REAL ACADEMIA DE CIENCIAS
EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

IMPLICACIONES TEÓRICAS Y MÉDICAS DE LA VARIABILIDAD VÍRICA

DISCURSO LEÍDO EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN
COMO ACADÉMICO DE NÚMERO POR EL

EXCMO. SR. D. ESTEBAN DOMINGO SOLANS

Y CONTESTACIÓN DE LA

EXCMA. SRA. DÑA. MARGARITA SALAS FALGUERAS

EL DÍA 27 DE FEBRERO DE 2013

MADRID
Domicilio de la Academia
Valverde, 22

ISSN: 0214-9540
I.S.B.N.: 978-84-87125-55-3
Depósito legal: M. 2.707-2013

Imprime:
Realigraf, S. A.
Pedro Tezano, 26. 28039 Madrid

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS 9

Introducción general 10

Una perspectiva histórica sobre la variabilidad genética de los virus ARN 11

Implicaciones biológicas de la dinámica de cuasiespecies de los virus ARN 21

Movimientos en el espacio de secuencia como mecanismo de evolución 22

Interacciones dentro de un espectro de mutantes: complementación, interferencia, memoria y comportamiento determinista. Cuasiespecies como unidad de selección 25

Nuevas estrategias antivirales: mutagénesis letal y terapias secuenciales 28

REFERENCIAS 35

CONTESTACIÓN por la Excma. Sra. Dª. Margarita Salas Falgueras 41

DISCURSO
DEL
Excmo. Sr. D. Esteban Domingo Solans

Excmo. Sr. Presidente,

Excmos. Señores Académicos,

Señoras y Señores,

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a los miembros de esta Real Academia por el honor que me han dispensado nombrándome miembro de la misma y muy en particular a los Académicos D. Jesús Ávila, D. Pedro García Barreno y Dña. Margarita Salas por presentar mi candidatura. A Eladio Viñuela y Margarita Salas siempre les agradeceré que nos aceptaran a Cristina Escarmís y a mí para formar parte del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, una de las instituciones clave en el desarrollo de la Biomedicina española. También quiero agradecer a los Académicos D. Antonio García Bellido y D. Carlos López Otín su apoyo en distintas etapas de mi carrera profesional y a D. Luís Franco, Presidente de la Sección de Ciencias Naturales, su cálida acogida en esta casa y su introducción a la organización y a las distintas actividades de la Academia. Es para mí un honor muy especial ser Académico poseedor de la medalla número 2, sucediendo a nueve ilustrísimos científicos, desde el Excmo. Sr. D. Pascual Asensio, Académico Fundador, hasta el Excmo. Sr. D. Enrique Sánchez-Monge y Parellada, gran personalidad de la Genética en España.

Expreso también mi reconocimiento a varios maestros que guiaron mi carrera científica desde mis inicios en el campo de la Química en Barcelona hasta las últimas etapas de estudios sobre evolución de virus, algunos de cuyos nombres aparecerán en mi presentación.

La investigación científica se realiza en equipo y mediante colaboración entre grupos que aportan conocimientos complementarios. Son unas setenta las personas que han trabajado en nuestro laboratorio durante sus treinta y cinco años de existencia. Un sentido agradecimiento a todos aquellos que

con su trabajo intenso y continuado han permitido avanzar en el desarrollo de nuestro plan de investigación sobre diversidad viral. En este apartado debo también mencionar varias de las instituciones españolas y extranjeras con las que hemos mantenido (o mantenemos) colaboraciones: Universidad de California, San Diego, Instituto de Biología Molecular de Barcelona, Universidad de Barcelona, Instituto de Química Médica, Instituto de Salud Carlos III, Centro de Astrobiología, Universidad Complutense de Madrid, Hospital Germans Trias i Pujol, Hospital Vall d'Hebron, Instituto de Biomedicina de Sevilla, CIBER de enfermedades hepáticas y digestivas, Laboratorios Sobrino, S.A. (hoy Pfizer Olot), CISA-INIA en Valdeolmos, INTA Castelar en Buenos Aires, Panaftosa en Río de Janeiro, Instituto Cavanilles de la Universidad de Valencia, Instituto de Salud Animal de Pirbright, Universidad de Oxford, Instituto Max Planck de Bioquímica-Física de Göttingen, Scripps Research Institute de la Jolla, Instituto Pasteur de París y la Universidad de Rockefelller de Nueva York. A lo largo de mi presentación mencionaré algunos nombres y colaboraciones concretas.

También quiero agradecer a mi familia (ahora ya con varios nietos) su paciencia, comprensión y apoyo ante largas jornadas de trabajo y frecuentes ausencias. Este agradecimiento es muy especial para la Dra. Cristina Escarmís, por su condición de esposa y colaboradora en tareas de investigación. No puedo dejar de destacar en esta Academia que Cristina fue quien trabajando con Margarita Salas, introdujo la técnica de secuenciación de nucleótidos en España en el inicio de los años 1980. Esta metodología resultó fundamental para el desarrollo de la biología molecular en España y muy particularmente para nuestro grupo de trabajo, como resumo a continuación.

Introducción general

Esta memoria explica cómo se fraguó el concepto de que los virus que poseen ARN como material genético mutan continuamente, de modo que sus poblaciones constituyen nubes de mutantes altamente dinámicas, de composición cambiante, y con un notable grado de indeterminación en cuanto a su comportamiento biológico. Los estudios que permitieron llegar a esta conclusión abarcan disciplinas tan dispares como la biofísica teórica, la biología molecular, la genética de poblaciones, la bioquímica y, evidentemente, la virología. Para reconstruir los orígenes de lo que actualmente se conoce como dinámica de cuasiespecies de los virus ARN y sus implicaciones biológicas, me ha parecido conveniente dividir este relato en cuatro apartados: esta breve introducción general, una perspectiva histórica de la variabilidad

genética de los virus ARN, implicaciones biológicas y, finalmente, posibles desarrollos futuros, con énfasis en el gran desafío que representan la prevención y el tratamiento de enfermedades asociadas a virus altamente variables.

Entender el origen y el mantenimiento de la diversidad biológica en nuestra biosfera es un problema central que interesa tanto a los científicos experimentales como a los teóricos. La diversidad caracteriza tanto a organismos diferenciados como unicelulares y a sus parásitos, entre ellos los virus. Las propiedades que definen a los virus como entidades biológicas son (i) disponer de un programa genético propio codificado en ácido desoxirribonucleico (ADN) o en ácido ribonucleico (ARN) y (ii) depender completamente de la célula para la expresión de su programa genético. A pesar de que vivimos en un mundo celular basado en ADN como molécula codificante de información genética, los virus más abundantes identificados en la biosfera actual son los virus con ARN, e incluyen patógenos tan importantes como son el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1), los virus de las hepatitis A, C y E, virus de la gripe, virus de la glosopeda o fiebre aftosa animal y varios virus hemorrágicos asociados a enfermedades emergentes en la población humana, entre otros muchos. Son precisamente los virus con ARN los que manifiestan el mayor grado de heterogeneidad genética, un rasgo que determina su adaptabilidad y que ha constituido mi principal interés en ciencia. Resultan particularmente atractivas las conexiones que la rápida generación de heterogeneidad en virus tiene con cuestiones tan aparentemente alejadas como son el origen de la vida o la práctica clínica para el control de las enfermedades infecciosas. Para comprender la relevancia teórica y aplicada de la variabilidad vírica, así como la ruptura que significó respecto a los conceptos dominantes en la genética del siglo XX, debemos examinar el contexto científico en el que se realizaron los primeros experimentos que permitieron calcular una tasa de error para un virus ARN y que desvelaron su complejidad a nivel poblacional.

Una perspectiva histórica sobre la variabilidad genética de los virus ARN

Durante la primera mitad del siglo XX no se tenía la percepción que tenemos actualmente de que vivimos en un Universo en constante evolución, tanto desde el punto de vista físico como biológico. Las escuelas más influyentes en la genética de comienzos del siglo XX consideraban importante la diversidad biológica como fuente de adaptabilidad, pero defendían que la di-

versidad se había generado en tiempos pretéritos y con gran lentitud. La diversidad actual se veía como el resultado de la distribución aleatoria de cromosomas cuyos mensajes genéticos se habían forjado como consecuencia de una larga historia evolutiva, pero que en la actualidad eran fundamentalmente constantes.

La mutación se consideraba excepcional y detrimental. Sirvan como ejemplo algunas frases del gran genético de poblaciones Sewall Wright, quien en 1932 escribió: "La enorme importancia de la reproducción biparental como un factor en evolución fue desvelado hace muchos años por East. Las propiedades observadas de las mutaciones –fortuitas en su origen, de frecuencia escasa y deletéreas cuando no negligibles en su efecto– parecen tan desfavorables como pueda imaginarse para un proceso evolutivo. En cambio, bajo reproducción biparental, un número limitado de mutaciones que no son demasiado dañinas para ser portadas por la especie, suministran un campo casi infinito de posibles variaciones a través de las cuales las especies pueden abrirse camino bajo la selección natural" (Wright, 1932). En este párrafo, extraído de una comunicación presentada en el VI Congreso Internacional de Genética celebrado en Ithaca, Nueva York en el año 1932, Wright se refiere al genético de plantas norteamericano Edward Murray East quien contribuyó al desarrollo del maíz híbrido y al concepto de vigor de estirpes híbridas frente a las consanguíneas. Wright sigue diciendo: "Debe haber mutación génica, pero una tasa excesiva produce un conjunto de monstruos, no evolución".

A mediados del siglo XX se hicieron dos descubrimientos, uno trascendental y otro que me permito calificar de sutilmente rupturista. El más importante y de grandísimo impacto en la ciencia actual fue la descripción de la estructura en doble hélice del ADN por James Watson y Francis Crick. Tras décadas de debate sobre el tipo de molécula en la que residía el material genético, primero los experimentos de transformación de *Pneumococcus pneumoniae* por Oswald Avery y colaboradores y después la estructura en doble hélice, permitieron reconocer al ADN como molécula depositaria de información heredable (Watson and Crick, 1953). El modelo sugería no solamente un mecanismo de replicación sino también que errores en la copia del ADN molde podían originar mutaciones, algo que fue confirmado amplísimamente durante las décadas que siguieron al gran descubrimiento.

En unas circunstancias en las que la posible incidencia de mutaciones en la evolución reciente era cuestionada y muchos agentes mutagénicos y sus efectos desconocidos, llega el segundo descubrimiento al que me he referido

como sutilmente rupturista. Se trata de la primera descripción de los polimorfismos genéticos, la presencia de dos o más formas distintas de un mismo gen, por Richard Lewontin y Jack Hubby en *Drosophila* y por Harry Harris en el hombre, en trabajos publicados el año 1966 [revisados en (Lewontin, 1974)]. Que la existencia de múltiples formas de un gen impactara la genética poblacional de la época revela hasta qué punto estaba enraizada la noción de que un gen se definía por una secuencia precisa de nucleótidos.

En aquel período, el mundo microbiano y principalmente el de los virus, era prácticamente ignorado por los científicos interesados en evolución. No obstante, la virología avanzaba a gran ritmo, en la vanguardia de las ciencias de la vida. Concretamente, un grupo de virus bacterianos, los bacteriófagos con ADN como material genético, estaban alumbrando la biología molecular, gracias a los trabajos de la escuela del gran Max Delbrück, como lo refleja el estimulante libro "Fagos y el Origen de la Biología Molecular" cuya versión de 1992 fue editada por John Cairns, Gunther Stent y James D. Watson (Cairns et al., 1992). El grupo de Delbrück de los laboratorios de Cold Spring Harbor buscaba principios desconocidos de la física que pudieran regir el comportamiento de los sistemas biológicos. Finalmente resultó que interacciones bien establecidas en el campo de la física y de la química subyacen a la multiplicación del ADN y a la cascada de reacciones biológicas que implica la expresión génica.

En la segunda mitad del siglo XX se descubrió que varios virus tenían ARN como material genético, en particular el bacteriófago f2 descrito por Tim Loeb y Norton Zinder en 1961 (Loeb and Zinder, 1961). Los bacteriófagos con ARN proporcionaban cantidades elevadas de ARNs heteropoliméricos ensayables como ARN mensajeros. Por ello, atrajeron a los investigadores que participaron en el desciframiento del código genético y que estaban interesados en la traducción de ARN a proteínas, entre ellos Severo Ochoa en el New York University (NYU) Medical Center. En el laboratorio de Ochoa trabajaba en aquella época, además de ilustrísimos españoles como Eladio Viñuela y Margarita Salas (quien contribuyó decisivamente a desvelar precisamente los mecanismos de biosíntesis de proteínas), un joven postdoctoral centroeuropeo nacido en Hungría pero nacionalizado suizo de nombre Charles Weissmann.

Aunque en estos momentos resulte difícil comprenderlo, el mecanismo de replicación de los bacteriófagos con ARN suscitó una considerable controversia entre Sol Spiegelman, un pionero de la biología molecular que tra-

bajaba en la Universidad de Columbia en Nueva York, y Charles Weissmann. Spiegelman sostenía que la replicación del ARN implicaba copia directa del ARN vírico, sin participación de una cadena complementaria tipo Watson-Crick. Weissmann, en cambio, postulaba una cadena complementaria de ARN, denominada cadena negativa. La controversia se resolvió a favor de Weissmann gracias al aislamiento de ARN de cadena negativa del bacteriógafo Qβ, libre de cadena positiva. Qβ es otro bacteriófago con ARN que infecta *Escherichia coli* e induce una polimerasa compleja, que todavía hoy constituye el sistema más eficiente de replicación de un ARN vírico en el tubo de ensayo. La replicación vía una cadena complementaria conllevaba una generalización de los posibles mecanismos de mutación que, tanto para ADN como para ARN se basaban en la incorporación incorrecta de nucleótidos. Weissmann adoptó el bacteriófago Qβ como modelo de trabajo en su nuevo Instituto de Biología Molecular en la Universidad de Zürich, inaugurado en 1967 y al que Cristina y yo nos incorporamos en Enero de 1974, debido al retraso en la inauguración del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.

En Zürich el grupo de Weissmann desarrolló un sistema de genética inversa basado en las propiedades únicas de la replicasa de Qβ que permitían sintetizar en el tubo de ensayo cadenas de ARN negativo que, a su vez, la enzima copiaba para dar ARN infeccioso. El procedimiento de replicación del ARN de Qβ *in vitro* permitía introducir un nucleótido mutagénico en una posición preseleccionada de la cadena negativa que, al ser copiada de nuevo, daba lugar a progenie de ARN con una mezcla de secuencia de tipo silvestre y mutante (Flavell et al., 1974). Mientras que un primer mutante extracistrónico (es decir, de la zona no codificante) del fago Qβ producido de esta manera por Richard Flavell no fué infeccioso, otro mutante en la misma zona (que Weissmann me pidió sintetizar) resultó, en aquel tiempo de modo inesperado, viable (Domingo et al., 1976). Este mutante validó el procedimiento de mutagénesis dirigida de Weissmann, quien acuñó el término "genética inversa" para referirse a la nueva capacidad de modificar el material genético de modo controlado y estudiar las consecuencias fenotípicas de la modificación, en contraposición al método clásico consistente en mutagenizar al azar y buscar los mutantes de interés entre la progenie mutagenizada. Cabe recordar que este método de mutagénesis dirigida se desarrolló antes de que las herramientas de la ingeniería genética estuvieran disponibles.

El mutante infeccioso del bacteriófago Qβ resultó clave para desvelar la complejidad de las poblaciones de virus ARN, y, como ocurre a menudo en las ciencias experimentales, por vías no planificadas. El mutante replicaba

más lentamente que el virus de tipo silvestre y esta desventaja selectiva daba como resultado la reversión del nucleótido mutante al de tipo silvestre. El proceso de reversión pudo seguirse mediante un sistema analítico de huellas genéticas (o "fingerprints") de ARN. Se basaba en una separación electroforética de los oligonucleótidos resultantes de la digestión con ribonucleasa del ARN vírico marcado radiactivamente con ^{32}P; la posición de los oligonucleótidos dependía de las mutaciones presentes en el ARN. Experimentos de reversión del mutante y de competición entre el mutante y el tipo silvestre, permitieron calcular una tasa de mutación de 10^{-4} errores por nucleótido copiado (Batschelet et al., 1976), varios órdenes de magnitud mayor que las tasas que habían sido determinadas por John Drake para bacteriófagos con ADN y bacterias (Drake, 1969).

Llegamos a la notable conclusión de que al propagar un clon del virus (es decir, derivado de un solo genoma) en su hospedador *E.coli*, se originaban múltiples variantes, con mutaciones dispersas a lo largo del ARN genómico. Las poblaciones del fago Qβ estaban formadas por genomas individuales que diferían entre sí en 1 a 2 posiciones del ARN. La observación era chocante para la época (recuérdese que el descubrimiento de los polimorfismos había tenido lugar tan solo diez años antes) pero era coherente con los resultados de tasa de mutación de 10^{-4} errores por nucleótido copiado, dado que la longitud del ARN del fago era tan solo de 4220 nucleótidos.

Aquellos y otros muchos experimentos realizados entre 1975 y 1977 en colaboración con la Dra. Donna Sabo (quien lamentablemente falleció poco después de abandonar Zürich para realizar una segunda estancia postdoctoral en un laboratorio de Cold Spring Harbor) representaron el inicio de lo que hoy se conoce como dinámica de cuasiespecies de los virus ARN. Traduzco una frase del resumen del trabajo publicado en Cell en 1978: "Proponemos que una población del fago Qβ está en un equilibrio dinámico, con mutantes viables que por una parte surgen con alta frecuencia y por otra parte son seleccionados negativamente. El genoma del fago Qβ no puede ser descrito como una única estructura definida sino como un promedio ponderado de un gran número de secuencias individuales" (Domingo et al., 1978). En un momento en el cual todavía la mutación se consideraba infrecuente y excepcional, el fago Qβ, replicaba inmerso en un proceso de mutación permanente. El virus que comúnmente se denominaba "de tipo silvestre" no se podía definir mediante una secuencia definida de nucleótidos, sino solamente de modo estadístico. Había una indeterminación acerca de qué genoma tenía qué secuencia. Solamente podíamos hablar de promedios y aproximaciones.

Durante la misma década de los años 1970 en la que se desarrollaban los trabajos experimentales que acabo de resumir, Manfred Eigen, del Instituto Max-Planck de Biofísico-Química de la Universidad de Göttingen en Alemania (Premio Nobel de Química en 1967 por sus investigaciones sobre reacciones químicas extremadamente rápidas) estaba elaborando una teoría sobre autoorganización de elementos genéticos sencillos que propuso pudieron existir como formas ancestrales de vida en la Tierra hace unos 4.500 millones de años. El trabajo fundamental inicial fue publicado en el año 1971 en la revista Naturwissenschaften del propio Instituto Max-Planck, al parecer debido a que su longitud (58 páginas de líneas muy comprimidas) resultó excesiva para otras revistas. El trabajo se tituló "Autoorganización de la materia y la evolución de macromoléculas biológicas" (Eigen, 1971). Transcurridos cuarenta y dos años desde su publicación resulta altamente significativo leer parte de los agradecimientos escritos al final del texto. Dice Eigen: "Muchas de las ideas individuales expresadas en este trabajo ciertamente no pueden ser consideradas nuevas. No obstante, este trabajo está escrito para físicos y biólogos, y lo que puede a veces parecer trivial a uno puede no serlo para el otro. Otra excusa para escribir un trabajo tan largo es que creo que el todo representa más que la suma de las ideas individuales" (una frase que refleja conceptos actuales de complejidad). Eigen también reconoció que las ideas que expuso sobre selección fueron estimuladas durante un desayuno con Francis Crick, y que los experimentos de Sol Spiegelman de replicación de ARN *in vitro* y los conceptos de termodinámica irreversible de Ilya Prigogine aportaron un impulso adicional. Eigen y su estudiante Peter Schuster, actualmente Profesor Emérito en la Universidad de Viena, desarrollaron la "teoría de las cuasispecies", en una serie de trabajos publicados también en la revista Naturwissenschaften en los años 1977 y 1978. Eigen organizaba anualmente un seminario interdisciplinar en Klosters, un pueblo de los Alpes suizos. Eigen invitó a Weissmann a hablar en el seminario de Enero de 1978 y Weissmann presentó los resultados de diversidad genética del fago Qβ. Los asistentes relataron que Eigen no pudo contenerse al escuchar los resultados y poniéndose de pié exclamó "¡Cuasispecies reales!". Ese fue el momento en el que se inició la conexión entre la teoría de cuasiespecies y las cuasiespecies víricas.

Efectivamente, la teoría de cuasiespecies predecía que los replicones primitivos, probablemente moléculas de ARN (o parecidas al ARN) de pequeño tamaño, se organizaban en forma de distribuciones de mutantes que conferían capacidad adaptativa y de autoorganización al conjunto. Esta predicción de la teoría coincidía con los resultados que acabábamos de obtener sobre la estructura poblacional del fago Qβ. Si la teoría de cuasiespecies era

cierta, el murmullo genético de enjambres de moléculas de ARN en un mundo primitivo todavía desprovisto de cualquier actividad biológica, se estaba repitiendo en un parásito subcelular, unos cuatro mil millones de años después. Una de las preguntas que surgieron inmediatamente fue si la estructura poblacional de Qβ era excepcional o si también se daba con otros virus, en particular virus ARN patógenos.

De regreso a España iniciamos una nueva línea de investigación con el Dr. Juan Ortín y, a sugerencia de Eladio Viñuela, investigamos la estructura poblacional del virus de la gripe humana y de la glosopeda animal o fiebre aftosa. Se conocía la variabilidad antigénica de estos patógenos pero no su base molecular. Fue un periodo fascinante en el cual Juan inició su brillante carrera sobre replicación de virus de la gripe y yo continué los estudios sobre cuasiespecies empleando el virus de la fiebre aftosa como modelo.

Los trabajos iniciales realizados en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa demostraron que tanto el virus de la gripe humana como el de la fiebre aftosa animal generaban distribuciones de mutantes y seguían la dinámica de cuasiespecies, con resultados experimentales muy parecidos a los obtenidos con el fago Qβ. Los primeros trabajos fueron publicados en el año 1980 con Mercedes Dávila, Juan Ortín, Rafael Nájera y Cecilio López-Galíndez como coautores (Domingo et al., 1980; Ortín et al., 1980). En 1983 Francisco Sobrino, mi primer estudiante de doctorado, publicó la dinámica de cuasiespecies del virus de la fiebre aftosa en cultivos celulares (Sobrino et al., 1983). El mapeo de mutaciones sugirió que las variaciones genéticas se localizaban a lo largo de todo el genoma. Por tanto, no era una variabilidad específica de las zonas que codificaban sitios antigénicos sino que la diversidad antigénica era una de las consecuencias de una variabilidad genética general.

En aquella época la fiebre aftosa era enzoótica en España y en gran parte de Europa y gracias a la mediación de Eladio Viñuela pudimos obtener muestras de tejidos infectados tanto del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) como de los Laboratorios Sobrino, en Olot (Girona). Tuvimos un apoyo considerable de la comunidad de veterinarios, en particular de los Dres. Ángel Ordás del INIA y Joan Plana y su equipo de los Laboratorios Sobrino. Obtuvimos evidencia de la gran diversidad genética del virus e identificamos la presencia de dos variantes muy parecidos entre sí (distinguibles solamente por un oligonucleótido en su huella genética) en un animal infectado (Domingo et al., 1980) (Figura 1). Dado que en la huella dactilar so-

lamente se analizaba un 7% del genoma vírico, debían coexistir múltiples mutantes en el animal infectado. Este resultado representó la primera evidencia de la presencia de un espectro de mutantes en un virus animal durante una infección *in vivo*.

FIGURA 1. *La primera evidencia de la presencia de dos mutantes distintos en un animal infectado por el virus de la fiebre aftosa. A y B son las huellas dactilares del ARN de dos clones biológicos aislados de un mismo animal. Los oligonucleótidos 35 y 35' difieren en su posición debido a una mutación puntual. En C se representa la huella de una mezcla de los dos ARNs. [Basado en (Domingo et al., 1980)].*

A instancias de un excelente inmunólogo, llegado al Centro de Biología Molecular Severo Ochoa desde Estados Unidos, el Dr. Luis Enjuanes, preparamos con su colaboración anticuerpos monoclonales contra el virus de la fiebre aftosa. Ello nos permitió extender conceptos de variación desde el nivel genético al nivel antigénico. Por ejemplo, con la aplicación de anticuerpos monoclonales al diagnóstico, se constató que prácticamente cada nuevo aislado del virus podría considerarse un nuevo subtipo antigénico. La diversidad antigénica era tan evidente que, finalmente, durante la década de los 80 se dejó de subtipar. Tanto por análisis de muestras de campo como por diseños experimentales de laboratorio se confirmó que la diversidad antigénica del virus era un reflejo de su variabilidad genética. A esta importante conclusión se pudo llegar gracias al trabajo del Dr. Mauricio García Mateu, entonces en el inicio de su carrera como investigador y Profesor universitario (Mateu et al., 1989).

Durante la década de los años 1980 se confirmaron las altas tasas de error y la dinámica de cuasiespecies no solamente para el virus de la fiebre aftosa sino también para otros virus con ARN como material genético (Figura 2). Cabe destacar el trabajo con el virus de la estomatitis vesicular realizado por el grupo de John Holland de la Universidad de California en San Diego, con un memorable e influyente trabajo de revisión publicado en la revista Science en 1982 (Holland et al., 1982), al que siguieron varios trabajos fundamentales para entender la dinámica de cuasiespecies y establecer conexiones entre conceptos de genética poblacional clásica y lo que John Holland denominó la genética del ARN. También resultó muy significativo un estudio con el entonces recientemente descubierto virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1), el causante del SIDA, publicado en la revista Cell por el grupo del Dr. Simon Wain-Hobson del Instituto Pasteur de París (Meyerhans et al., 1989). El trabajo incluyó una frase que por su contenido conceptual he repetido en artículos de revisión: "Cultivar es perturbar". Estas tres palabras reflejan que cualquier modificación ambiental al que se somete un virus da lugar a selección de subpoblaciones que antes eran minoritarias en la misma población. En este caso, además, la frase se refiere a un procedimiento tan común en la práctica de la virología como es cultivar en células un aislado natural de un virus para su posterior estudio.

Antes de revisar las implicaciones biológicas de la dinámica de cuasiespecies y las perspectivas actuales en este campo de investigación, deseo terminar esta descripción histórica destacando el contacto permanente de nuestro grupo con otros equipos de investigación, tanto teóricos como experimentales,

FIGURA 2. *Representación esquemática de cuasiespecies virales y distintos patrones de evolución. A. Una distribución de mutantes en la que los genomas individuales se representan mediante rayas horizontales y las mutaciones como símbolos sobre las rayas. B. Evolución de la cuasiespecie sin modificación de la secuencia consenso. C. Evolución de la cuasiespecie con modificación de la secuencia consenso debido a la ventaja selectiva de genomas con la mutación representada por un asterisco. D. Los cuellos de botella poblacionales (a partir del genoma representado mediante una línea discontinua en la distribución del panel A) dan lugar a la acumulación de mutaciones en la secuencia consenso. [Cortesía de Celia Perales, basado en (Domingo, 2006; Domingo et al., 2012; Escarmís et al., 1996)].*

que continúa en la actualidad. El frecuente intercambio de información tanto con teóricos como con médicos especialistas en enfermedades infecciosas, que perciben cuasiespecies como una dificultad para el tratamiento de infecciones víricas, ha sido una fuente de motivación adicional. Dejo ya los aspectos históricos para resumir las implicaciones biológicas de la diversidad viral.

Implicaciones biológicas de la dinámica de cuasiespecies de los virus ARN

Los espectros, distribuciones, enjambres o nubes de mutantes (tan diversos son los nombres que han recibido) subyacen a la adaptabilidad de los virus porque constituyen reservas altamente dinámicas de variantes genotípicos y fenotípicos [como revisión reciente, ver (Domingo et al., 2012)]. Entre los variantes que han sido descritos para numerosos virus se hallan aquellos que pueden replicar en presencia de inhibidores, de anticuerpos neutralizantes o de células T citotóxicas, y que denominamos genéricamente mutantes de escape. Los espectros de mutantes también pueden incluir mutantes con tropismo celular alterado, con el potencial de modificar el rango de hospedador, con implicaciones para la emergencia de nuevas enfermedades víricas. Para todos los mutantes de escape opera el mismo mecanismo: componentes minoritarios presentes en un espectro de mutantes que es mayoritariamente sensible a la presión selectiva aplicada, pueden replicar y reconstituir un nuevo espectro de mutantes. La evolución entendida como una redistribución de mutantes –si se quiere, variaciones permanentes en equilibrios poblacionales efímeros y metaestables– ha sido una de las principales aportaciones de la teoría de cuasiespecies a la virología. Estos conceptos han resultado válidos para todos los virus ARN examinados hasta el momento y han sido descritos, en numerosos artículos de revisión en libros y revistas [como ejemplos véase (Domingo, 2006; Domingo et al., 2001; Domingo et al., 2008; Domingo et al., 1985; Domingo et al., 2012; Figlerowicz et al., 2003; Holland et al., 1982; Lauring and Andino, 2010)].

La eficacia o aptitud biológica (o "fitness") es un concepto introducido por Darwin, quien en el capítulo IV de su Origin of Species se refiere al "survival of the fittest", supervivencia del más apto. Fitness ha sido y es uno de los parámetros más empleados para cuantificar la dinámica adaptativa de virus altamente variables. Un valor de fitness es relativo a un ambiente determinado. Dado que en un organismo infectado el virus se enfrenta a un mosaico de células, tejidos y órganos, se generará una compartimentación de enjambres de mutantes ligeramente distintos, adaptados a cada ambiente concreto. En qué medida una microevolución dentro del hospedador es una fase importante para que un virus manifieste su potencial de causar enfermedad es uno de los puntos clave que se están investigando actualmente.

Las circunstancias biológicas o ambientales pueden determinar que sean una o unas pocas partículas infecciosas las que inician una infección, lo que

se conoce como cuello de botella poblacional (Figura 2). Con ello se introduce un elemento adicional de aleatoriedad en la evolución vírica. Efectivamente, si una población viral consiste en una distribución de mutantes, un cuello de botella poblacional aísla a una o a unas pocas partículas víricas del conjunto al que pertenecen. Está bien documentado que cuellos de botella poblacionales se dan frecuentemente en la transmisión de virus desde un hospedador infectado a otro susceptible, y a veces también durante la expansión de un virus dentro de un organismo infectado [revisión en (Domingo et al., 2012)].

Diseños experimentales consistentes en estudiar las consecuencias que tienen para los virus los cuellos de botella extremos y sucesivos, han constituido una de las pruebas más directas de la propuesta teórica de Hermann J. Muller que se conoce como trinquete de Muller (Muller, 1964). Según este concepto, los organismos asexuales con tamaño poblacional limitado y altas tasas de mutación tenderán a incorporar mutaciones deletéreas de modo irreversible (de ahí el término trinquete), a menos que las mutaciones puedan ser eliminadas mediante mecanismos compensatorios como es la recombinación genética. Estudios muy detallados llevados a cabo en nuestro laboratorio por Cristina Escarmís, trabajando con el virus de la fiebre aftosa, revelaron por vez primera las bases moleculares del trinquete de Muller en virus [véanse como trabajos representativos (Escarmís et al., 1996; Escarmís et al., 2008; Escarmís et al., 2009)]. Estos estudios permitieron aislar y caracterizar mutantes inusuales con fenotipos extremos escondidos en los espectros de mutantes, cuya presencia no se desveló durante la evolución del virus en la naturaleza o en el laboratorio con diseños experimentales exentos de cuellos de botella poblacionales. Son mutantes que aguardan su oportunidad de replicar cuando las condiciones ambientales lo permitan, aunque la mayoría existe como reserva aparentemente silenciosa. Repitiendo las palabras de Peter Schuster, "las cuasiespecies son las reservas fenotípicas de los organismos asexuales" (Schuster, 2010).

Movimientos en el espacio de secuencia como mecanismo de evolución

El hecho de que la evolución de los virus ARN ocurre como resultado de redistribuciones de secuencias en los espectros de mutantes (Figura 2), y no de una acumulación lineal de cambios genéticos, representa una notable ruptura con el punto de vista de la genética poblacional clásica. Esta nueva percepción de la evolución vírica se ha cimentado en el análisis de la com-

posición de mutantes en muestras secuenciales de virus replicando tanto en células en cultivo como *in vivo*. Los resultados obtenidos mediante clonaje molecular y secuenciación Sanger están siendo confirmados por estudios que emplean las nuevas metodologías de secuenciación profunda o masiva y más recientemente por las técnicas de secuenciación masiva de genomas enteros, llamadas de tercera generación.

Un concepto que ha ayudado a entender evolución de virus es el de espacio de secuencias, cuyo origen se sitúa también en el campo de la biofísica teórica. Espacio de secuencias fue propuesto por John Maynard Smith para proteínas y por Manfred Eigen para ácidos nucléicos (Eigen and Biebricher, 1988), y contribuye a entender las transiciones evolutivas como desplazamientos de conjuntos de secuencias. El espacio teórico de secuencias de un genoma vírico es el número total posible de secuencias que puede tener el genoma sin considerar restricciones estructurales o funcionales. El valor es inmenso e imposible de imaginar pero calculable: viene dado por 4 (el número de nucleótidos distintos que componen un ARN) elevado al número de nucleótidos totales que integran el genoma del virus, entre 3.000 y 33.000 nucleótidos para virus ARN. En cambio, el espacio de secuencias realmente asequible a un virus, es decir el número de secuencias genómicas compatibles con el mantenimiento de una capacidad replicativa, aún siendo muy grande e imposible de precisar, nos ofrece una imagen muy útil para interpretar procesos adaptativos. Cada componente de un espectro de mutantes es un punto en el espacio de secuencias y la adaptación se consigue mediante el desplazamiento hacia nuevos puntos del espacio. Si lo simplificamos a tres dimensiones la imagen podría ser la de nubes de forma cambiante como la que ofrece una representación fílmica a velocidad acelerada del cielo un día de tormenta (Figura 3). La amplitud y volubilidad de la nube poblacional reflejan adaptabilidad. Una de las características de un espacio de secuencias es su conectividad, es decir que un número limitado de pasos mutacionales permite alcanzar puntos aparentemente alejados del espacio. Los gradientes de eficacia biológica aceleran los movimientos en el espacio de secuencias. Cuanto más amplio es el espacio ocupado por una nube de mutantes, mayor es el número de puntos vecinos accesibles por mutación y mayor, por tanto, la capacidad adaptativa del conjunto [como revisión véase (Domingo et al., 2012)].

Uno de los nuevos campos de trabajo en virología evolutiva es el de los mutantes de polimerasas virales con fidelidad de copia alterada. Estos estudios ofrecen argumentos convincentes de cómo la adaptabilidad de un virus, incluida su virulencia, se puede asociar al tamaño y composición de los

espectros de mutantes, es decir a la capacidad de ocupación del espacio de secuencias. Cabe destacar que la fidelidad de copia de una polimerasa no depende solamente de la presencia o no de una actividad enzimática correctora de pruebas [la 3'–5' exonucleasa; revisado en (Friedberg et al., 2006)] sino también de la propia estructura del dominio de polimerización o de su entorno, cuyas modificaciones pueden alterar el reconocimiento de nucleótidos en el centro catalítico de la enzima. Por ello se han obtenido tanto mutantes de fidelidad elevada (hipomutadores) como de fidelidad baja (mutadores) en polimerasas víricas que carecen de la actividad correctora de pruebas. Además, se dispone de las herramientas moleculares y virológicas necesarias para examinar consecuencias biológicas de un aumento de fidelidad de ARN polimerasas dependientes de ARN codificadas por virus. Este es un punto clave que está dando importantes resultados.

En los laboratorios de Raúl Andino en San Francisco y de Karla Kirkegaard en Stanford se obtuvo y estudió de modo independiente un mutante del virus de la poliomielitis resistente a la acción mutagénica de análogos de

FIGURA 3. *Una representación esquemática y extraordinariamente simplificada del espacio de secuencias ocupado por un virus. Un espacio de secuencias es en realidad multidimensional, pero aquí se ha simplificado a tres dimensiones. El espacio de secuencias real se representa mediante una esfera con superficie irregular, insertada en el espacio teórico inmenso representado por el fondo difuso. La volubilidad y el tamaño del espacio de secuencias ocupado por un virus determinan su adaptabilidad. [Cortesía de Julie Sheldon y Celia Perales, adaptado de (Eigen y Briebricher, 1988; Domingo et al., 2012)].*

nucleótido, que mostró una fidelidad de copia de molde unas cuatro veces superior a la del virus de tipo silvestre. Ambos laboratorios llegaron a la misma conclusión: el mutante de alta fidelidad produjo un espectro de mutantes más restringido que el virus de tipo silvestre y resultó menos adaptable a un ambiente complejo, como lo demostró su incapacidad de invadir el sistema nervioso central de ratones susceptibles al virus (Pfeiffer and Kirkegaard, 2005; Vignuzzi et al., 2006). El mutante menos adaptable ocupaba una porción menor del espacio de secuencias y era incapaz de causar enfermedad neurológica. La adaptabilidad y patogenicidad se recuperaron cuando la población vírica fue mutagenizada en la medida adecuada para restablecer la amplitud del espectro de mutantes típica de poliovirus de tipo silvestre. Trabajos recientes, empleando otros mutantes de fidelidad de virus de distintas familias, están apoyando las conclusiones obtenidas con el mutante de poliovirus. Las repercusiones biológicas de las alteraciones de fidelidad de copia en virus y la preparación de virus con fidelidad incrementada como candidatos a vacunas vivas atenuadas constituyen campos activos de investigación [revisión en (Domingo et al., 2012)].

Interacciones dentro de un espectro de mutantes: complementación, interferencia, memoria y comportamiento determinista. Cuasiespecies como unidad de selección

Una de las observaciones más relevantes para entender el comportamiento de los virus ha sido que los espectros de mutantes de las cuasiespecies no se comportan como meros agregados de mutantes, cada uno de ellos con un comportamiento independiente de los demás. Varios estudios con distintos sistemas virus-hospedador, tanto en cultivos celulares como *in vivo*, han demostrado que se establecen interacciones tanto de complementación como de interferencia entre los componentes de un espectro de mutantes (Figura 4). Sobresale el trabajo realizado por la Dra. Celia Perales en nuestro laboratorio (Perales et al., 2007; Perales et al., 2009). Con las tasas de mutación típicas de los virus ARN, la eficacia biológica del conjunto es superior a la de los clones biológicos individuales cuando se aíslan y separan del conjunto. Podríamos denominarlo microcomplementación diseminada. Todavía no hemos podido demostrar sus bases moleculares de modo directo. En cambio, tenemos evidencia experimental sólida para el proceso contrario, es decir, la interferencia ejercida por genomas con mutaciones deletéreas sobre la replicación de virus funcional estándar (González-López et al., 2004; Perales et al., 2007). Al aumentar la tasa de error se incrementa la actividad interferente

(Figura 4). No solamente una población viral está compuesta por un conjunto complejo e indeterminado de mutantes sino que, además, los variantes pueden interaccionar entre ellos dando lugar a propiedades biológicas altamente impredecibles.

Que la diana de la selección sea un conjunto de individuos establece una importante distinción con las formulaciones clásicas de dinámica evolutiva de Wright-Fisher basadas en un equilibrio de mutación-selección y acerca el concepto de unidad de selección al propuesto en la teoría de cuasiespecies por Eigen y Schuster (Eigen and Schuster, 1979). Las interacciones entre componentes de una población que influyen en el comportamiento del conjunto se dan también en agrupaciones de células (como son las presentes en biofilms bacterianos o en tumores) o incluso en priones, tal como ha sido recientemente descrito por Charles Weissmann y su grupo del Scripps Florida.

Aumento de mutación, transición desde complementación a interferencia

FIGURA 4. *Representación esquemática de las interacciones dentro de una cuasiespecie vírica. Cuando la frecuencia de mutación es estándar (a la izquierda) la mayoría de virus (representados mediante esferas lisas) son viables y se establecen relaciones de complementación entre ellos, representadas por flechas delgadas. Al aumentar la tasa de mutación (de izquierda a derecha) aumenta la proporción de virus que aún siendo viables (representados por partículas rugosas) expresan proteínas con defectos que pueden interferir con la replicación del virus normal (flechas grandes). Véase el texto para la evidencia experimental en apoyo de este esquema. [Cortesía de Celia Perales, adaptado de (Domingo et al., 2012)].*

Estas observaciones apuntan a la posibilidad de que a varios niveles de organización biológica, los conjuntos interactivos sean los verdaderos protagonistas del comportamiento observado [como revisiones sobre la extensión del concepto de cuasiespecies a sistemas no virales, ver (Mas et al., 2010; Ojosnegros et al., 2011; Weissmann et al., 2011)].

Otra de las consecuencias de que las nubes de mutantes sean los objetos sobre los que actúa la selección, es que los fenómenos evolutivos observados en un momento dado pueden no ser independientes de la historia evolutiva del mismo linaje. No me refiero a la mera acumulación de cambios genéticos como un acontecimiento histórico a largo plazo que condiciona el comportamiento actual, al igual que un programa de desarrollo se halla condicionado por toda la historia evolutiva del organismo. Se trata de la presencia en las nubes de mutantes de subpoblaciones cuyo nivel de frecuencia depende de la historia evolutiva reciente. Le denominamos memoria de las cuasiespecies y fue descrita por primera vez por Carmen Martín Ruiz-Jarabo trabajando con el virus de la fiebre aftosa en cultivos celulares y posteriormente documentada por Carlos Briones con el virus de la inmunodeficiencia humana, tanto en cultivos celulares como en pacientes infectados (Briones and Domingo, 2008; Ruiz-Jarabo et al., 2000). La memoria consiste en que en un espectro de mutantes se pueden mantener como minoritarios, pero a mayor frecuencia de la que se esperaría por las tasas basales de error, genomas que fueron los mayoritarios en una etapa anterior del mismo linaje evolutivo.

La búsqueda de memoria en cuasiespecies víricas se inspiró en la dinámica del sistema inmune que, al igual que la evolución vírica, despliega características típicas de los sistemas adaptativos complejos. Las células del sistema inmune mantienen una memoria de aquellos antígenos a los que fueron expuestas en fases anteriores. Existe un paralelismo conceptual con las nubes de mutantes víricas que mantienen como memoria aquellos genomas que fueron dominantes en una fase anterior del sistema. La memoria de las cuasiespecies es una propiedad colectiva del conjunto de la población y tiene implicaciones médicas. Así, por ejemplo, la interrupción de un tratamiento antivírico puede mantener a nivel de memoria virus resistentes a los fármacos incluidos en el tratamiento. La progenie de los genomas memoria puede contribuir a reconstituir una población dominante, en caso de reanudarse el mismo tratamiento. Tanto para nuestra biosfera en general como para el microcosmos de un organismo infectado en particular, los factores ambientales, aún siendo diversos, son a menudo recurrentes: alternancias de temperatura, sequía y humedad, respuestas fisiológicas como fiebre, sistema inmune innato

y respuesta inmune adaptativa, etc. Estamos inmersos en sistemas medioambientales regidos por parámetros recurrentes más que linealmente divergentes. Por tanto, la presencia de memoria molecular puede conferir una ventaja selectiva a un virus. Recientemente un concepto similar al de memoria en virus ha sido descrito para *Drosophila melanogaster* (Teotonio et al., 2009), por lo que las propiedades colectivas que se reflejan en una memoria genética pueden también tener validez para organismos diferenciados.

Los estudios sobre memoria en cuasiespecies condujeron a nuevas e interesantes preguntas sobre la naturaleza determinista de los fenómenos evolutivos. La memoria molecular en virus decae lentamente a medida que transcurren rondas de replicación. Curiosamente, la cinética de pérdida de memoria fue idéntica para cuatro líneas evolutivas del virus de la fiebre aftosa tratadas en paralelo en condiciones controladas de laboratorio (Ruiz-Jarabo et al., 2003). Este hecho incide en una cuestión que trasciende al mundo de los virus: la influencia de componentes deterministas frente a estocásticos (de azar) en un proceso evolutivo. El caso de la cinética de pérdida de memoria no es el único en el que poblaciones de virus muestran un comportamiento predecible, aunque el comportamiento dependa de mutaciones cuya ocurrencia es fundamentalmente estocástica. Lo notable es que con una base molecular aleatoria se generan acontecimientos reproducibles, en este caso la cinética del declive de la memoria. Este es un fértil campo de trabajo tanto teórico como experimental, con el aliciente adicional de que la teoría de las cuasiespecies en su formulación inicial fue una teoría determinista.

Nuevas estrategias antivirales: mutagénesis letal y terapias secuenciales

En el campo de la prevención y tratamiento de las enfermedades víricas ha ocurrido un hecho paradójico. Mientras que los análisis poblacionales desvelaban la complejidad poblacional de los virus a controlar, la monoterapia era el protocolo preferido en farmacología y las nuevas tendencias en biotecnología (síntesis química de péptidos o expresión de proteínas antigénicas mediante técnicas de ADN recombinante) tendían a simplificar el diseño de vacunas. El problema de fondo es que es muy difícil combatir complejidad con simplicidad y de ello quiero tratar en los párrafos que siguen. Esta profunda contradicción entre los protocolos antivirales empleados y lo que íbamos desvelando sobre la complejidad de las poblaciones víricas (Figuras 2 y 4) ha sido un importante acicate para nuestro trabajo durante la última dé-

cada. Nuestro enfoque ha tenido dos vertientes complementarias: demostrar experimentalmente la inadecuación de los protocolos antivíricos al uso [véase (Domingo, 1989) como primera revisión representativa] y proponer nuevas terapias que tomen en consideración la dinámica de cuasiespecies (sinónimo de adaptabilidad) de los virus que se quieren controlar [revisión reciente en (Domingo et al., 2012)].

Todos los diseños antivíricos desarrollados durante los últimos dos siglos y medio, desde las primeras vacunas de Edward Jenner y Louis Pasteur hasta los agentes antivirales obtenidos estos últimos años por las grandes compañías farmacéuticas, tienen como objetivo inhibir alguna fase de la multiplicación de los virus. La inhibición puede ser mediada por una estimulación del sistema inmune adaptativo o por una droga que interfiere con algún proceso físico o químico importante para la compleción del ciclo replicativo de un virus. Por lo que sabemos actualmente de la complejidad las poblaciones virales y de la flexibilidad estructural y funcional de proteínas codificadas por los virus, no resulta sorprendente que entre los enjambres de mutantes de una cuasiespecie replicante se den mutantes de escape a componentes, ya sean naturales o artificiales, dirigidos a impedir la replicación vírica. Las frecuencias de mutantes de escape halladas implican que para que una vacuna pueda producir una respuesta inmune efectiva debe presentar al sistema inmunitario múltiples epítopos capaces de desencadenar una amplia respuesta protectora similar a la que se produce durante una infección natural por el correspondiente virus patógeno.

Argumentos paralelos aplican a la terapia antiviral con drogas. Prácticamente cada uno de los inhibidores antivíricos empleados en clínica produce la selección de mutantes resistentes en los pacientes tratados. Es más, la selección de un mutante de resistencia se considera una prueba de la especificidad de una droga. Todas las evidencias experimentales y clínicas disponibles implican a los espectros de mutantes como responsables directos de los fracasos terapéuticos. Una gran cantidad de datos se obtuvieron (y siguen obteniéndose) con los tratamientos de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, pero en la actualidad estamos viviendo observaciones parecidas con los tratamientos de las infecciones con los virus de las hepatitis B y C, con nuevas generaciones de drogas. Caben pocas dudas de que son necesarios nuevos protocolos de tratamiento que tengan en cuenta la dinámica de cuasiespecies de los virus a controlar.

Varios diseños de terapia antiviral se están desarrollando y algunos se están ya aplicando con el objetivo de evitar la selección de mutantes de es-

cape (Tabla 1). A pesar de la eficacia de las terapias de combinación para controlar las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1), no todos los problemas de la terapia antiviral se resuelven mediante combinaciones de inhibidores. Los efectos secundarios de las drogas administradas suelen ser importantes. Además, si la supresión de la replicación viral no es completa, el virus encuentra vías de adaptación a múltiples inhibidores dando lugar a la selección de virus multi-resistentes (resistentes a varios inhibidores). La teoría de cuasiespecies inspiró un abordaje antiviral alternativo denominado mutagénesis letal y que se está investigando en varios laboratorios. Consiste en la administración de un agente mutagénico específico para el virus y su base conceptual yace en la existencia de un límite máximo de error tolerable durante la copia de un mensaje genético. Por encima de este límite máximo de error, la información codificada no puede mantenerse (Eigen and Biebricher, 1988; Eigen and Schuster, 1979).

La primera verificación experimental de esta predicción fue obtenida por John Holland y sus colaboradores quienes mostraron que la presencia de agentes mutagénicos disminuía la producción de virus de la estomatitis vesi-

TABLA 1. *Diseños antivíricos para virus altamente variables*

Tratamiento	*Comentarios*
Terapia de combinación (3 o más inhibidores administrados simultáneamente).	Se ha demostrado eficaz en infecciones modelo y en la práctica clínica.
Terapia en dos fases: inducción y mantenimiento.	Se ha planteado teóricamente pero sin ensayos experimentales.
Uso de drogas dirigidas a dianas celulares, aisladamente o en combinación con drogas dirigidas al virus.	Pueden mostrar toxicidad y se ha demostrado la selección de mutantes víricos resistentes a drogas dirigidas a la célula.
Uso combinado de inmunoterapia y farmacoterapia.	Se ha sugerido en varias ocasiones pero con pocos estudios experimentales o clínicos.
Mutagénesis letal.	Se halla en fase de investigación en distintos laboratorios y un ensayo clínico realizado con pacientes de SIDA. Una terapia secuencial inhibidor-mutágeno puede tener ventaja sobre la correspondiente terapia de combinación

Basado en las referencias: (Domingo et al., 2012; Mullins et al., 2011; Perales et al., 2009; Iranzo et al., 2011; von Kleist et al., 2011).

cular o poliovirus en cultivos celulares (Holland et al., 1990). A este estudio siguió otro de James Mullins, Laurence Loeb y colaboradores quienes demostraron extinción de VIH-1 en cultivos celulares y acuñaron el término de mutagénesis letal (Loeb et al., 1999). En nuestro laboratorio, iniciamos trabajo sobre extinción de los virus de la fiebre aftosa y de la coriomeningitis linfocitaria de ratón por mutagénesis incrementada, en colaboración con Pedro Lowenstein, entonces en la Universidad de Manchester en el Reino Unido. Los trabajos confirmaron la extinción de virus por agentes mutagénicos que ya desde el inicio restringimos a análogos de base o de nucleósido que se emplean para el tratamiento de enfermedades virales, como es el caso de la ribavirina, o en quimioterapia de cáncer, como es el caso del 5-fluorouracilo o la 5-azacitidina. Su eficacia antiviral fue demostrada tanto en cultivos celulares como *in vivo*, en un experimento de colaboración con Juan Carlos de la Torre del Scripps Research Institute, realizado en La Jolla.

Una de las conclusiones de estos trabajos iniciales fue que la transición hacia la extinción ocurre sin ninguna modificación detectable de la secuencia consenso de la población. Quiero destacar que si, siguiendo el abordaje típico de la genética de poblaciones clásica, solamente hubiéramos prestado atención a la secuencia consenso y no a los espectros de mutantes, las bases moleculares que subyacen a la extinción de virus hubieran pasado inadvertidas.

Muy recientemente la compañía estadounidense Koronispharma, con el asesoramiento del grupo de Loeb y Mullins, ha descrito un primer ensayo clínico con pacientes de SIDA que no disponían de otras opciones terapéuticas, a quienes se administró un análogo primididínico mutagénico para el VIH-1 (Mullins et al., 2011). Los ensayos continúan en este momento y han abierto la posibilidad de una aplicación clínica real de la mutagénesis letal, reforzado por resultados recientes que acabamos de obtener en colaboración con el grupo de la Dra. Susanna Manrubia del Centro de Astrobiología. Efectivamente, en el transcurso de experimentos sobre extinción del virus de la fiebre aftosa mediante el agente mutagénico ribavirina y el inhibidor cloruro de guanidinio, realizados por Celia Perales en nuestro laboratorio, observamos que los descensos de la carga viral y la consiguiente extinción del virus se producían de modo más eficaz al administrar secuencialmente primero el inhibidor y después el mutagéno que al administrar los dos a la vez (Perales et al., 2009). La ventaja de la administración secuencial no es universal ya que se observa solamente en un rango de valores de las acciones inhibitorias y mutagénicas, siendo tanto más acentuada cuanto más intensa es la inhibición inicial (Iranzo et al., 2011). Hemos identificado los mecanismos que inter-

vienen en conferir una ventaja a la terapia secuencial. Actualmente estamos explorando nuevas opciones terapéuticas con el virus de la hepatitis C, un nuevo sistema de replicación del virus completo puesto a punto en nuestro laboratorio por las Dras. Celia Perales y Julie Sheldon y con la colaboración del grupo del Dr. Charles Rice de la Universidad Rockefeller de Nueva York. Tengo la impresión de que poco a poco, de forma gradual pero en cierto modo también implacable, el trabajo de nuestro laboratorio y de otros que empiezan a enfocar su interés en cuasiespecies va desvelando a la comunidad científica las potentes estrategias adaptativas de los virus. Esperamos que también gradualmente podamos hallar nuevos protocolos de tratamiento, ahora que empezamos a entender a lo que nos enfrentamos. El éxito no está en absoluto garantizado, pues en palabras de Josua Lederberg: "Existen abundantes fuentes de variación genética para que los virus aprendan nuevos trucos, que no necesariamente se limitan a lo que ocurre rutinariamente o frecuentemente".

Termino destacando, una vez más, que la ciencia básica es esencial para producir novedades que pueden llevar a una aplicación práctica. La mutagénesis letal surgió de un concepto tan fundamentalmente básico como es la teoría de las cuasiespecies propuesta inicialmente para entender el origen de la vida sobre la tierra. Si cualquiera de nosotros hubiera escrito una solicitud al Plan Nacional diciendo que quería investigar modelos sobre el origen de la vida para diseñar nuevas terapias antivirales hubiera sido dirigido discretamente a los servicios médicos de la institución a la que pertenece. En cambio, el entendimiento en profundidad a nivel básico de qué mecanismos subyacen a la adaptabilidad de virus, inspirado en una teoría del origen de la vida, está abriendo nuevas vías para controlar enfermedades víricas, uno de los desafíos actuales más importantes en salud pública. Como contribución fundamental, la aplicación de la teoría de cuasiespecies a la virología ha desvelado tanto mecanismos adaptativos como el comportamiento colectivo de genomas interactivos, un aspecto ni siquiera sospechado hace una década.

Agradezco a los miembros de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales que me hayan concedido el honor de formar parte de este insigne grupo. Trataré de aportar trabajo y entusiasmo. Además de la oportunidad de cultivar y de disfrutar con ciencia interdisciplinar o transdisciplinar, espero participar en una lucha perenne en nuestro país para que la ciencia en España tenga el apoyo público y privado que hasta hoy no ha tenido. Ya D. Santiago Ramón y Cajal se refirió en varias ocasiones al atraso científico de España, precisamente las palabras con las que concluye su memorable discurso de ingreso en esta Real Academia, leído el 5 de Diciembre de 1897.

Repito a Severo Ochoa al decir que sin ciencia no hay desarrollo y repito también al anterior Presidente de nuestra Academia, el Profesor Miguel Ángel Alario y Franco, con la frase incluida en su felicitación de la Navidad de 2011 enviada a los Académicos: "Un país sin ciencia es un país sin influencia". No me cabe la menor duda de que los seis millones de parados que actualmente tiene España son consecuencia de la falta de impulso a la ciencia básica durante muchas décadas y a unos presupuestos generales del Estado que, en vez de ciencia y educación, priorizan inversiones que no son las que pueden conducir a un futuro esperanzador para España. Pienso que una lucha por la ciencia, que equivale a la lucha por el bienestar económico y social de España, es también responsabilidad de la Academia y en ello me tendréis también a vuestra disposición.

Muchas gracias.

Agudo, Rubén	Menéndez-Arias, Luis
Airaksinen, Antero	Miller, Eric
Arias, Armando	Moreno, Elena
Ávila, Ana I. de	Moreno, Héctor
Baranowski, Eric	Nájera, Isabel
Beach, Nathan	Nájera, Rafael
Borrego, Belén	Negro, Pedro
Carrillo, Elisa C.	Ochoa, Wendy F.
Charpentier, Nathalie	Ojosnegros, Samuel
Cristina, Juan	Ortega, Ana Mª
Dávila, Mercedes	Ortín, Juan
Díez, Juana	Pallás, Vicente
Domingo, Esteban	Palma, Eduardo L.
Escarmís, Cristina	Pariente, Nonia
Gallego, Isabel	Perales, Celia
García-Arriaza, Juan F.	Portela, Agustín
García-Cueto, Eva	Quiñones-Mateu, Miguel E.
Gebauer, Fátima	Río, Lucía del
Gómez, Jordi	Rocha, Elisabet
Gómez-Mariano, Gema	Rodríguez-Calvo, Teresa
González-López, Claudia	Ruiz-Jarabo, Carmen M.
Grande-Pérez, Ana	Sáiz, Juan Carlos
Gutiérrez-Rivas, Mónica	Sanz-Ramos, Marta
Hernández, Javier	Sevilla, Noemí
Herrera, Mónica	Sheldon, Julie
Herrero, Eva	Sierra, Macarena
Higuera, Ignacio de la	Sierra, Saleta
Holguín, África	Sobrino, Francisco
López-Galíndez, Cecilio	Soria, Mª Eugenia
Luna, Susana de la	Tejero, Héctor
Martín, Verónica	Toja, Miguel
Martínez, Concepción	Torre, Juan Carlos de la
Martínez, Miguel A.	Vayreda, Francesc
Martínez-Salas, Encarnación	Vicente, Óscar
Martín-Hernández, Ana M.	Villanueva, Nieves
Mas, Antonio	Villaverde, Antonio
Mateu, Mauricio G.	Weaver, Scott C.
Medina, Miguel	Yuste, Eloísa

Personas que han trabajado en el laboratorio de Esteban Domingo en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (1978-2012).

Referencias

Batschelet, E., Domingo, E., and Weissmann, C. (1976). The proportion of revertant and mutant phage in a growing population, as a function of mutation and growth rate. *Gene* **1**(1), 27-32.

Briones, C., and Domingo, E. (2008). Minority report: hidden memory genomes in HIV-1 quasispecies and possible clinical implications. *AIDS Rev* **10**(2), 93-109.

Cairns, J., Stent, G. S., and Watson, J. D. (1992). «Phage and The Origins of Molecular Biology. Expanded Edition.» Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Domingo, E. (1989). RNA virus evolution and the control of viral disease. *Prog Drug Res* **33**, 93-133.

Domingo, E. (2006). Quasispecies: Concepts and Implications for Virology. *In Curr Top Microbiol Immunol.* **Vol, 299**.

Domingo, E., Biebricher, C., Eigen, M., and Holland, J. J. (2001). Quasispecies and RNA Virus Evolution: Principles and Consequences. Landes Bioscience, Austin.

Domingo, E., Davila, M., and Ortin, J. (1980). Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. *Gene* **11**(3-4), 333-346.

Domingo, E., Escarmís, C., Menéndez-Arias, L., Perales, C., Herrera, M., Novella, I. S., and Holland, J. J. (2008). Viral quasispecies: dynamics, interactions and pathogenesis, p. 87-118. *In* Origin and Evolution of Viruses, Domingo, E., Parrish, C. and Holland, J.J. (eds.). Elsevier, Oxford.

Domingo, E., Flavell, R. A., and Weissmann, C. (1976). In vitro site-directed mutagenesis: generation and properties of an infectious extracistronic mutant of bacteriophage Qβ. *Gene* **1**(1), 3-25.

Domingo, E., Martínez-Salas, E., Sobrino, F., de la Torre, J. C., Portela, A., Ortín, J., López-Galindez, C., Pérez-Breña, P., Villanueva, N., Nájera, R., VandePol, S., Steinhauer, D., DePolo, N., and Holland, J. J. (1985). The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance—a review. *Gene* **40**(1), 1-8.

Domingo, E., Sabo, D., Taniguchi, T., and Weissmann, C. (1978). Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell* **13**(4), 735-744.

Domingo, E., Sheldon, J., and Perales, C. (2012). Viral quasispecies evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **76**(2), 159-216.

Drake, J. W. (1969). Comparative rates of spontaneous mutation. *Nature* **221**(5186), 1132.

Eigen, M. (1971). Self-organization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* **58**, 465-523.

Eigen, M., and Biebricher, C. K. (1988). Sequence space and quasispecies distribution. *In* «RNA Genetics» (E. Domingo, P. Ahlquist, and J. J. Holland, Eds.), Vol. 3, pp. 211-245. Boca Raton, FL. CRC Press.

Eigen, M., and Schuster, P. (1979). «The hypercycle. A principle of natural self-organization.» Springer, Berlin.

Escarmís, C., Dávila, M., Charpentier, N., Bracho, A., Moya, A., and Domingo, E. (1996). Genetic lesions associated with Muller's ratchet in an RNA virus. *J. Mol. Biol.* **264**, 255-267.

Escarmís, C., Lazaro, E., Arias, A., and Domingo, E. (2008). Repeated bottleneck transfers can lead to non-cytocidal forms of a cytopathic virus: implications for viral extinction. *J. Mol. Biol.* **376**(2), 367-379.

Escarmís, C., Perales, C., and Domingo, E. (2009). Biological effect of Muller's Ratchet: distant capsid site can affect picornavirus protein processing. *J Virol* **83**(13), 6748-6756.

Figlerowicz, M., Alejska, M., Kurzynska-Kokorniak, A., and Figlerowicz, M. (2003). Genetic variability: the key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections. *Medicinal Res. Reviews* **23**(4), 488-518.

Flavell, R. A., Sabo, D. L., Bandle, E. F., and Weissmann, C. (1974). Site-directed mutagenesis: generation of an extracistronic mutation in bacteriophage Q beta RNA. *J Mol Biol* **89**(2), 255-272.

Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schultz, R. A., and Ellenberger, T. (2006). «DNA repair and mutagenesis.» American Society for Microbiology, Washington, DC.

González-López, C., Arias, A., Pariente, N., Gómez-Mariano, G., and Domingo, E. (2004). Preextinction viral RNA can interfere with infectivity. *J. Virol.* **78**(7), 3319-3324.

Holland, J. J., Domingo, E., de la Torre, J. C., and 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.

Holland, J. J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S., and VandePol, S. (1982). Rapid evolution of RNA genomes. *Science* **215**(4540), 1577-1585.

Iranzo, J., Perales, C., Domingo, E., and Manrubia, S. C. (2011). Tempo and mode of inhibitor-mutagen antiviral therapies: A multidisciplinary approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(38), 16008-16013.

Lauring, A. S., and Andino, R. (2010). Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog* **6**(7), e1001005.

Lewontin, R. C. (1974). The Genetic Basis of Evolutionary Change. *Columbia University Press, New York and London.*

Loeb, L. A., Essigmann, J. M., Kazazi, F., Zhang, J., Rose, K. D., and Mullins, J. I. (1999). Lethal mutagenesis of HIV with mutagenic nucleoside analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1492-1497.

Loeb, T., and Zinder, N. D. (1961). A bacteriophage containing RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **47**, 282-289.

Mas, A., Lopez-Galindez, C., Cacho, I., Gomez, J., and Martinez, M. A. (2010). Unfinished stories on viral quasispecies and Darwinian views of evolution. *J Mol Biol* **397**(4), 865-877.

Mateu, M. G., Martínez, M. A., Rocha, E., Andreu, D., Parejo, J., Giralt, E., Sobrino, F., and Domingo, E. (1989). Implications of a quasispecies genome structure: effect of frequent, naturally occurring amino acid substitutions on the antigenicity of foot-and-mouth disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**(15), 5883-5887.

Meyerhans, A., Cheynier, R., Albert, J., Seth, M., Kwok, S., Sninsky, J., Morfeldt-Manson, L., Asjo, B., and Wain-Hobson, S. (1989). Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations. *Cell* **58**(5), 901-910.

Muller, H. J. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mut. Res.* **1,** 2-9.

Mullins, J. I., Heath, L., Hughes, J. P., Kicha, J., Styrchak, S., Wong, K. G., Rao, U., Hansen, A., Harris, K. S., Laurent, J. P., Li, D., Simpson, J. H., Essigmann, J. M., Loeb, L. A., and Parkins, J. (2011). Mutation of HIV-1 genomes in a clinical population treated with the mutagenic nucleoside KP1461. *PLoS One* **6**(1), e15135.

Ojosnegros, S., Perales, C., Mas, A., and Domingo, E. (2011). Quasispecies as a matter of fact: viruses and beyond. *Virus Res* **162,** 203-215.

Ortín, J., Nájera, R., López, C., Dávila, M., and Domingo, E. (1980). Genetic variability of Hong Kong (H3N2) influenza viruses: spontaneous mutations and their location in the viral genome. *Gene* **11**(3-4), 319-331.

Perales, C., Agudo, R., Tejero, H., Manrubia, S. C., and Domingo, E. (2009). Potential benefits of sequential inhibitor-mutagen treatments of RNA virus infections. *PLoS Pathog* **5**(11), e1000658.

Perales, C., Mateo, R., Mateu, M. G., and Domingo, E. (2007). Insights into RNA virus mutant spectrum and lethal mutagenesis events: replicative interference and complementation by multiple point mutants. *J. Mol. Biol.* **369**(4), 985-1000.

Pfeiffer, J. K., and Kirkegaard, K. (2005). Increased fidelity reduces poliovirus fitness under selective pressure in mice. *PLoS Pathogens* **1,** 102-110.

Ruiz-Jarabo, C. M., Arias, A., Baranowski, E., Escarmís, C., and Domingo, E. (2000). Memory in viral quasispecies. *J. Virol.* **74,** 3543-3547.

Ruiz-Jarabo, C. M., Miller, E., Gómez-Mariano, G., and Domingo, E. (2003). Synchronous loss of quasispecies memory in parallel viral lineages: a deterministic feature of viral quasispecies. *J. Mol. Biol.* **333,** 553-563.

Schuster, P. (2010). Genotypes and phenotypes in the evolution of molecules. *In* «Evolutionary Genomics and Systems Biology» (G. Caetono-Anolles, Ed.), pp. 123-152. Wiley-Blackwell, Hoboken. , New Jersey.

Sobrino, F., Dávila, M., Ortín, J., and 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.

Teotonio, H., Chelo, I. M., Bradic, M., Rose, M. R., and Long, A. D. (2009). Experimental evolution reveals natural selection on standing genetic variation. *Nat Genet* **41**(2), 251-257.

Vignuzzi, M., Stone, J. K., Arnold, J. J., Cameron, C. E., and Andino, R. (2006). Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* **439,** 344-348.

von Kleist, M., Menz, S., Stocker, H., Arasteh, K., Schutte, C., and Huisinga, W. (2011). HIV Quasispecies Dynamics during Pro-Active Treatment Switching: Impact on Multi-Drug Resistance and Resistance Archiving in Latent Reservoirs. *PLoS One* **6**(3), e18204.

Watson, J. D., and Crick, F. H. (1953). A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171,** 737-738.

Weissmann, C., Li, J., Mahal, S. P., and Browning, S. (2011). Prions on the move. *EMBO Rep* **12**(11), 1109-1117.

Wright, S. (1932). The roles of mutation, inbreeding, crossbreading, and selection in evolution. *Proc. of the VI International Congress of Genetics* **1,** 356-366.

CONTESTACIÓN
DE LA
EXCMA. SRA. Dª. MARGARITA SALAS FALGUERAS

Excmo. Sr. Presidente,

Excmos. Sres. Académicos,

Señoras y Señores

Tengo hoy el grato honor de dar la bienvenida al Excmo. Sr. D. Esteban Domingo Solans, en nombre de los miembros de esta Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Quiero, en primer lugar, expresar mi profundo agradecimiento a esta Real Academia por haberme confiado este cometido en el que resumiré los méritos que nos llevaron a elegir a Esteban Domingo Académico de número de la misma. Es para mi una satisfacción especial el que se me haya confiado esta misión ya que Esteban Domingo y yo hemos estado muy ligados en tareas de dirección del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". Por otra parte, Esteban Domingo colaboró con Eladio Viñuela, mi marido, con quien estuvo muy unido científicamente. Además, Cristina Escarmís, su mujer, trabajó en mi grupo de investigación durante varios años, determinando por primera vez en España la secuencia de un DNA utilizando el genoma del virus bacteriano ø29.

Esteban Domingo nació en Barcelona. En 1965 se licenció en Ciencias Químicas por la Universidad de Barcelona, obteniendo el grado de Doctor en Bioquímica en 1969 por la misma Universidad, ambos títulos con Premio Extraordinario.

Durante su etapa de doctorado bajo la dirección de los Dres. Fernando Calvet y Jorge Bozal, trabajó sobre la cinética de la xantina deshidrogenasa hepática con diversos sustratos, adquiriendo una excelente base en enzimología. Posteriormente, Esteban Domingo se desplazó a los Estados Unidos para realizar una etapa postdoctoral trabajando desde 1970 a 1973 con el Dr. Robert Warner en la Universidad de California en Irvine. Allí caracterizó por primera vez bacteriófagos de *Azotobacter vinelandii* y su DNA, que empleó

como molde para las RNA polimerasas dependientes de DNA, tanto de *A. vinelandii* como de *Escherichia coli*, estudiando la especificidad de los factores sigma y describiendo una transición entre un complejo de transcripción cerrado o inactivo y otro abierto o activo.

En 1974, Esteban Domingo se trasladó a la Universidad de Zürich trabajando con el Dr. Charles Weissmann hasta 1976. Allí obtuvo el primer mutante infeccioso del fago Qβ por mutagénesis dirigida, lo que permitió calcular por primera vez una tasa de error durante la replicación de un virus RNA. La caracterización de este mutante condujo a la evidencia de dinámica de cuasiespecies para virus RNA.

En 1977 se incorporó al Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", siendo desde 1989 Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en dicho Centro.

En los años 1980-81 realizó una estancia en la empresa biotecnológica Biogen en Suiza trabajando sobre el clonaje molecular y la expresión de genes de interferón humano.

Posteriormente, en 1983, trabajó en el National Institute for Medical Research en Mill Hill, Londres, en el laboratorio del Profesor John Skehel realizando la secuenciación de genes de hemaglutinina del virus de la gripe humana empleando el método de los dideoxinucleótidos de Sanger.

En los años 1988-89 y parte del 93 trabajó en la Universidad de California en San Diego, con el Profesor John Holland. Su investigación consistió en la determinación de eficacia biológica "fitness" y estudios sobre trinquete de Muller empleando el virus de la estomatitis vesicular, obteniendo la primera evidencia de entrada de virus en catástrofe de error por mutagénesis incrementada.

En 1999 realizó una estancia de dos meses en el Scripps Research Institute en La Jolla, California, con el Profesor Michael Oldstone y el Dr. Juan Carlos de la Torre, como asesor en proyectos con arenavirus en relación con evolución y estrategias antivirales.

Los principios de la genética son generales e independientes de que la molécula depositaria del mensaje genético sea DNA o RNA. A pesar de ello, las variaciones genéticas pueden repercutir en cambios de comportamiento

más inmediatos y acusados en elementos genéticos basados en RNA que en los basados en DNA. La base molecular para esta diferencia se halla en la maquinaria replicativa, con actividades de corrección de errores en las DNA polimerasas replicativas de la célula y su ausencia en las RNA replicasas víricas. Esta diferencia se da tanto por la ausencia de una exonucleasa 3' a 5' capaz de escindir nucleótidos incorrectamente incorporados durante la replicación, como por la especificidad que tienen las enzimas de las vías de reparación post-replicativa de reconocer DNA de doble banda y no RNA de doble banda o híbridos DNA-RNA. La acumulación de variantes propicia interacciones entre componentes de espectros de mutantes cuyo resultado es que el conjunto adquiera propiedades colectivas difíciles de explicar a partir de las propiedades de los componentes individuales. Así surge lo que John Holland denomina genética del RNA que tiene implicaciones que alcanzan a la práctica médica, en forma de nuevos protocolos de administración de agentes antivirales que actualmente están en estudio. Ello resalta, una vez más, la capacidad que tiene la ciencia básica de propiciar aplicaciones prácticas.

La incorporación del concepto de cuasiespecies resultó fundamental para la interpretación del comportamiento de los virus con RNA como material genético, principal sistema de estudio de Esteban Domingo. Más recientemente, se ha reconocido que cuasiespecies tiene una creciente aplicabilidad tanto a sistemas celulares como subcelulares, en particular en el caso de los priones. Todo ello está abriendo una nueva manera de entender la evolución biológica. Consiste en que los sistemas biológicos manifiestan como una de sus propiedades intrínsecas la capacidad de generar diversidad, bien sea por su maquinaria replicativa como en el caso de virus RNA, o por las fluctuaciones de los enlaces químicos que determinan diferencias de conformación en proteínas como son los priones. En estos casos podemos hablar de evolución basada en una redistribución de secuencias o de conformaciones. Los componentes minoritarios que ya preexisten en una población pasan a ser mayoritarios como consecuencia de algún cambio ambiental o simplemente del azar, como ocurre como consecuencia de un cuello de botella poblacional. Es decir, lo que la aplicación de la teoría de cuasiespecies nos ha enseñado es a no simplificar la evolución viéndola meramente como un cambio genético y una imposición de lo cambiado, sino como una emergencia dinámica y transitoria de componentes que ya forman parte oculta de un sistema altamente diverso. Este concepto entronca muy oportunamente con descubrimientos actuales, propiciados por las nuevas generaciones de métodos de secuenciación, sobre diversidad de la biosfera a distintos niveles de observación. Las cuasiespecies víricas son un reflejo de una gran microdiversidad producida en cada episodio de infección en un hospeda-

dor individual. Ya empieza a atisbarse que la aplicación de la secuenciación masiva (también denominada ultra-profunda) revolucionará la genética porque permitirá definir, de un modo molecularmente más preciso de lo que ha sido posible hasta ahora, tanto la composición de aquello que es objeto de selección como la composición de lo que ha sido seleccionado. Parece empezar una nueva época para la interpretación de los procesos darwinianos. Quiero resaltar aquí la importante contribución del trabajo de Esteban Domingo.

Es conocido que los fracasos terapéuticos con drogas antivirales han sido constantes desde que se aprobaron los primeros inhibidores de la replicación vírica, muy particularmente con drogas anti-virus RNA como son la ribavirina, que empezó a aplicarse clínicamente en 1972, o la amantadina, empleada contra el virus de la gripe desde 1976, o el AZT, el primer análogo terminador de cadena que se aprobó en 1987 para el tratamiento del SIDA. No se ha descrito ninguna droga o combinación de drogas para las que no se haya producido la selección de virus resistentes. Expertos que estudian las infecciones víricas desde distintos puntos de vista han expresado la necesidad de algún nuevo paradigma para el control de las enfermedades víricas, tanto para su prevención como para su tratamiento. Observaciones sobre vacunas ineficaces y drogas para las que los virus encuentran distintas vías de resistencia han sido constantes durante las últimas décadas. No se puede anticipar si los conceptos evolutivos derivados de la incorporación de cuasiespecies a la comprensión de virus a nivel poblacional van a traducirse en nuevas terapias aplicables. Lo que se está evidenciando cada vez más es que, desde unos inicios puramente teóricos como son las ecuaciones matemáticas desarrolladas por Eigen y Schuster, varios grupos, entre los que cabe destacar el de Esteban Domingo, están explorando nuevos protocolos antivirales muy prometedores, incluso con ensayos clínicos en marcha. Esto constituye otro ejemplo más de que la investigación básica es una fuente inagotable de aplicaciones prácticas que alimentan la economía de un país y, en consecuencia, su prosperidad.

Como resumen de la labor del Profesor Esteban Domingo quiero destacar que sus principales logros científicos han sido:

- El primer cálculo de una tasa de mutación para un virus RNA
- La demostración de la estructura en cuasiespecies de los virus RNA
- Demostración de que la variabilidad antigénica de virus es una consecuencia de la variabilidad genética general
- Desarrollo de la mutagénesis letal como nueva estrategia antiviral

Los trabajos realizados por el grupo del Profesor Esteban Domingo han dado lugar a 360 publicaciones en revistas internacionales del máximo prestigio como son Cell, Science, Nature Genetics, Proceedings of the US National Academy of Sciences, EMBO Journal, PLoS Pathogens o Journal of Virology, fundamentalmente en los campos de la Biología Molecular y Virología. Su índice h es de 66.

Además, su trabajo ha sido reconocido mediante la invitación a impartir seminarios en prestigiosas universidades y centros de investigación como la Universidad de California en Irvine y en San Diego, la Universidad de Columbia de Nueva York, el Scripps Research Institute de La Jolla, el Instituto Pasteur de París o la Royal Society en Londres. Ha formado parte del comité organizador de varias Reuniones y Congresos, destacando recientemente el Congreso de la Federación de Sociedades de Microbiología (FEMS) celebrado en Ginebra en 2011.

Cabe destacar también que ha sido director o codirector de 22 Tesis Doctorales, todas con la máxima calificación y 6 con Premio Extraordinario, y ha sido profesor de asignaturas relacionadas con la Biología Molecular y la Virología en la Universidad Autónoma y en la Universidad Complutense de Madrid, en la Universidad de California en Irvine, en el Instituto Pasteur de París y Hong Kong y en la Universidad de Helsinki.

Es miembro de los comités de evaluación del Departamento de Virología y del Departamento de Infección y Epidemiología del Instituto Pasteur de París, y del National Veterinary Institute de la Technical University de Dinamarca. Desde 2011 es miembro del Global Virus Network, coordinado por el Dr. Robert Gallo. Desde 2007 es Presidente de la Sociedad Española de Virología.

Esteban Domingo ha sido galardonado con importantes Premios y distinciones, entre ellos el Premio de esta Real Academia (1995), el de la Fundación Carmen y Severo Ochoa (1996), el Premio SEISIDA (2002) y el de Cultura Viva (2010). Desde 1991 es miembro de la Organización Europea de Biología Molecular (EMBO), Miembro Honorario de la Sociedad Europea de Virología Veterinaria (desde 1997), miembro de la Academia Europaea (desde 1998) y Miembro Fundador del Instituto Para Limes, Países Bajos (2006). Además, es Doctor Honoris Causa por la Universidad de Lieja, Bélgica (1999) y por la Universidad de Berna, Suiza (2004).

En los años 1992-1993 Esteban Domingo ha sido Director del Instituto de Biología Molecular del CSIC (hoy Instituto de Biología Molecular "Eladio Viñuela") y en el periodo 1994-1995 fue Director del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", organismo dependiente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y de la Universidad Autónoma de Madrid.

También quisiera comentar un aspecto del discurso de Esteban Domingo, y es su mención a sus numerosos colaboradores. En este sentido, tengo que decir que a lo largo de su carrera científica, Esteban Domingo ha formado a excelentes científicos, muchos de los cuales dirigen sus propios grupos de investigación. Además, el ambiente científico lo mantiene fuera del laboratorio, dado que su mujer Cristina Escarmís, ha trabajado con éxito en el campo de la Biología Molecular y la Virología.

Finalmente, en nombre de los miembros de esta real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y en el mío propio quiero darte la bienvenida, Esteban, a esta casa que desde hoy es la tuya, deseándote una grata estancia entre nosotros y una fructífera colaboración en las tareas de esta Real Academia.

Muchas gracias