe un compromiso adaptativo, la eficacia del generalista siempre será menor que la de un especialista en su huésped.

que es superior a la del virus ancestral. En paralelo, se mide la eficacia del virus evolucionado en el huésped ancestral y se comprueba que siempre es menor que la que mostraba el virus original. No obstante, este tipo de experimentos difieren de una situación real en un punto fundamental: en un proceso real debe existir un flujo continuo entre el nuevo huésped y el que actúa como reservorio. El efecto que esta fluctuación entre huéspedes tiene sobre la adaptación viral también ha sido estudiado experimentalmente en unos pocos casos, comprobándose que esta fluctuación genera las condiciones para que desaparezca el compromiso mostrado en la Figura 3 y evolucionen virus generalistas.

Cuando la selección natural no es la principal fuerza evolutiva: el proceso de contaminación genética

Hasta ahora hemos hablado sobre dinámicas evolutivas en las que la selección natural es la fuerza dominante que hace que la eficacia de un virus aumente. A continuación describiré otro tipo de dinámicas evolutivas en las que la selección deja de ser relevante y es el azar, asociado con colapsos demográficos, el que rige el destino de las poblaciones virales.

Un concepto fundamental en genética evolutiva es el de deriva genética. Se trata de un proceso por el cual un genotipo es transmitido a la siguiente generación independientemente de su eficacia biológica y únicamente como consecuencia de un proceso de muestreo aleatorio. Por ejemplo, en una población formada por distintos genotipos, si se elige únicamente uno al azar para producir progenie en la siguiente generación existe una probabilidad no despreciable de que el individuo elegido no sea el más eficaz de la población. En el caso de los virus de ARN y dadas sus elevadísimas tasas de mutación (recordemos que la mayoría de nuevos genomas sintetizados son portadores de al menos una nueva mutación) si al azar se toma un único genoma la probabilidad de que este lleve una mutación es considerable. Como la mayoría de las mutaciones son deletéreas, entonces cabría esperar que la eficacia biológica de la progenie fuese inferior a la de sus progenitores. Si este proceso de muestreo aleatorio y mutación continuase con el tiempo, los genotipos libres de mutaciones serían cada vez más infrecuentes, llegando a ser reemplazados por genotipos portadores de un número cada vez mayor de mutaciones. A este proceso de

reemplazamiento de unos genotipos por otros cada vez más mutados se le conoce como trinquete de Müller, en honor del genetista americano y premio Nobel Hermann J. Müller, quien describió el proceso en la década de los 60 del siglo pasado en el contexto de su trabajo sobre la ventaja evolutiva de la reproducción sexual. Un trinquete es una rueda dentada que solamente puede girar en una dirección porque existe una cuña que se apoya en los dientes e impide que gire hacia atrás. Usando la metáfora, cada vez que la rueda gira un diente se pierde la clase de genotipos menos mutados.

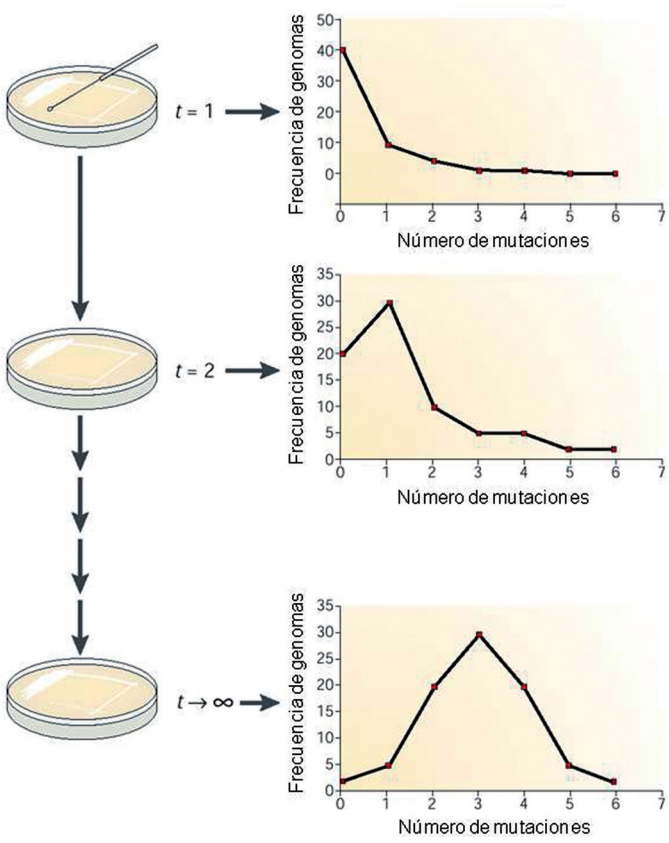


Figura 4. **La combinación de una alta tasa de mutación con una fuerte deriva genética pone en funcionamiento el trinquete de Müller.** Tras cada paso por un cuello de botella se pierden los genotipos menos mutados, lo que hace que el número promedio de mutaciones por genoma aumente y, por consiguiente, la eficacia de la población se reduzca.

¿Hay evidencia de que el trinquete actúe en poblaciones virales? Sí. A partir de los trabajos pioneros de Lin Chao a principios de los años 90 del siglo pasado en los que demostró, con un diseño experimental como el mostrado en la Figura 4, que cuando poblaciones del bacteriófago (virus que infecta bacterias) $\Phi 6$ eran forzadas a regenerarse a partir de un único individuo elegido al azar tras cada generación, la eficacia biológica del virus iba perdiéndose de manera continua, resultando, tras unos pocos de estos pases, en pérdidas que variaban entre el 20% y el 90%. Estos resultados pioneros se generalizaron pronto a otros bacteriófagos (MS2), a virus animales (virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus de la fiebre aftosa (FMDV) y HIV-1, y recientemente también a virus de plantas (TEV). Cuando se caracterizaron los genomas de los virus resultantes (por ejemplo en el caso del FMDV) se encontraron mutaciones no antes descritas en aislados naturales (lo que habla sobre su inviabilidad) y en números más grandes que las vistas en experimentos control en los que el trinquete no debía funcionar. Así pues, se cierra el círculo: el trinquete se encarga de aumentar la carga mutacional en los genomas virales y estas mutaciones hacen que sus portadores sean menos eficaces.

Los cuellos de botella son parte consustancial de las dinámicas demográficas de los virus. Así, por ejemplo, los virus transmitidos por el aire en pequeñas gotas de saliva al estornudar (como el virus de la gripe), han de colonizar un nuevo huésped a partir de muy pocas partículas virales. En el caso de virus transmitidos por insectos vectores, como el de la fiebre amarilla (YFV) o los de las encefalitis de San Luis (StLEV) y del oeste del Nilo (WNEV), el número de partículas virales inyectadas por el mosquito son también mínimas. Algo similar ocurre con los virus de plantas transmitidos por pulgones (como TEV o el virus del mosaico del pepino (CMV), donde cada insecto es capaz de transmitir muy pocas unidades virales. Dentro de un huésped infectado los cuellos de botella también pueden ser frecuentes. Por ejemplo, el virus de la polio, que se transmite fecal-oralmente, ha de llegar al sistema nervioso para reproducirse, pero la barrera hemato-encefálica limita el número de partículas virales capaces de alcanzar su destino. En el caso de virus de plantas, se ha comprobado que muy pocas partículas son capaces de migrar de una hoja infectada a otras partes alejadas de la planta. Así pues, estos cuellos de botella generan las condiciones necesarias para poner en marcha el trinquete de Müller. Pero paradójicamente, el resultado de una infección natural no parece ser que

el virus disminuya su eficacia tras cada evento de transmisión. ¿Por qué? ¿Qué hay de diferente entre los experimentos de laboratorio descritos en el anterior párrafo y las transmisiones naturales? Muchas cosas, pero fundamentalmente es el número de generaciones virales que tienen lugar entre dos cuellos de botella consecutivos. En los trabajos experimentales éste es un número muy reducido (entre unidades y algunas pocas decenas), mientras que en un proceso de infección real pueden ocurrir cientos de generaciones, sino miles. Durante este enorme lapso de tiempo (en la escala temporal que importa a un virus) se generarán múltiples mutaciones beneficiosas que compensarán el posible efecto de las deletéreas que se hubiesen podido quedar fijadas tras el proceso de transmisión.

Conclusiones

Hemos visto que el proceso fundamental de la mutación, el cambio en los genomas virales, es la clave fundamental para entender cómo los virus evolucionan y se adaptan a todas las circunstancias y desafíos que les plantea el siempre fluctuante mundo en el que se ven forzados a vivir. Estas fluctuaciones pueden estar causadas por el salto a un nuevo huésped, por la presión del sistema inmunitario u otros mecanismos de defensa de los huéspedes, o por la presencia de fármacos antivirales. Cuando la mutación se combina con el efecto de la selección natural, entonces las poblaciones virales aumentan su eficacia biológica y se adaptan a la situación. El proceso de adaptación no es ilimitado, existiendo constricciones que lo limitan. También hemos visto que cuando la selección natural es reemplazada por el azar, las poblaciones virales pueden llegar a perder su eficacia biológica.

Estos temas no son, ni de lejos, los únicos en los que se está trabajando y en este capítulo sólo he pretendido llamar la atención sobre procesos básicos en virología evolutiva con la esperanza de que el tema pueda haber despertado la curiosidad del lector y éste pueda dirigirse hacia lecturas más profundas (Elena, *et al.* 2007). En estas lecturas podrá encontrar el camino hacia otros temas apasionantes tales como la evolución de la virulencia, la evolución de mecanismos para minimizar el efecto de las mutaciones, la evolución de la tasa de mutación, sobre extinción viral y hasta sobre la sociología y el comportamiento viral entre otros.

PARA SABER MÁS

Domingo, E., Parrish, C.R., Holland, J.J. (2008) *Origin and evolution of viruses*. Academic Press, Reino Unido.

Elena, S.F. y Sanjuán, R. (2007) Virus evolution: insights from an experimental approach. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **38**: 27-52.

Elena, S.F., Agudelo-Romero, P. y Lalic, J. (2009) The evolution of viruses in multi-host fitness landscapes. *Open Virol. J.* **3**: 1-6.

Holmes, E.C. (2009) *The evolution and emergence of RNA viruses*. Oxford Series in Ecology and Evolution. Oxford University Press, Reino Unido.

Wright, S. (1932) The roles of mutation, inbreeding, crossbreeding and selection in evolution. *Proc. 6th Int. Cong. Genet.* **1**: 356-366.