

ELS VIRUS RNA COM A MODEL EN BIOLOGIA

MIGUEL ÁNGEL MARTÍNEZ

RESUM

En aquest capítol es presenten alguns virus de RNA amb especial èmfasi en els agents que han causat pandèmies recentment, i en els que han estat models per a entendre els mecanismes d'invasió de la cèl·lula hoste i dels mecanismes de replicació. Els virus de RNA utilitzen la variació genètica contínua per a adaptar-se a les condicions canviants del seus hostatges. Aquesta variació està íntimament lligada al seu potencial de causar malalties: escapar de la resposta immunitària, de las vacunes, i d'infectar nous hostes. La causa de la gran variació genètica és deguda a l'alta taxa de mutació (entre 10^4 - 10^5 substitucions/lloc/generació) que posseeixen els virus RNA. Les taxes de mutació durant la replicació del DNA tant de cèl·lules eucariotes com procariotes oscilla entre 10^{-8} i 10^{-11} per nucleòtid copiat. Aquesta alta variabilitat genètica dels virus RNA origina que el virus estigui sotmès constantment a un procés de mutació, competició i selecció d'aquells genomes vírics millor adaptats a un determinat ambient. La complexitat de les poblacions víriques generades per aquests virus fa que la seva evolució dins dels hostes sigui probabilística i diferencial i que no es pugui predir el seu paper tant en la patogènesi com en la naturalesa de noves aparicions víriques.

PARAULES CLAU Origen dels virus, variabilitat vírica, receptors vírics, quasispècies, VIH.

ABSTRACT

This chapter discusses RNA viruses with emphasis on some of agents causing recent pandemics as well as those serving as models for understanding their mechanisms for invading the cell, replicating their genomes, etc. RNA viruses utilize continuous genetic change to adapt to the changing condition environment of their host. Variation is intimately linked to their disease-causing potential; escape from immune responses, challenge of vaccine response as well as infecting new hosts. RNA viruses replicate with high mutation rates, in the range of 10^{-4} to 10^{-5} misincorporations per nucleotide and round of copy. This genetic variability is the main feature that distinguish the evolution of RNA viruses from DNA-based organisms. Mutation rates during the replication of DNA of eukaryotic and prokaryotic cells are between 10^{-8} and 10^{-11} misincorporations per nucleotide and round of copy. The fact that during the RNA viruses replication variant genomes are continuously arising offers adaptive advantages for virus in the face of an environmental change.

KEYWORDS Virus origin, virus variability, víric receptors, quasispecies, HIV.

SÓN ELS VIRUS ORGANISMES DE RECENT APARICIÓ?

Tot i l'aparició, en alguns casos sorprenents, de noves malalties causades per virus, com per exemple el de la immunodeficiència humana (VIH) i més recentment el virus de la CVP (pneumònia per coronavirus), l'existència dels virus no és recent. L'aparició de malalties que mai no s'havien descrit, com són les originades pel VIH i el virus de la CVP, es perceben com quelcom que no existia i que ha començat a sorgir en els darrers anys. Aquesta percepció que tenim actualment també es va tenir al primer terç del segle XX quan s'estengué l'epidèmia originada pel virus de la poliomièlitis. En aquella època es va discutir si aquest virus podia ser de recent aparició, debat que es va cloure curiosament amb la troballa d'un gravat egipci de l'època dels faraons en el qual apareixia representat un alt funcionari amb clars símptomes d'haver patit poliomièlitis (vegeu la figura 1). Canvis de la societat moderna, com el fet que els parts es fessin en condicions d'esterilitat, van originar que la població deixés de vacunar-se d'una manera natural per al virus de la poliomièlitis i es van crear les condicions perquè aquest virus tingués unes condicions millors per a la seva propagació. Així, el que abans era una malaltia rara es va convertir en una epidèmia (Domingo *et al.*, 1996). Aquest és un bon exemple per a destacar quins canvis en la conducta humana, juntament amb canvis ecològics, poden originar brots vírics epidèmics. Com discutirem més endavant, l'origen dels virus està connectat al dels primers organismes unicel·lulars i, per tant, no els podem considerar com organismes de nova aparició.

Durant el segle XIX, tots els agents infecciosos es consideraven virus (la paraula *virus* prové del grec i significa 'verí') fins que Koch va desenvolupar un medi i tècniques de cultiu que permetien un cultiu selectiu de bacteris. Al final del segle XIX, els bacteris s'identificaren com a tals i s'establí la seva relació amb diferents malalties. Al mateix



FIGURA 1 Gravats egipcis d'un home on es poden apreciar seqüeles de la poliomièlitis.

temps, també fou possible distingir-les dels *agents filtrables*, aquells capaços de passar filtres especialment dissenyats per a prevenir el pas de bacteris. Els primers virus descoberts van ser: el virus del mosaic del tabac (1886), el virus de la febre aftosa (picornavirus) (1898), el virus de la febre groga (flavivirus) (1900), el virus del sarcoma de Rous (retrovirus) (1906). Ja que aquest seminari i llibre és interdisciplinari, és important ressaltar el paper que les malalties causades pels virus han tingut en la història de la humanitat. Els virus, sumats a d'altres processos infecciosos, com poden ser bacteris i paràsits, han condicionat la història de la humanitat. Exemples molt clars són la introducció a Amèrica de la verola, el xarampió i el virus de la grip, que pràcticament eliminaren tota la població autòctona. D'igual manera, és molt conegut el brot de grip que es va produir durant la Primera Guerra Mundial, un brot de grip que va matar molta més gent que la guerra (al voltant de vint milions de persones). També és important ressaltar el que ha succeït en els darrers vint anys, en què una nova epidèmia de virus produïda pel VIH condicionarà sobretot el futur d'un continent com és l'Àfrica, en el qual existeixen més de quaranta milions de persones infectades.

QUÈ ÉS UN VIRUS?

Els virus poden definir-se com organismes acel·lulars els genomes dels quals consisteixen en àcids nucleics (DNA o RNA) que obligatòriament es repliquen a l'interior de la cèl·lula la qual infecten utilitzant la maquinària metabòlica cel·lular. (Fields *et al.*, 1996). Els virus no poden, per tant, créixer en un medi estèril, sinó que requereixen la presència de cèl·lules específiques com a hostes. Un virus es diferencia d'una cèl·lula en el fet que ni conté ni codifica la suficient maquinària enzimàtica per a sintetitzar tant

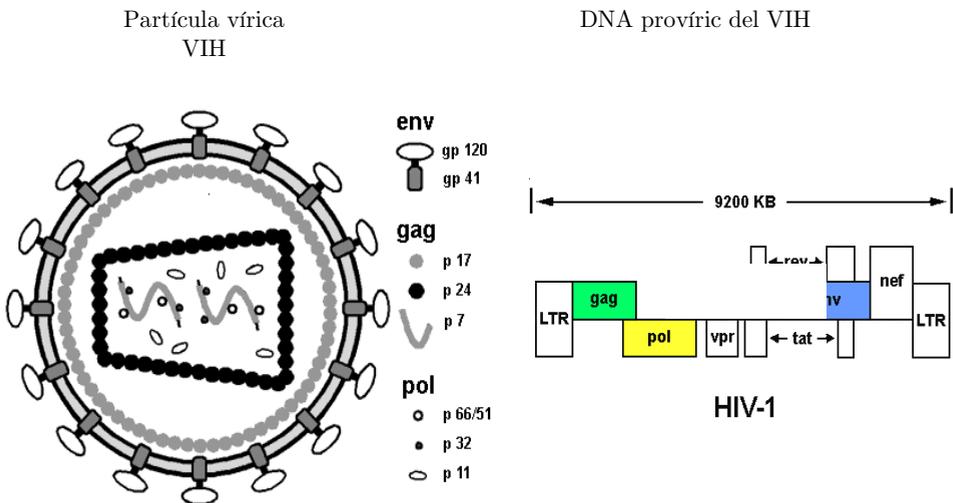


FIGURA 2 Partícula vírica i DNA províric del VIH.

les proteïnes com els àcids nucleics que els componen. D'alguna manera, els virus els podem considerar entre la frontera entre la vida i la no-vida fora ja de la cèl·lula que infecten, i els podem considerar partícules inertes. La classificació dels virus es realitza en funció de la seva morfologia (mitjançant fotografies al microscopi electrònic), serologia (reactivitat antigènica creuada) i material genètic (DNA o RNA). Pel que respecta al material genètic dels virus, és important ressaltar que són els únics organismes que poden tenir RNA en lloc de DNA com a material genètic. Així, per exemple, el VIH, el virus de la CVP, el virus de la poliomièlitis, els rinovirus que causen el constipat comú, el virus de l'hepatitis A o C, el virus de la ràbia, el virus del xarampió o de la grip són virus RNA. Com veurem més endavant, l'RNA fa que aquests virus tinguin una sèrie de característiques especials que poden explicar per una part les malalties que produeixen i per l'altra com en resulta de difícil el control. Això no vol dir que els virus DNA no causin malalties o que no resultin organismes interessants des del punt de vista científic. Exemples de virus DNA són la nombrosa família dels virus *herpes* (origenen una multitud de malalties, que inclouen diversos tipus de càncer), el virus del papilloma (origina càncer cervical en dones), els adenovirus (causants de nombrosos refredats, entre altres malalties) o el virus de la verola.

A la figura 2 podem observar l'estructura tant de la partícula vírica com la del genoma víric del VIH. Aquest virus és un bon representant dels virus RNA i les seves dimensions i moltes de les seves característiques poden estendre's a una gran majoria d'aquesta classe de virus. Les partícules víriques d'aproximadament 100 nm de diàmetre estan compostes per una càpsida formada per diverses proteïnes i codificades pel denominat gen *gag*. Aquesta càpsida vírica està rodejada per una membrana lipídica que conté una glicoproteïna exposada cap a l'exterior i codificada pel gen *env*. Dins de la càpsida vírica es troben els diferents enzims vírics, polimerasa, proteasa i integrasa, codificades pel gen *pol*. Per acabar, dins de la càpsida vírica també es troba el genoma víric compost per dues molècules de RNA de cadena senzilla, polaritat positiva i aproximadament 10 KB de longitud (revisió a Coffin *et al.*, 1997). Com succeeix amb altres famílies de virus, el VIH té un cicle de replicació relativament complex i potser allunyat dels objectius d'aquest capítol. Igual com altres virus animals, el tropisme i l'entrada a la cèl·lula infectada es produeix mitjançant la interacció específica de la glicoproteïna de la coberta vírica i el receptor o coreceptors presents a la superfície exterior de la cèl·lula (els virus vegetals no necessiten un receptor específic per a entrar a la cèl·lula). Així, el VIH utilitza la molècula CD4 com a receptor cel·lular i receptora de quimiocines (CXCR4 i CCR5, entre altres) com a coreceptors. Un cop que s'ha produït la interacció virus-cèl·lula es produeix la desencapsidació de l'RNA víric i aquest és introduït al citoplasma cel·lular, on la polimerasa vírica retrotranscriurà aquest RNA de cadena senzilla en una doble cadena de DNA. Aquesta etapa del cicle de replicació del virus, la retrotranscripció, és la que dona nom a aquesta família de virus, retrovirus, ja que altres virus RNA repliquen els seus genomes sense passar per un intermediari de DNA. El següent pas en el cicle és la integració de la doble banda de DNA (generada durant la retrotranscripció i denominada *DNA províric*) al genoma de la cèl·lula. Aquesta inserció al genoma cel·lular és dependent de la integrasa vírica i és un fet que ocorre en aquesta família de virus, però no a la majoria de virus tant de RNA com de DNA. Aquest enzim s'encarrega de processar tant el DNA cel·lular com el províric i del lligament d'aquest últim al genoma de la cèl·lula. Aquesta integració permet que els retrovirus no solament

es propaguin verticalment sinó també horitzontalment, és a dir, el virus no ha de sortir de la cèl·lula per a multiplicar-se, sinó que la duplicació cel·lular i replicació del genoma cel·lular també origina la replicació del genoma víric. En la majoria dels retrovirus, un cop que es troba integrat el genoma víric, la seva transcripció es troba quasi totalment a expenses de la maquinària cel·lular. Així, quan la cèl·lula està inactiva, el virus també ho està. Tanmateix, certs retrovirus com el VIH han desenvolupat estratègies per a intentar propagar-se quan la cèl·lula està en repòs. Aquestes estratègies, mitjançades per una sèrie de gens vírics denominats *accessoris* i que no s'engloben en els gens vírics anteriorment esmentats *gag*, *pol* i *env* (vegeu la figura 2), es basen en la transactivació específica de gens vírics que originen la producció i transcripció de proteïnes víriques en absència d'activació cel·lular. Un aspecte que cal ressaltar és com els virus, i més concretament els virus RNA, s'apoderen de la maquinària cel·lular i eventualment de tot un organisme, tot i ser organismes molt senzills i posseir genomes petits i amb poca capacitat codificant, és a dir, genomes que posseeixen molt pocs gens (vegeu la figura 2).

<i>Triticum aestivum</i>	16.000.000.000
<i>Homo sapiens</i>	2.900.000.000
<i>Arabidopsis thaliana</i>	200.000.000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12.500.000
<i>Escherichia coli</i>	4.720.000
<i>Mycoplasma genitalium</i>	580.073
<hr/>	
<i>Poxvirus</i>	350.000
<i>Adenovirus</i>	35.937
Virus de la immunodeficiència humana	9.710
Gens de prions	762
Viroides	246

Adaptat de Bove i Flores

FIGURA 3 *Diferents organismes que componen l'arbre de la vida ordenats en funció de la mida del seu genoma.*

QUAN S'ORIGINAREN ELS VIRUS?

Si observem detingudament la figura 3, en la qual hi ha ordenats els diferents organismes que componen l'arbre de la vida en funció de la mida del seu genoma, podem veure que, a excepció del blat, que posseeix un genoma enorme, la complexitat d'un determinat organisme està associada a la mida del seu genoma. També podem observar que els organismes més senzills i amb el genoma menor són els virus i, dins dels virus, els de RNA, com és el cas del VIH que apareix a la figura. Generalment els virus de DNA tenen genomes majors, com és l'exemple que es representa a la figura 3 —poxvirus (virus de la verola) i adenovirus. Un aspecte interessant és el fet que quan consultem els llibres de text de biologia ens trobem un arbre de la vida que més o menys és similar a la representació que es mostra a la figura 3; és a dir, a la base de l'arbre es troben els organismes més senzills i a la capçada els organismes més complexos. Tanmateix, en aquesta organització, que coincideix amb el registre fòssil, no trobem enlloc els virus. Intuïtivament, intentaríem situar-los a baix, amb els organismes més simples, com ocorre amb els bacteris. Ara bé, si ens aturem a pensar una mica podem ràpidament adonar-nos que existeixen virus que infecten bacteris, organismes eucariotes unicel·lulars, plantes, insectes, vertebrats, etc. És a dir, no hi ha organisme que escapi a la infecció dels virus. Arribats a aquest punt, podem concloure que no és tan senzill saber l'origen dels virus i la seva ubicació a l'arbre de la vida.

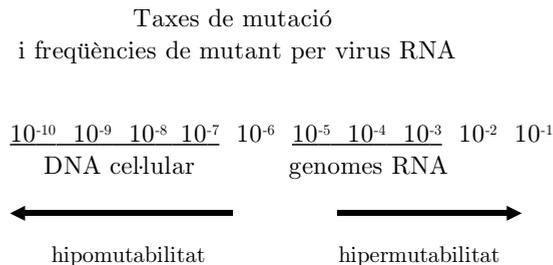
Existeixen tres teories que intenten explicar o buscar l'origen dels virus. La primera d'elles, denominada *evolució regressiva*, suggereix que els virus són formes de vida degenerada que han perdut moltes de les funcions que posseeixen altres organismes i que únicament han retingut la informació genètica essencial per al seu obligat mode de vida parasitari. La segona teoria, denominada *origen cel·lular*, sosté que els virus són conjunts de macromolècules funcionals que han fugit del seu origen intracel·lular i que han aconseguit de ser entitats independents. Finalment, la tercera de les teories afirma que els virus són entitats independents que han evolucionat en paral·lel a la resta dels organismes vius i que igualment s'han originat a partir del primitiu món prebiòtic de l'RNA.

El coneixement de l'origen dels virus és important no tan sols per a ampliar el nostre coneixement sobre la vida orgànica, sinó que també té implicacions pràctiques a l'hora d'esbrinar com s'estan originant les pandèmies de recent aparició originades per diversos virus (VIH, CVP, etc.).

VARIABILITAT GENÈTICA DELS VIRUS RNA

Una de les característiques més importants, si no la principal, dels virus RNA, és el seu gran potencial evolutiu. Aquest potencial evolutiu és degut a la combinació d'una alta taxa de mutació (entre 10^4 - 10^5 substitucions/lloc/generació), un temps curt de generació (hores o uns pocs dies) i la presència, en els organismes infectats, d'un gran nombre de cèl·lules infectades (10^7 - 10^8) que originen una nombrosa progènie vírica (10^{11} - 10^{12}) (Domingo *et al.*, 1996). La variabilitat genètica és el que distingeix l'evolució dels virus RNA de la resta d'organismes que posseeixen DNA com a material genètic (figura 4). Les taxes de mutació durant la replicació del DNA tant de cèl·lules

eucariotes com procariotes oscillen entre 10^{-8} i 10^{-11} per nucleòtid copiat. Aquesta alta variabilitat genètica dels virus de RNA origina que el virus estigui sotmès constantment a un procés de mutació, competició i selecció dels genomes vírics millor adaptats a un determinat ambient. La resposta adaptativa a un canvi ambiental no està conduïda per un únic tipus de genoma víric, sinó per un conjunt de genomes relacionats però no idèntics denominat *quasiespècie*. D'aquesta manera, el conjunt de mutants vírics present en un organisme o individu infectat (denominat *quasiespècie*) conté una sèrie de variants potencialment útils com són, per exemple, els resistents als agents antivírics o resistents a la neutralització per anticossos o a limfòcits T citotòxics. Per tant, no és sorprenent que la població vírica en un individu infectat vagi canviant durant el curs de la infecció. Aquesta estructura poblacional en *quasiespècies* permet als virus RNA una certa probabilitat de trobar una ruta adaptativa en resposta a canvis ambientals. Un exemple d'aquesta gran variabilitat dels virus RNA la podem trobar a la figura 5, en la qual es representa el conjunt de genomes diferents (en aquest cas corresponents al gen que codifica la proteasa vírica del VIH) que es poden trobar en un individu infectat per un virus RNA. Una conseqüència pràctica d'aquesta capacitat adaptativa dels virus RNA ha estat la sistemàtica selecció de virus mutants resistents als diferents inhibidors antivírics. Una clara mostra del potencial evolutiu d'aquests virus és el gran nombre de subtipus del VIH existents (tal com ocorre amb molts altres virus RNA). Des del començament de l'epidèmia del VIH s'han identificat nou subtipus diferents i un gran nombre de virus recombinants intersubtipus. Un bon exemple de la capacitat d'adaptació del VIH és la ràpida expansió del subtipus C al con sud d'Àfrica. A l'inici dels anys noranta en aquesta zona del continent africà predominava el subtipus B, el qual és el que principalment predomina a Europa occidental i al nord d'Amèrica. Tot i així, avui dia el subtipus C representa el 51 % dels 40 milions de persones infectades amb el VIH a l'Àfrica subsahariana. A més a més (no se sap amb certesa), aquest subtipus víric C podria ser més eficaçment transmès per via sexual. La ràpida expansió del VIH de tipus C a Àfrica posa de manifest el fet que les diferències en la transmissió i la patogènesi poden alterar les prediccions tant sobre el futur de les epidèmies originades



Adaptat de Domingo, 1994

FIGURA 4 Taxes de mutació i freqüències de mutant per a virus RNA i organismes DNA.

per virus RNA com del seu impacte clínic. Un altre exemple de l'adaptabilitat dels virus RNA la tenim en el recent salt a l'home del virus de la CVP. En aquest cas, un virus que es replica en un altre organisme que l'allotja genera una variant que és capaç de reconèixer una cèl·lula humana i replicar-s'hi.

A causa de la complexitat de les poblacions de virus RNA, aquests evolucionen dins dels hostes d'una manera probabilística i diferencial (Eigen i Biebricher, 1988) i és impredecible el seu paper tant en la patogènesi com en la naturalesa de nous brots vírics.

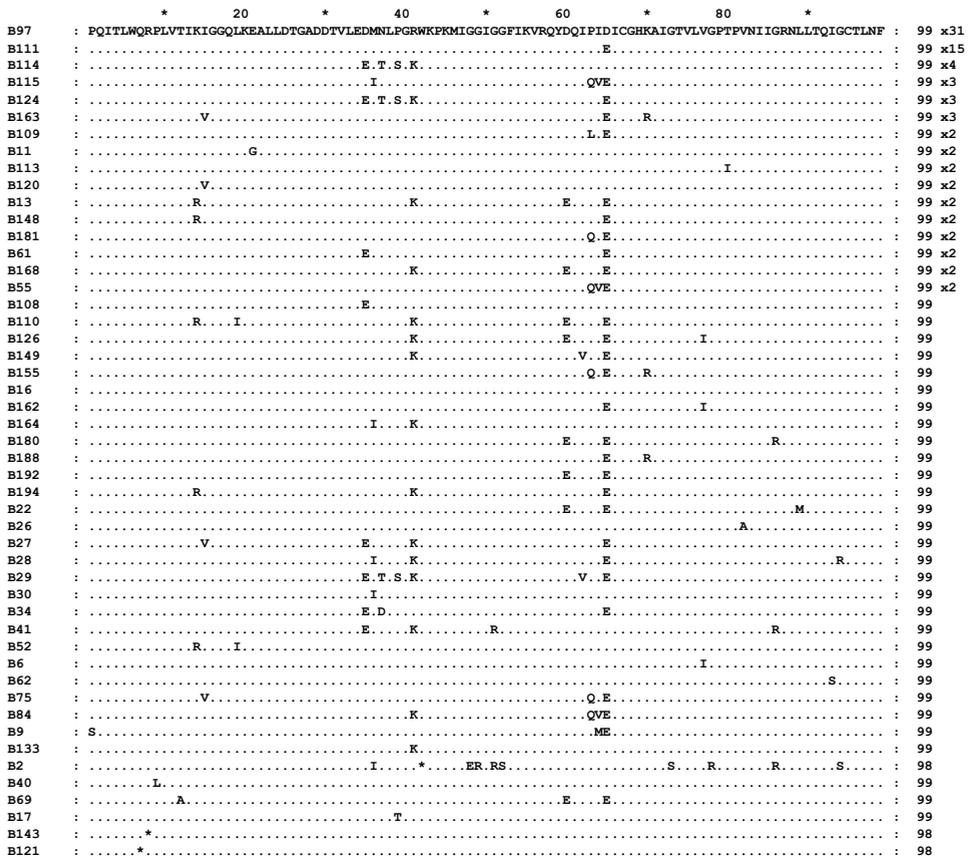


FIGURA 5 Alineament d'aminoàcids corresponents al gen que codifica la proteasa del VIH. Totes les seqüències que s'observen en aquest alineament es van aïllar de la sang d'un únic individu infectat amb el VIH. A la dreta de l'alineament s'indica el nombre de vegades que es va trobar la mateixa seqüència d'aminoàcid.

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

- DOMINGO, E.; ESCARMIS, C.; SEVILLA, N.; MOYA, A.; ELENA, S. F.; QUER, J.; NOVELLA, I. S. I HOLLAND, J. J. (1996). «Basic concepts in RNA virus evolution.» *Faseb. J.*, vol. 10, núm. 8, pàg. 859-64.
- FIELDS, B. N.; KNIPE D. M. I HOWLEY, P. M. (1996). *Virology*. Philadelphia, Nova York: Lippincott-Raven.
- COFFIN, J. M.; HUGHES, S. H. I VARMUS, H. E. (1997). *Retroviruses*. Plainview, EUA: C. S. H. L. Press.
- EIGEN, M. I BIEBRICHER, C. (1988). «Sequence space and quasispecies distribution.» A: DOMINGO, E.; HOLLAND, J. J. I AHLQUIST, P. (cur.) *RNA Genetics*, vol. 3. Pàg. 211-245. Boca Raton: CRC Press.

BIOGRAFIA DE L'AUTOR

El Dr. Miguel Ángel Martínez de la Sierra obtingué el doctorat en biologia molecular i bioquímica a la Universidad Autónoma de Madrid l'any 1989. Després d'una breu estada a l'Institute for Animal Health (Pirbright, RU), realitzà el seu treball postdoctoral al Centro de Biología Molecular Severo Ochoa de Madrid, sota la direcció del Dr. Esteban Domingo Solans. L'any 1992 es va traslladar a la Unitat de Retrovirologia Molecular de l'Institut Pasteur, a París, on va treballar sota la direcció del Dr. Simon Wain-Hobson. El 1996 es reincorporà al Centro de Biología Molecular Severo Ochoa com a investigador contractat. Actualment, i des de l'inici de 1997, dirigeix el Laboratori de Biologia Molecular Bàsica dins el Laboratori de Retrovirologia de la Fundació irsiCaixa, a Badalona. Des de l'inici de la seva tesi doctoral (Variabilidad genética y antigénica del virus de la fiebre aftosa), el seu interès científic s'ha basat en l'estudi dels mecanismes moleculars de la variabilitat i la ràpida evolució dels virus RNA.

CORRESPONDÈNCIA Fundació irsiCaixa, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, 08916 Barcelona.
 mamartz@ns.hugtip.scs.es