

MEMÒRIA EN QUASIESPÈCIES VÍRIQUES. HI HA CAP CONNEXIÓ AMB LA MEMÒRIA NEUROLÒGICA?

ESTEBAN DOMINGO

RESUM

Les quasiespècies víriques poden posseir una memòria molecular consistent en genomes minoritaris que reflecteixen els que van ésser dominants durant una etapa anterior de la evolució del virus. Això és una conseqüència del comportament de las quasiespècies com a sistemes complexos adaptatius. En aquest article s'exploren paral·lismes entre memòria en quasiespècies víriques i memòria neurològica. Se suggereix que els subconjunts de connexions sinàptiques (o les seves conseqüències bioquímiques) poden exercir una funció anàloga en processos de manteniment o pèrdua de memòria

PARAULES CLAU Evolució vírica, quasiespècies, memòria molecular.

ABSTRACT

Viral quasispecies may contain a molecular memory consisting of minority genomes that reflect those genomes that were dominant in a previous phase of quasispecies evolution. This is a consequence of quasispecies behaving as complex, adaptive systems. In the present article, parallelisms between quasispecies memory and neurological memory are explored. It is suggested that subsets of synaptic connections (or their biochemical consequences) may exert a function which is analogous to minority genomes in viral quasispecies, in processes of memory maintenance and decay.

KEYWORDS Viral evolution, quasispecies, molecular memory.

MEMÒRIA EN QUASIESPÈCIES VÍRIQUES

Inspirats per les bases cel·lulars de memòria del sistema immunitari dels vertebrats, al nostre laboratori dissenyem experiments amb el virus de la febre aftosa, encaminats a explorar si les quasiespècies víriques poden posseir una memòria molecular que reflecteixi la seva història evolutiva. Les raons per a aquesta insòlita pregunta foren, per una part, el fet que el sistema immunitari i les quasiespècies víriques comparteixen el fet d'ésser sistemes complexos adaptatius i, també, que la presència de memòria en quasiespècies representaria un avantatge selectiu per a les poblacions víriques que podria ajudar a entendre el seu comportament.

Com a revisió de conceptes bàsics de virologia, i com descriu el Dr. Miguel Ángel Martínez en un altre capítol d'aquest volum, s'ha de destacar que els virus es caracte-

ritzen per tenir un missatge genètic propi l'expressió del qual és totalment dependent de la cèl·lula. A més, i com a fet rellevant de la present exposició, els virus el material genètic dels quals és RNA tenen taxes mitjanes d'error de l'ordre de 10^{-4} errors per nucleòtid copiat (Drake i Holland, 1999). Aquesta xifra representa que és poc probable copiar un motlle de RNA víric en la seva cadena complementària sense introduir-hi cap mutació. La base bioquímica de les altes taxes d'error és l'absència (o poca eficiència) d'activitats correctores d'errors (com l'exonucleasa $3' \rightarrow 5'$) a les RNA replicases i a les retrotranscriptases. A més, un nombre de vies de reparació postreplicativa presents a la cèl·lula hoste —que poden eliminar bases desaparellades— actuen sobre DNA de doble banda però no sobre RNA. Com a conseqüència de la replicació errònia, les poblacions de virus RNA estan formades per distribucions altament dinàmiques de genomes no idèntics, relacionats entre si, que es denominen *quasiespècies víriques* (revisió a Domingo *et al.*, 2001). Durant la replicació de l'RNA víric, les mutacions sorgeixen incessantment, de manera que la millor descripció que podem fer actualment d'un virus RNA és la d'un núvol de mutants la composició del quals modula per l'ambient.

En aquest punt, cal esmentar ja un paral·lisme significatiu entre virus i activitat neurològica en organismes diferenciats. El missatge genètic del virus està sotmès a contínua variació, el conjunt és fluid, plàstic i modificable per estímuls ambientals. Fluïdesa i plasticitat són també termes que s'utilitzen per a descriure la resposta del cervell a estímuls exteriors (com a llibres generals introductoris, vegeu Calvin, 1989 i Staddon, 2001).

La dinàmica de quasiespècies comporta canvis freqüents de capacitat replicativa relativa (també denominada *aptitud biològica* o *fitness*) de les poblacions víriques, tot dependent de canvis ambientals i de les mides poblacionals dels virus que participen a la replicació. En general, colls de botella poblacionals successius o augments de taxes de mutació solen originar descensos de valors de *fitness*. Contràriament, la replicació de grans poblacions de virus en un determinat ambient sol portar a augments de *fitness* relatius mesurats en el mateix ambient revisió a (Domingo *et al.*, 2001).

Utilitzant dos marcadors genètics del virus de la febre aftosa, el picornavirus que causa la malaltia econòmicament més important en medicina veterinària (com a recopilacions recents sobre aquest virus i la malaltia que produeix, vegeu Rowlands, 2003 i Sobrino i Domingo, 2004), hem pogut documentar que, efectivament, existeix una memòria molecular en quasiespècies víriques (Domingo, 2000; Ruíz-Jarabo *et al.*, 2000).

La memòria resideix en una subpoblació dels genomes minoritaris que constitueixen l'espectre de mutants de les quasiespècies (vegeu la figura 1). Els genomes minoritaris memòria reflecteixen els genomes vírics que van ésser majoritaris en una etapa anterior del procés evolutiu de la mateixa població vírica. L'establiment dels genomes de memòria implica les següents etapes (figura 1):

— Selecció d'un component minoritari d'una quasiespècie, que passa a ésser dominant.

— Pèrdua de dominància d'aquest component en cessar el factor selectiu que va imposar la seva dominància. La pèrdua de dominància pot produir-se per reversió o per irrupció d'una subpoblació de *fitness* major.

— En perdre dominància, la subpoblació ocupa un nivell l de freqüència major de la que tenia en l'espectre de mutants en l'inici de tot el procés. Aquest nou nivell l de freqüència es denomina *nivell l memòria* (nivell l 2 a la figura 1).

La transició a escala de memòria es produeix perquè en el procés de selecció (la primera etapa de l'establiment de memòria) els genomes seleccionats guanyen *fitness*. En ésser desplaçats per revertents o competidors, el seu nivell a l'espectre de mutants depèn del valor de *fitness* aconseguit després de la selecció. Això fou documentat experimentalment mitjançant competició de dos virus que diferien 7,6 cops en el valor de *fitness*, amb un virus de *fitness* superior. Un *fitness* 7,6 vegades superior va originar

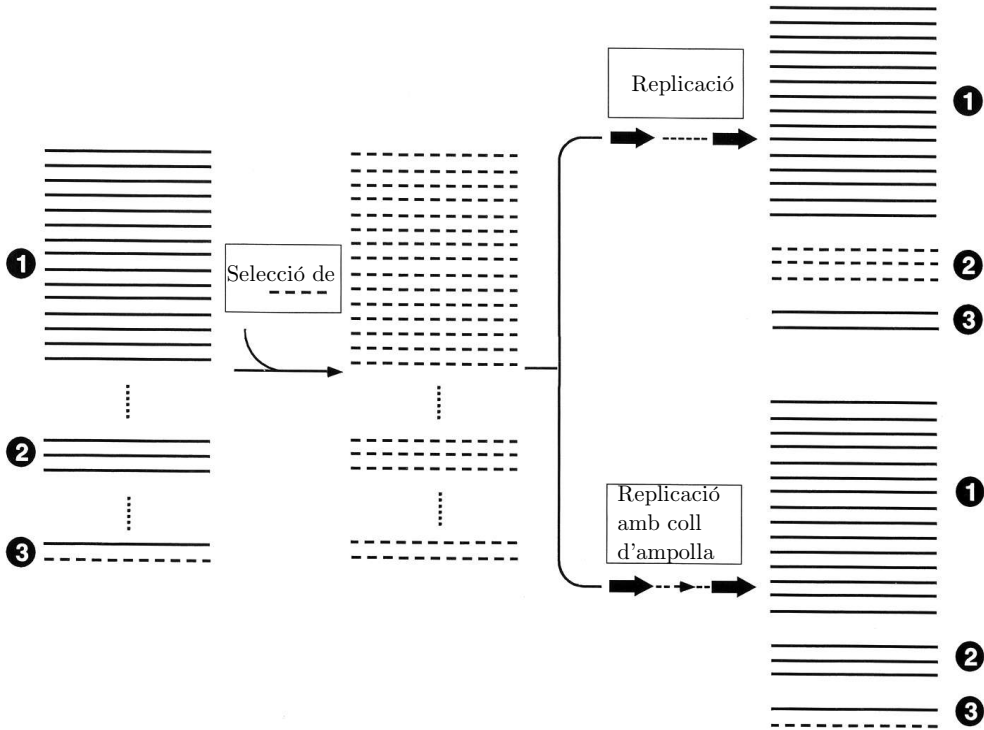


FIGURA 1 Representació esquemàtica de memòria en quasiespècies víriques. La distribució de mutants (quasiespècies) de l'esquerra s'ha dividit arbitràriament en tres nivells (1, 2, 3) segons la freqüència dels genomes. El genoma minoritari del nivell 3 (el de menor freqüència), assenyalat amb una línia discontinua, pot ésser seleccionat i passar a dominar la quasiespècie (distribució central). A causa de la replicació durant la selecció, encara que en successives rondes de replicació sorgeixin genomes competidors (o revertents) de major eficàcia biològica (*fitness*), el genoma desplaçat ocuparà un nivell de freqüència (2) superior al que tenia inicialment (3) (esquema de dalt a la dreta). El nivell de freqüència 2 es denomina nivell memòria. Si durant la replicació s'introdueix un coll de botella poblacional es perd la memòria i el genoma assenyalat amb trets discontinus torna al seu nivell inicial (3). Aquest esquema està basat en resultats experimentals resumits al text i detallats a Ruíz-Jarabo et al., 2000; Arias et al., 2001; Ruíz-Jarabo et al., 2002 i Ruíz-Jarabo et al., 2003.

nivells de memòria de 30 a 100 vegades majors (Ruíz-Jarabo *et al.*, 2002). Més recentment hem demostrat l'existència de memòria al virus de la immunodeficiència humana *in vivo* (Briones *et al.*, 2003). En els casos de memòria tant del virus de la febre aftosa en cultius cel·lulars com del virus de la immunodeficiència humana *in vivo* que hem quantificat, les freqüències que aconseguen els genomes memòria són unes cent vegades superiors a les freqüències que aconseguen inicialment quan són components minoritaris de l'espectre de mutants (Ruíz-Jarabo *et al.*, 2002; Briones *et al.*, 2003).

L'establiment de genomes memòria s'explica amb la mateixa dinàmica de quasiespècies i això ha estat modelat matemàticament (Ruíz-Jarabo *et al.*, 2002; Briones *et al.*, 2003). Una sèrie d'experiments control recolzen el model de memòria en quasiespècies que acabem de resumir i que es descriu esquemàticament a la figura 1. Aquests experiments són: *a)* línies evolutives mantingudes en paral·lel però que mai no han passat per dominància dels genomes destinats a ésser memòria, que van mantenir sempre aquests genomes a nivells 10^2 vegades menors que els nivells memòria. Les diferències entre els valors de freqüència van ésser sempre estadísticament significatius. *b)* La introducció de colls de botella poblacionals dóna peu a pèrdua de memòria. Aquesta dada demostra que els genomes memòria es mantenen com a part de l'espectre de mutants i reforça el concepte que la memòria en una propietat de la quasiespècie en el seu conjunt (Domingo, 2000; Ruíz-Jarabo *et al.*, 2000; Ruíz-Jarabo *et al.*, 2002).

EL PROCÉS DE PÈRDUA DE MEMÒRIA

Utilitzant un dels marcadors de memòria del virus de la febre aftosa —un triplet RED en un lloc antigènic de la superfície del virus que reverteix a RGD en el procés de l'establiment de memòria (Ruíz-Jarabo *et al.*, 2000)— hem quantificat el procés de pèrdua de memòria en línies evolutives paral·leles. Sorprenentment, el procés de pèrdua de memòria va seguir un patró paral·lel a les quatre línies, tot i que la seva base molecular va ésser l'aparició estocàstica de mutacions (Ruíz-Jarabo *et al.*, 2003). El patró notablement paral·lel en quatre processos evolutius independents va identificar una característica determinista en el comportament de quasiespècies víriques.

La seqüenciació de molts clons biològics de la població vírica en el procés de pèrdua de memòria va indicar que la pèrdua va associada a l'aparició de mutants entorn de la zona codificant del RED, de manera que la freqüència de genomes memòria codificants de RED es redueix en benefici d'altres variants. És a dir, la pèrdua de memòria comporta un procés de difusió en l'espai de seqüències (Domingo *et al.*, 2001).

SISTEMES COMPLEXOS ADAPTATIUS

El comportament de les quasiespècies víriques té diverses característiques pròpies d'un tipus de sistemes —ja esmentats en la introducció d'aquest article— que es denominen *sistemes complexos adaptatius* (revisió a Domingo *et al.*, 2001). Aquests sistemes es caracteritzen per tenir múltiples components que mantenen un nucli d'informació invariable, però que són capaços de respondre a estímuls del medi exterior modificant la seva composició detallada. Així, el virus de la grip manté contínuament un compor-

tament caracteritzat pel potencial de donar peu a *malaltia* (amb un rang de símptomes no sempre predicibles però parcialment catalogables) mentre que el virus canvia genèticament de manera incessant. Com escrivien J. Gómez i els seus associats, «un virus es redefeix contínuament genèticament i fenotípicament» (Gómez *et al.*, 1999). Un exemple clàssic d'aquest comportament el constitueix el sistema immunitari dels vertebrats, que manté un nucli d'organització que determina característiques generals del seu comportament, però que a la vegada està dissenyat per a respondre a estímuls externs com són els antigens que reconeix com a no propis. En la seva estructura destaca la presència de subpoblacions cel·lulars de memòria (Frank, 1996), que ofereixen un paral·lisme molt ressaltable amb les subpoblacions de genomes memòria en quasiespècies víriques.

EL SISTEMA NERVIÓS COM A SISTEMA COMPLEX ADAPTATIU

El cervell humà té unes 10^{11} neurones que estableixen de l'ordre de 10^3 a 10^4 connexions per neurona, fet que dona peu a la increïble xifra de l'ordre de 10^{14} connexions sinàptiques (Staddon, 2001). Pel que coneixem avui dia, aquestes connexions no estan organitzades de manera predeterminada, controlada i fixa, sinó que s'estableixen de mode altament dinàmic i plàstic i, almenys en part, en resposta a estímuls que l'individu rep del món exterior (Calvin, 1989; Churchland, 2002). El detall de les connexions neuronals que determinen les nostres facultats de percepció (inclosa la consciència, encara que és un punt que voldria consideracions que van més enllà dels objectius d'aquest article) es construeixen molt probablement en resposta a experiències prèvies, de mode similar a com una població vírica redefeix la seva composició detallada com a resposta a modificacions ambientals. Actualment es pensa que el soroll, variabilitat i indeterminació que s'observa entre les neurones i les seves interaccions es compensa amb la seva plasticitat, reflectida en una capacitat per a modificar les seves propietats de senyalització (Laughlin i Sejnowski, 2003). El sistema nerviós, com altres sistemes complexos adaptatius, té una base anatòmica que li proporciona un nucli amb característiques invariants i a la vegada components individuals (connexions sinàptiques) que varien de manera altament dinàmica.

CORBES DE PÈRDUA DE MEMÒRIA NEUROLÒGICA

Les primeres corbes de pèrdua de memòria neurològica van ésser establertes ja al segle XIX per Herman Ebbinghaus i han aguantat de manera molt notable el pas del temps tot i les diverses millores metodològiques (revisió a Staddon, 2001). La pèrdua de memòria neurològica recorda la pèrdua altament reproduïble observada en quasiespècies víriques (Ruíz-Jarabo *et al.*, 2003), encara que, per la diferent natura de les mesures efectuades, no ha estat possible analitzar fins a quin punt ambdues pèrdues de memòria són funcions amb una base matemàtica que suggereix paral·lismes als mecanismes subjacents.

El procés de pèrdua de memòria neurològica s'ha interpretat com un procés de difusió a l'«espai psicològic» que ocorre quan cessa l'estímul objecte de memòria (Shepard,

1987; Staddon, 2001). El concepte d'«espai psicològic» va ésser introduït com un intent d'aplicar principis de física a la psicologia. Concretament, l'espai psicològic de cada individu es mapa en un espai físic que defineix distàncies mètriques entre estímuls capaços de provocar una resposta. En aquest espai, la probabilitat que la resposta a un estímulo es pugui estendre a un altre depèn de la distància entre els dos estímuls (Shepard, 1987; Staddon, 2001). La difusió de l'espai psicològic té un notable paral·lisme conceptual amb el procés de difusió a l'espai de seqüències d'aminoàcids que caracteritza la pèrdua de memòria en quasiespècies víriques (per a una discussió en aquest punt, vegeu Ruíz-Jarabo *et al.*, 2003).

Com en tot sistema complex adaptatiu dotat d'una memòria d'esdeveniments passats, és important establir mecanismes que assegurin un equilibri entre oblidar i retenir. De fet, aquest és un reflex d'un dilema més ampli entre plasticitat i estabilitat que ha d'afrontar contínuament la selecció natural. En efecte, un sistema ha de mantenir un nucli d'informació i de capacitat funcional invariant i, a la vegada, tenir la suficient flexibilitat per a respondre a noves circumstàncies i a estímuls externs. Aquest concepte ha estat expressat per S. Grossberg (Grossberg, 1987) i explorat per molts autors (vegeu Calvin, 1989).

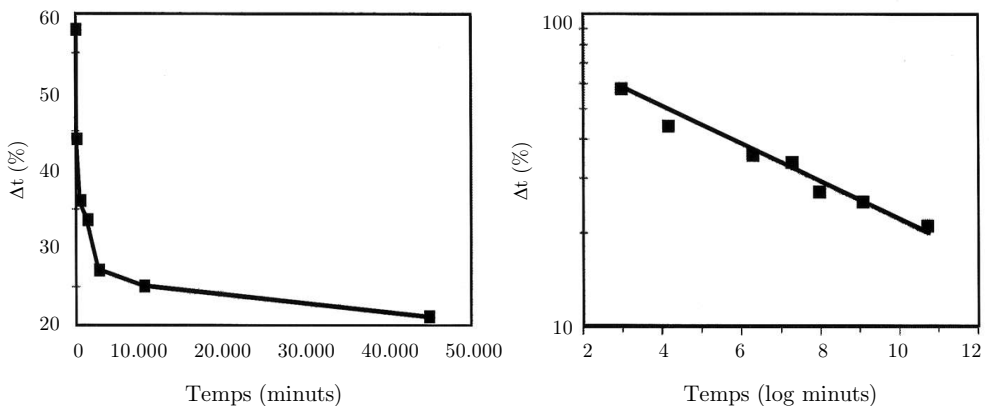


FIGURA 2 Corbes de pèrdua de memòria de Herman Ebbinghaus (1885), que va realitzar experiments amb ell mateix, mesurant el temps que trigava a aprendre grups de tretze síl·labes sense significat. (Qui obtindria avui una subvenció per a tal projecte?). Δt (%) (savings) representa la diferència entre el temps que li va costar d'aprendre la llista la primera vegada i el temps que li va costar d'aprendre-la de nou, al cap del temps indicat a les abscisses, expressat en percentatge del temps que li va costar la primera vegada. Sorprenentment, tot i les nombroses imprecisions en el procediment experimental, el tipus de funció obtinguda per Ebbinghaus ha estat confirmada utilitzant altres mètodes en diversos estudis realitzats durant el segle XX (com a revisió d'aquests experiments, vegeu Staddon, 2001)

UNA HIPÒTESI DE TREBALL

La memòria neurològica i la memòria de les quasiespècies víriques són, més probablement, sistemes anàlegs que homòlegs. No sembla molt raonable científicament aventurar paral·lelismes mecànics. No obstant això, és temptador proposar, com a hipòtesi de treball, que el paper dels genomes minoritaris en una distribució de mutants el fa el nombre i la força de les connexions sinàptiques en el sistema nerviós. L'empremta de l'experiència passada —com es recorda un esdeveniment passat— pot ésser donada pels pesos sinàptics o les corresponents intensitats de senyalització o, en termes generals, les seves conseqüències bioquímiques. Aquests pesos sinàptics (o les seves conseqüències) que romanen per conferir-me una memòria del que va ocórrer abans (ahir, quan un dels meus estudiants va explicar els seus resultats al seminari dels dilluns), són un subconjunt (en nombre o intensitat) de tots els pesos que adquiriren la seva màxima intensitat quan el seminari ocorria. L'experiència directa produeix pesos sinàptics de la màxima intensitat, igual com la dominància de genomes segueix la selecció directa, prèvia a l'establiment de la memòria (figura 1). El paper dels pesos sinàptics romanents —quan l'episodi abans dominant ha passat a ésser memòria— el tenen els genomes minoritaris *memòria* en quasiespècies víriques.

No estic convençut —pel meu desconeixement de metodologia experimental en neurobiologia— que aquesta proposta tingui un mínim de versemblança o que ajudi en el plantejament d'experiments, bé per comprendre millor la memòria neurològica, bé per comprendre la memòria en virus. Tot i que sigui, fins i tot, una proposta trivial, atès el desenvolupament de teories que afavoreixen una dinàmica darwinista per a explicar mecanismes de percepció i resposta a estímuls externs. Així, repetint conceptes de W. H. Calvin (el qual recopila bibliografia anterior que proposa idees similars), desencadenar, per exemple, un moviment físic en resposta a un estímulo extern, depèn d'una relació spatiotemporal entre moltes neurones. Sens dubte, el joc darwinista de variació i selecció dependrà de «comitès», igual com el darwinisme biològic depèn de poblacions que modifiquen les seves característiques. O, encara més clar, els principis darwinians que formaren la vida sobre la Terra en el decurs de milions d'anys, que cada dia reconfiguren el sistema immunitari dels nostres cossos, han florit en els caps humans, en una escala de temps encara més accelerada. De manera molt semblant com es va desenvolupar la vida, la nostra vida mental s'enriqueix progressivament, permetent a cadascú de nosaltres crear el nostre propi món. Parafraçant Charles Darwin, «hi ha grandiositat en aquest punt de vista de la ment» (Calvin, 1989).

Personalment, com a viròleg em fascina que els mateixos principis darwinians que han regit l'evolució biològica siguin de la mateixa natura que els mecanismes que determinen l'adaptabilitat i la patogenicitat dels virus o l'activitat neuronal que ens permet tractar d'entendre els conceptes subjacents. La diferència és l'escala de temps en què els principis darwinians actuen.

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

- ARIAS, A.; LÁZARO, E.; ESCARMÍS, C. I DOMINGO, E. (2001). «Molecular intermediates of fitness gain of an RNA virus: characterization of a mutant spectrum by biological and molecular cloning.» *J. Gen. Virol.*, vol. 82, pàg. 1049-1060.
- BRIONES, C.; DOMINGO, E. I MOLINA-PARÍS, C. (2003). «Memory in retroviral quasispecies: experimental evidence and theoretical model for human immunodeficiency virus.» *J. Mol. Biol.*, vol. 331, pàg. 213-229.
- CALVIN, W. H. (1989). *The cerebral symphony. Seashore reflections on the structure of consciousness. An authors guild.* Lincoln, NE, EUA: Backinprint.com.
- CHURCHLAND, P. M. (2002). *Brain-Wise. Studies in neurophilosophy.* Cambridge, Massachusetts, EUA: The MIT Press.
- DOMINGO, E. (2000). «Viruses at the edge of adaptation.» *Virology*, vol. 270, pàg. 251-253.
- DOMINGO, E., BIEBRICHER, C., EIGEN, M. I HOLLAND, J. J. (2001). *Quasispecies and RNA virus evolution: principles and consequences.* Austin, EUA: Bioscience.
- DRAKE, J. W. I HOLLAND, J. J (1999). «Mutation rates among RNA viruses.» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 96, pàg. 13910-13913.
- FRANK, S. A. (1996). *The design of natural and artificial adaptive systems.* San Diego: Academic Press. Pàg. 451-505.
- GÓMEZ, J.; MARTELL, M.; QUER, J.; CABOT, B. I ESTEBAN, J. I. (1999). «Hepatitis C viral quasispecies.» *J. Viral Hepat.*, vol. 6, pàg. 3-16.
- GROSSBERG, S. (cur.) (1987). *The adaptive brain.* Amsterdam: Elsevier.
- LAUGHLIN, S. B. I SEJNOWSKI, T. J. (2003). «Communication in neuronal networks.» *Science*, vol. 301, pàg. 1870-1874.
- ROWLANDS, D. J. (cur.) (2003). «Foot-and-mouth disease.» *Virus Res.*, vol. 91, pàg. 1-161.
- RUIZ-JARABO, C. M.; ARIAS, A.; BARANOWSKI, E.; ESCARMÍS, C. I DOMINGO, E. (2000). «Memory in viral quasispecies.» *J. Virol.*, vol. 74, pàg. 3543-3547.
- RUIZ-JARABO, C. M.; ARIAS, A.; MOLINA-PARÍS, C.; BRIONES, C.; BARANOWSKI, E.; ESCARMÍS, C. I DOMINGO, E. (2002). «Duration and fitness dependence of quasispecies memory.» *J. Mol. Biol.*, vol. 315, pàg. 285-296.
- RUIZ-JARABO, C. M.; MILLER, E.; GÓMEZ-MARIANO, G. I DOMINGO, E. (2003). «Synchronous loss of quasispecies memory in parallel viral lineages: a deterministic feature of viral quasispecies.» *J. Mol. Biol.*, vol. 333, pàg. 553-563.
- SHEPARD, R. N. (1987). «Toward a universal law of generalization for psychological science.» *Science*, vol. 237, pàg. 1317-1323.
- SOBRINO, F. I DOMINGO E. (cur.) (2004). *Foot-and-mouth disease: current perspectives.* Londres: Horizon Press.
- STADDON, J. E. R. (2001). *Adaptive dynamics. The theoretical analysis of behavior.* Cambridge, Massachusetts, EUA: The MIT Press.

AGRAÏMENTS

Agraïxo a C. M. Ruiz-Jarabo, A. Arias, C. Escarmís i C. Briones la seva important contribució a l'estudi experimental de memòria en virus. Treballa amb el suport dels ajuts BMC2001-1823-C02-01, CAM 08.2/0046.1/2000, CAM 08.2/0015/2001.1 i la Fundació Ramón Areces.

BIOGRAFIA DE L'AUTOR

Doctor en Química i professor d'investigació al CSIC, al Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid. És director del Centro de Investigación de Sanidad Animal (CISA-INIA) a Valdeolmos, Madrid, i un dels científics fundadors del Centro de Astrobiología de Torrejón de Ardoz, Madrid. El Dr. Esteban Domingo ha treballat en virologia molecular, un camp al qual ha contribuït amb la quantificació de les elevades taxes de mutació i amb l'estudi de la dinàmica de quasiespècies que operen durant la replicació vírica. Els seus interessos actuals van des de la caracterització de les quasiespècies i de l'origen de la vida a la replicació amb error de còpia, les implicacions de la dinàmica de les quasiespècies en el comportament víric i el desenvolupament de noves estratègies antivíriques que tenen en consideració les altes taxes de mutació i la dinàmica de quasiespècies dels virus de RNA.

CORRESPONDÈNCIA Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Cantoblanco, 28049 Madrid. Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA), Valdeolmos, 28130 Madrid.
edomingo@cbm.uam.es, edsolans@inia.es