

SIMULACIÓN COMPUTACIONAL DE LA EVOLUCIÓN DE UNA POBLACIÓN
DE ROTAVIRUS SA11 SOMETIDA A
MUTACIONES PUNTUALES Y RECOMBINACIÓN
BAJO SUCESIVOS CUELLOS DE BOTELLA GENÉTICOS

CÉSAR TULIO SALDAÑA FERNÁNDEZ
csaldana@javeriana.edu.co

PROYECTO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar al título de

Biólogo

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BIOLOGÍA
Bogotá, D. C.
Bogotá D.C Marzo 1 de 2005

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

SIMULACIÓN COMPUTACIONAL DE LA EVOLUCIÓN DE UNA POBLACIÓN
DE ROTAVIRUS SA11 SOMETIDA A
MUTACIONES PUNTUALES Y RECOMBINACIÓN
BAJO SUCESIVOS CUELLOS DE BOTELLA GENÉTICOS

CÉSAR TULIO SALDAÑA FERNÁNDEZ
csaldana@javeriana.edu.co

APROBADO

EUGENIO ANDRADE, Quim. MSc.
Director

MANUEL RUIZ , Biol. Ph.D
Codirector

Juan Carlos Vaca, Biol. MSc. PhD,
Jurado

Carlos Estévez, Biol. MSc
Jurado

SIMULACIÓN COMPUTACIONAL DE LA EVOLUCIÓN DE UNA POBLACIÓN
DE ROTAVIRUS SA11 SOMETIDA A
MUTACIONES PUNTUALES Y RECOMBINACIÓN
BAJO SUCESIVOS CUELLOS DE BOTELLA GENÉTICOS

CÉSAR TULIO SALDAÑA FERNÁNDEZ
csaldana@javeriana.edu.co

APROBADO

Ángela Umaña
Decano Académico

Cecilia Espíndola
Directora de Carrera

A mi Madre por su inmenso
sacrificio,
y a mi Padre que anhelo en vida este
momento.

Hay hombres que ven las cosas como
son y se preguntan ¿por qué?, yo
pienso en las cosas que no existen y me
pregunto ¿por qué no?

Gilbert Shaw

CONTENIDO

Resumen

INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. Estado del arte.....	5
2.2. BIOINFORMÁTICA CAS Y PAISAJES ADAPTATIVOS.....	22
2.3. Biología molecular de Rotavirus.....	25
2.4. Ecología de Rotavirus.....	29
2.5. Hiper ciclos.....	30
2.6. Cuasiespecie.....	30
2.7. Umbral del error.....	32
2.8. La mutación en la evolución de virus RNA.....	33
2.9. La recombinación en la evolución de virus RNA.....	35
2.10. Biología evolutiva de los virus RNA.....	37
2.10.1. Deriva genética.....	37
2.10.2. Cuellos de botella.....	38
2.10.3. Selección Darwiniana.....	39
2.10.4. Memoria molecular.....	39
2.10.5. Eficacia biológica o habilidad replicativa.....	40
2.10.6. Equilibrio puntuado.....	40
2.10.7. La Reina Roja en la competencia.....	41
2.10.8. Trinque de Muller.....	41
2.10.9. Tasa de divergencia.....	42
2.10.11. Balance mutación-selección en cuasiespecies.....	42
2.11. Densidad viral (m.o.i).....	43
2.12. Sinergismo y acciones colectivas en poblaciones de virus RNA.....	43
2.13. Perl 6.0.....	44
3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	45
3.1. Formulación del problema.....	45
3.2. Pregunta de Investigación.....	48
3.3. Justificación.....	48
4. OBJETIVOS	49
4.1. General.....	49
4.2. Específicos.....	49
4.2.1. Diseño y programación del algoritmo.....	49
4.2.2. Simulación computacional.....	50
4.2.3. Principios evolutivos evidenciados en el paisaje adaptativo.....	50

5. MATERIALES Y MÉTODOS	50
5.1. Diseño de la investigación.....	50
5.1.1. Población y estudio de muestra.....	53
5.1.2. Variables de estudio.....	54
5.2. MÉTODOS	
5.2.1. <i>Diseño y programación del algoritmo</i>	55
5.2.1.1. Operadores genéticos (influencia interna).....	56
5.2.1.2. Deriva genética y cuellos de botella (influencia externa).....	56
5.2.1.3. Criterios de selección para las secuencias de Rotavirus.....	57
5.2.1.4. Consenso poblacional.....	57
5.2.1.5. Programación en Perl (construcción de módulos).....	58
5.2.2. <i>Simulación computacional</i>	59
5.2.2.1. Subprogramas simuladores.....	59
5.2.2.2. Montaje y ejecución de DOTHEVOLUTIONVIRUS.....	60
5.2.3. <i>Principios evolutivos paisajes evidenciados en adaptativos</i>	60
5.2.3.1. Cálculo de la eficacia biológica.....	61
5.2.3.2. Representación en el paisaje adaptativo.....	62
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
7. CONCLUSIONES	105
8. RECOMENDACIONES	107
REFERENCIAS	110

Agradecimientos:

A mi Madre y a mi Padre porque gracias a ellos esto se hizo realidad. A Eugenio Andrade (Director del Grupo de Biología teórica de la Universidad Nacional) por su colaboración en el desarrollo del trabajo. A Manuel Ruiz por sus clases y su colaboración en el desarrollo del trabajo (Director del laboratorio de Genética de poblaciones-Pontificia Universidad Javeriana), Fidel Ramírez (Biólogo Universidad Nacional) por su asesoría en la programación. A Isabel Novella (Department of Microbiology and Immunology-Medical College of Ohio) por su motivación y asesoría

conceptual y experimental en la evolución de virus RNA. A Carlos Guerrero (Director de la Maestría de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional) por sus enseñanzas en el laboratorio y por su asesoría en la bioquímica de los Rotavirus. A todos aquellos que confiaron en mí y a todos aquellos que ya saben quienes son.

INTRODUCCIÓN

El grupo A de Rotavirus es el principal agente etiológico de diarreas graves en aves, bovinos, porcinos, murinos y primates incluyendo al hombre. Cada año el grupo A de rotavirus causa 870.000 muertes de niños, siendo mayoritarias en países subdesarrollados (Bern et al 1992, revisado en Borgan et al 2003); se han diseñado vacunas contra rotavirus y sin embargo estas no han tenido éxito por sus efectos secundarios como lo reporta el Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos en el año 2000. Las medidas profilácticas afirman que la infección de rotavirus depende directamente de la calidad de las aguas y por tanto presenta repercusiones ecológicas dado que estos virus son muy estables en el medio ambiente (Metcalf, 1982)

La dinámica evolutiva de las poblaciones de virus RNA puede ser estudiada bajo un modelo darwiniano (cuasiespecies) mediante algoritmos genéticos y sistemas adaptativos complejos (Wilke and Novella 2003) dado que dicha dinámica puede ser representada en un paisaje adaptativo como lo demuestra Holland (1993), evidenciando principios de la biología evolutiva aplicados a poblaciones virales. Gracias a esto la bioinformática se ha consolidado en los últimos años como una ciencia biológica encargada del modelamiento de sistemas biológicos y procesos biológicos complejos como la evolución.

Las altas tasas mutacionales, tiempos cortos de replicación, grandes tamaños poblacionales, los rearreglos y recombinaciones en las poblacionales de RNA virus generan constantemente nuevos tropismos celulares garantizando la supervivencia de la población ante cambios en las condiciones (Domingo and Holland 1997; Novella et. al 1999 y Wilke y Novella 2003). Las altas tasas de mutación fluctúan alrededor del umbral del error y por consiguiente permiten la supervivencia y la extinción de virus RNA *in vitro*, *in vivo* e *in silico* dado que se fijan mutantes dentro de la población (independientemente de su valor selectivo) por el balance continuo de la mutación-selección característico de la optimización de la cuasiespecie, dichos mutantes se ven aventajados o desaventajados por selección positiva o negativa y son fijados dentro de

la población dependiendo de las condiciones del medio y pueden entrar en periodos de estasis evolutivo sin las condiciones permanecen constantes.

La eficacia biológica (habilidad replicativa) de las poblaciones virales es dependiente de la tasa de mutación, la eficacia inicial (W_0), la densidad viral-m.o.i- (Novella 2004), y se ve fuertemente influenciada por la cantidad de cuellos de botella genéticos (Novella et. al 1995, 1999, 2004).

A partir de la proporción entre mutantes y silvestres antes y después de cada cuello de botella se puede calcular la eficacia biológica de cada población, representándola en un paisaje adaptativo (en este de caso de un pico dado que los criterios de selección fueron constantes) que permite evidenciar el efecto de operadores genéticos como la mutación y la recombinación a través de sucesivos ciclos de replicación y cuellos de botella.

La población clonal típica de los RNA virus se denomina cuasiespecie (Eigen 1971, 1988, 1993, 1996, 2002), fue inicialmente formulada a nivel teórico para explicar los orígenes de la información genética y ha sido evidenciada a nivel experimental en VSV (Holland et al 1991; Novella et. al 1995, 1999, 2004) y FMDV (1993) sin embargo dicha distribución presenta indicios en poblaciones de fagos Qb40, fago o6, HIV, influenza A, rabia, la hepatitis C, entre otros (Domingo and Holland 1997; Chao 1990, Holland et. al,1991; Cichutech et. al, 1992; Dockter, 1996; Morimoto et. al 1998; Farsi et. al. 2002).

Los estudios evolutivos de poblaciones virales fundamentados en cuasiespecies y realizados *in vivo*, *in vitro* e *in sillico* siempre han tenido en cuenta las altas tasas mutacionales (Chao 1988; Chao 1990; Holland et. al 1991; Novella et. al 1995; Maree et. al 2000; Lázaro et. al 2002; Maree et al; Bonhoeffer et. al 2002) sin embargo pocos han tenido en cuenta el proceso de recombinación bajo un modelo de cuasiespecie (Bruyeré et al., 2000), proceso importante en la generación de nuevas variantes y un posible mecanismo de corrección errores (Chao, 1988) bajo sucesivos cuellos de botella. La recombinación ha sido reconocida como un mecanismo eficaz para disminuir las mutaciones deletéreas (Chao, 1988) y es común tanto en virus segmentados como rotavirus, influenza y HIV (Human Inmunodeficiense Virus) y no

segmentados, como VSV (Vesicular Stomatitis Virus) y FMDV (Food and Mouth Disease Virus o fiebre aftosa).

Dado que son pocos los estudios que tienen en cuenta la recombinación en la evolución de poblaciones de secuencias (VP1 y VP2) y es poco lo que se sabe de la evolución de los Rotavirus, se vió la necesidad de construir un algoritmo que permite simular la evolución de una población viral (VP1 y VP2) sometida a mutación y recombinación (homóloga y heteróloga) bajo sucesivos cuellos de botella; esto a partir de una secuencia maestra inicial de nucleótidos del Rotavirus A (Simian Rotavirus type A-11) publicada en el Gene Bank, teniendo en cuenta la acumulación de mutaciones puntuales, el umbral del error (95% de homología) y la formación de la secuencia consenso dentro de la población (secuencia promedio), así como las secuencias de nucleótidos y péptidos implicados en la replicación como criterios de selección.

Las secuencias de Rotavirus SA11 VP1 (3302nts) y VP2 (2690nts) se obtuvieron del Gene Bank y fueron copiadas con error a diferentes tasas mutacionales (Drake 1993) 10000 veces, posteriormente se eligieron al azar entre 1 y 200 copias (cantidad de virus que entran a una célula) para ser sometidas a mutaciones puntuales aleatorias y posteriormente ser recombinadas de forma azarosa con el fin de ver la influencia del efecto de dicha recombinación sobre las secuencias mutadas al azar y las fluctuaciones de la eficacia biológica bajo presiones de selección y sucesivos cuellos de botella dada la ausencia de mecanismos de corrección de errores generados por las altas tasas de mutación en virus RNA

Se pretende conocer si hay diferencias significativas entre las poblaciones de secuencias mutadas puntualmente al azar, mutadas puntualmente-recombinadas y las mutaciones generadas solo por recombinación y si existen dichas diferencias ¿como se manifiestan estos efectos en la caminata por el paisaje adaptativo?.

2. MARCO TEORICO Y REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ESTADO DEL ARTE

En la década de los 30 Wrigth define el concepto de paisaje adaptativo y eficacia biológica. En 1942 Mayr define la especie biológica, la especiación alopátrica y el efecto fundador como una variante de esta. Dobzansky en 1967 demuestra la variabilidad genética inducida por arreglos, además de generar la Síntesis Darwiniana (Mayr, 1997). En 1971 Eigen formula el modelo de las cuasiespecies para determinar la dinámica evolutiva de las primeras moléculas autoreplicantes (Eigen, 1971; Eigen y Schuert, 1977).

En 1972 Eldrege formula la teoría del equilibrio puntuado y luego junto con Gould, incorporan los paisajes adaptativos introducidos por Writte en el Equilibrio puntuado, en el mismo año Van Valen formula hipótesis de la Reina Roja (Mayr, 1997).

Mas tarde en 1975 Muller evidencia que en poblaciones pequeñas y asexuales de protozoarios la acumulación de mutaciones deletéreas conduce a la perdida irreversible de eficacia, proceso conocido como el Trinquete de Muller.

En 1988 Chao modela la evolución del sexo en los virus RNA. Chao en 1990 determina la eficacia biológica en poblaciones virales, un año después Holland et. al como calcula la eficacia biológica relativa, es decir cuando se encuentran dos o mas cepas en competencia. En 1992 Eigen afirma que alrededor del 10% de la cuasiespecie es mutante y que un virus al entrar a una célula normalmente produce entre 1000 y 10000 copias. Drake en 1993 determina la tasa de mutación espontánea entre RNA virus, y en el mismo año encuentra que bajo diferentes presiones de selección clones con eficacia bajas siempre la incrementan con el transcurso de los pases. En 1994 Duarte et. al evidencia un consenso en la eficacia biológica de 98 clones estudiados. Novella et. al en 1995 evidencia la replicación continua de tipos silvestres en líneas celulares de mamífero y mosquito encuentra que la eficacia biológica es dependiente de su valor inicial. Un año mas tarde Elena et. al encuentra que los clones que mas pierden eficacia (72%) son los de mayor eficacia en la población parental. En este mismo año Rodríguez et. al presentan los factores ecológicos y temporales que dominan la evolución de VSV. En 1998 Turner y Chao evidencian que clones derivados

sexualmente son selectivamente favorables solo cuando la coinfección es común. Este mismo año Sevilla et. encuentra que la eficacia biológica relativa es dependiente de la densidad viral o moi . Mas tarde Escarmis Davila y Domingo encuentran tres rutas por las cuales FMDV recupera su eficacia.

En 1999 Novella et. al evidencia que el incremento de la eficacia es dependiente de la cantidad de cuellos de botella; mas tarde Sole et. al afirma que por el efecto del principio de exclusión competitiva se da el desplazamiento de una cepa respecto a la otra al iniciar con eficacias iguales, tanto ganadores como perdedores de eficacia incrementan su eficacia.

En el año 2000 Turner y Elena afirman que existe un costo de la adaptación a diferentes hospederos basado en el dilema del prisionero. Pariente y colaboradores en el 2001 demuestran la extinción eficiente por combinación entre mutagénicos y antivirales. En este mismo año Quert evidencia que bajo presiones de selección las mutaciones beneficiosas no pueden ser generadas tan rápidamente y en la cantidad suficiente como para competir por las que están siendo generadas por el silvestre. A finales del 2002 Yuste et. al reitera que la selección es dependiente de la frecuencia y promueve la heterogeneidad genética. En el 2003 Lázaro et. al encuentra resistencia a la extinción de FMDV con el transcurso de 50 cuellos de botella.

Recientemente San Juan et. Al 2005 determinaron los efectos de la distribución de la eficacia causado por una sustitución de nucleótidos en VSV y Novella, Reissig y Wilke 2004 reiteran la selección es dependiente de la densidad viral o moi .

Ahora se revisarán los principales trabajos realizados en los últimos 15 años sobre el estudio de la evolución de virus RNA.

Steinhauer et.al. (1989) cosechó el virus de la Estomatitis Vesicular VSV, sembrándolos en células de riñón de hámster bebe (BHK 21) utilizando Medio mínimo esencial (MEM) con 7% de suero fetal bovino, suplementado con Difco peptona. A dicho cultivo agrego un mutagénico viral (5 fluororacil) encontrando que a los 523 pases la secuencia consenso se mantiene siendo todos los integrantes de la población diferentes entre si (cuasiespecie), demostrando la importancia del role de la presión selectiva como determinante en la composición de una población viral y un potencial

para la generación de la heterogeneidad .

Chao (1990) determinó cómo calcular la eficacia biológica a partir de las proporciones entre mutantes y silvestres, al empezar y al terminar los ciclos de replicación. Fue el primero en evidenciar el efecto del trinquete de Muller sobre la disminución de la eficacia biológica de 20 linajes del bacteriofago $\phi 6$ (lítico), cosechado en *Pseudomonas passeolica* sembrada en agar enriquecido con caldo LC; Chao sometió $8 \cdot 10^9$ partículas a cuellos de botella bajo intensa deriva genética encontrando diferencias significativas en la eficacia causada por la acumulación de mutaciones deletéreas en concordancia con el trinquete de Muller. Chao afirma que la reproducción sexual en virus segmentados es causante de la variación viral en ambientes heterogéneos y un mecanismo de reparación de daño genético cuando dos o más partículas infectan la misma célula (coinfeción). Chao estimó la variación de la eficacia biológica de los clones por heredabilidad (h_b^2), siendo todos los clones derivados de un parental $h_b^2=0$, luego de 40 ciclos con intensa deriva genética $h_b^2=86\%$ indica diferencia entre linajes. Chao encontró que las mutaciones deletéreas no cambia el banco genético del virus y que las reversiones de las mutaciones no pueden detener el Trinquete de Muller dado que una mutación reversible permite restaurar la secuencia.

Cuando en los virus RNA se detiene una presión de selección -como en el caso de la suspensión de tratamientos antivirales- y las cepas son suficientemente comunes entre sí el trinquete de Muller podría ser detenido a través de rearrreglos de genomas segmentados y requeriría que una mutación fuera fijada en diferentes segmentos.

Holland et. al. (1991) determinaron como calcular la eficacia relativa, entendida como la eficiencia de replicación de 2 o más poblaciones de virus que compiten por un mismo recurso. Cosecharon VSV (Vesicular Stomatitis Virus) en diferentes líneas celulares como MDCK (células de riñón de canido), HeLa (células de carcinoma cervical humano y BHK-21 (células de riñón de hámster bebe), a bajos y altos moi, realizaron ensayos de eficacia biológica -ensayos de infección- utilizando un anticuerpo monoclonal resistente a mutantes (MARM) de VSV obtenido en células de hibridoma y determinaron la proporción entre mutantes y silvestres durante los cambios de hospederos o líneas celulares. Holland et. al diseñaron un método para

calcular un vector de eficacia cuya pendiente es el valor de la eficacia relativa demostrando gráficamente que los clones de VSV influenciado por la historia de los países presentan gran adaptabilidad al cambiar de hospedero induciendo divergencia. Al cambiar las cepas mutantes de línea celular estas tenían una fuerte ventaja sobre los tipos silvestres durante los posteriores experimentos de competencia con el parental silvestre. Holland determinó que el tiempo de adaptación a nuevos hospederos sigue un modelo múltiple step wise de mutaciones adaptativas cuando se incrementa el número de países. Los cambios en la eficacia relativa se deben a los cambios en la proporción entre mutantes y silvestres. Holland encontró un mutante adaptado por cada 10000 silvestres indicando gran heterogeneidad reiterando lo encontrado por Steinhauer et.al en 1989.

Duarte (1992) et.al del Instituto de Genética Molecular del Departamento de Biología de la Universidad de California. evidencian pérdida rápida de la eficacia en clones de virus asexuales de VSV debido al trinquete de Muller. Evidencian la operación del trinquete de Muller sometiendo VSV a 20 cuellos de botella mediante países de placa a placa, alternando el hospedero de BHK 21 a HeLa encontraron ganancia significativa en la eficacia solamente en 10 países cuando las poblaciones virales son grandes (mayores a 10^4). Duarte y colaboradores propusieron que el trinquete podría tener implicaciones significantes en la variabilidad de enfermedades severas y epidemias como el HIV, es decir que la baja probabilidad de incrementar la eficacia durante cuellos de botella genético repetitivos mediante la transferencia de RNA virus en la naturaleza -reservorios huésped y vector- debe tener efecto en la patogénesis de individuos infectados y en la población del hospedero concluyendo que los cuellos de botella incrementan las diferencias biológicas entre subpoblaciones de virus con estructura de cuasiespecies. Este estudio reafirmo lo realizado por Chao en 1990.

Drake (1993a) determina tasas de mutación espontánea en Bacteriofago Q β 40 ($1.5 \cdot 10^{-3}$ mutaciones por ciclo de replicación (mcr), el virus de la poliomeilitis ($1.3 \cdot 10^{-5}$ mcr), VSV ($2.5 \cdot 10^{-4}$ mcr), Influenza A ($7.3 \cdot 10^{-5}$ mcr), encontrando que estos virus al ser líticos tienden a tener tasas de mutación cercanas a 1 a diferencia de los Retrovirus como RSV -Sarcoma de Rous- ($4.6 \cdot 10^{-5}$ mcr) y MuLV ($3.8 \cdot 10^{-7}$ mcr) mucho menores que 1.

En este mismo año Drake (1993b) en JVI demuestra que al someter clones de VSV con eficacias muy bajas a 20 cuellos de botella bajo diferentes temperaturas de incubación 37 y 32 C, los clones con tamaños poblacionales grandes con el transcurso de los pases siempre retornan a niveles altos de eficacia a diferencia de los clones con mayor eficacia que mediante cuellos de botella tienen gran probabilidad de incrementarla. Drake mostró que durante los sucesivos cuellos de botella el trinquete de Muller operaba a las 2 temperaturas y que los pases repetitivos con tamaños poblacionales grandes sobre las diferentes líneas celulares regularmente seleccionaban virus con gran eficacia relativa, esto para que el trinquete de Muller induzca la pérdida de eficacia por los cuellos de botella asegurando la supervivencia de futuras generaciones dado que su eficacia se incrementara con el transcurso de los pases luego de ser sometidas a una presión de selección por efecto de las altas tasas.

Eigen (1993) afirma que el modelo de las cuasiespecies es una visión amplia y dinámica de las poblaciones de virus necesaria para la comprensión de los procesos evolutivos en la lucha antiviral.

Martínez et. al (1993) encuentran alteraciones en la eficacia de FMDV dado que mutantes resistentes a neutralización con anticuerpos muestran desventajas selectivas en células BHK21 cuando compiten con el parental o tipo silvestre. Cuando los mutantes se replican sin el parental-virus- estos adquieren una ventaja selectivas sobre el parental y fija una sustitución sin la reversión del fenotipo mutante resistente al anticuerpo, dichas variantes presentaban bajas frecuencias en el espectro de secuencias y rápidamente retornan a la secuencia maestra que coincide con el tipo silvestre y domina sobre la población.

Stuart, Rowe y Fitch (1993) evidencian equilibrio puntuado y selección positiva en la evolución de VSV Realizan do un análisis filogenético del gen de la proteína P de VSV que no revelo evidencia de un reloj molecular pero si mostró seguir un modelo de evolución tipo *Step wise* .

Tian et. al (1993) demostraron que el cambio rápido en los genomas de rotavirus a través de delección y concatenación puede generar variantes de virus no defectuosas

cuyo código ha sido potencialmente alterado y por tanto conducen a cambios en el fenotipo.

Clarke et. al (1994) evidencian la hipótesis de la Reina roja (Inicialmente formulada por Van Valen en 1973) en poblaciones de virus RNA mediante la mezcla de poblaciones clonales de VSV con eficacia relativas iguales encontrando que durante muchos pases con tamaños poblacionales grandes eventualmente una de las dos poblaciones excluía a su competidora y tanto perdedores como ganadores incrementaban su eficacia en acuerdo con el principio de exclusión competitiva y la hipótesis de la Reina roja (simular una carrera armamentista).

Duarte et.al (1994) evidencian un consenso en la eficacia biológica de los genes de un clon de VSV cuantificando la eficacia de 98 subclones aislados de una población parental de virus RNA bajo 15 pases, encontró una distribución normal entre los clones de baja eficacia prediciendo que gran parte de los mutantes generados durante la replicación son deletéreos reconfirmando el efecto trinquete de Muller en la evolución de estos virus. Sometiendo los cultivos del virus a 60 horas de selección, durante 15 pases y cosechando los virus luego de 4 horas la población de virus incremento la media de la eficacia en 250%. También encontró que los repetidos cuellos de botella pueden causar declives estocásticos en la eficacia por la heterogeneidad fenotípica de las poblaciones virales. Duarte et. al dio tres razones por las cuales se da la gran plasticidad genética en RNA virus: (i) Para escapar al sistema inmune (ii) para desarrollar resistencia a antivirales (iii) para adquirir fácilmente nuevos tropismos celulares infectando nuevos hospederos.

Hoshiino, Kapikian y Chanok (1994) sometieron Rotavirus wa D y DS1 a temperaturas subóptimas encontrando adaptabilidad. Cada mutante adaptado fue seleccionado durante los pases sucesivos en células de riñón de mono verde disminuyendo progresivamente la temperatura (30, 28, 26 C). Encontraron que los fenotipos mutantes son casi indistinguibles de los silvestres parentales. Luego dichos mutantes fueron cultivados en las condiciones originales a 30 C, con el transcurso de 10 pases recuperaron su adaptabilidad formando la placa además de formar placas a

temperaturas subóptimas, es decir estaban adaptados a dos hospederos.

Moya y Brancho (1995) Realizan una revisión proponiendo a los virus como modelos del estudio de la evolución experimental discutiendo las implicaciones de la variabilidad genética en el éxito evolutivo y la posibilidad de plantearlo teóricamente como una probabilidad: 0 cuando son especies iguales y 1 cuando las especies son diferentes. Moya reconoce a los virus RNA por su capacidad de generar grandes números en poco tiempo y espacio y su elevado grado de variabilidad genética. Una partícula de 10 Kb tiene por lo menos 1 base diferente del parental o secuencia original. Moya también reconoce las consecuencias del trinquete de Muller en la eficacia viral bajo sucesivos cuellos de botella.

Novella et. al.(1995a) evidencian drásticos cambios en la eficacia de VSV en mamíferos e insectos luego de replications continuas. Demostraron la persistencia de la replicación del tipo silvestre en células de mamífero e insectos, la persistencia de la infección fue 2.000.000 de veces mas grande que células de mamíferos que en insectos indicando diferencias selectivas extremas de la replicación en células de mosquito y mamífero. La adaptación a células de mosquito muestra una baja extrema en la eficacia en células de cerebro de ratón comparado con los cultivos de las células de mamífero, también se reconoció que un fenotipo atenuado recupera su eficacia y neurovirulencia con los cuellos de botella. Esto demostró la enorme capacidad de los RNA virus para adaptarse a los cambios selectivos en el medio ambiente (antivirales y cambios de hospederos).

Novella (1995b) y colaboradores evidencia que los cuellos de botella conducen a la perdida del eficacia y está determinada por su media inicial. Estos estudios reafirmaron la importancia de los cuellos de botella y el trinquete de Muller en la diversificación y colonización de nuevos nichos por parte de los virus, reiterando la perdida de eficacia biológica por efecto del trinquete de Muller como una ventaja ante nuevos nichos. Novella y colaboradores utilizaron poblaciones de VSV para determinar el tamaño poblacional que conduce al decrecimiento de la eficacia. Encontraron que cuando se inicia con poblaciones de baja eficacia VSV solo necesita de 5 pases para incrementar

su eficacia y cuando una población parental con gran eficacia es transferida se necesitan de 30 clones para mantener los valores de la eficacia.

Novella et.al. (1995c) determinaron el efecto del incremento exponencial de la eficacia durante los pases de poblaciones grandes. Durante transferencias repetitivas (pases) de virus con tamaño poblacionales grandes la eficacia se incrementa exponencialmente. Los clones que inician su reproducción con baja eficacia exhiben un incremento regular en un periodo bifásico (ganancia y pérdida), mientras que los clones neutrales muestran un cinética monofásica (pérdida).

Elena et al. (1996) determinan la evolución de la eficacia biológica en poblaciones experimentales de VSV a partir de clones con diferentes eficacias (w): X (alta W), C (W neutral) y R (de baja W), encontraron que el clone X – el más adaptado- perdió el 72% de su eficacia bajo sucesivos cuellos de botella. Mediante un análisis genético cuantitativo encontraron que la magnitud del cambio en la eficacia observada depende de la eficacia inicial del clone original confirmando las afirmaciones de Novella et. al. en 1995. En el mismo año Quert et. al (1996) evidencia experimentalmente una dinámica no-lineal en la población y los puntos críticos de la cuasiespecie durante procesos de competencia.

Domingo et al. (1996) Realizan una revisión de los principales conceptos de la evolución de virus RNA como la Reina Roja el trinquete de Muller y el principio de exclusión competitiva, además de reconocer el efecto de los cuellos de botella sobre la dinámica de las poblaciones virales .

Tsmimring y Levine (1996) evidencian matemáticamente las fluctuaciones de la eficacia de los virus observadas por Novella .

Rodríguez, Fitch y Stuart (1996) encuentran factores ecológicos y temporales que dominan la evolución de VSV determinando si los virus que están la misma zona ecológica tienen genotipos diferentes distintos; mediante análisis filogenéticos encontraron que los genotipos divergen entre si indicando que los factores ecológicos

ejercen una presión de selección externa. Rodríguez et al. afirman que la divergencia genética representa la selección positiva con la que los virus se adaptan a vectores o reservorios presentes en la zona ecológica.

Escarmis et. al. (1996) determinaron las lesiones genéticas causadas por el trinquete de Muller. Encontraron que al someter dos clones poblaciones de FMDV (sembrados en células BHK 21) a sucesivos cuellos de botella, 11 de 19 clones estudiados perdieron eficacia relativa, 3 presentaron un pequeño incremento en su eficacia y 1 de muy baja estuvo cerca de la extinción; sugirieron que la acumulación de mutaciones deletéreas puede conducir a la población cerca de la extinción por efecto del trinquete de Muller. Realizando análisis genético encontraron extensiones frecuentes de poly A reconociéndose como una región Hot spot del genoma de FMDV. Escarmis y colaboradores concluyeron que el genoma de FMDV puede ser debilitado con muy pocas mutaciones suficientes para conducir a la población a la extinción.

Elena et al (1997) evidencia que la selección es dependiente de la frecuencia de virus RNA en mamíferos. Mediante experimentos y una regresión lineal encuentra relación cuadrática concluyeron que dicha selección promueve la coexistencia estable de dos genotipos que compiten por el mismo recurso.

Domingo y Holland (1997) realizan una revisión de las mutaciones en los procesos de supervivencia de los virus RNA concluyendo que la capacidad adaptativa de poblaciones clonales se deben al efecto causado por el trinquete de Muller y la Reina roja en un proceso de competencia por el mismo pool de recursos celulares. La acumulación de mutaciones deletéreas conduce a la supervivencia en eventuales cambios de hospedero y a la fijación de una mutación ventajosa.

Domingo et al (1998) Propone que la estructura y distribución de las cuasiespecies en la persistencia de la infección viral se debe a que (i) los largos tiempos de supervivencia están limitados por el genoma viral; (ii) rara vez se reduce la persistencia por que la estrecha relación virus-hospedero enfrenta a múltiples presiones selectivas; (iii) los virus se mantienen en la naturaleza con o sin persistencia en sus huéspedes

siendo estables por cortos o largos periodos de tiempo y siendo influidos por las condiciones ecológicas.

Elena (1998) sometió a 5 regímenes demográficos una población clonal de VSV (Ribovirus no segmentado) calculando el número mínimo y el número máximo de partículas por régimen. Calculó el número de poblaciones en expansión (k) y el número de genomas replicados por cuello de botella (g). Realizó cuellos de botella de una población de 10^6 partículas (población grande) manteniéndolas en las mismas condiciones de cultivo. Encontraron que no importan la cantidad de cuellos de botella todos los clones ganaban eficacia y el clon que más ganaba eficacia era similar en eficacia al silvestre, sin embargo existen algunas discrepancias respecto al efecto de los cuellos de botella según Novella, 1995, 1999)

Turner y Chao (1998) hablan de la importancia del sexo en la evolución del bacteriofago $\phi 6$ en procesos de competencia dentro del hospedero. El sexo permite que las mutaciones beneficiosas sucedan en linajes separados y puedan ser fijadas en el mismo genoma por esta razón el modelo Fisher-Muller predice que la adaptación al ambiente es más rápida en poblaciones sexuales grandes si se le compara con una población asexual de igual número, sin embargo el sexo no incrementa la tasa de adaptación. Turner y Chao encontraron que clones derivados sexualmente son selectivamente favorables únicamente cuando la coinfección es común.

Sevilla et. al. (1998) evidencian la adaptación de FMDV a moi (multiplicity of infection, o densidad viral), encontrando que la eficacia relativa de dos poblaciones en competencia depende de moi .

Escarmis, Davila y Domingo (1998) encontraron 3 rutas por las cuales la pérdida de eficacia en FMDV causada por el trinquete de Muller se recupera; encontraron que el clon debilitado presentaba una inusual extensión de Poly adenilato. FMDV recupera su eficacia mediante la pérdida del poliadenilato. Entonces las 3 rutas por las cuales FMDV recupera su eficacia son (i) la poliadenilación para asegurar el codón de iniciación; (ii) el recorte de dicha poliadenilación; (iii) la delección de 69 residuos cercanos a la extensión de la poliadenilación.

Drake y Holland (1999) determinan tasas mutacionales entre Ribovirus, encontrando valores cercanos a 0.76 mutaciones por genoma por replicación equivalentes a $2.5 \cdot 10^{-4}$ mutaciones puntuales por ciclo de replicación.

Mírales et.al. (1999) evidencias los efectos de la interferencia clonal en la evolución de VSV (poblaciones asexuales) donde las mutaciones beneficiosas pueden ocurrir en diferentes linajes que compiten entre si asegurando la fijación de estas durante largos periodos de tiempo.

Novella et. al. (1999a) determina que el incremento exponencial de la eficacia esta limitada por los cuellos de botella; observó un componente estocástico en la variación de la eficacia. Novella et. al (1999b) evidencia perdida de éstasis durante replications alternantes de la misma población viral (VSV) entre células de mamíferos e insectos observando el incremento de la eficacia. También observaron que trascurridos 80 pases de la población de VSV el número de mutaciones acumuladas durante la alternancia de hospederos era similar a la que se daba en ambientes constantes .

Sole et.al (1999) Evidencian la dinámica de competencia de la Reina Roja y los puntos críticos en las poblaciones de RNA virus mediante un modelo que permitió probar los resultados obtenidos experimentalmente en anteriores investigaciones. Cuando dos poblaciones virales con eficacias relativas iguales se encuentran en competencia una excluye a la otra con el transcurso de los pases, tanto perdedores como ganadores incrementan su eficacia, dichos resultados son consistentes con la hipótesis de la Reina Roja, sugiriendo un componente determinístico en el comportamiento no lineal altamente predecible de la dinámica de la cuasiespecie .

Turner y Chao (1999) evidencian el dilema del prisionero en la evolución del bacteriofago $\phi 6$ encontrando que cuando existen altos m_{oi} , muchos fagos infectan el mismo hospedero mientras que a bajos m_{oi} se mantienen clonales. Cuando el fago crece a grandes tasas de coinfección inicialmente incrementa su eficacia pero después la disminuye. Turner y Chao encontraron que la eficacia relativa de los fagos con altos

m.o.i genera un costo o pay off conforme al dilema del prisionero en la teoría de juegos.

Weaber et.al. (1999) evidencia cambios en la eficacia de Arbovirus EEEV (Easter encefalitis equina) para la adaptación a células de vertebrados e invertebrados como lo realizado por Novella en VSV.

Moya et. al (2000) Plantean que la genética de poblaciones es una visión reduccionista dentro de la teoría evolutiva dado que el espacio genotípico es mucho mas lineal en RNA virus que en organismos Eucariotas. Estudian experimentalmente el role de las mutaciones deletéreas y beneficiosas en el grado de adaptabilidad de VSV además de discutir los pros y los contras dentro de la teoría de las cuasiespecies y los modelos clásicos de la genética de poblaciones. Moya et. al concluyen las razones por las cuales la cuasiespecie es la diana de selección (i) son entidades replicativas en la cual la estructura poblacional promueve rápida divergencia genética, (ii) los miembros dentro de una cuasiespecie están íntimamente ligados..

De la Peña, Elena y Moya (2000) estiman la tasa de disminución de la eficacia biológica del bacteriofago o6, encontrando que la eficacia disminuye en un 16 % o mas por cuello de botella.

Ruiz-Jarabo et. al. (2000) evidencia que la memoria molecular en cuasiespecies es similar a la presentada en el sistema inmune. Luego Saleta et. al (2000) determinan la respuesta de FMDV al incremento de la mutagenesis bajo la influencia de la carga viral y la eficacia.

Turner y Elena (2000) determinan el costo que pagan los virus por la adaptación a diferentes nichos (radiación del hospedero); encontraron que la infección de huéspedes alternativos disminuye la eficacia viral debido a la replicación lenta por las modificaciones que ha sufrido el huesped. Turner y Elena examinaron las consecuencias de la radiación de hospedero en VSV durante 100 generaciones en BHK 21 -huésped original- y células HeLa como nuevo huésped. Cada población experimental gana eficacia con el transcurso de los pases, sin embargo la población

que infecta un nuevo hospedero sufre disminución en su competitividad cuando infecta el hospedero original.

Kitcher, Holder y Bull (2001) determinaron los perfiles de adaptación en bacteriofagos similares oX174 y G4 (de baja eficacia) sometidos a temperaturas inhibitorias (44 C) durante sucesivas transferencias, la cuasiespecie rápidamente selecciona los genotipos con mayor rapidez de reproducción. oX174 presentó 5 mutaciones desventajosas (misswense) tempranas. G4 sufrió 70 mutaciones: 14 desventajosas, 2 sielciosas, y 1 intergénica observándose grandes periodos de polimorfismos.

Pariante et. al (2001) determinaron la extinción eficiente en poblaciones de HIV por combinación de mutagénesis e inhibidores antivirales.

Quert et. al (2001) evidenciaron la contingencia neutral –no se encuentran eventos repetitivos en la historia evolutiva (Moya 1995)- en poblaciones virales en competencia. En una población de VSV genéticamente marcada se realizaron ensayos de competencia en cultivos de BHK21. Durante los primeros 8 pases los mutantes compiten obteniendo eficacias similares con el wt (tipo silvestre) con el transcurso de los pases en competencias wt tiende a dominar (Quert. 1996). La eficacia biológica es contingente cuando (i) se da la presencia de partículas defectuosas interferentes (DIP), (ii) la presencia de un mutagénico, o (iii) el incremento de la temperatura a 40.5 C , la eficacia neutral de MARM C es contingente.

Se identificaron 6 mutaciones en MARM C, algunas de estas mutaciones permiten la competencia equivalente entre MARM C y wt en un ambiente constante pero el periodo de neutralidad es disminuido cuando se dan perturbaciones durante la competencia. Aparentemente la cuasiespecie de MARM C se mueve en un segmento del espacio de secuencias en el cual la media del valor de la eficacia es neutral pero bajo presiones selectivas las mutaciones beneficiosas no pueden ser generadas tan rápidamente y en cantidad suficiente como para competir con las que están siendo generadas por el tipo silvestre.

Schneider y Rossinski (2001) encontraron que la diversidad genética de del Virus del Mosaico del Tabaco (TMV) es controlada por la interacción entre el virus y el hospedero y la cuasiespecie se mantiene constante a través de los países. Cuando se alternan hospederos la población de la cuasiespecie presenta cambios en el tamaño poblacional directamente asociada con la interacción virus-nuevo hospedero.

Gareth et.al. (2001) argumentan evidenciar la inaplicabilidad de la cuasiespecie en la evolución de virus RNA sin embargo esto no es concordante con la evidencia experimental reportada en la literatura.

Chao, Rang, y Wong (2002) determinaron la distribución de mutaciones espontáneas e infección en el bacteriofago $\phi 6$ analizando un lisado sugiriendo que el virus utiliza la plantilla del parental para su replicación. Discuten los diferentes modos de replicación que pueden conferir una ventaja adaptativa. Mas tarde Elena hace una revisión, realizando un aproximación experimental de las restricciones de la adaptabilidad viral. Afirma que como consecuencia del costo de la adaptación viral existe un limite de adaptabilidad bajo presiones selectivas como la alternancia de hospederos y los antivirales; este proceso está influenciado por las secuencias que tienen como replicarse pero funcionalmente son inviables (no entran a la célula). La producción de linajes generalistas que se replican eficientemente en diferentes hospederos de forma alternativa, son costeados por una replicación generalmente ventajosa con modificación genética. Alelos que sean beneficiosos bajo algún tipo de presión selectiva –un nuevo nicho- podrían disminuir su rendimiento haciendo de la especialización una buena solución dado que la adaptación simultanea a diferentes habitats expone únicamente una fracción del linaje al nuevo nicho (Levin 1969, revisado en Elena 2002). Las mutaciones mas ventajosas se presenta cuando la competencia entre los linajes es muy intensa sin embargo la competencia disminuye la tasa a la cual los fenotipos llevan a cabo la fijación de una mutación ventajosa dentro de la población (Mirales 1999, revisado en Elena 2002). La expansión del rango del hospedero reduce la competencia entre partícula permitiendo al virus el acceso los recursos del hospedero para la producción de su progenie.

Los virus generalistas son competitivamente inferiores en huéspedes ancestrales (Novella 1995, Crill 2000, Turner y Elena 2000) . La adaptación a huéspedes alternos genera grandes cambios en los virus RNA a diferencia de la adaptación a un solo huésped (Novella et. al 1999)

Lázaro et.al. (2002) desarrollan un modelo numérico que describe la evolución de clones virales durante sucesivos cuellos de botella, evidenciaron estado estacionario en la eficacia biológica. Lázaro et al. A partir del modelo predijeron que la evolución de la eficacia es bifásica, tiene una fase de decrecimiento exponencial seguido de un estado estacionario en el cual los valores de la eficacia fluctúan alrededor de la media. Dicha evolución bifásica estaba en concordancia con los estudios llevados a cabo en FMDV mediante sucesivas transferencias de poblaciones pequeñas donde el estado estacionario es alcanzado bajo eficacias relativas muy bajas. El estado estacionario depende de la probabilidad de fijación de mutaciones ventajosas y deletéreas así como de la eficacia inicial , el numero de ciclos de replicación y sobre todo la cantidad de cuellos de botella.

Malpica et. al. (2002) realizaron mutaciones constitutivas (MP) en el virus del mosaico de tabaco (TMV) y determinaron las tasas de mutación espontánea de MP ,encontrando que la frecuencia de mutaciones es de 0.02-0.05 como resultado el 35% de las secuencias mutantes tenían 1 o mas mutaciones constitutivas.

Holmes y Moya (2002) en las cartas de editor de la revista de Virología habla de la relevancia del concepto de la cuasiespecie , la naturaleza y los principios que rigen una cuasiespecie en poblaciones virales afirmando que: (i) la secuencia maestra o su consenso se mantiene cerca al umbral del error; (ii) existe umbral del error genotípico y fenotípico; (iii) existen comportamiento no-lineal predecible por la presencia de un punto critico o divergencia durante las competencias virales; (iv) Existe memoria en los genomas virales; (v) los tropismos celulares tienen conexión entre la complejidad del espectro de mutantes y el rango del hospedero; (vi) el uso de vacunas y terapia combinante induce potencial adaptativo en la dinámica del espectro de mutantes , (vii) se han identificado mutaciones dentro del espectro de mutantes que incrementan la

eficacia y se convierten en dominantes dentro de la cuasiespecie, (viii) se puede generar extinción mediante el incremento de la mutagénesis.

Yuste et.al. (2002) evidencia la selección dependiente de la frecuencia (FDS) en el HIV tipo I es impuesto por el cambio en las condiciones, donde FDS es un mecanismo que promueve la heterogeneidad genética. Mas tarde Eigen habla de la importancia de las cuasiespecies en la estrategia antiviral y la búsqueda nuevas terapias antivirales basadas el error de catástrofe.

Elena, Cordoñer y San Juan (2003) realizan una revisión de la variación intraclonal de VSV, teniendo en cuenta aspectos ecológicos y evolutivos. Estudian las implicaciones evolutivas de la variabilidad de RNA virus en ambientes naturales (pacientes infectados) y en condiciones de laboratorio encontrando que existen tres factores que mantienen la variabilidad genética (i) cumplir el teorema fundamental de Fisher que compara la tasa de cambio en la eficacia con la variación de la misma en la población experimental, (ii) la gran magnitud de las tasas mutacionales y (iii) la selección dependiente de la frecuencia (FDS) confiere un ventaja a los fenotipos raros. Elena y colaboradores concluyeron que entre las consecuencias de la variabilidad esta la fijación de mutaciones deletéreas por deriva genética cuando las poblaciones son grandes indicando el role de la interferencia clonal reduce la probabilidad de fijación de una mutación ventajosa.

Kamp et.al (2003) realizan una revisión del efecto de la evolución viral en el sistema inmune adaptativo modelando matematicamente como los RNA virus encuentran mutaciones optimas para evadirlo.

Lázaro et.al. (2003) encuentran resistencia a la extinción de FMDV con el transcurso de 50 cuellos de botella generados mediante transferencias placa a placa. Analizaron varios clones de baja eficacia encontrando que la magnitud de las fluctuaciones se incrementaba con la disminución de la eficacia resultado en la remarcada resistencia a la extinción. Mas tarde Ruiz et.al. (2003) evidencia perdida de memoria en linajes paralelos confirmando el efecto irreversible del Trinquete de Muller .

Rustom et. al. (2003) hacen una revisión del rol de la evolución en las infecciones emergentes. Wilke (2003) diseña un modelo para calcular la probabilidad de fijación de un mutante ventajoso en una cuasiespecie viral. Wilke y Novella (2003) determinan las contribuciones de los fenotipos escondidos y mezclados a la memoria viral concluyendo: (i) con el incremento de m_{oi} la tasa a la cual un mutante desaparece disminuye y la proporción de mutantes aumenta; (ii) una fracción substancial de genomas mutantes debería encapsidarse con la proteína silvestre; (iii) Con el incremento de m_{oi} , la proporción de genomas mutantes encapsidados con la cubierta silvestre y los mutantes encapsidados con la cubierta mutante debería disminuir; (iv) si la eficacia de los mutantes es baja compara con la del tipo silvestre, cuando existan bajos m_{oi} una fracción de mutantes por efecto del balance de mutación-selección debería ser mas grande que el predicho por modelos estándar de cuasiespecies; (v) a m_{oi} muy bajos, la disminución de la frecuencia de mutantes durante los primeros pases debería ser independiente de m_{oi} e igual a la obtenida con el transcurso de los pases.

Novella (2004) evidencia efectos negativos de los cuellos de botella en la adaptabilidad de VSV, encontró que mutantes de baja eficacia (según la historia conocida de cuellos de botella) tenían baja probabilidad de recuperar la eficacia por no poder competir con el tipo silvestre, esto en situaciones donde la eficacia inicial de los mutantes sometidos cuellos de botella igual o mayor que la eficacia inicial del tipo silvestre. Determinó los paisajes adaptativos de una serie de mutantes teniendo en cuenta la historia de los pases.

San Juan et.al (2004) determinan los efectos en la distribución de la eficacia causados por una sustitución de nucleótidos en VSV creando mutaciones en 91 clones derivados de un ancestro común, midieron la eficacia de cada mutante y encontraron que la eficacia de las mutaciones deletéreas generadas al azar son bien descritas por una distribución log-normal cuyos efectos se observan en un modelo beta con 19% de reducción en la media de la eficacia. Mas del 40% de las mutaciones fueron letales siendo la proporción de las mutaciones beneficiosas inesperadamente alta. Los efectos de las mutaciones beneficiosas siguen una distribución gamma con una eficacia esperada del 1% para mutaciones al azar.

Wilke, Reissig y Novella (2004) evidenciaron que los cambios periódicos en la densidad viral promueven la existencia de poblaciones en competencia; desarrollaron un modelo teórico de competencia entre el tipo silvestre y un mutante bajo regímenes alternados de MOI , asumiendo que los mutantes deletéreos tiene una ventaja selectiva cuando la coinfección con el tipo silvestre es rara dado que los productos proteicos creados pueden tener algún beneficio para el silvestre. Reafirmaron que la selección dependiente de la frecuencia como lo evidenciado por Yuste et al. 2000.

Novella Reissig y Wilke (2004) determinaron que la selección es dependiente de la densidad viral o MOI en acuerdo con lo encontrado por Yuste en HIV. Cosecharon VSV a diferentes densidades virales ($m.o.i$) para medir el efecto de la complementación en la eficacia relativa de un mutante deletéreo (MARM N) en competencia con su ancestro silvestre. Desarrollaron un modelo matemático asumiendo que durante la coinfección ambos virus contribuyen a un pool común de productos proteicos que se explotan igualmente en la célula infectada; bajo estas condiciones la eficacia promedio de todos los viriones que coinfectan una célula es la media de la eficacia. En ausencia de coinfección la complementación no toma lugar y la eficacia relativa de cada competidor es determinada por el valor selectivo de sus propios productos. Concluyeron sugiriendo que el tipo silvestre y MARM N comparten libremente todos sus productos génicos bajo coinfección.

2.2. BIOINFORMÁTICA CAS Y PAISAJES ADAPTATIVOS

Los algoritmos evolutivos permiten simular la evolución de poblaciones mediante operadores genéticos bajo procesos de selección y reproducción. El efecto de dichos operadores pueden ser representados en el paisaje adaptativo (Kauffman, 1993) mediante el cálculo de la eficacia biológica.

En un Sistema Adaptativo Complejo (CAS) una población de genomas (o secuencias) es sometida a reglas de selección y operadores genéticos como la mutación y la recombinación por tanto posee potencial para generar nuevas variantes. Cada individuo de la población es evaluado, estableciendo una medida de su valor adaptativo (eficacia biológica) con respecto al ambiente, es decir, los criterios que determinan la reproducción e indican lo bien adaptada que esta la población a una presión selectiva particular (Ramírez, 2004).

Thomas Ray de la Universidad de Delaware crea organismos artificiales *in silico* que se autorepican donde la CPU es el recurso energético limitado, y la memoria es el recurso material igualmente limitado (metáfora computacional de tierra). Las mutaciones generan nuevas formas y el proceso evolutivo se da por la selección natural de genotipos que compiten por tiempo de CPU y espacio en memoria (Thomas Ray 1997). Cuando las replications son lentas se generan recombinaciones y rearrreglos de forma similar a la reproducción sexual actuando como una gran fuerza evolutiva ante los cambios en el sistema (Thomas Ray 1997).

Tierra es un ambiente virtual que emula procesos paralelos donde interaccionan organismos virtuales similares a virus que utilizan un lenguaje especial inventado por Tom Ray denominado terran, este programa genera mutaciones al azar y cada organismo es capaz de replicarse por sí mismo en la memoria virtual del procesador. Cada criatura de terran realiza funciones como: leer instrucciones, decodificar la instrucción, ejecutar la instrucción e incrementar la instrucción. Entre las instrucciones que recibe están operaciones aritméticas, instrucciones de movimiento o no realizar ninguna. Estos organismos son de reproducción asexual parecidos a parásitos o virus y por tanto no son capaces de replicarse en condiciones aisladas, es decir que dependen de la CPU y la RAM (Langton et al 1997).

Los Sistemas Adaptativos Complejos como tierra pueden ser representados en los paisajes adaptativos gracias a la medida de la eficacia biológica que fluctúa con el transcurso de las generaciones. Los paisajes adaptativos inicialmente formulados por Wright en los 30 e incorporada por Gould a la teoría de los equilibrios puntuados (May 1997) son una representación de colinas y valles que relaciona cada uno de los picos o un solo pico (en este caso) con las variantes más adaptadas y los valles con las menos adaptadas (Kauffman 1993). Los paisajes adaptativos pretenden conocer como ocurre la evolución entendida como una caminata por el paisaje adaptativo en la que se puede evidenciar principios de la Biología Evolutiva.

Los operadores genéticos como la mutación y la recombinación bajo sucesivos ciclo de replicación y cuellos de botella evaluados por habilidad replicativa recorren el paisaje

adaptativo, sin embargo cuando no existe posibilidad de divergir (una secuencia diana diferente a la secuencia maestra original) el paisaje queda atrapado en picos locales (Ramírez, 2004) si las condiciones son constantes. Además de esto la recombinación como operador genético depende en gran medida de el grado de epistasis o interacción entre las secuencias (Kauffman, 1993).

En el modelo NK planteado por Kauffman, donde N hace referencia a numero de elementos en un sistema y K hace referencia a la interacción entre ellos y determina la rigurosidad del paisaje. **Cuando K es “0” el paisaje tiene un solo pico** (probablemente en este caso sea así porque las condiciones son constantes). Cuando la interacción (K, de cierta manera epistasis) es N-1 el número de picos tiene una relación exponencial con N. La interacción generada se denomina frustración que refleja el hecho de que al ajustar una parte se desajusta la otra y a medida que K se hace más grande la frustración se hace más grande (Ramírez, 2004).

Cuando K (la interacción) tiene su valor máximo la recombinación es inútil dado que el paisaje se vuelve muy aleatorio y puede tener picos adyacentes, en este caso el estado adaptativo del sistema depende del estado de las otras secuencias con las cuales interactúa (Ramírez, 2004). Cuando se utilizan valores de m.o.i pequeños (respecto aun máximo de 200) diferentes de 1 (5,10,20) las variantes seleccionada luego de un ciclo de replicación son muy heterogéneas por efecto del azar, esto implica que la diversidad de las secuencias del siguiente ciclo de replicación son bastante heterogéneas y por ente interactúan (Brown, 2001). Cuando los valores de K son pequeños o nulos (densidad viral de 1) la recombinación es útil dado que permite establecer nuevos picos adaptativos.

2.3. BIOLOGÍA MOLECULAR DE ROTAVIRUS

Los genomas de los RNA virus pueden ser de cadena (+) o (-), doble o sencilla, segmentados, no segmentados y circulares. Estos genomas deben garantizar la replicación y la síntesis de proteínas virales para el ensamblaje de la partícula. Todos los RNA virus, a excepción de los Retrovirus que codifican RNA dependiente de DNAPol, codifican RNA dependiente de polimerasa para catalizar la síntesis de nuevos genomas (Flints et al 2000) .

Los virus RNA poseen genomas pequeños, si es de 10Kb tiene 4^{10000} secuencias posibles (Eigen 1993). Una partícula de HIV al ser de 10Kb es una de las 4^{10000} secuencias posibles, de las cuales el 20% de las posiciones son constantes, el 70% tiene una vida media de 1000 años, y el 10% de las posiciones son hipervariables con vida media de 30 años (Eigen, 1993a).

Los virus RNA se adaptan fácilmente a diferentes presiones de selección gracias a sus altas tasas de mutación, por esta razón cambian en un año lo que un eucariota cambia en 1000000 de años, en otras palabras, la tasa mutacional de un virus RNA varía entre 10^{-3} y 10^{-5} cambios de nucleótidos por ciclo de replicación, mientras que en los eucariotas varía entre 10^{-9} y 10^{-10} cambios de nucleótidos por ciclo de replicación (Moya 1995).

La RNA polimerasa lleva a cabo la síntesis de RNA. Esta recibe dos nombres dependiendo de la actividad que realice: replicasa cuando copia RNA y transcriptasa cuando produce mRNA. Para algunos RNA virus la replicación del genoma y la síntesis de RNA son la misma reacción; los RNA virus de doble cadena que sintetizan mRNA producen plantillas que pueden ser utilizadas en la replicación. (Flints et al 2000). Cuando se replica la cadena esta se elonga en dirección 5' 3'. En el caso de poliovirus se pueden producir 50000 copias en 8 horas de infección (Flints et al 2000). Existen motivos conservados dentro de la RNA pol importantes en la replicación, entre estos se encuentran el motivo C Gly-Asp-Asp (GDD), en la enzima que replica RNAs dependientes de RNA polimerasas en virus de doble cadena y el Asp Asp (DD) en la enzima que replica RNAs dependientes de DNAPol como el HIV (Flints et al 2000).

Los Rotavirus del grupo A son muy estables en el medio ambiente (Bern 1992 revisado en Borgan 2003) y son el principal agente etiológico de diarreas graves en aves, bovinos, porcinos, murinos y primates incluyendo al hombre. Cada año el grupo A de rotavirus causa 870.000 muertes de niños, siendo mayoritarias en países subdesarrollados (Bern et al 1992, revisado en Borgan et al 2003)

El nombre rotavirus es derivado del latín “rota”, significa rueda. Son de doble cubierta están formados por una capsida de tres capas (TLPs). Los rotavirus son virus no envueltos, miembros de la familia Reoviridae, tienen 100nm de diámetro y exhiben simetría icosaédrica (T=131). La nucleocapsida encierra el genoma compuesto de 11 segmentos de una hebra doble de RNA (Arias, 2001), que codifican para seis proteínas estructurales y cinco no estructurales. Los Rotavirus presentan proteínas estructurales como VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7 implicadas en la entrada y replicación del virus y no estructurales como NSP2, NSP3, NSP4 (enterotoxina), y NSP5 (ANEXO 7: Estructura y genoma de Rotavirus).

Para la activación del virus se requiere de proteasas como la tripsina, encargada de la activación viral induciendo el clivaje de VP4 que se dimeriza en los subdominios VP5 y VP8 necesarios para la adherencia del virus. La adherencia del virus a la célula se realiza por VP4 y VP7 que esta glicosilada (Arias et al, 2002).

VP4 al clivarse genera VP5 y VP8 (93-208 a.a) que interactúa con moléculas de ácido sálico de la superficie de los eritrocitos y con los residuos de aminoácidos 155, 188-190 que juegan un rol esencial en la infección de rotavirus dependientes de ácido siálico (Guerrero 2002). Se ha reportado que posee en VP5 el tripeptido DGE (308-310) que se une a $\alpha 2\beta 1$ integrina (Pavel 1997, revisado en Arias, 2002).

Los rotavirus interactúan con integrinas. Estas se encargan de mediar interacciones célula matriz y célula-célula, además de participar en procesos de proliferación, migración y diferenciación celular. Las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ y la proteína de choque térmico Hsc70 interactúan con el virus en pasos post adherencia (Arias et al 2001, Guerrero et al 2002). VP4 luego de ser dimerizada con tripsina interactúa con la célula. Cuando los rotavirus dependen de ácido siálico para entrar interactúan con VP8 en la región aminoácida 93-208, si el virus no es dependiente de ácido siálico para su entrada, entonces interactúa VP5 en vez de VP8 (Arias 2001) (ANEXO 8 Ciclo de infección de Rotavirus).

La mayoría de las cepas de rotavirus aislados de animales requieren ácido siálico para la entrada (Mendez et al. 2000), mientras que algunas de las aisladas de humanos no requieren ácido siálico (Zarate et al 2003).

Los cambios conformacionales de las proteínas del virus son inducidos por los eventos iniciales de unión a los receptores. Las integrinas a2b1, a1b1, a1b3 y a1ba están implicadas en la entrada de rotavirus a la célula, funcionando como receptores post unión (Coulson, Londrigan y Lee, 1997) al igual que hsc70 (Guerrero 2000, Guerrero 2002)..

La a2b1 integrina se adhiere al Rotavirus a través de tripeptido DGE (Zarate et al., 2000b) presente en VP5 dado que anticuerpos contra la subunidad a2 reduce la infectividad en nar3 y RRV, dicho tripeptido inhibe la unión a integrina de nar3 pero no la de RRV (Coulson, Londrigan y Lee, 1997; Arias et al., 2002)

Recientes estudios reportan que VP4 posee un péptido cuya secuencia tripeptídica DGE, interactúa con a2b1 integrina, mientras que VP7 posee el motivo GRP que interactúa con la a2b1 integrina y el motivo LDV que interactúa con a4b1 integrina (Graham et al., 2003). Anticuerpos contra estos ligandos de unión bloquean la infección por rotavirus. Las integrinas a2b1 y a4b1 median la entrada del rotavirus a células k562 (Revisado en Sánchez san-martín, 2004).

Las TLPs se unen a la hsc70 pero las DLP no, y dicha interacción puede ser bloqueada con anticuerpos monoclonales contra VP4 y VP7 (Guerrero 2002; revisado en Arias, 2002).

Hsc70 podría servir como anclaje del virus a la membrana durante la transición al citoplasma especulando que la actividad chaperona de Hsc70 tiene mayor actividad durante la entrada del virus (Zarate et al 2003). El contacto inicial del virus provoca un cambio conformacional en la partícula viral facilitando la interacción del C terminal de VP5 con Hsc70 (Guerrero et al 2002; Zarate et al 2003). Hsc70 ha sido propuesta como receptor post-adherencia en la infección de Rotavirus (Guerrero 2002).

Un rotavirus necesita de factores de transcripción para producir cadenas negativas. La actividad de la transcriptasa se ha observado *in vitro* cuando la VP4 y la VP7 se ha removido de la partícula mediante el tratamiento de quelantes de calcio. La pérdida de la TLP *in vivo* no ha sido dilucidada, sin embargo se sugiere que la penetración al citoplasma celular tiene que darse en concentraciones de calcio mas bajas que en el medio extracelular, este factor debe inducir la pérdida de la TLP y activar la transcriptasa viral, sin embargo la dependencia del calcio no parece ser esencial en la iniciación de la replicación viral.

La remoción de las TLPs activa la transcriptasa viral . La transcripción se da dentro de las DLPs por acción de la VP1 (transcriptasa viral) y VP3 (guaniltransferasa) . En dicho proceso se crean moldes para proteínas estructurales y para la maquinaria de replicación. La traducción del mRNA se realiza en polisomas unidos al retículo endoplasmático (Lopez y Arias 2001).

El proceso de replicación se realiza exclusivamente en el citoplasma y las células no contienen enzimas para replicar dsRNA , dicho proceso se da junto con las partículas nacientes y en asociación con viroplasmas maduran a través del ER adquiriendo la cubierta exterior (Fields et al 1996).

El incremento en los niveles de calcio intracelular durante estadios tempranos de replicación puede bloquear la liberación de la cubierta y viceversa , niveles bajos de Ca son los responsables de dicho proceso y la activación de la polimerasa endogena.

VP7 y NSP4 se localizan en el ER y NSP1 y NSP3 en el citoesqueleto. NSP3 interactúa con el IF4G1 o factor iniciador de la traducción que se ve favorecida por la interacción entre el extremo 3 del RNA con el IF4G (Lopez y Arias 2001).

Durante la formación del virus los segmentos de RNA son internalizados, luego se seleccionan trimeros de VP6 para la formación de DLPs que se acumulan formando inclusiones citoplasmáticas o viroplasmas donde se selecciona, empaqueta y replica el genoma viral y se ensamblan las DLPs junto con VP2 y VP6.

Al terminar la replicación del genoma las DLPs salen del viroplasma y migran al ER donde adquieren proteína glicosilada como VP7 mediante un mecanismo aun desconocido (Lopez y Arias 2001).

NSP4 interactúa con VP6 y VP4 durante la traslocación de las DLPs hacia el lumen de ER, esto se da mediante la adquisición de una cubierta temporal que se pierde al llegar al ER, se adquiere la DLP y se genera la lisis para que el virus salga (Arias et. al, 2001).

2.4. ECOLOGÍA DE ROTAVIRUS

Los Enterovirus- incluyendo rotavirus-, son los más abundantes en aguas contaminadas, entre ellos se encuentran 62 humanos, 27 animales (22 enterovirus símicos, 2 bovinos(BEV) y 3 porcinos). Estos son muy estables a cambios de pH, temperatura y salinidad (Lev et al, 2002).

En ecosistemas lenticos y lóticos, se desarrollan bivalvos y mariscos que actúan como reservorios y vectores de poliovirus, enterovirus-incluyendo rotavirus-, reovirus, calicivirus, hepatitis, entre otros; se pueden encontrar más de 100 especies distintas de enterovirus que afectan al ser humano, normalmente se transmiten vía fecal-oral y se denominan genéricamente “virus entéricos” (Metcalf 1982).

La prevalencia de rotavirus en aguas residuales, es causada por el vertimiento de heces de los individuos afectados (animales y el hombre) a los cuerpos de agua, dichos virus requieren de una dosis baja para infectar facilitando la infección de muchos individuos (Enriquez, 1992).

Los vertimientos contaminados de rotavirus llegan a otras agua no contaminadas siendo sometidos a procesos de filtración (20 litros en 1 hora) que realizan los moluscos bioacumulando en el estomago y branquias(Ley, Higgins y Fayer, 2002; Enriquez 1992) disminuyendo la cantidad de virus en el agua. Como consecuencia de este flujo se retienen todo tipo de partículas sólidas, muchas de las cuales son flóculos sedimentarios que poseen adheridas partículas virales, esto como consecuencia de la bioacumulación (Metcalf,1982). De esta manera moluscos como mejillones, lapas, almejas y ostras, actúan como concentradores virales naturales.

2.5. HIPERCICLOS

Existen interacciones dinámicas moleculares en la síntesis de RNA denominadas hiperciclos en los que existen varias secuencias maestras con sus mutantes denominadas cuasiespecies. Dichas interacciones aparecieron al tiempo que la traducción como un mecanismo de evaluación del transcrito. Si el contenido informático de la secuencia supera el umbral del error se pierde la información por catástrofe, para combatir esto, los virus RNA como cuasiespecies compiten con sus mutantes, de modo que no se acumulen errores (Eigen 1993a; Lev S. And Herber Levine 1996).

Existen discrepancias entre los genetistas de poblaciones y los biólogos evolutivos sobre los hiperciclos. La visión no Darwiniana de los hiperciclos afirma que la selección se da para siempre, es decir que un hiperciclo una vez establecido no puede ser desplazado por un competidor así sea más eficiente, la visión Darwiniana afirma que una sola molécula mutante ventajosa puede llegar a predominar sobre una población establecida (Eigen 1993a) si las condiciones son propicias.

2.6. CUASIESPECIE

Una cuasiespecie es un conjunto de secuencias heterogéneas copiadas con error alrededor de una secuencia maestra, de la cual surgen mutantes adaptados que incrementan dramáticamente la variabilidad genética (Eigen 1993), la cuasiespecie se organiza en un espectro de mutantes dominada por una secuencia maestra que coincide con la secuencia consenso o tipo silvestre dentro de la población y puede permanecer invariante por generaciones entrando en periodos de éstasis (Steinhauer et. al, 1989; revisado en Domingo et. al 1996) y a la vez tener un reservorio de mutantes como fenotipos potenciales a los cambios ambientales.

Las variantes genéticas en una población de virus RNA son función no solamente de la habilidad de replicar sin errores sino también de la probabilidad de que surjan por errores de replicación y procesos de recombinación otras secuencias de RNA adaptadas entre la distribución de mutantes. Como consecuencia los genomas no son entidades

independientes debido a que las variantes mutacionales se distribuyen de forma organizada y cooperativa (Moya et. al 2000).

Si el contenido informático de la secuencia supera el umbral del error por mutación hay pérdida de información, entonces los mutantes compiten entre si de modo que no se acumulan errores (Domingo et. al , 1996) . La recombinación permite la corrección de errores de la RNAPol (Chao 1988) . La cuasiespecie presenta un reservorio de mutantes adaptados con replications de alta fidelidad donde algunos de estos mutantes son baja eficacia y podrían fijarse fácilmente si la tasa de error esta cerca del error de catástrofe (Eigen ,1993; Domingo et. al , 1996) y si las presiones de selección los favorecen.

En poblaciones reales de RNA virus el ambiente introduce complejidad y cuando las condiciones son adversas y caóticas algunos mutantes y el tipo silvestre pueden tener una existencia breve (Eigen y Briebricher 1988, revisado en Domingo et. al, 1996).

En general una cuasiespecie es una unidad que evoluciona como un conjunto y se comporta como un gas ideal dado que tiende a difundirse en el espacio de secuencias y esta sometido a mutaciones y procesos de selección. En una cuasiespecie entre mayor sea el número de mutaciones menor es la virulencia (Domingo et. al., 2002) dado que las variantes que se producen no son infectivas o sin inviables.

Cuando la población viral ha enfrentado un cambio ambiental o alguna presión de selección existen fenotipos que se fijan irreversiblemente en la población y otros que son reversibles y tienen la capacidad de retornar a ser infectivo en el huésped ancestral o en el ambiente previo (Elena , 2002; Wilke, 2003).

La cuasiespecie persiste gracias a la conexión entre todos los integrantes de la población y el pool de mutantes desventajoso capaz de replicarse que promueve la variación fenotípica (Domingo 1998) ante presiones selectivas.

La distribución de secuencias en la cuasiespecie es función de la tasa de error de replicación, de la secuencia maestra y la de los otros miembros de la población , además

es dependiente del tiempo de replicación y el tamaño poblacional (Holmes and Moya, 2002).

La distribución de poblaciones clonales tipo cuasiespecies ha sido evidenciada (o al menos con indicios) experimentalmente en virus RNA como QB40 (Domingo and Holland 1997), o6 (Chao 1990), VSV (Holland et. al,1991; Novella et. al 1995, 1999, 2004) , HIV (Cichutech et. al, 1992), FMDV (Martínez et. al 1991) , LCMV (Dockter, 1996), Virus de la Rabia (Morimoto et. al 1998) Hepatitis C (Farsi et. al. 2002). VSV y FMSDV presenta las evidencias mas consistentes.

El pool informativo de la cuasiespecie se encuentra en la población de secuencias. La evolución continuamente genera y selecciona secuencias individuales con potenciales para generar poblaciones antes posibles cambios ambientales. Las secuencias seleccionadas en una generación se convierten en la(s) secuencia(s) maestra(s) de la siguiente generación y cuando surge una nueva secuencia (un mutante aventajado) esta usualmente abre un amplio espectro de posibilidades” (Holland, 1995 revisado en Ramírez 2004).

2.7. UMBRAL DEL ERROR

En el contexto de la cuasiespecie el umbral del error se entiende como el momento en que hay perdida informativa irreversible debido a las altas tasas mutaciones (Sole et. Al 1999). Este umbral puede ser genotípico refiriéndose a las secuencias o fenotípico referido a las secuencias de aminoácidos y al plegamiento de la proteína.

Existe una porción neutral del espacio de secuencias en la cual las variantes son fenotípicamente inviables. La perdida de información implica cruzar el umbral del error fenotípico (Solé et. Al 1999) que genera catástrofe informática y por ende extinción .

Cuando una población sobrepasa el umbral entra en extinción por cambios en la fidelidad de replicación por mutagénesis o sustratos alterados , el umbral del error permite predecir el comportamiento de la tasa de error (Sierra, et. al 2000; Grande et. al 2002, Eigen, 2002, Domingo, et al 2005).

2.8. LA MUTACIÓN EN LA EVOLUCION DE VIRUS RNA

Las mutaciones son importantes en la exploración del espacio de secuencias durante infecciones in vivo , in vitro e in silico y permiten la incorporación de nuevos tipos de polimerasa (Domingo and Holland 1997, De la Peña et al 2000; Malpica et al 2002).

Las tasas mutacionales varían entre 10^{-3} y 10^{-5} mutaciones por nucleótido por replicación favoreciendo la adaptabilidad de mutantes de baja eficacia en eventuales cambios ambientales, de esta manera surgen variantes que cambian de hospedero y variantes resistentes a la neutralización de anticuerpos y antivirales (Drake 1993, Drake et al 1998, Drake y Holland 1999).

Las tasas mutacionales de los virus RNA en comparación con las del DNA difieren de forma dramática, tanto así que se puede afirmar que un virus RNA cambia en un año lo que un eucariota cambia en 1000000 de años, dicho de otra manera la tasa mutacional de un virus RNA varía entre 10^{-3} y 10^{-5} cambios de nts por ciclo de replicación , mientras que en los eucariotas varía entre 10^{-9} y 10^{-10} cambios de nucleótidos por ciclo de replicación (Chao 1990; Drake 1993, Moya 1995; Drake and Holland 1999). Por esta razón la adaptabilidad en ambientes fluctuantes es acelerada, tanto así que *E. coli* se adapta a un nuevo tipo de cultivo un 8% en 400 generaciones y un 37% en 2000 generaciones mientras que VSV se adapta aun nuevo hospedero en un 5000% en 50 generaciones (Chao 1990).

Las tasas mutacionales son una alternativa para la reconstrucción de repertorios de receptores y correceptores celulares determinantes de la virulencia como en el caso del HIV y alguna variantes de poliovirus que son capaces de alterar receptores celulares (Domingo and Holland 1997, Sole et. al., 1999) generando cambios conformacionales. Según estudios Bioquímicos se dan entre 0.1 y 1 incorporaciones erradas por cada ciclo de replicación (Drake 1996, revisado en Domingo et. al, 1996), de esta manera muchos errores de replicación son neutrales y contribuyen a la aleatorización de codones mediante la inserción de mutaciones silenciosas . Paradójicamente las mutaciones neutrales al tener mayores oportunidades para incrementar la eficacia no

se producen con más frecuencia que las perjudiciales, es decir, en la replicación de una partícula viral en su hospedero se producen más mutantes deletéreos que virus infectivos (Domingo, 2002; Holmes y Moya, 2002) dado que las RNA polimerasas copia con error constantemente .

Los cambios ocasionados por la mutación en sitios de residuos antigénicos deben afectar el reconocimiento del receptor factor importante en la coevolución de las proteínas de cubierta (antígenos) frente a los posibles rangos de hospederos (receptores) (Domingo y Holland 1997)

Muchos errores en la replicación son deletéreos y son rápidamente removidos por el competitivo mundo de la reproducción viral. En el caso de VSV una mutación del gen de la polimerasa aparentemente incrementa la frecuencia de la mutación en pequeñas partes del genoma presumiblemente por el incremento de la frecuencia de error de la enzima. (Fields et al 1996).

La tasa mutacional determina la habilidad de un virus para mantener la información esencial mientras copia las secuencias y cuando se dan las presiones selectivas. La fijación de un mutante ventajoso ,según el Darwinismo, llega a predominar sobre una población establecida (Eigen 1993a) cuando se presentan en los picos de los paisajes adaptativos , siendo el dominante una porción crítica del parental , es decir, la secuencia fijada predominante en el pico adaptativo luego de una presión de selección era un mutante de baja eficacia en la población parental (Domingo and Holland 1997) con capacidad de replicarse.

2.9. LA RECOMBINACION EN LA EVOLUCION DE RNA VIRUS

Entre las causas de variabilidad genética de los virus se encuentran la recombinación homóloga y heteróloga que permiten la exploración de nuevas combinaciones en diferentes regiones del genoma o el resurgimiento de un parental debilitado. Esto teniendo en cuenta que la recombinación no es un requisito estricto para la adaptación viral en cortos y largos periodos de tiempo durante la evolución (Novella et. al 1995; Bruyere et. al 2001).

El proceso de recombinación viral fue descubierto en células infectadas con poliovirus estimándose que del 10 al 20 % del genoma está recombinado (Flints et. Al 2000). La recombinación viral es el intercambio de secuencias de nucleótidos entre diferentes moléculas de RNA viral causante de la variabilidad genética y un posible mecanismo de corrección de errores (Chao 1988) que pueden llegar a ser ventajoso bajo diferentes presiones de selección como antivirales, vacunas y eventuales cambios de hospedero.

Se ha observado en BMV (Brome mosaic bromovirus) eventos de recombinación homóloga y no homóloga, la homóloga promueve el entrecruzamiento entre secuencias idénticas o muy parecidas mientras que el entrecruzamiento no homólogo entre secuencias o regiones del genoma disímiles; el entrecruzamiento homólogo es 10 veces más común que el no homólogo (Nagy and Buhasky 1992 revisado en Bruyere et al 2000). La recombinación homóloga ha sido evidenciada en picornavirus, coronavirus, tombusvirus y bacteriofagos (Bruyeré et al 2000). La recombinación de BMV requiere de un segmento común de 15 a 60 nts el cual contiene regiones ricas en GC y AU. El mecanismo de plantilla predice que las pausas en la replicación son mediadas por regiones ricas en AU que facilitan la hibridación con GC en el RNA naciente (Bruyeré et al 2000). La mayoría de las recombinaciones no difieren mucho del parental permitiendo un consenso dentro de la población. La recombinación se presenta con bajas presiones selectivas o sin ellas

En poliovirus la recombinación ocurre durante la síntesis de cadenas negativas. La RNA polimerasa primero copia la porción 3' terminal del parental de cadena (+) y luego intercambia una plantilla por otra del segundo parental de cadena (+) (Flints et. Al 2000).. Dicho intercambio de plantillas ocurre durante la síntesis de cadenas negativas cuando se dan las pausas de la polimerasa durante la elongación de la cadena; este proceso ocurre dado que la concentración de cadenas (+) es 100 veces mayor que la de negativas (Flints et. Al 2000).

La recombinación homóloga permite el intercambio de genes virales entre sí de forma homóloga o heteróloga además de ocasionar el resurgimiento de un parental debilitado (Novella 1995 y Bruyere 2001) es decir una partícula que antes se adaptó a ciertas condiciones (crecer en determinada línea celular) y en el presente está debilitada (crece

en otra línea celular y es otra partícula la adaptada) al retornar condiciones ancestrales vuelve a predominar dentro de la población generando rearrreglos dentro de la población.

La Recombinación no homologa o heteróloga, permite transmisión de RNA celulares dentro de genomas virales que conduce a la adquisición de partículas “defectuosas” pero con poder de replicación que brindan información genética (Domingo and Holland 1997, Bruyere et al 2000) y por ende una estrategia de adaptación ante presiones selectivas.

Los Rearreglos de genomas segmentados son típicos de virus de la influenza A, y están fuertemente asociados al surgimiento de mutantes resistentes a anticuerpos. En este proceso dos virus segmentados producen progenies con varias combinaciones de dichos segmentos mucho mas altas que las producidos en los rearrreglos cromosómicos. Esta estrategia permite la producción constante de virus con nuevos potenciales adaptativos y sugiere que durante la evolución los virus podrían romper sus cadenas y formar genomas segmentados o monopartitos generando nuevas variantes . La ventaja selectiva del genoma segmentado al recombinar es el intercambio genético mientras que la ventaja de monopartito es el empaquetamiento y transmisión de una pequeña molécula de RNA que contiene toda la información del virus. (Strauss Ellen, Lamess Strauss, y Arnold Levine. 1996).

2.10. BIOLOGÍA EVOLUTIVA DE LOS RNA VIRUS

El proceso evolutivo de las poblaciones de virus RNA se entiende como el efecto de la mutación, la recombinación y los rearrreglos en el genoma de las partículas de una población como respuesta a presiones selectivas en un numero n de generaciones necesarias para adaptarse (entrar en periodos de estasis) o divergir (cambiar de hospedero) para garantizar la replicación –eficacia biológica- de la población en la siguiente generación (ANEXO 10 Evolución de Rotavirus) .

El proceso evolutivo esta influenciado por fuerzas evolutivas como la selección natural, la mutación, la recombinación (homóloga y no homóloga) , la deriva genética y

los cuellos de botella . Dichas fuerzas se manifiestan en los principios evolutivos que explican la gran adaptabilidad de virus RNA como el Trinquete de Muller, la Hipótesis de la Reina roja, la exclusión competitiva y el equilibrio puntuado (ANEXO 9 Dinámica de las poblaciones de RNA virus). La adaptabilidad se puede medir mediante la eficacia biológica y puede ser influenciada por la memoria molecular, el umbral del error, la eficacia biológica inicial, la alternancia de hospederos, el tratamiento con antivirales, es decir por cambios en las condiciones ambientales.

2.10.1. Deriva genética

La *deriva genética* es el resultado de los errores de muestreo generados durante la transmisión de los genes, es más eficaz con tamaños poblacionales pequeños (cuellos de botella) (Novella et al 1995; Novella et al 1999) donde la frecuencia de un gen cambia de generación a generación.

Se afirma que un gen puede cambiar de una generación a otra gracias a lo que se llaman errores de muestreo, ya que de todos los genes de la población sólo una pequeñísima fracción pasará a la siguiente .

Si no hubiera otros procesos de cambio evolutivos como la mutación y la selección natural, las poblaciones llegarían al final a tener un solo alelo de cada gen, aunque se tardase muchas generaciones en llegar a ello. La razón es que tarde o temprano uno u otro alelo sería eliminado por la deriva genética sin posibilidad de que reapareciera por mutación. Debido a la mutación los alelos desaparecidos de una población pueden reaparecer de nuevo, y gracias a la selección natural la deriva genética no tiene consecuencias importantes en la evolución de las especies, excepto en poblaciones de pocos individuos.

2.10.2. Cuellos de botella

En poblaciones pequeñas de RNA virus existe una gran probabilidad de que la muestra no represente la población original (*cuellos de botella*) , y por tanto que el genoma con la secuencia silvestre se pierda y/o da lugar a la fijación de mutaciones independientemente de su valor selectivo (Novella et al 1999).

Los *cuellos de botella* permiten seleccionar una población a partir de los individuos afectados por la deriva genética permitiendo fijar genes adaptados y en algunos casos no

óptimos que resultan en el variable decrecimiento de la eficacia biológica en poblaciones pequeñas (Chao, 1990; Duarte et al. 1992; Duarte et. al 1994; revisado en Domingo et. al 1996). Dichos cuellos de botella disminuyen o incrementan la eficacia únicamente cuando la cuasiespecie se adapta a un nuevo ambiente mediante la fijación un nuevo mutante (antes de baja eficacia) , dicho mutante tiene mas probabilidades de ser fijado cuando se encuentra cerca al umbral del error como lo demuestras estudio en el fago 06 y VSV (Chao, 1990; Duarte et al. 1992; revisado en Domingo et.al, 1996).

La disminución del tamaño poblacional a causa de sucesivos cuellos de botella esta asociado con el decrecimiento de polimorfismos y debe contribuir a la extinción de especies (Land, 1994; revisado en Domingo et. al. 1996).

Los cuellos de botella genéticos tienden a incrementar el efecto deletéreo del trinquete de Muller durante la evolución de los virus RNA acumulando mutaciones deletéreas. La valides de la hipótesis de la reina roja y el principio de exclusión competitiva en virus RNA es resultado de la naturaleza adaptativa de las cuasiespecies (Domingo et. al 1996). Dichos cuellos de botella suceden en diferentes intensidades normalmente en los ciclos naturales de los virus RNA (Chao 1990, Domingo and Holland 1997, Lázaro et al 2003; Novella 1999) incrementando o disminuyendo la eficacia y en alguna ocasiones entrar en periodos de éstasis (Duarte et al , 1992,1993,1994) dependiendo de las condiciones ambientales y los procesos de competencia.

2.10.3. Selección Darwiniana

El modelo de las cuasiespecies planteado por Eigen (1993) es totalmente darwiniano, es decir que los efecto de la selección natural se manifiestan en la heredabilidad y eficacia de los caracteres adquiridos (Darwin, 1859).

La *adaptabilidad* de las cuasiespecies en ambientes fluctuantes es acelerada, teniendo en cuenta que *E. coli* se adapta a un nuevo tipo de cultivo un 8% en 400 generaciones y un 37% en 2000 generaciones mientras que VSV se adapta aun nuevo hospedero en un 5000% en 50 generaciones (Chao 1990) esto gracias a que las tasa de mutación de los virus RNA fluctuan alrededor de 10^{-4} nt por ciclo de replicación en comparación con los eucariotas que oscila alrededor de 10^{-9} nts por ciclo de replicación (Drake ; 1993).

La *Selección negativa* - Alelos con efecto deletéreo son eliminados de la población- afirma que la población que sea más eficiente en aprovechar el recurso limitado sobrevivirá permitiendo la eliminación de mutantes con el fin de mantener la cuasiespecie en límites aceptados por el espacio de secuencias (Domingo et. al, 1996) o entrar en periodos de estasis.

La *selección positiva* - Alelos con efecto beneficioso aumentan de frecuencia en la población- implica que uno o mas de los mutantes en la distribución de las cuasiespecies sean replicados en nuevos ambientes (Domingo et. al, 1996) dado que los mutantes que inicialmente eran desventajosos (baja eficacia) en la población ancestral serán ventajosos y posiblemente fijados en la población descendiente luego de ser sometidos a presiones de selección.

2.10.4. Memoria molecular

La *memoria molecular* provee un mecanismo para que la cuasiespecie responda eficientemente a la presión selectiva que ha sido previamente experimentada por la población, es decir el hecho de poseer un nuevo hospedero no implica que la cuasiespecie no pueda retornar al huésped parental (Ruiz et al 2000; Elena, 2002; Wilke y Novella 2003).

2.10.5. Eficacia biológica o habilidad replicativa

La *Eficacia biológica* se entiende como la habilidad replicativa de una población viral, es decir que tan bien adaptada esta para replicarse en un ambiente en particular. La eficacia biológica relativa es la eficacia biológica de la población viral en comparación con otra genética o fenotípicamente diferente que compite por las maquinaria del mismo hospedero (Chao 1990; Holland et. Al 1991; Domingo and Holland 1997)

La eficacia biológica se ha convertido en una forma de medida de la adaptabilidad viral, siendo dependiente de la eficacia inicial, la densidad viral e historia evolutiva.

En poblaciones virales de VSV que inician con eficacias bajas (menores que 1), necesitan 5 pases o generaciones para incrementar la eficacia, mientras que en poblaciones que inician con altos valores de eficacia (Mayores o iguales a 1) se necesitan 30 pases para mantener el v_r inicial de la eficacia (Novella et al 1995, 1999).

La pérdida de eficacia por lesiones genéticas puede ser consecuencia de los cuellos de botella genéticos generados a partir de un solo rearrreglo de aminoácido que sea desventajoso en la capsida (Domingo et al., 1996) es decir que impida la entrada al hospedero. La eficacia biológica disminuye bajo sucesivos cuellos de botella por el efecto del trinquete de Muller.

La ganancia de eficacia se produce a expensas de sustituciones adicionales sin reversiones críticas antigénicas en los rearrreglos (Borrego et al. 1993, revisado en Domingo, 1996) es decir sin alterar el fenotipo. La eficacia aumenta en el curso de una infección masiva permitiendo la competencia de las variantes optimizando la cuasiespecie (Novella et al., 1995; revisado en Domingo et al. 1996).

2.10.6. Equilibrio puntuado

El *Equilibrio puntuado* afirma la evolución de los linajes presenta periodos de estabilidad o estasis en los cuales las especies permanecen inalteradas sin cambios graduales interrumpidos por periodos cortos de cambio en donde en pocas generaciones se pasa de un estado a otro (Mayr 1997). Cuando se realizaron análisis de diferentes cepas de VSV en diferentes partes de América se encontró que dichas cepas separadas geográficamente 15 años atrás diferirían solo en 2 nucleótidos (Stuart, Row and Fitch 1993; Rodríguez et al. 1993) evidenciando estasis evolutiva.

2.10.7. La Reina Roja en la competencia

El efecto evolutivo de la reina Roja es una metáfora original de Alicia en el país de las maravillas “Necesitas correr tan rápido como te sea posible para mantenerte en el mismo lugar” (Lewis Carroll).

Es decir que los competidores deben evolucionar a la misma tasa similar a una carrera armamentista en que la presa evoluciona a la misma tasa del predador (Clarke et al. 1994).

El efecto *de la reina roja*, en el contexto de las cuasiespecies, afirma que los mutantes con eficacias biológicas altas pueden ser desplazados por mutantes de baja eficacia y conducen al flujo de la cuasiespecie en el espacio de secuencias (Clarke 1994; Sole 1999).

Por otra parte la competencia entre clones de VSV con eficacias iniciales aproximadamente iguales resulta en eventuales desarreglos de una población por parte de la otra en acuerdo con el principio de exclusión competitiva (Clarke 1994, revisado en Domingo, 1996) el cual afirma que en ausencia de nuevos nichos una especie siempre desplaza a la otra, es decir una de las poblaciones será eliminada y la población que sea más eficiente en aprovechar el recurso sobrevivirá (Mayr 1997). La idea original se refiere a la continua evolución de ecosistemas complejos conducidos por las interacciones bióticas entre especies donde cada especie está forzada a mantenerse en competencia para ajustarse a las condiciones del ambiente cambiante (Clarke 1994; Sole et. al 1999). Cada adelanto evolutivo de una especie representa el deterioro de las condiciones ambientales para el adelanto de otra, por lo que ambas especies tienen que evolucionar tan rápidamente como puedan solamente para sobrevivir (Van Valen, 1972; revisado en Clarke 1994).

2.10.8. Trinque de Muller

En ausencia de recombinación, poblaciones sometidas a repetidos cuellos de botella sufren la pérdida de los genomas menos mutados y acumulan mutaciones deletéreas que llevan a una pérdida de eficacia biológica, este efecto se conoce como el Trinquete de Muller (Chao 1990; Duarte et al 1992).

El *trinquete de Muller* en poblaciones sexuales postula que el sexo es un mecanismo que permite la eliminación o reducción de mutaciones deletéreas dado que la mayoría de estas no se acumulan gracias a la recombinación, (Maynard-Smith, 1978; Wuethrich, 1998; revisado en Ramírez 2004).

El *Trinquete de Muller* en poblaciones asexuales donde existen altas tasas mutacionales y tamaños poblacionales pequeños causados por los cuellos de botella, se aceleran las acumulaciones de mutaciones deletéreas (con o sin recombinación) disminuyendo la eficacia de la cuasiespecie (Chao 1990, Novella 1995). Originalmente afirmaba que una población asexual pequeña con altas tasas mutacionales tiende a incorporar mutaciones deletéreas de manera irreversible (Muller, 1964; revisado en Domingo et. al, 1996).

2.10.9. Tasa de divergencia

La *tasa de divergencia* de un RNA virus es tan alta que se ha encontrado homología en las secuencias de virus que infectan tanto a plantas como animales; siendo estos grupos diversificados hace tanto tiempo se podría afirmar que los virus RNA tienen origen milenario. La tasa de divergencia para un genoma viral a nivel de nucleótidos es 0.03 al 3% por nucleótido por año, un millón de veces mayor que la de los eucariotas (Fields et al , 1996). Sin embargo existen tasas muy bajas de divergencia, v. gr el virus del mosaico amarillo del navo únicamente ha cambiado un 1% en los últimos 10000 años así como en poliovirus como el Sindbis virus. Los virus RNA tienen la habilidad de encontrar nuevos hospederos y crear divergencia a partir de los mutantes que se producen en la cuasispecie (Fields et al 1996).

La diversificación genética se da mediante la generación de mutaciones durante la replicación en células infectadas y el destino de los mutantes generados es la búsqueda nuevos nichos, donde cada individuo o partícula depende de su eficacia inicial (Domingo et. al 1996).

2.10.11. Balance mutación-selección en cuasispecies

Los procesos de mutación y la recombinación proveen mecanismos moleculares que permiten la exploración de grandes porciones del espacio de secuencias de la cuasispecie. Los RNA virus deben su adaptabilidad al permanente conflicto entre la presión del cambio impuesto por las altas tasa mutacionales y la necesidad de restringir la variación debido a su complejidad ancestral y a la dependencia de las funciones celulares (Domingo et. al, 1996) manifestadas en un constante equilibrio mutación-selección. Dicho equilibrio esta influenciado por los cuellos de botella y la densidad viral y esta sometido a selección natural positiva y negativa según las condiciones.

2.11. DENSIDAD VIRAL (MULTIPLICITY OF INFECTION)

La densidad viral o m.o.i (multiplicity of infection) se refiere a la cantidad de virus que entran a una célula cuya probabilidad está determinada por una distribución de Poisson e indica la probabilidad del numero de virus que pueden entran a una célula (Wilke and Novella, 2003).

La teoría de la selección natural es dependiente de la densidad poblacional o número de partículas que entra a una célula y la habilidad de estas para utilizar el recurso (Muller 1988, revisado en Elena 2002). La estrategia *k* favorece la eficiencia en la utilización del recurso e incrementa la habilidad competitiva. La estrategia *r* favorece el incremento reproductivo siempre y cuando este implique un sacrificio en la habilidad competitiva (Muller y Ayala 1981; revisado en Elena 2002).

La eficacia biológica de la estrategia *k* bajo altos *moi* presenta valores de eficacia más altos que la estrategia *r*. Utilizando *moi* de 0.04 y 1 en 3 linajes celulares se determinó la eficacia mezclando 1:1 (*k:r*) diferentes linajes, luego de 20 días se midió la frecuencia de cada competidor. Se observó correlación negativa entre la eficacia de la selección *r* y *moi*. La estrategia *k* presenta estrategias adaptativas ventajosas solo en poblaciones pequeñas (de bajos *moi*) pero esta ventaja desaparece cuando el tamaño de la población se incrementa dramáticamente. Existe un costo para la estrategia *k* es decir para tamaños poblacionales grandes (*moi*=5) mientras que para *moi* pequeños (0.002) no existe costo (Turner y Chao 1998, revisado en Elena 2002).

2.12. SINERGISMO Y ACCIONES COLECTIVAS EN POBLACIONES DE VIRUS RNA

Se refiere a una situación en que la coinfección de dos o más virus aumenta la infección en el cual al menos una de las infecciones se ve incrementada comparado con la ausencia de coinfección (revisado en Kareija et al 2000); por otra parte se han realizado estudios de la coinfección como acción colectiva (interacción y colaboración) basado en el dilema del prisionero planteado por la teoría de juegos (Brown 2001). El sinergismo ha sido reportado tanto virus animales como el HIV (Xavier et al 2002) y en virus vegetales como potyvirus (Kareija et al 2000) donde la coinfección con otro tipo de virus incrementa el título de alguno de los dos (revisado en Kareija et al 2000).

En presencia de virus como el herpes simplex (HSV), Citomegalovirus (CMV), y el virus del Epstein-Bar (EBV). La infección por HIV es acentuada, esto es mas probable en el caso de CMV dado que los virus infectan las misma células (Xavier et al 2002). El CMV produce un transactivador promiscuo denominado IE-286 para muchos virus y promotores celulares. El EBV es capaz de hacer alta regulación (upstream) incrementando la expresión de proteínas del HIV (Xavier et al 2002)

2.13. PERL

Perl (Practical Extraction and Report Lenguaje) fue inicialmente creado por Larry Wall en C++ para simplificar las tareas de administración de sistemas de redes UNIX (Merelo 2002). Perl permite manejar archivos muy grandes de texto (una población de 10e6 secuencias ocupa 3.5GBs en disco) y facilita hacer prototipos rápidos de algún algoritmo que queremos ver funcionar (Merelo 2002). En los últimos años se ha implementado en la bioinformática dado que permite trabajar secuencias con facilidad. Recientemente se ha diseñado una versión para estudio biológico denominada BioPerl el cual permite manejar y acceder a bases de datos como el Gene Bank o el Protein Data Bank y utilizar herramientas de programas como ClustalX, GeneDoc y Macaw. Perl permite la búsqueda, extracción y formateado de archivos de tipo texto (secuencias) además permite la construcción de pequeños programas que pueden ser usados como unidades independientes o como filtros para obtener información de archivos, realizar búsquedas y por ende realizar simulaciones computacionales.

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

3.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Los Rotavirus A son los principales agentes etiológicos de diarreas graves en aves, bovinos, porcinos, murinos y primates, incluyendo al hombre. Cada año el grupo A de Rotavirus causa 870.000 muertes de niños en todo el mundo (Bern et al 1992, revisado en Borgan et al 2003).

Los Rotavirus A no han sido ampliamente investigados dado que existen procesos en la entrada y replicación del virus que aun no han sido clarificados como (i) la dependencia de ácido sialico para la entrada de Rotavirus animales a excepción de wa (Arias et al 2001); (ii) las implicaciones de proteínas estructurales como VP1, VP2 y VP3 en la replicación de Rotavirus (Patton et al 1997) y VP7 y VP4 implicadas en la encapsidación de las DLP (doble layer protein) y la entrada del virus a la célula (Lopez y Arias 2001; Sánchez-San Martín et al 2004); por estas y otras razones tal vez la vacuna contra Rotavirus presenta graves efectos secundarios y desde el 22 de octubre de 1999 dejó de ser administrada a los niños según los informes del Centro de Control de enfermedades de los Estados Unidos.

La falta de información básica sobre la Biología molecular del virus obliga a buscar alternativas antivirales más efectivas que lideren el desarrollo de la vacuna como por ejemplo la catástrofe por error basada en el modelo de las cuasiespecies (Eigen 1992; Domingo et al 2005).

El modelo de las cuasiespecies fundamentado en el darwinismo trata de explicar la dinámica poblacional de los virus RNA teniendo en cuenta el balance mutación-selección en la producción de variantes por mutación (Eigen, 1992). Dicho modelo ha sido evidenciado experimentalmente en VSV (Holland et al 1991) y FMDV (Martinez et al 1993) teniendo en cuenta los efectos de la deriva genética, los cuellos de botella y la densidad viral (Novella et al.,1995; Novella et al 1999; Wilke Reissig and Novella 2004). La ventaja del modelo de las cuasiespecies radica en que es posible generar extinción induciendo a la población a rebasar el umbral del error que lleva perdida inexorable de la información genética (Eigen 2002).

Los grandes tamaños poblacionales, las altas tasas mutacionales –entre $10e^{-4}$ y $10e^{-5}$ nt por ciclo de replicación (Drake, 1993), los tiempos cortos de replicación, la recombinación y los rearrreglos permiten a los virus RNA (segmentados como no segmentados) generar una distribución de mutantes alrededor de una secuencia maestra que se replica con error y fluctúa cerca al umbral (Domingo and Holland 1997) razón por la cual se pueden fijar mutaciones dentro de la población (independientes a su valor selectivo) evidenciadas en la secuencia consenso (secuencia promedio poblacional).

Las altas tasas de mutación permiten explorar grandes porciones del espacio de secuencias manteniendo mutantes (cerca al umbral) con posibles fenotipos potenciales ante cambios ambientales generando gran diversidad en la población (Drake et. Al 1993; Domingo and Holland 1997). La *recombinación* por su parte puede darse entre virus y hospedero o entre virus de forma homóloga o heteróloga (Domingo and Holland 1997) contribuyendo a la generación de variantes o a la corrección de errores generados por mutación (Chao 1988) según las condiciones.

Las mutaciones puntuales producen gran heterogeneidad en la variabilidad genética de la población (Domingo and Holland 1997) mientras que la recombinación homóloga bajo altas tasas de error de replicación permite homogenizar la variabilidad de la población corrigiendo errores de copiado (Chao, 1988) dada su mayor frecuencia en poblaciones de virus RNA (Bruyeré et al 2000).

Algunas de las variantes producidas por mutación y/o recombinación son fijadas ante el disturbio o la inminente extinción (Escarmis et al 1996; Yuste et. al 1999; Farsi et al 2002; González et al 2004), de esta forma se induce la evolución rápida ante presiones selectivas como: (i) el sobrepaso del umbral del error por el uso de mutagénicos, es decir la pérdida de la información genética por catástrofe informática (Pfeiffer y Kirkegaard, 2003); (ii) anticuerpos y antivirales (AZT en el caso del HIV) (Ribeiro et al, 2000; Mammano et al 2000; Kuritzket 2001; Ritchman et al 2003); (iii) la respuesta inmune y los tratamientos con interferón en el caso de la hepatitis y VSV (Kan et al 2003; Novella et al 1996) y (iv) eventuales cambios de hospedero (Elena, 2002).

Las poblaciones virales se adaptan rápidamente ante presiones de selección fuertes (como las nombradas anteriormente) fijando un mutante dentro de la población que desplaza al consenso, fijado en la condición ancestral dado que se replica mejor en la nueva condición si se compara con el parental (Clarke et al., 1994; Elena 2002). Si las condiciones permanecen constantes, la selección positiva incrementa el número de mutantes con efectos ventajosos, si ocurren disturbios o las condiciones se ven alteradas (un antiviral), la selección negativa incrementa la frecuencia de mutantes deletéreos dentro de la población, permitiéndole a la población enfrentar nuevas condiciones mediante la generación de variantes diferentes a las fijadas en condiciones ancestrales (Domingo et al 1996; Elena, 2002).

Eigen (2002) afirma que es posible generar catástrofe informática teniendo en cuenta el efecto del trinquete de Muller y haciendo que las secuencias sobrepasaran el límite del umbral del error, donde la información genética se pierde y por consecuencia se genera extinción por pérdida de información. Esta pérdida de la información puede ser inducida por (i) mutagénicos, incrementando la tasa de error (Briecbicher and Eigen 2005) y (ii) partículas que interfieren en la replicación (DIPs), que producen mutantes inviables (Briecbicher and Eigen 2005, Domingo et al 2005). Claro está que las poblaciones virales se adaptan fácilmente a mutagénicos y las partículas que interfieren en la replicación pueden convertirse en viables por mecanismos de corrección post-transcripcionales como la complementación (Garcia-Ariza et al 2004).

3.2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Durante la evolución *in silico* de Rotavirus SA11 (VP1 y VP2), ¿existen diferencias significativas en las mutaciones acumuladas en poblaciones de secuencias sometidas a operadores genéticos (mutación puntual y recombinación) bajo deriva genética, sucesivos cuellos de botella y a diferentes densidades virales?; si existen estas diferencias, ¿cómo se manifiestan en el recorrido de las poblaciones por el paisaje adaptativo (eficacia biológica) y bajo que principios evolutivos pueden ser argumentadas las fluctuaciones de la habilidad replicativa (Eficacia biológica) de las poblaciones de secuencias de Rotavirus SA11?.

3.3. JUSTIFICACIÓN

La bioinformática es una forma de abordar y analizar la problemática de la evolución viral dado que permite utilizar operadores genéticos de variación como la mutación y la recombinación basada en algoritmos genéticos y evolutivos aplicando la dinámica de los paisajes adaptativos complejos (Holland 1993) bajo la influencia de la deriva genética, sucesivos cuellos de botella y densidad viral.

Los modelos de evolución y estudios experimentales de poblaciones virales basados en las Cuasiespecies (Eigen 1993) siempre han tenido en cuenta la influencia de la mutación y los cuellos de botella en la eficacia biológica (habilidad replicativa) (Novella et al 1995, Novella et. Al 1999; Lázaro 2002; Novella et al 2004), sin embargo pocos han tenido en cuenta los procesos de recombinación (Bruyere et al., 2000). Este mecanismo se entiende como una estrategia adaptativa para incrementar la variabilidad genética y reducir las altas tasas mutacionales ante presiones selectivas como el tratamiento con mutagénicos y eventuales cambios de hospedero tanto en virus segmentados como influenza, HIV, y rotavirus, como en no segmentados FMDV, VSV- (Chao 1988).

Según lo anterior es imperativo realizar simulaciones computacionales y estudios experimentales que permitan la construcción de modelos, con el fin de ver los efectos de operadores genéticos (mutación puntual y recombinación) en la corrección de errores producidos durante la replicación, evidenciando manifestaciones de dichos operadores en la eficacia biológica de la población (caminata por el paisaje adaptativo) y en la formación de una secuencia consenso que coincide con el tipo silvestre y permite evaluar mutaciones fijadas en la población. Esto con el fin de encontrar puntos susceptibles a extinción o pérdida de habilidad replicativa para el desarrollo de terapias antivirales basadas en la catástrofe informática (Crotty, Cameron y Andino 2001; Eigen 2002) es decir cuando se pierde la información del genoma porque ha sido rebasado el umbral del error.

4. OBJETIVOS

4.1. GENERAL

Realizar una simulación computacional de la evolución de una población secuencias de Rotavirus SA11 (VP1 y VP2) bajo sucesivos ciclos de replicación y cuellos de botella sometiéndola a operadores genéticos como mutaciones puntuales aleatorias y recombinación (homóloga y heteróloga), influenciados por la densidad viral (m.o.i)

4.2. ESPECÍFICOS

4.2.1. Diseñar y programar un algoritmo que permita simular la evolución de una población de Rotavirus SA11 bajo sucesivos ciclos de replicación y cuellos de botella, sometiéndola a operadores genéticos como mutaciones puntuales, mutación-recombinación y solo recombinación bajo la influencia de la densidad viral (m.o.i)

4.2.2. Simular la evolución de una población de secuencias de Rotavirus SA11 (VP1 y VP2) bajo sucesivos ciclos de replicación y cuellos de botella, sometiéndola a mutaciones puntuales aleatorias y recombinación (homóloga y heteróloga) bajo la influencia de la densidad viral.

4.3.3. Evidenciar y estudiar los efectos de los operadores genéticos (mutación y recombinación), la densidad viral (m.o.i), y los cuellos de botella en la acumulación de mutaciones y en la eficacia biológica (habilidad replicativa) basados en principios de la Biología Evolutiva de virus RNA reportados en la literatura que pueden ser evidenciados en un paisaje adaptativo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

La Bioinformática es una gran herramienta para la modelación de procesos naturales, en este caso se modeló la evolución de una población de secuencias de Rotavirus SA11 a partir de un algoritmo basado en Sistemas Adaptativos Complejos (concepto ampliamente utilizados en los modelos evolutivos computacionales) y programado en Perl 6.0.

Un Algoritmo genético consiste en someter un grupo de estructuras de datos (en este caso secuencias de nucleótidos) a una serie de operadores genéticos inspirados en la teoría de la evolución de Darwin: las mutaciones y la recombinación, que representan soluciones a un problema determinado como la presión selectiva (Ramirez, 2004) dado que se inducen variabilidad genética dentro de la población.

Los algoritmos evolutivos planteados por Holland permiten usar operadores genéticos como mutación, recombinación y por ende variación, bajo un modelo darwiniano en el que se pueden representar las fluctuaciones de la eficacia biológica en el paisaje adaptativo. De esta forma se pueden diseñar modelos de la dinámica poblacional en sistemas biológicos y ecológicos (Holsbin 2000). Tomas Rey diseña un ecosistema virtual en el que los organismos digitales compiten por procesador y memoria RAM, esta es tal vez la aplicación más reconocida de los Sistemas Adaptativos Complejos en los que se utilizan operadores genéticos como la mutación (Ray 1998) para generar variabilidad. También se han realizado estudios en evolución de la cooperación basados en teoría de juegos, en especial el dilema del prisionero que se ha aplicado a la dinámica viral (Brown 2001) pero que en este caso no se tuvo en cuenta al igual que el sinergismo.

Con los algoritmos genéticos planteados por Holland y las aplicaciones realizadas por Ray (entre otros) se pueden diseñar dinámicas bioinformáticas que representan los procesos biológicos con resultados cercanos a la realidad. Esto tipo de conceptos y aplicaciones fue el que permitió diseñar y programar un algoritmo basado en Sistemas Adaptativos Complejos (CAS) que simulara la evolución de virus RNA utilizando un lenguaje de programación bastante eficiente (Perl 6.0) para realizar búsquedas y extracciones de datos de archivos de texto. Perl 6.0 permite construir módulos (incluye

operadores genéticos) que pueden ser usados como filtros para obtener información de archivos.

El factor de diseño se define como el número de ciclos de replicación por cuello de botella, cuyos niveles son las secuencias mutadas puntualmente (al azar), mutadas puntualmente-recombinadas y solo recombinadas, la variable respuesta es la acumulación de mutaciones puntuales y la eficacia biológica, la unidad de respuesta es cada una de las poblaciones de secuencias evaluadas por eficacia biológica o habilidad replicativa.



Figura 2. Algoritmo evolutivo para poblaciones de RNA virus. A partir de los parámetros iniciales: tasa de mutación, tamaño poblacional, número de generaciones y densidad viral (m.o.i). Una secuencia maestra se copia con error generando una población inicial, las secuencias descendientes bajo efecto cuellos de botella son evaluadas por homología respecto a la secuencia maestra (95%)-umbral del error- y posteriormente son traducidas seleccionando las secuencias que contienen las secuencias de nucleótidos y el tripéptido DDG para VP1, datos necesarios para determinar la proporción entre mutantes y silvestres. A partir de dicha población inicial se selecciona la densidad viral (m.o.i entre 1 y 200) que representa el cuello de botella y funciona como las secuencias maestras de la siguiente generación para generar la siguiente población.

TABLA 1. POSIBLES CRITERIOS DE SELECCIÓN DE SECUENCIAS DE ROTAVIRUS SA11

	<i>función</i>	<i>promotores</i>	<i>péptido</i>	<i>Posición</i>	<i>Autor</i>
VP1	RNA replicasa síntesis y empaquetamiento de RNA	3'ugugacc	GDD	630-632	Yang, 2004
VP2	Induce actividad replicasa para síntesis de RNA	PGYG, YYGYG, GYYYGYG			Chen and Patton 2000; Yang 2004
VP4 (VP5)	Implicada en la adhesión y penetración del virus		DGE GGA KIDRSTQISPNTLP (RRV)	308-310 (a2b1) 399-411 (a2) 643-658	Graham 2003 Dowling 2000 Zarate 2003
VP6	Interactúa con VP2, VP4, y VP7		(RLSFQLVRPPNMTP) of YM	289 to 302	Sandino 1994
VP7	Implicada en la adhesión del virus		LDV DGE	237-239 (a4b1- a4b7) 65-78 (a2b1)	Coulson 1997

5.1.1. Población y estudio de muestra

A partir de una secuencia de nucleótidos (secuencia maestra) publicada en el Gene Bank (VP1 y VP2) se generaron poblaciones de 10000 secuencias (Eigen, 1992) por ciclo de replicación y bajo sucesivos cuellos de botella, estas fueron copiadas a diferentes tasas de error reportadas para RNA virus (Drake 1993) con la posibilidad de determinar la secuencia consenso (promedio) dentro de la población por cada cuello de botella; de dichas copias obtenidas por cada generación se seleccionaron entre 1 y 200 secuencias -en la simulación este número se determina según la densidad viral elegida que sigue una distribución de Poisson- con el fin de generar cuellos de botella y posteriormente evaluar los sobrevivientes por umbral del error del 5% (95% de homología) y la presencia o ausencia de secuencias nucleotídicas y peptídicas importantes en la replicación del virus, esto con el fin de determinar la proporción entre silvestres y mutantes necesaria para calcular la eficacia biológica por cada cuello de botella.

5.1.2. Variables de estudio

En la simulación existen 4 variables que se mantienen constantes cuyo valor es determinado al iniciar la simulación: (i) tasa de mutación, (ii) tamaño de la población, (iii) número cuellos de botella, y (iv) densidad viral m.o.i. Según Novella Reissig and Wilke (2004) es posible observar efectos significativos al variar la tasa de mutación y la densidad viral. El proceso de evolución *in silico* cambia la estructura de los datos (secuencias) mediante operadores genéticos y cuellos de botella arrojando datos de las mutaciones acumuladas por cuello y porcentaje de secuencias evaluadas positivamente (reportada en el Gene Data Bank) a partir del cual se realizan los cálculos de la eficacia biológica.

Las medidas de la simulación se hacen comparando el efecto de las mutaciones acumuladas como fuente de variación y la eficacia biológica de dichas variantes contra tiempo, es decir el efecto de los cuellos de botella (tiempo) es medido con base a las mutaciones acumuladas y las fluctuaciones de eficacia biológica por efecto de dichas mutaciones.

Se utilizaron diferentes tasas de mutación reportadas para RNA virus (Drake, 1993), y se generaron frecuencias de recombinación aleatorias, siendo la densidad viral un factor

influyente en la heterogeneidad dentro de la población y cuya probabilidad sigue una distribución de Poisson (Wilke y Novella 2003).

Las variables utilizadas en la simulación estuvieron bajo la influencia de las condiciones iniciales como la eficacia biológica inicial y el efecto de los cuellos de botella bajo operadores genéticos. Los efectos de dichas variables se manifiestan en la caminata de la eficacia biológica por el paisaje adaptativo.

5.2 MÉTODOS

5.2.1. Diseño y programación del Algoritmo

Se diseñó y construyó un algoritmo que modela la evolución de poblaciones de Rotavirus SA11 (o cualquier RNA virus) teniendo en cuenta el efecto de operadores genéticos como la mutación y la recombinación y la influencia de factores externos como la deriva genética y los cuellos de botella. Dicho modelo fue basado en el modelo matemático de Lazaro et al 2002 y Manrubia et al 2003 en el cual cada secuencia tiene cierta probabilidad de generar un número k ($k=(1,2,3\dots)$) de descendientes es obtenida por una distribución de Poisson donde $P(k) = [(W)^k e^{-W}]/k!$ donde W es la habilidad replicativa (eficacia biológica) obtenida a partir de un número k de descendientes.

5.2.1.1. Operadores genéticos (como influencia interna)

Los operadores genéticos son los causantes de la variabilidad de los individuos de la población por tanto son determinantes en la adaptabilidad de las poblaciones virales tipo cuasiespecie. Además de esto la recombinación es una posible vía de corrección de errores de copia en ausencia de mecanismos de reparación como en el caso de las replicasas de virus RNA.

La *mutación puntual* genera variantes clonales que se distribuyen alrededor de una secuencia maestra y se denomina cuasiespecie (acepta recombinación) (Eigen 1993); la mutación puntual se realizó por ciclo de replicación, es decir que si la tasa de mutación es de 0.002 nts/ciclo en una secuencia de 2000 nts, esta mutará al azar 2 nucleótidos por cada mil sin diferenciar entre transiciones y transversiones solo cambiando el nucleótido..

La *Recombinación* (homóloga y heteróloga) se generó al azar y se realizó en cada población, es decir cada secuencia fue dividida en un número de partes (grupos) determinadas al azar (hasta el largo de la secuencia) y posteriormente se recombinaron los grupos del mismo tamaño de forma aleatoria en toda la población. En el caso de ser *homóloga* la recombinación se da entre secuencias del mismo gen; en el caso de ser *heteróloga* se da entre diferentes genes (Flints et al., 2000) y la generación de grupos esta determinado por un número divisible entre el tamaño de la secuencia 1 (VP1 3302nts) y el tamaño de la secuencia 2 (VP2 2690nts) con el fin de poder realizar la recombinación dado que los tamaños de las secuencias son diferentes.

Las *mutaciones puntual-recombinación* (más cercano a la realidad) se produjeron en las poblaciones de secuencias y posteriormente fueron recombinadas (cada población) de forma homóloga o heteróloga como se explicó arriba.

También se generaron *mutaciones por recombinación* en la cual solo se generaron los grupos de secuencias para recombinar homóloga o heterológamente sin mutarlas previamente de forma puntual.

5.2.1.2. *Deriva genética y cuellos de botella (como influencia externa)*

Existen factores externos como la deriva genética (generada por cada ciclo de replicación) y los cuellos de botella (determinados según el número de partículas o secuencias que entran a la célula) muy influyentes en el proceso de evolución de los RNA virus (Domingo and Holland 1997) dado que permite generar diversidad de mutantes independientemente a su valor selectivo

El resultado de los errores de muestreo generados durante la transmisión de la información genética (herencia) es más significativo con tamaños poblacionales pequeños (Novella et al 1995; Novella et al 1999) donde la frecuencia de un gen cambia de generación a generación por efecto de la deriva genética.

En poblaciones pequeñas de RNA virus existe una gran probabilidad de que la muestra no represente la población original, es decir que los cuellos de botella estan determinados por la densidad viral (muestra) y donde la representatividad poblacional es tan baja, tanto así que es muy probable que el genoma con la secuencia silvestre (probablemente el consenso) se pierda y/o de lugar a la fijación de mutaciones

independientemente de su valor selectivo (Novella et al 1999) disminuyen el tamaño de la población dada la intensa selección por cuello de botella.

5.2.1.3. Criterios de selección para las secuencias de Rotavirus

Se determinaron criterios de selección (condiciones) por ciclo de replicación y cuello de botella generando competencia indirecta entre las secuencias, es decir si no presentan dichos criterios establecidos no sobreviven en la simulación.

Para la simulación de poblaciones de VP1 y VP2 implicadas en la replicación se utilizaron los siguientes criterios:

(i) VP1 y VP2 aceptan como mínimo un 5% de error en la copia de secuencias (95% de homología), este limite representa el umbral del error (Eigen, 2002).


(ii) Para VP1 o enzima encargada de la replicación se definieron como silvestres las secuencias que presentaran el tripéptido GDD (630-632) compartido por muchas polimerasas y la región 3' terminal ugugacc que posee señales cis-acting importantes en la síntesis de cadenas (-) específicas a la región 3' terminal del mRNA (Flints et al., 2000; Yang 2004).

(iii) Para VP2 se definieron como silvestres las secuencias que presentaran el promotor GYYYGYG necesario para la iniciación de la replicación de cadenas RNA (-), (Chen and Patton 2000, Yang 2004).

En el modelo de evolución planteado las secuencias implicadas en replicación de Rotavirus SA11 (VP1 y VP2) y publicadas en el Gene Data Bank (AF015955 y X16831 respectivamente) fueron copiadas con error 10000 veces generando poblaciones bajo diferentes parámetros de tasas de mutación (Drake, 1993) y densidad viral (m.o.i) para posteriormente ser evaluadas como silvestres o mutantes según los siguientes los criterios de selección de VP1 y VP2 (para el resto del genoma véase Tabla 1)

5.2.1.4. Consenso poblacional

Este determina la fijación de mutaciones en la población. Se calcula a partir de los nucleótidos que presentan la mayor frecuencia entre las secuencias de la población (VP1 y VP2) y por consiguiente se obtiene una secuencia consenso (promedio) dentro de la población. Esta en muchos casos es muy similar al tipo silvestre el cual en la mayoría de los casos es el mejor adaptado (Domingo, Webster and Holland 1999). V.gr si la secuencia maestra (original) es acacaaaataaaaaa y se producen 2 mutaciones puntuales al azar en dos copias con error de dicha secuencia (aGacaaaataaGaaaa, acaAaaaataaaaaaC), la secuencia de nucleótidos con mayor frecuencia es acacaaaataaaaaa, la cual representa el promedio de frecuencias de nucleótidos dentro de la población y permite determinar la fijación de mutaciones predominantes en la población de secuencias.

La secuencia maestra (Gene Bank) se usa para generar la primera población, donde cada genoma no es más que una copia de esta secuencia original que varia según su tasa de mutación. Luego la población original copiada es seleccionada y recombinada. En este punto se determina la secuencia consenso (consensus.pl) y se compara con la secuencia original para determinar los cambios ocurridos. Sólo la primera población es generada a partir de la secuencia original. Ninguna población es generada a partir de la secuencia consenso. La secuencia consenso se construye o se determina a partir del predominio de las frecuencias de nucleótidos de las secuencias que conforman una población cualquiera y no tiene más que un  valor informativo para el investigador en la determinación de las mutaciones fijadas dentro de la población.

5.2.1.5. Programación en Perl 6.0 (escritura del algoritmo)

Perl permite la búsqueda, extracción y formateado de archivos de tipo texto (secuencias) además permite la construcción de pequeños programas que pueden ser usados como unidades independientes o como filtros para obtener información de archivos, realizar búsquedas y por ende realizar simulaciones computacionales.

Se construyeron módulos independientes con funciones independientes que permiten:

(i) producir mutantes a partir de tasas de mutación y tamaños poblacionales determinados (*mutate.pl*) y para generar la población de estudio inicial a partir de la secuencia maestra (reportada en el Gene Bank) utilizando tasas de mutación y tamaños poblacionales definidos (*initiate_population.pl*); (ii) traducir las secuencias mutadas (*aa.pl*); (iii) calcular los consensos poblacionales (*concesus.pl*) (iv) buscar y encontrar secuencias nucleótídicas o peptídicas implicadas en la replicación del virus (*find.pl*); (v) hacer un reporte del porcentaje de secuencias que poseen los nucleótidos o péptidos encontrados por *find.pl* (*evaluate.pl*); (vi) realizar los cuellos de botella de forma aleatoria, es decir escogiendo un número entre 1 y 200 (densidad viral) que sigue una distribución de Poisson (*Reproduce.pl*) (vii) comparar el porcentaje de diferencias entre la secuencia maestra (original del Gene Bank) y la secuencia consenso (*compare.pl*).

Estos módulos nombrados anteriormente son necesarios para hacer funcionar el algoritmo en conjunto dado que cada una realiza una función específica y debe ser colocada en su lugar correspondiente dentro del algoritmo para realizar la simulación.

5.2.2. Simulación computacional

5.2.2.1. Subprogramas simuladores

Los módulos construidos fueron ubicados dentro del algoritmo para realizar sus funciones correspondientes (ANEXOS), es decir gracias a esto se pudo diseñar un subprograma encargado de realizar la simulación a partir de las funciones explicadas anteriormente. El resultado es poder simular la evolución de Rotavirus SA11 (o cualquier virus RNA) mediante las funciones específicas de los módulos localizándolas dentro del algoritmo (ANEXOS).

El subprograma *Evolution.pl* se encarga de simular la evolución de Rotavirus SA11 (o sus secuencias) bajo sucesivos ciclos de replicación y cuellos de botella someténdola solo a mutaciones puntuales, a diferencia del subprograma *Recombinación.pl* que permite simular la evolución de Rotavirus bajo mutación y recombinación. Si la recombinación es homóloga en el archivo *genome.rna* se encontrarán dos secuencias de VP1 (si es con todo el genoma solo se recombinan las copias del mismo gen), si la

recombinación es heteróloga en el archivo genome.rna estarán las secuencias VP1 y VP2 (bajadas del Gene Bank) o es su defecto todo el genoma.

A partir de los datos de entrada la simulación arroja datos como mutaciones acumuladas por ciclo de replicación y cuello de botella (uno precede al otro), porcentaje de secuencias que cumplen con el criterio de selección, secuencias seleccionadas por cuello de botella, diferencias con respecto a la secuencia ancestral (Gene Bank) y a la consenso. Sin embargo para los datos presentados en este trabajo solo se tuvieron en cuenta la acumulación de mutaciones por ciclo de replicación (10000) que incluye un cuello de botella (m.o.i) y el porcentaje de secuencias que cumplen los criterios de selección, el cual permite calcular por diferencia del total de la población una proporción entre mutantes y silvestres necesaria para calcular la eficacia biológica o habilidad replicativa cuyo valor se representa en el paisaje adaptativo.

5.2.2.2. Montaje y ejecución de DOTHEVOLUTIONVIRUS

DOTHEVOLUTIONVIRUS fue escrito en Perl 6.0, se ejecutó en DOS bajo la plataforma de Windows realizando las correspondientes adaptaciones para que el sistema operativo interpretara el lenguaje Perl (emulador de perl ActivePerl 5.8 para Windows).

La ejecución del algoritmo se realizó en un PC Intel Pentium IV de 3.0 GHZ, Board ASUS P4C800-E DELUXE (bus de datos de 800), y RAM de 1024 MB y 120 GB de disco duro.

Para realizar la simulación se definieron las variables de entrada que determinan el proceso evolutivo. Estas fueron tasa de mutación (nts por ciclo), tamaño de la población, número de ciclos de replicación o generaciones (igual al número de cuellos de botella) y densidad viral (m.o.i).

5.2.3. Principios evolutivos evidenciados en análisis de paisajes adaptativos

El efecto de operadores genéticos, la deriva y los cuellos de botella en la evolución de poblaciones de Rotavirus SA11 da la posibilidad de evidenciar principios evolutivos en los cambios de la acumulación de mutaciones puntuales y fluctuaciones de la eficacia biológica en la caminata por el paisaje adaptativos de un pico dado que la presión selectiva es siempre la misma.

A partir de la simulación de la evolución de Rotavirus SA11 *in silico* se realizó un análisis del efecto de la acumulación de mutaciones puntuales y las fluctuaciones de la eficacia biológica en paisajes adaptativos de un pico (presión selectiva constante); esto teniendo en cuenta la influencia de operadores genéticos (mutación y recombinación), la deriva genética y los cuellos de botella, como factores internos y externos (a las poblaciones virales) influyentes en la evolución de las cuasiespecies determinados por la eficacia biológica inicial y la densidad viral (m.o.i).

El porcentaje de secuencias evaluadas positivamente a los criterios de selección (adaptados) en un número n de ciclos de replicación y cuellos de botella, bajo diferentes tasas mutacionales y densidades virales (elegidos al iniciar la simulación), permite calcular la eficacia biológica por cada cuello, esto a partir de la diferencia entre porcentaje de silvestres evaluados positivamente y los evaluados negativamente antes y después de cada cuello, determinando una proporción entre mutantes y silvestres necesario para calcular la eficacia biológica.

La eficacia Biológica fue obtenida a partir de la proporción de mutantes y silvestres (Chao 1990), y fue representada en un paisaje adaptativo de un pico, basado en las fluctuaciones de la habilidad replicativa por efecto de operadores genéticos y cuellos de botella tratando de evidenciar los principios evolutivos que explican la adaptabilidad de los virus RNA (el trinquete de Muller, la hipótesis de la Reina roja y el estasis evolutivo característico del equilibrio puntuado).

5.2.3.1. Cálculo de la Eficacia biológica

Según Chao 1990 la Eficacia Biológica se calcula de la siguiente manera:

$$W^n = R_n/R_0$$

$$\ln W^n = \ln (R_n/R_0)$$

$$N \ln W = \ln(R_n/R_0)$$

$$\ln w = \ln(R_n/R_0)/n$$

$$e^{\ln(R_n/R_0)/n} = W$$

Donde R_0 es la proporción de mutantes y silvestres al comenzar el plaqueo, n el número de ciclos o generaciones, y R_n la proporción de mutantes y silvestres después de n generaciones o ciclos de crecimiento.

Se analizaron los efectos de operadores genéticos (mutación y recombinación) a través de sucesivos ciclos de replicación con cuellos de botella, teniendo en cuenta la fijación de mutaciones en la población a través del cálculo de la secuencia consenso, explicando la dinámica del efecto de los operadores genéticos en la caminata de las poblaciones por el paisaje adaptativo a partir de principios de la biología evolutiva de virus RNA reportados en la literatura (trinquete de Muller, exclusión competitiva, reina roja, y equilibrio puntuado).

5.2.3.2. Representación en el paisaje adaptativo.

Esta simulación permitió generar datos de las fluctuaciones de la eficacia de poblaciones de virus RNA manifestadas en la caminata por el paisaje adaptativo (Kauffman 1993) bajo efecto de operadores genéticos deriva genética y cuellos de botella de las poblaciones de secuencias (VP1 y VP2) cuyas mutaciones fijadas pueden evidenciarse en la formación de una secuencia consenso durante la exploración del espacio de secuencias.

Los paisajes adaptativos inicialmente formulados por Wright y aplicados en la teoría de los equilibrios puntuados de Gould (Mayr 1997) permiten graficar el efecto de operadores genéticos (para el caso del equilibrio puntuado) y las fluctuaciones de la eficacia biológica evidenciando principios de la biología evolutiva de virus RNA basados en criterios de selección previamente establecidos y apoyados por evidencia experimental.

6.RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Gráfica 1. Efecto de la mutación puntual, la recombinación heteróloga y la mutación puntual-recombinación simultánea (operadores genéticos) en la acumulación de mutaciones bajo sucesivos cuellos de botella. Los parámetros utilizados fueron tasa de mutación (tm) 0.002 , tamaño poblacional ($10e4$), número de generaciones o cuellos de botella (45) y m.o.i (1).

Cada uno de los puntos de la gráfica representa las poblaciones secuencias (inicialmente 1000) que cumplieron con los criterios de selección establecidos durante la simulación para VP1, este valor disminuye con el transcurso de los cuellos de botella. El azul, representa las mutaciones puntuales acumuladas al azar en VP1; el rosado, indica las mutaciones generadas por la recombinación heteróloga entre VP1 y VP2; el amarillo, representa las mutación-recombinación de VP1 y VP2. Los parámetros utilizados en esta simulación fueron tasa de mutación (tm) 0.0015 , tamaño poblacional ($10e4$), número de generaciones o cuellos de botella (45) y m.o.i (1).

El test de *Kolmogorov-Smirnov* indica la distribución normal de los datos obtenidos, dado que el valor calculado para cada operador genético fue mayor a 0.05. La *prueba t* (0.05, 44gl) indica que hay diferencias significativas entre el efecto de los operadores genéticos utilizados dado que el índice de significancia bilateral (0.00) fue menor que el alfa (0.05) y el intervalo de confianza no contiene el "0" indicando *diferencias altamente significativas* (véase anexo de Estadísticas).



Gráfica 2.

Efecto de la mutación puntual, la recombinación heteróloga y la mutación puntual-recombinación simultánea (operadores genéticos) en la acumulación de mutaciones bajo sucesivos cuellos de botella. Los parámetros utilizados fueron tasa de mutación (tm) 0.002 , tamaño poblacional ($10e4$), número de generaciones o cuellos de botella (45) y m.o.i (5)

Cada uno de los puntos de la gráfica representa las poblaciones secuencias (inicialmente 1000) que cumplieron con los criterios de selección establecidos durante la simulación para VP1, este valor disminuye con el transcurso de los cuellos de botella. El azul, representa la mutaciones puntuales acumuladas al azar en VP1; el rosado, indica las mutaciones generadas por la recombinación heteróloga entre VP1 y VP2; el amarillo, representa las mutación-recombinación de VP1 y VP2. Los parámetros utilizados en esta simulación fueron tasa de mutación (tm) 0.0015 , tamaño poblacional ($10e4$), número de generaciones o cuellos de botella (45) y m.o.i (1).

El test de *Kolmogorov-Smirnov* indica la distribución normal de los datos obtenidos, dado que el valor calculado para cada operador genético fue mayor a 0.05. La *prueba t* (0.05, 44gl) indica que hay diferencias significativas entre el efecto de los operadores genéticos utilizados dado que el índice de significancia bilateral (0.00) fue menor que el alfa (0.05) y el intervalo de confianza no contiene el "0" indicando *diferencias altamente significativas* (véase anexo de Estadísticas).



Gráfica 3 Efecto de la mutación puntual, la recombinación heteróloga y la mutación puntual-recombinación simultánea (operadores genéticos) en la acumulación de mutaciones bajo sucesivos cuellos de botella. Los parámetros utilizados fueron tasa de mutación (tm) 0.00038 , tamaño poblacional ($10e4$), número de generaciones o cuellos de botella (45) y m.o.i (1).

Cada uno de los puntos de la gráfica representa las poblaciones secuencias (inicialmente 1000) que cumplieron con los criterios de selección establecidos durante la simulación para VP1, este valor disminuye con el transcurso de los cuellos de botella. El azul, representa las mutaciones puntuales acumuladas al azar en VP1; el rosado, indica las mutaciones generadas por la recombinación heteróloga entre VP1 y VP2; el amarillo, representa las mutación-recombinación de VP1 y VP2. Los parámetros utilizados en esta simulación fueron tasa de mutación (tm) 0.0015 , tamaño poblacional ($10e4$), número de generaciones o cuellos de botella (45) y m.o.i (1).

El test de *Kolmogorov-Smirnov* indica la distribución normal de los datos obtenidos, dado que el valor calculado para cada operador genético fue mayor a 0.05. La *prueba t* (0.05, 44gl) indica que hay diferencias significativas entre el efecto de los operadores genéticos utilizados dado que el índice de significancia bilateral (0.00) fue menor que el alfa (0.05) y el intervalo de confianza no contiene el “0” indicando *diferencias altamente significativas* (véase anexo de Estadísticas).



Grafica 4. Efecto de la mutación puntual, la recombinación heteróloga y la mutación puntual-recombinación simultánea (operadores genéticos) en la acumulación de mutaciones bajo sucesivos cuellos de botella. Los parámetros utilizados fueron tasa de mutación (tm) 0.00038 , tamaño poblacional ($10e4$), número de generaciones o cuellos de botella (45) y m.o.i (5).

Cada uno de los puntos de la gráfica representa las poblaciones secuencias (inicialmente 1000) que cumplieron con los criterios de selección establecidos durante la simulación para VP1, este valor disminuye con el transcurso de los cuellos de botella. El azul, representa las mutaciones puntuales acumuladas al azar en VP1; el rosado, indica las mutaciones generadas por la recombinación heteróloga entre VP1 y VP2; el amarillo, representa las mutación-recombinación de VP1 y VP2. Los parámetros utilizados en esta simulación fueron tasa de mutación (tm) 0.0015 , tamaño poblacional ($10e4$), número de generaciones o cuellos de botella (45) y m.o.i (1).

El test de *Kolmogorov-Smirnov* indica la distribución normal de los datos obtenidos, dado que el valor calculado para cada operador genético fue mayor a 0.05. La *prueba t* (0.05, 44gl) indica que hay diferencias significativas entre el efecto de los operadores genéticos utilizados dado que el índice de significancia bilateral (0.00) fue menor que el alfa (0.05) y el intervalo de confianza no contiene el "0" indicando *diferencias altamente significativas* (véase anexo de Estadísticas).



Gráfica 5 Efecto de la mutación puntual, la recombinación heteróloga y la mutación puntual-recombinación simultánea (operadores genéticos) en la acumulación de mutaciones bajo sucesivos cuellos de botella. Los parámetros utilizados en esta simulación fueron tasa de mutación (tm) 0.0015 , tamaño poblacional ($10e4$), número de generaciones o cuellos de botella (45) y m.o.i (1).

Cada uno de los puntos de la gráfica representa las poblaciones secuencias (inicialmente 1000) que cumplieron con los criterios de selección establecidos durante la simulación para VP1, este valor disminuye con el transcurso de los cuellos de botella. El azul, representa la mutaciones puntuales acumuladas al azar en VP1; el rosado, indica las mutaciones generadas por la recombinación heteróloga entre VP1 y VP2; el amarillo, representa las mutación-recombinación de VP1 y VP2.

El test de *Kolmogorov-Smirnov* indica la distribución normal de los datos obtenidos, dado que el valor calculado para cada operador genético fue mayor a 0.05. La *prueba t* (0.05, 44gl) indica que hay diferencias significativas entre el efecto de los operadores genéticos utilizados dado que el índice de significancia bilateral (0.00) fue menor que el alfa (0.05) y el intervalo de confianza no contiene el "0" indicando *diferencias altamente significativas* (véase anexo de Estadísticas).



Gráfica 6 Efecto de la mutación puntual, la recombinación heteróloga y la mutación puntual-recombinación simultánea (operadores genéticos) en la acumulación de mutaciones bajo sucesivos cuellos de botella. Los parámetros utilizados fueron tasa de mutación (tm) 0.0015 , tamaño poblacional ($10e4$), número de generaciones o cuellos de botella (45) y m.o.i (1).

Cada uno de los puntos de la gráfica representa las poblaciones secuencias (inicialmente 1000) que cumplieron con los criterios de selección establecidos durante la simulación para VP1, este valor disminuye con el transcurso de los cuellos de botella. El azul, representa las mutaciones puntuales acumuladas al azar en VP1; el rosado, indica las mutaciones generadas por la recombinación heteróloga entre VP1 y VP2; el amarillo, representa las mutación-recombinación de VP1 y VP2. Los parámetros utilizados en esta simulación fueron tasa de mutación (tm) 0.0015 , tamaño poblacional ($10e4$), número de generaciones o cuellos de botella (45) y m.o.i (1).

El test de *Kolmogorov-Smirnov* indica la distribución normal de los datos obtenidos, dado que el valor calculado para cada operador genético fue mayor a 0.05. La *prueba t* (0.05, 44gl) indica que hay diferencias significativas entre el efecto de los operadores genéticos utilizados dado que el índice de significancia bilateral (0.00) fue menor que el alfa (0.05) y el intervalo de confianza no contiene el "0" indicando *diferencias altamente significativas* (véase anexo de Estadísticas).



Gráfica 7. Efecto de la mutación puntual, la recombinación homóloga y la mutación puntual-recombinación simultánea (operadores genéticos) en la acumulación de mutaciones bajo sucesivos cuellos de botella. Los parámetros utilizados fueron tasa de mutación (tm) 0.002 , tamaño poblacional ($10e4$), número de generaciones o cuellos de botella (45) y m.o.i (1).

Cada uno de los puntos de la gráfica representa las poblaciones secuencias (inicialmente 1000) que cumplieron con los criterios de selección establecidos durante la simulación para VP1, este valor disminuye con el transcurso de los cuellos de botella. El azul, representa las mutaciones puntuales acumuladas al azar en VP1; el rosado, indica las mutaciones generadas por la recombinación homóloga entre VP1 y VP2; el amarillo, representa las mutación-recombinación de VP1 y VP2. Los parámetros utilizados en esta simulación fueron tasa de mutación (tm) 0.0015 , tamaño poblacional ($10e4$), número de generaciones o cuellos de botella (45) y m.o.i (1).

El test de *Kolmogorov-Smirnov* indica la distribución normal de los datos obtenidos, dado que el valor calculado para cada operador genético fue mayor a 0.05. La *prueba t* (0.05, 44gl) indica que hay diferencias significativas entre el efecto de los operadores genéticos utilizados dado que el índice de significancia bilateral (0.00) fue menor que el alfa (0.05) y el intervalo de confianza no contiene el "0" indicando *diferencias altamente significativas* (véase anexo de Estadísticas).



Gráfica 8. Efecto de la mutación puntual, la recombinación homóloga y la mutación puntual-recombinación simultánea (operadores genéticos) en la acumulación de mutaciones bajo sucesivos cuellos de botella. Los parámetros utilizados fueron tasa de mutación (tm) 0.002 , tamaño poblacional ($10e4$), número de generaciones o cuellos de botella (45) y m.o.i (5).

Cada uno de los puntos de la gráfica representa las poblaciones secuencias (inicialmente 1000) que cumplieron con los criterios de selección establecidos durante la simulación para VP1, este valor disminuye con el transcurso de los cuellos de botella. El azul, representa las mutaciones puntuales acumuladas al azar en VP1; el rosado, indica las mutaciones generadas por la recombinación homóloga entre VP1 y VP2; el amarillo, representa las mutación-recombinación de VP1 y VP2. Los parámetros utilizados en esta simulación fueron tasa de mutación (tm) 0.0015 , tamaño poblacional ($10e4$), número de generaciones o cuellos de botella (45) y m.o.i (1).

El test de *Kolmogorov-Smirnov* indica la distribución normal de los datos obtenidos, dado que el valor calculado para cada operador genético fue mayor a 0.05. La *prueba t* (0.05, 44gl) indica que hay diferencias significativas entre el efecto de los operadores genéticos utilizados dado que el índice de significancia bilateral (0.00) fue menor que el alfa (0.05) y el intervalo de confianza no contiene el "0" indicando *diferencias altamente significativas* (véase anexo de Estadísticas).



Gráfica 9. Efecto de la mutación puntual, la recombinación homóloga y la mutación puntual-recombinación simultánea (operadores genéticos) en la acumulación de mutaciones bajo sucesivos cuellos de botella. Los parámetros utilizados fueron tasa de mutación (tm) 0.002 , tamaño poblacional ($10e4$), número de generaciones o cuellos de botella (45) y m.o.i (20).

Cada uno de los puntos de la gráfica representa las poblaciones secuencias (inicialmente 1000) que cumplieron con los criterios de selección establecidos durante la simulación para VP1, este valor disminuye con el transcurso de los cuellos de botella. El azul, representa las mutaciones puntuales acumuladas al azar en VP1; el rosado, indica las mutaciones generadas por la recombinación homóloga entre VP1 y VP2; el amarillo, representa las mutación-recombinación de VP1 y VP2. Los parámetros utilizados en esta simulación fueron tasa de mutación (tm) 0.0015 , tamaño poblacional ($10e4$), número de generaciones o cuellos de botella (45) y m.o.i (1).

El test de *Kolmogorov-Smirnov* indica la distribución normal de los datos obtenidos, dado que el valor calculado para cada operador genético fue mayor a 0.05. La *prueba t* (0.05, 44gl) indica que hay diferencias significativas entre el efecto de los operadores genéticos utilizados dado que el índice de significancia bilateral (0.00) fue menor que el alfa (0.05) y el intervalo de confianza no contiene el "0" indicando *diferencias altamente significativas* (véase anexo de Estadísticas).



Gráfica 10. Efecto de la mutación-recombinación heteróloga a diferentes densidades virales (1m.o.i azul, 10 m.o.i rosado y 20 m.o.i amarillo) en la acumulación de mutaciones puntuales bajo sucesivos cuellos de botella utilizando la misma tasa de mutación (0.002nts/ciclo de replicación).



Gráfica 11 Eficacia biológica de las poblaciones de secuencias sometidas a operadores genéticos bajo sucesivos cuellos de botella. El azul, indica el efecto de las mutaciones puntuales azarosas en VP1, el rosado, la acumulación de mutaciones por recombinación heteróloga entre VP1 y VP2. El amarillo, indica el efecto de la mutación puntual-recombinación heteróloga entre VP1 y VP2. Los parámetros utilizados fueron 0.002 nts/ciclo y 1 m.o.i.



Gráfica 12. Eficacia biológica de las poblaciones de secuencias sometidas a operadores genéticos bajo sucesivos cuellos de botella. El azul, indica el efecto de las mutaciones puntuales azarosas en VP1, el rosado, la acumulación de mutaciones por recombinación heteróloga entre VP1 y VP2. El amarillo, indica el efecto de la mutación puntual-recombinación heteróloga entre VP1 y VP2. Los parámetros utilizados fueron 0.002 nts/ciclo y 5 m.o.i.



Gráfica 13 Eficacia biológica de las poblaciones de secuencias sometidas a operadores genéticos bajo sucesivos cuellos de botella. El azul, indica el efecto de las mutaciones puntuales azarosas en VP1, el rosado, la acumulación de mutaciones por recombinación heteróloga entre VP1 y VP2. El amarillo, indica el efecto de la mutación puntual-recombinación heteróloga entre VP1 y VP2. Los parámetros utilizados fueron 0.00038 y 1 m.o.i



Gráfica 14. Eficacia biológica de las poblaciones de secuencias sometidas a operadores genéticos bajo sucesivos cuellos de botella. El azul, indica el efecto de las mutaciones puntuales azarosas en VP1, el rosado, la acumulación de mutaciones por recombinación heteróloga entre VP1 y VP2. El amarillo, indica el efecto de la mutación puntual-recombinación heteróloga entre VP1 y VP2. Los parámetros utilizados fueron 0.00038 y 5 m.o.i.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los Sistemas Adaptativos Complejos (CAS) como las poblaciones de virus RNA se comportan como un sistema lejos del equilibrio *a priori* reaccionan rápidamente a cambios en su entorno (Holsbin 1996), es decir pueden responder a antivirales o mutagénicos que inhiban su entrada o replicación, además de responder a eventuales cambios de hospedero; esta adaptabilidad se debe a las altas tasas de mutación que hacen fluctuar a las secuencias cerca al umbral del error donde emergen mutantes independientemente de su valor selectivo posteriormente seleccionados por cada cuello de botella. Este tipo de efecto lleva a las poblaciones a crear secuencias que se autoorganizan colectivamente (cuasiespecie) y de las cuales emergen nuevas formas optimizadas altamente adaptadas y tal vez resistentes a la extinción.

Este Sistema Adaptativo Complejo (CAS) fue representado en un algoritmo evolutivo y posteriormente programado en Perl 6.0 dando origen a una herramienta bioinformática denominada DOTHEVOLUTIONVIRUS, dado que no existen programas reportados en la literatura o en la internet que permitan realizar simulaciones mediante mutación y recombinación de genes de virus bajo sucesivos cuellos de botella teniendo en cuenta la tasa de mutación, la densidad viral (m.o.i) y el tamaño de la población. DOTHEVOLUTIONVIRUS permite hacer este tipo de simulaciones.

DOTHEVOLUTIONVIRUS es un algoritmo que permite generar mutantes y recombinar cualquier tipo de genoma viral secuencia de RNA o DNA publicado en el Gene Bank a diferentes tasas de mutación y tamaños poblacionales. El programa permite medir el efecto de la mutación y la recombinación evaluando la presencia o ausencia de promotores y péptidos implicados en la replicación del virus (Tabla 1), además de esto puede identificar las mutaciones fijadas en la población el cálculo de la secuencia consenso (promedio) dentro de la población, la cual es muy similar a los fenotipos silvestres dado que dicha secuencia consenso predomina en la población.

DOTHEVOLUTIONVIRUS es un algoritmo construido y programado en PERL (.pl) que permite realizar las siguientes funciones por módulos independientes (i) generar poblaciones parentales que se copian con error hasta 10^6 veces a diferentes tasas de mutación (`initiate_population.pl`) (ii) trabajar densidades virales entre 1 y 200 m.o.i por célula (sigue una distribución de Poisson); (iii) *mutar* una secuencia (nts/ciclo) a una

tasa de error escogida (*mutate.pl*); (iv) *traducir* mRNAs (*aa.pl*); (iv) generar cuellos de botella produciendo un archivo de genomas que contiene una nueva población descendiente, producida a partir de una densidad viral (m.o.i) determinada al azar o fijada al iniciar la simulación (desde 1 hasta 200) (*reproduce.pl*); (v) calcular el porcentaje de secuencias dentro de la población que cumplen con los criterios de selección establecidos, es decir la presencia de secuencias nucleótidos o péptidos implicados en la replicación (*find.pl*); (vi) *comparar* cada una de las secuencias con la original y la secuencia consenso (*compare.pl*) (vii) *evaluar* o seleccionar secuencias según la presencia de promotores y péptidos encontrados por *find.pl* implicados en la entrada y replicación de Rotavirus SA11 (*evaluate.pl*) y ; (viii) calcular la secuencia consenso poblacional, es decir la secuencia con mayor frecuencia de nucleótidos en la población (*consensus.pl*).

Cada uno de los programas (módulos) recibe parámetros específicos: *initiate population.pl* y *mutate.pl* reciben los mismos parámetros: tasa de mutación y tamaño de la población de mutantes generando un archivos de genomas (*pop.txt*). *Aa.pl* recibe un archivo de genoma (*pop.txt*) y genera uno *aa.txt*. *Reproduce.pl* recibe tamaño poblacional y un archivo de genomas que contenga una población (*pop.txt*) produciendo una nueva población por cuello de botella a partir del m.o.i obtenido de la población parental. *Find.pl* encuentra el promotor o el péptido a evaluar (este debe ser cambiado dentro del código del programa), es decir no recibe parámetro, el parámetro se determina dentro del código. *Compare.pl*. no recibe parámetro solo compara cada secuencia de la población con la original presentando un reporte del porcentaje de diferencias encontradas en las secuencias de aminoácidos. *Evalaute.pl* recibe un archivo de genomas que es traducido y se evalúa según la presencia de promotores y péptidos encontrados con *find.pl*.

La simulación se realizó colocando cada modulo en su lugar correspondiente dentro del algoritmo inicial. *Evolution.pl* permite simular el efecto de mutaciones puntuales debidas al azar bajo sucesivos cuellos de botella generando nuevas poblaciones a partir del m.o.i seleccionado. *Recombinacion.pl* realiza las mismas funciones que *evolution.pl* y además de esto recombina las secuencias homóloga (VP1 y VP1) o heterológamente (VP1 y VP2) –las secuencias recombinar fueron “pegadas” en el archivo *genome.rna.-*.

Evolution.pl y *recombinación.pl* permiten realizar la simulación bajo mutaciones puntuales y recombinación (operadores genéticos) y son el resultado final del algoritmo, reciben parámetros como tasa de mutación, tamaño de la población número de generaciones o cuellos de botella y densidad viral, datos necesarios para poder realizar un seguimiento de la acumulación de mutaciones puntuales mutadas y posteriormente recombinadas por cada cuellos de botella. Las secuencias producidas fueron comparadas con la secuencia maestra y la secuencia consenso durante toda la simulación.

Evolution.pl arroja datos como número de mutaciones promedio acumuladas por generación dentro de la población, porcentaje de diferencias promedio respecto a la secuencia original, porcentaje de secuencias que contienen los péptidos (porcentaje de silvestres) y las diferencias promedio respecto a una secuencia consenso y ñla original. *Recombinacion.pl* arroja los mismos datos que *evolution.pl*, la diferencia radica en el efecto de la recombinación.

Los datos obtenidos en esta simulación se restringen a las mutaciones acumuladas y el porcentaje de secuencias que presentan los nucleótidos y los péptidos por cuellos de botella, sin embargo DOTHEVOLUCIONVIRUS arroja datos como diferencias con la secuencia maestra y consenso entre otras que no fueron analizadas en este trabajo.

Se han reportado evidencias experimentales de principios evolutivos aplicados a las poblaciones virales, DOTHEVOLUTIONVIRUS permite evidenciar el principio de exclusión competitiva, el efecto la deriva genética y los cuellos de botella, el trinquete de Muller y la Reina roja bajo operadores genéticos como la mutación y la recombinación, dado que el porcentaje de secuencias que cumplen con los criterios de selección obtenido en la simulación permite calcular la eficacia biológica y puede ser representada en un paisaje adaptativo (Kauffman 1993).

Se tuvieron cuatro limitantes en la construcción y desarrollo del algoritmo al iniciar la programación y solo una de ellas fue solucionada: (i) el manejo y almacenamiento de archivos grandes de texto (superiores a 3 GBs) presentaba inconvenientes por esta razón se utilizó lenguaje PERL que permite manejar archivos de texto muy grandes; (ii) la determinación de los números aleatorios dado que la aleatoriedad realmente no es

aleatoria (El “random” lo genera un programa) y por consecuencia ocasiona ruido en la ejecución del algoritmo e influencia los datos obtenidos, claro esta que este es un problema general en la programación; (iii) la limitante ingenieril, dado que no se pudo realizar la simulación con todo el genoma por la necesidad de teragigas para almacenar la información obtenida; (iv) las tasa de mutación utilizadas fueron las reportadas para virus RNA por ciclo de replicación-entre $10e^{-3}$ y $10e^{-5}$ nts/ciclo por genoma (Drake 1993) y por ende hay un error en la simulación, sin embargo al realizar las correcciones pertinentes se obtienen tasas de mutación por secuencia que se encuentran en el rango utilizado en todos los casos ($10e^{-3}$ - $10e^{-7}$), por tanto el error no es significativo a la hora de interpretar los datos porque se mantienen dentro del rango utilizado.

El algoritmo permite evaluar secuencias silvestres y mutantes dentro de la población según la presencia de promotores y péptidos implicados en la replicación del virus manteniendo un umbral del error respecto a la secuencia maestra (95% de homología), gracias a esto teóricamente se pueden eliminar secuencias por catástrofe informática al si cruzan el umbral del error (Eigen, 2002). Sin embargo, los resultados obtenidos en la simulación no lo demuestras porque el porcentaje de eliminados por cuello es muy bajo probablemente porque los criterios de selección no son selectivamente fuertes (se esperaba que entre el 10 y el 20% de las secuencias evaluadas cumplieran con los criterios de selección y se obtuvieron porcentajes entre 80 y 90%).

La modelación realizada no representa totalmente el ciclo natural del virus dada la limitante en el almacenamiento de información-la simulación no se realizó con todo el genoma-, sin embargo el modelo es muy parecido al ciclo de virus *in Vitro* (infección célula a célula) dado que se simula la evolución de una población viral generada a partir de una partícula (la secuencia maestra publicada en el Gene Bank) bajo sucesivos cuellos de botella. En la simulación los cuellos de botella son de célula a célula (epidemia celular), sin embargo en la realidad *In vitro* son pases de cultivo a cultivo con tamaños poblacionales mucho mas grandes que los utilizados en la simulación.

Por tanto deberían realizarse *in vitro* sucesivos pases de cultivo a cultivo realizando ensayos de eficacia biológica (Holland et al 1991; Duarte 1994) comparando con los datos obtenidos a partir de nuevas tecnologías de hardware (Procedadores paralelos y

teragigas de disco duro) que permitiera realizar la simulación con todo el genoma, esto con el fin de refinar el modelo.

El algoritmo construido no tiene en cuenta (i) las propiedades físicas y químicas de las bases nitrogenadas; (ii) la formación de estructuras secundarias del RNA; (iii) rerreglos estructurales del RNA; (iv) la formación de estructuras terciarias y cuaternarias de proteínas; (v) plegamientos que determinen la viabilidad de las proteínas; (vi) interacciones entre aminoácidos indispensables en los cambios conformacionales de las proteínas del virus.

El algoritmo tiene en cuenta (i) la redundancia del genoma; (ii) el efecto de la deriva genética; (iii) los cuellos de botella y (iv) la densidad viral o m.o.i; no es significativo el tamaño poblacional dado que se ha evidenciado que la eficacia biológica no depende del tamaño poblacional (Novella 2004) sino de la densidad viral y la tasa de mutación (Domingo and Holland ,1997; Wilke and Novella, 2003) aunque se pueden generar tamaños poblacionales grandes (mayores a 10^6 copias) de variantes de una misma secuencia.

El algoritmo se limita a la mutación puntual aleatoria, la recombinación (homóloga o heteróloga) y a la traducción de secuencias de mRNA viral a aminoácidos simulando poblaciones seleccionadas por criterios predeterminados (v.gr la presencia de tripeptido DDG) donde se puede calcular el consenso poblacional por cada cuellos de botella, el cual permite determinar mutaciones fijadas dentro de la población (Jenkins et al., 2002).

Una de las ventajas de la simulación en DOTHEVOLUTIONVIRUS es diferenciar entre los efectos causados solo por mutación de los causados por la recombinación de las secuencias mutadas (recomendación de Yuste et al 2000), esto permitiría evidenciar en futuros estudios si la adaptación bajo sucesivos cuellos de botella ante presiones selectivas como antivirales y cambios de hospedero es causada por mutación puntual azarosa o por recombinación según el consenso que predomine en la población dado que permite determinar las mutaciones que fueron fijadas en promedio dentro de la población.

Si la adaptación (medida por eficacia biológica o habilidad replicativa) es causada por mutaciones puntuales se podrían utilizar mutagénicos para diseñar nuevas terapias antivirales *in vitro* generando catástrofe informática (Eigen 2002), si la adaptación es causada por el efecto de la recombinación (homóloga o heteróloga) o la recombinación de genomas mutados se podrían utilizar secuencias muy disímiles al virus de RNA (en exceso) que interfirieran con la replicación (DIP) del RNA viral (Mírales et al 1999), de esta forma la recombinación permitiría generar catástrofe informática y por ende pérdida de eficacia, aunque recientemente se ha demostrado que algunos DIPs virales son viables por complementación (Novella et al., 2004). Este estudio se limita a evidenciar diferencias en la eficacia para poblaciones de secuencias mutadas, recombinadas y mutadas-recombinadas. La aplicabilidad de este tipo de alternativas antivirales serán discutidas más adelante

Según los resultados obtenidos se puede afirmar que existen diferencias significativas entre las secuencias, mutadas, recombinadas y mutadas-recombinadas simultáneamente (T-student (0.05, 42) dado que el t calculado fue menor que 0.05 por tanto los datos obtenidos en la simulación son significativos.

En la gráfica 1 (recombinación heteróloga 1m.o.i y 0.002 nts/ciclo). Las poblaciones de secuencias mutadas y recombinadas (amarillo) se encuentra subyacente—indica que no hay coinfección— entre las secuencias solo recombinadas (rosado) y las secuencias mutadas aleatoriamente (azul) dado que la densidad viral es 1 donde la recombinación homóloga o heteróloga no tiene efecto significativo (según los resultados) por no haber coinfección. El cambio en la acumulación de mutaciones en todo los casos es gradual (mutadas, recombinada y mutadas-recombinadas) dado que la tasa de mutación utilizada fue muy alta.

En la gráfica 2 (recombinación heteróloga, 5m.o.i,0.002). Aquí hay coinfección (5 m.o.i). Se observa que la acumulación de mutaciones por recombinación (rosado) y por mutación puntual aleatoria (azul) es gradual a diferencia de las poblaciones de secuencias que fueron mutadas y recombinadas heterológamente (amarillo) las cuales presentan periodos cortos de estabilidad y realizando un escalamiento entre las

poblaciones de secuencias recombinadas y mutadas aleatoriamente indicando que bajo este efecto la acumulación de mutaciones bajo una densidad viral de 5 es menor que en las poblaciones recombinadas. Esto implica que la recombinación heteróloga bajo sucesivos cuellos de botella no corrige los errores generados por la mutación de poblaciones de secuencias.

En la gráfica 3 (recombinación heteróloga 1m.o.i, 0.00038nts/ciclo). Aquí no existe coinfección (1 m.o.i.), a diferencia de la gráfica 1 en este caso los cambios en la acumulación de mutaciones son marcadamente puntuados, se observa la misma tendencia de las secuencias mutadas y recombinada a mantenerse entre las mutaciones acumuladas por recombinación y las producidas por mutación aleatoria bajo sucesivos cuellos de botella; la diferencia respecto a la gráfica 1 radica en que en todos los casos las secuencias acumulan mutaciones de forma semi-puntuada con cambios graduales y abruptos no muy claros probablemente por que el m.o.i utilizado fue 1 y por tanto no hay efecto significativo de la recombinación. La recombinación heteróloga parece ser una forma de producir variantes (Chao, 1988).

En la gráfica 4 (recombinación heteróloga 5m.o.i y 0.00038nts/ciclo). Aquí existe coinfección y los cambios en la acumulación de mutaciones son más puntuados que generados por recombinación, sin embargo en el caso de las poblaciones de secuencias mutadas y recombinadas los cambios en la acumulación son graduales. Este tipo de afirmaciones pueden estar influenciados por la escala dado que si se incrementa el número de cuellos de botella a números grandes (500 0 1000) los cambios puntuados pueden observarse como graduales().

En la gráfica 5 (recombinación heteróloga 1m.o.i y 0.0015nts/ciclo). Aquí no existe coinfección por tanto el efecto de la recombinación es nulo. A diferencia de las gráficas en donde se utiliza m.o.i de 1 (Gráfica 1 y 3) y una tasa de mutación similar, la tendencia en los cambios en la acumulación de mutaciones es semi-gradual como se observa en la gráfica.

En la gráfica 6 (recombinación heteróloga, 5m.o.i y 0.0015 nts/ciclo) se observa la misma tendencia que en la gráfica 4 aunque existen diferencia en la tasa de mutación que se manifiesta en la gradualidad de los cambios dado que la tasa de mutación fue más alta. Esto implica que al incrementar la tasa de mutación los cambios en las secuencias mutadas puntualmente son graduales. Aquí existe recombinación y las secuencias que fueron mutadas-recombinadas heterológamente (amarillo) evidencian fuertemente escalamientos con periodos de estabilidad y cambios abruptos es decir equilibrio puntuado (Mayr, 1997).

En la gráfica 7 (recombinación homóloga 1m.o.i y 0.002nts/ciclo). Al no existir la coinfección (1 m.o.i) se puede evidenciar que los efectos entre la recombinación heteróloga y homóloga son iguales al utilizar la misma densidad viral con muestra la gráfica 1 y la 7. En todos los casos (amarillo, azul y rosado) la acumulación de mutaciones es gradual.

En la gráfica 8 (recombinación homóloga, 5moi y 0.002nts/ciclo) La coinfección se da al incrementar el m.o.i a 5. Bajo el efecto de los cuellos de botella la acumulación de mutaciones es gradual tanto en secuencias recombinadas como en secuencias mutadas, a diferencia de las mutadas-recombinadas que bajo un m.o.i mayor presentan periodos de estabilidad y cambios abruptos en la acumulación de mutaciones puntuales (equilibrio puntuado), siendo esta una posible evidencia de periodos de estabilidad (estasis evolutivo) o del efecto de las mutaciones silenciosas o sinónimas en las cuales el cambio en la tercera base no presenta efectos en el fenotipo. Probablemente los cambios abruptos se deban a cambios en la tercera base de las tripletas de mRNA (Domingo and Holland 1997).

Respecto a la gráfica 2, utilizando la misma tasa de mutación y la misma densidad viral se empieza a observar la tendencia de la recombinación homóloga a corregir los errores dados los periodos de estabilidad en los primeros 20 cuellos de botella, sin embargo la corrección no es efectiva porque la densidad viral utilizada es pequeña, se espera que al incrementar el m.o.i la corrección sea efectiva.

En la gráfica 9 (recombinación homóloga, 20moi y 0.002nts/ciclo. Aquí la coinfección es significativa (20 m.o.i). La acumulación de mutaciones por efecto de la recombinación (rosado) y la mutación al azar (azul) es gradual, la diferencia respecto a la gráfica 1 radica en que el m.o.i utilizado en este caso fue mucho mayor (20); gracias a la influencia de la coinfección la recombinación tiene efectos significativos, tanto así que se pueden observar dos periodos de estabilidad de al menos 10 cuellos de botella; además la mutación-recombinación homóloga bajo altos m.o.i corrige los errores generados por la mutación puntual aleatoria (Bruyere et al 2000). También se observa una tendencia evidenciada por Sole 1999, en la cual el modelo presenta periodos determinísticos -predecibles- al menos en los primeros 20 cuellos de botella y periodos estocásticos -impredicibles- como se observa luego del cuello número 30.

La recombinación homóloga bajo densidades virales altas (mayores a 10 para rotavirus) corrige los errores generados por las altas tasas de mutación (Bruyere et al 2000; Wilke, Reissig and Novella 2004). Según esta gráfica el uso de mutagénicos en Rotavirus no sería efectivo ni sería una buena alternativa antiviral dado que cuando se incrementa la tasa de mutación (en la realidad del virus, cercana a $10e^{-5}$) bajo altas densidades virales la recombinación homóloga corrigió efectivamente los errores producidos por las altas tasas de mutación hasta los 30 cuellos de botella.

En la gráfica 10 (Efecto del m.o.i a 1 a 10 y a 20 bajo recombinación heteróloga). Aquí se observa el fuerte efecto de la coinfección (determinada por la densidad viral) dado que al incrementarse existe tendencia a generarse periodos de estabilidad probablemente por la acumulación de mutaciones sinónimas. Al realizar el mismo experimento bajo recombinación homóloga *in silico* la tendencia es igual pero los periodos de estabilidad son más continuos y largos y se acumulan menos mutaciones (los datos no se reportan).

Los datos presentados anteriormente indican los efectos de los operadores genéticos (mutación y recombinación) bajo sucesivos cuellos de botella utilizando tamaños poblacionales (10000) y número de generaciones (45) constantes variando tasas de mutación y densidad viral. Sin embargo esta acumulación de mutaciones bajo sucesivos cuellos de botella fue realizada teniendo en cuenta criterios de selección previamente establecidos como la homología del 95% (umbral del error) y la presencia de

nucleótidos y péptidos en las secuencias genotípicas y fenotípicas implicadas en la replicación de rotavirus SA11 (VP1 y VP2). DOTHEVOLUTIONVIRUS permite calcular el porcentaje de secuencias que presentan dichos criterios, es decir las secuencias seleccionadas dentro de la población que tienen el poder de replicarse. A partir de este porcentaje de silvestres (los adaptados) se puede calcular una proporción entre mutantes y silvestres por diferencia y por ende determinar la eficacia biológica (población) por cuello de botella (Chao 1990) evidenciado principios de biología evolutiva viral en las fluctuaciones de la eficacia biológica manifestados en los paisajes adaptativos que serán analizados más adelante.

Las mutaciones puntuales generadas aleatoriamente producen gran heterogeneidad en la variabilidad genética de la población y por ende en la eficacia (fluctuación) como se esperaba (Gráfica 13), la recombinación homóloga, a diferencia de la heteróloga, bajo sucesivos cuellos de botella, permite disminuir la cantidad de errores ocasionados por la mutación como lo afirma Chao 1988 (como se esperaba).

Es evidente que la recombinación homóloga y heteróloga acumula más mutaciones que las secuencias que son solo mutadas como se observa en todas las gráficas, también es claro el gran efecto de la deriva genética y los cuellos de botella en poblaciones de secuencias de virus RNA y que la densidad viral es determinante del efecto corrector de la recombinación. Sin embargo pueden existir problemas de escala a la hora de interpretar cambios puntuados dado que al incrementar la escala se pueden volver graduales.

La recombinación homóloga disminuye la cantidad de mutaciones acumuladas solo si la coinfección es común y el m.o.i es mayor o igual a 10. La recombinación homóloga heterogeniza la población e incrementa la probabilidad de mantener la cuasiespecie estable lejos de la catástrofe informática (Chao, 1988; Bruyere et al 2000; Eigen 2002; Wilke Reissig and Novella 2004).

Probablemente los efectos de la recombinación se manifiestan en los periodos de estabilidad causados por la acumulación de mutaciones puntuales en secuencias (VP1 y VP2) que al ser recombinadas corrigen errores de copia dentro de la población dado que no se acumulan mutaciones probablemente por la optimización de la cuasiespecie (Chao, 1988; Manrubia et al., 2005).

Al incrementar el m.o.i (altos) la recombinación homóloga de las secuencias corrige los errores generados por las altas tasas de mutación homogenizando de esta forma la información genética de la población y por tanto la eficacia tiende a 1 porque la población alcanza un pico adaptativo en el cual la diversidad de la población disminuye dado que las condiciones son constantes y la población se encuentra adaptada (Wilke Chao, 1988; Reissig and Novella 2004).

El consenso (consensus.pl) o frecuencias promedio de las bases nitrogenadas dentro de toda la población, es un promedio poblacional en el cual se puede observar si alguna mutación fue fijada dentro de la población (Jenkins et al 2002). Gracias a esto se monitorearon los cambios en la secuencias de nucleótidos evidenciando fijación de mutaciones por efecto de los cuellos de botella (los datos no se muestran).

Según los resultados obtenidos es probable que la adaptación de los Rotavirus sea en su mayoría causada por el efecto de la recombinación— solo cuando la coinfección común- (Chen et al 1997) y no por la mutación dado que es un virus segmentado y por ende la recombinación homóloga más común que la heteróloga (Nruyere et al 2000; Flints et al 2000) permitiendo generar periodos de estabilidad por efecto de la corrección de errores y cambios abruptos (variantes) por efecto mutaciones puntuales que contribuyen a generar un equilibrio mutación-selección las poblaciones se mantienen en una marcada resistencia a la extinción bajo sucesivos de botella, tendiendo a diversificarse mediante las altas tasas de mutación.

Las evidencias encontradas están determinadas por el efecto de operadores genéticos como la mutación y la recombinación influenciados por los cuellos de botella y la densidad viral (m.o.i), importantes en el proceso de evolución. Sin embargo el equilibrio puntuado presenta problemas en su interpretación dado que al incrementar el

número de generaciones (aumentar la escala) los cambios en la acumulación de mutaciones se pueden ver graduales sin presentar periodos de cambios abruptos característicos del equilibrio puntuado (Mayr 1997; Stuart Row and Fitch 1996), esto por efecto de la escala. La posible evidencia de estasis evolutivo debería interpretarse como un proceso de optimización de la cuasiespecie.

En la gráfica 11 (Recombinación heteróloga, 1moi 0.002nts/ciclo) En ausencia de coinfección, se observa que la eficacia de las poblaciones mutadas (azul) y las que solo fueron recombinadas heterológicamente (rosado) tiende a uno, sin embargo la habilidad replicativa de las poblaciones mutadas y recombinadas heterológicamente es mayor al iniciar los cuellos, indicando una ventaja selectiva de la población inicial mutada-recombinada (amarillo). La marcada estabilidad en los cambios luego de 10 cuellos es probable gracias al efecto de mutaciones silenciosas o a la optimización de la población tipo cuasiespecie.

En la gráfica 12 (Recombinación heteróloga, 5moi, 0.002 nts/ciclo) Aquí existe coinfección y se observa que la acumulación de mutaciones en secuencias copiadas con error (azul) pierde gradualmente la eficacia biológica (iniciando con valores mayores a 1) sin llegar a 1 siguiendo una curva parabólica. Tanto las secuencias solo recombinadas heterológicamente como las mutadas-recombinadas que acumulan mutaciones pierden la eficacia biológica de forma fluctuante indicando periodos alternos de ventajas y desventajas en las poblaciones según los picos y valles observados en el paisaje adaptativo. Las poblaciones mutadas y recombinadas inician con valores de eficacia menores a 1 evidenciando la optimización de la cuasiespecie bajo el efecto de la Reina roja dado que un mutante desventajado se estabiliza y recupera su adaptabilidad al ser desventajoso (Clarke et al,1994; Sole et al 1999). Este proceso indica la gran adaptabilidad y resistencia de los mutantes de virus RNA en condiciones que no se ven favorecidos causada por la memoria evolutiva viral (Ruiz et al 2000; Wilke, Reissig and Novella 2004).

En la gráfica 13 (Recombinación heteróloga; 1m.o.i y 0.00038nts/ciclo) En ausencia de coinfección y a diferencia de la gráfica 11 la eficacia biológica de las secuencias mutadas puntualmente y al azar (azul) presenta picos y valles adaptativos que representan ventajas y desventajas de la población respectivamente. La estabilidad de los cambios de las secuencias mutadas (azul) no es tan marcada como en la gráfica 11, esto puede ser explicado por efecto de la aleatoriedad implícita en el sistema

Las secuencias mutadas y mutadas-recombinadas heterológamente están juntas y paralelas en concordancia con las gráfica de acumulación en las que se utiliza 1 m.o.i dado que el efecto de la recombinación a 1m.o.i no es significativo porque la coinfección no existe.

En la gráfica 14 (Recombinación heteróloga, 5m.o.i y 0.00038 nts/ciclo) La habilidad replicativa de las secuencias solo recombinadas heterológamente (rosado) y mutadas puntualmente y al azar (azul) incrementan su eficacia en los primero cuellos, sin embargo luego del cuello número 10 existe tendencia a la estabilidad probablemente por el efecto de mutaciones sinónimas o por que los criterios de selección utilizados son muy débiles y no significativos selectivamente.

Se encontró que la eficacia biológica de las poblaciones de Rotavirus SA11 (VP1 y VP2) es dependientes del valor inicial (Novella et al., 1995) de la eficacia como lo demostrado en otros virus RNA (Novella et al., 1999), dado que al iniciar con valores mayores que 1 la eficacia se pierde y tiende a uno con el transcurso de las generaciones y viceversa, cuando la eficacia inicial es baja la población gana eficacia con el transcurso de los cuellos de botella influenciada por la densidad viral (Novella, Reissig and Wilke; Elena 2002) bajo efecto de la Reina Roja (Clarke et al 1994; Sole et al 1999).

Respecto a la eficacia biológica de las secuencias mutadas y recombinadas homologamente (amarillo) se puede afirmar que al incrementar el m.o.i (coinfección), la habilidad replicativa de las secuencias se pierde paulatinamente tendiendo a 1, aunque

los periodos de estabilidad o éstasis son más largos (los datos no se muestran) rápidos a diferencia de la recombinación heteróloga (los datos no se muestran).

Es claro que en todos los casos la población inicial generada a partir de las secuencias reportadas en el Gene Bank (VP1 y VP2) tiene un valor de uno en habilidad replicativa y tiende a perderla paulatinamente con el transcurso de los cuellos de botella dada las altas tasas de mutación, los cuellos de botella y la acumulación de mutaciones deletéreas como lo afirma el trinquete de Muller (Chao 1990; Escarmis 1996; Domingo et al 1996; Domingo and Holland 1997, Lázaro 2003; Domingo et al 2005) o probablemente porque las poblaciones fueron seleccionadas con el mismo criterio y por tanto la estabilidad de la cuasiespecie indica la llegada a un pico adaptativo. Dicha tendencia a perder eficacia se estabiliza en 1 por efecto de la capacidad de reparación de errores de la recombinación homóloga o por el proceso de optimización de la cuasiespecie o por el efecto no significativo de los criterios de selección utilizados.

Las fluctuaciones de la eficacia biológica (Gráficas 11,12,13,14) evidencia la selección de poblaciones de mutantes ventajosos (picos) y desventajosos (valles), cada punto indica la generación de una población nueva a partir de número de secuencias escogidas (m.o.i). Si el valor de eficacia de un punto es mayor a 1 se entiende como una ventaja, si es menor a uno se entiende como una desventaja. Se observa gran estabilidad en las poblaciones cuando la densidad viral es 1 y la tasa de mutación es alta (gráfica 11) dado que en ausencia de coinfección (1m.o.i) la recombinación homóloga o heteróloga no es viable. Es evidente la fijación de mutante dentro de la población independientemente de su valor selectivo por efecto del azar y como se observa en las fluctuaciones de la eficacia biológica (gráfica 13).

La habilidad replicativa de VP1 y VP2 presenta fluctuaciones en las que puede evidenciar la fijación de mutantes en la población mediante cálculo de la secuencia consenso (consensus.pl). La alternancia de picos y valles demuestra que los mutantes más adaptados en un cuello serán los menos adaptados en el siguiente cuello por efecto de la acumulación de mutaciones y viceversa (Sole et al 1999).

Como ya se intuirá la medida de la eficacia biológica se manifiesta en los picos y valles explicados anteriormente y se denomina paisaje adaptativo que en este caso es de un

solo pico, dado que las presiones selectivas son con base en un ancestro (Secuencia maestra del Gene Bank) y no respecto a un derivado es decir que siempre son las mismas. El pico se manifiesta en el periodo de estabilidad indicando que la población ya se encuentra adaptada o resistente a variaciones causadas por mutación y recombinación probablemente porque los criterios de selección utilizados no fueron muy fuertes, es decir que la proporción en tamaño de las secuencias utilizadas como criterios no fueron significativos respecto al tamaño de la secuencia maestra (9 nts, y un tripéptido respecto a 3000nts y 1000 péptidos), además el umbral del error utilizado fue muy grande (5% de error equivalente a un 95% de homología). En general las fluctuaciones de la eficacia biológica son el resultado de la marcha hacia el equilibrio mutación-selección entre las ventajas y las desventajas generadas al azar bajo el actuar de la selección positiva y la selección negativa (Domingo et al., 1996) y dependiendo de las condiciones, es decir los criterios de selección.

Las altas tasas de mutación características de los virus RNA ($10e-4$ a $10e-5$ nts/ciclo) (Drake 1993) aceleran su evolución, sin embargo muchas de las mutaciones producidas tienen efectos deletéreos y por ende efectos negativos en la habilidad replicativa (en nuestro caso VP1 y VP2) aunque pueden surgir mutantes aventajados como se observa en la gráfica 12 por efecto de la Reina Roja.

Los mutantes que en algún momento se ven aventajados (Gráfica 12) corresponden a la periferia de la cuasiespecie en donde se explora el espacio de secuencias sin perder la capacidad de volver a una condición ancestral (Elena 2002; Bierbricher and Eigen 2005) fijando mutantes similares al silvestre permitiendo recobrar la eficacia biológica con el transcurso de los cuellos de botella por efecto de la memoria evolutiva (Ruiz et al 2000).

Los mutantes ventajosos se producen con más frecuencia que los desventajosos al igual que la recombinación homóloga se produce con mayor frecuencia que la heteróloga (Bruyere et al 2000), esto implica la tendencia a generar variantes mutantes adaptadas que se estabilizan en un equilibrio de mutación-selección (Eigen, 1993) cuyo mecanismo de corrección de errores es la recombinación homóloga como se evidencia en los resultados de la simulación. Este balance entre la continua generación de mutantes y la acción de las fuerzas de selección positiva y negativa (Domingo et al

1996) actúan en el complejo ensamblaje poblacional que conduce a una dinámica organizada compuesta de variantes de un mismo genoma muy relacionados entre si y competente en cualquier condición (Domingo, 2001; Revisado en Manrubia 2005) por efecto de las altas tasas de mutación y bajo la influencia del sinergismo y las acciones colectivas característicos de la cuasiespecie (Brown 2001) que no fueron tomadas en cuenta en la simulación.

Se han reportado evidencias experimentales de principios evolutivos aplicados a las poblaciones virales (Domingo and Holland 1997; Domingo et al 2005) basados en un modelo Darwiniano (Eigen 1993). DOTHEVOLUTIONVIRUS permite evidenciar el principio de exclusión competitiva (Clarke et al 1994; Sole et al 1999), el efecto la deriva genética, los cuellos de botella (Novella et al 1995; Novella et al 1999), y el trinquete de Muller (Chao, 1990), además de dar indicios del efecto de la Reina roja (Clarke et al 1994; Sole et al 1999) (gráfica 12) y el equilibrio puntuado (Stuart Row and Fitch 1996) que presenta problemas en su interpretación por efecto del incremento de la escala (los cambios puntuales pueden verse graduales).

La competencia entre poblaciones virales se induce indirectamente mediante los criterios de selección utilizados, es decir la presencia de un umbral (mínima homología) y la dependencia funcional a las secuencias de nucleótidos y péptidos evaluados necesarios para la replicación. Esto implica un nivel de competencia en el cual tiene efectos la reina roja dado que algunos mutantes desaventajados recuperan su eficacia (Clarke et al 1994) en condiciones constantes como se muestra en la gráfica 12. Sin embargo en condiciones fluctuantes estos mutantes generan una pequeña porción de mutantes deletéreos con los cuales se explora el espacio de secuencias dando la probabilidad de producir un mutantes ventajoso que recupere la eficacia biológica de la población en la condición adversa (Sole et al., 1999).

Existen procesos inherentes en la evolución de poblaciones virales como la deriva y los cuellos o los cuellos de botella, los cuales son eventos estocásticos que causan una fuerte reducción del tamaño poblacional efectivo (Manrubia 2005), esto se simula con

el modulo `initiate population.pl` y `reproduce.pl` encargados de realizar la deriva genética y los cuellos de botella en DOTHEVOLUTION VIRUS determinados por la densidad viral establecida al iniciar la simulación.

En la naturaleza los cuellos de botella son muy frecuentes en epidemias (estornudos para el caso de la influenza). Estos tienden a reducir el tamaño de la población en la realidad y en la simulación. Cuando se seleccionan las secuencias por cuello (m.o.i) la probabilidad de fijar una mutación deletérea en la población descendiente es muy alta y puede ser transmitida fácilmente a las siguientes generaciones como lo argumenta Manrubia et al 2005 y como ocurre probablemente en la simulación al evaluar la secuencia consenso bajo efecto de los cuellos de botella (Gráfica 12).

Bajo el efecto de los cuellos de botella una minoría de la población permite generar una nueva población sin interferir en la dinámica de la cuasiespecie dado el efecto de las altas tasas de mutación. La optimización de la cuasiespecie es dependiente de la frecuencia de transmisión de información genética (m.o.i) por cuellos de botella y el grado de optimización intra e inter hospederos que tiene lugar antes de que suceda el cuello (Manrubia et al 2005).

En los resultados obtenidos no se observa extinción pero si pérdida de eficacia en los primeros cuellos y una estabilización de la acumulación de mutaciones que podría llegar a ser indicio de pérdida de eficacia biológica característico del trinquete de Muller (Gráficas 11, 12, 13, y 14) si los criterios de selección no fueron significativos hay posibilidad de extinción. Esto puede ser apoyado en los datos de estandarización del modulo `reproduce.pl` donde se obtuvieron datos de extinción en los cuellos 13, 28 y 30 (los datos no se muestran) de la secuencia VP1 encargada de la replicación, probablemente por efecto de la acumulación de mutaciones deletéreas bajo sucesivos cuellos de botella (Lázaro et al 2003) característicos del efecto del trinquete de Muller

El *Trinquete de Muller* afirma que bajo influencia de los cuellos de botella en poblaciones asexuales donde existen altas tasas mutacionales y tamaños poblacionales pequeños (en este caso 10000 secuencias) se aceleran las acumulaciones de mutaciones deletéreas (con o sin recombinación) como lo muestran las gráficas 1,2,3,4,5, y 6 disminuyendo la eficacia de la población o cuasiespecie (Chao, 1990; Novella et al, 1995).

El *trinquete de Muller* postula que el sexo (en este caso un virus segmentado) es un mecanismo que permite la reducción del efecto de las mutaciones deletéreas dado que la mayoría de estas no se acumulan por efecto de la recombinación (Gráficas 11,12,13 y 14) (Maynard-Smith 1978; revisado en Ramírez 2004) . La recombinación entonces se entiende como un mecanismo de reparación de errores de replicación que fue evidenciada en la simulación (Chao 1988) (véase gráfica 8 Y 9).

La pérdida de eficacia biológica por efecto del trinquete de Muller ha sido evidenciada en o6 (Chao 1990), VSV (Duarte 1992) FMDV (Escarmis et al 1996; Lazaro et al 2003), HIV(Yuste et al 1999), MS2 (De la Peña 2002). En los experimentos *in silico* realizados en la simulación se evidencia que al menos los segmentos VP1 y VP2 de Rotavirus SA11 pierden eficacia biológica por efecto del trinquete de Muller entrado en un periodo estacionario o estasis evolutivo probablemente por la falta de criterios de selección más fuertes o porque estos fueron constantes durante toda la simulación.

La Teoría de las cuasiespecies (Eigen 1971; Eigen 1992; Eigen 1993) y los Sistemas adaptativos complejos (Holland 1993) están fundamentados en principios del Darwinismo como la heredabilidad, la competencia y la selección determinantes en el proceso de evolución de los seres vivos (Darwin 1859).

Las secuencias de VP1 y VP2 reportadas en el Gene Bank, son el centro de gravedad de la cuasiespecie dado que variantes del mismo (cuasi-) individuo (especie) se distribuyen alrededor de una secuencia maestra similar al silvestre (fluctuando cerca al umbral del error) que en muchos casos puede incrementar la eficacia biológica por balance

mutación-selección que permite fijar mutaciones independientemente de su valor selectivo (Eigen, 1992; Bierbricher and Eigen 2005). En el caso de la simulación en DOTHEVOLUTIONVIRUS las mutaciones generadas al azar permiten crear variantes evaluando su fijación según la secuencia consenso.

Si ocurren disturbios algunos mutantes (antes de baja eficacia o desaventajados) se ven aventajados por el cambio en las condiciones (Elena 2002), sin embargo esto no se tiene en cuenta en la simulación dado que las condiciones, es decir los criterios de selección fueron constantes. En el caso de la simulación dichos mutantes solo se evidencian en las fluctuaciones de la eficacia biológica (paisaje adaptativo) que puede ser indicio del efecto de la reina roja (gráfica 12)

Las altas tasas de mutación características de los virus RNA bajo un modelo de cuasiespecie permiten la coexistencia estable de pequeñas poblaciones de mutantes que son resistentes a la acción de antivirales como mutagénicos y se mantienen entre las variantes de la cuasiespecie (Manrubia et al 2005).

En la presencia de mutagénicos–incrementadores de la tasa de error de replicación–cuyo efecto es observado al utilizar tasas de mutación de 0.002 nts/ciclo dado que son mucho mayores que las reportadas para Rotavirus, probablemente la recombinación homóloga corrige los errores producidos durante la replicación bajo los efectos del mutagénico según la predicción de la simulación.

La acumulación de mutaciones obtenidas en la simulación utilizando tasas de mutación muy altas (0.02nts/ciclo) y seleccionando un pequeño número de individuos (5, y 20) presenta periodos de estabilidad por efecto de las mutaciones compensatorias (gráfica 9) o por la acumulación de mutaciones silenciosas o sinónimas en las cuales el cambio en la tercera posición de la tripleta de RNA no afecta el fenotipo (Domingo and Holland 1997).

Es claro que las altas tasas de mutación reducen la eficacia biológica de la población resistente, sin embargo los mutantes tienen un mecanismo compensatorio que se manifiesta severamente por el aventajamiento de algunos mutantes y el efecto de la recombinación homóloga que no se han tenido en cuenta en otros modelos como el de

Lázaro et al 2002. Esto implica que la eficacia de los antivirales podría incrementarse si se administra simultáneamente antivirales para inhibir la entrada y mutagénicos para incrementar la tasa de error de replicación y dado que ha sido demostrado experimentalmente por Pariente et al 2001. Sin embargo la presencia de mutagénicos incrementa el mecanismo compensatorio de mutación-selección haciéndose la cuasiespecie resistente como se muestra en la figura 9, dado que no se acumulan mutaciones por efecto de la recombinación y el efecto balance mutación-selección indicando que el problema de la terapia antiviral es mas complejo.

DOTHEEVOLUTIONVIRUS es una herramienta para el estudio de la dinámica evolutiva de los RNA virus; este permite evaluar el efecto secuencias promotoras y peptidicas importantes en la entrada y replicación de los virus RNA que han sido reportadas en la literatura. Si se conocen dichas secuencias estas pueden ser usadas como criterio de selección y por tanto evaluar la respuesta de la población viral ante la ausencia de dichas secuencias que pueden inhibir la entrada o replicación del virus, como por ejemplo la inhibición del péptido LIV de VP4 para inhibir la entrada de Rotavirus RRV (Arias et al 2001).

Recientemente Briebricher and Eigen 2005 reafirman dos posible vías de conducir poblaciones virales a la extinción de forma natural: (i) el *trinquete de muller* como un mecanismo constante de disminución de la eficacia biológica y (ii) la *catástrofe informática* como un medio para el incremento de la tasa de mutación (Domingo et. al 2005) dado que la ocurrencia de mutaciones deletéreas esta asociada con la proximidad al umbral del error (Eigen, 2002).

Cerca de el umbral la cuasiespecie se mantiene organizada y la variabilidad genética es máxima por efecto de las mutaciones puntuales generadas al azar durante la simulación y donde los mutantes generados son rápidamente seleccionados; cuando el limite del umbral es rebasado la población se desorganiza formando un ensamblaje de secuencias incapaces de transmitir la información genética, por ende se genera extinción (Manrubia et al 2005). En la realidad la presencia de cuellos de botella puede seleccionar y aislar positivamente virus capaces de mantener su infección. Las interacciones, la

complementación (Novella and Ebreddick 2004) y las acciones colectivas de los mutantes de la cuasiespecie permiten crear un efecto compensatorio (algunos deletéreos) en la generación de diversos mutantes y los procesos de recombinación (Yuste et al 2000; Manrubia et al 2005) manifestados en el balance mutación-selección de la cuasiespecie.

Dado que el efecto del trinquete de Muller (Chao 1990) se evidenció en la simulación realizada y ha sido reportado en la literatura a nivel experimental *in Vitro* en poblaciones tipo cuasiespecie como FMDV (Martinez et al 1993) y VSV (revisado en Domingo and Holland 1997), existe gran probabilidad de que las poblaciones de Rotavirus se distribuyan como poblaciones clonales tipo cuasiespecie según los resultados obtenidos. Si esto es cierto el modelo de las cuasiespecies permitiría diseñar estrategias antivirales contra Rotavirus basada en la catástrofe informática (Domingo et al 2005) dadas los inconvenientes en la efectividad de la vacuna contra rotavirus utilizadas en 1999 según el Programa de vacunación del CDC de 2000.

Los mutagénicos han demostrado ser una buena alternativa en el tratamiento de FMDV, mutagénicos como 5 fluoracil (FU) y Azacitidina (AZT) al igual que la Rivabirina han tenido buenos resultados en el tratamiento de la fiebre aftosa (Pariante et al 2001, Sierra et al 2000; revisado en Domingo et al 2005), por esta razón es probable que los mutagénicos sean una alternativa en la terapia antiviral contra Rotavirus; sin embargo, estos tienen efectos diferentes dependiendo del virus al que se le aplique por razones que aun no han sido establecidas (Domingo et al 2005) y dado el efecto de la recombinación homóloga no parecen ser una buena alternativa en el tratamiento de infecciones por Rotavirus como lo muestran los resultados obtenidos (Gráfica 9).

En recientes estudios Grande et al 2005 propone que una pequeña fracción de las poblaciones virales puede conducir a la extinción a la población perdiendo la habilidad de infectar y replicarse por la acción de defectores (DIPs) y mutagénicos que inducen el sobrepaso del umbral del error y por ende la catástrofe informática. Según Novella Ball and Wertz 2004 cuando se realizan pases de competencia entre dos poblaciones utilizando m.o.i mayores que 1, un solo pase de competencia (un cuello de botella) acumula potencialmente DIPs o Defective interfering particles (secuencias que

interfieran en la replicación); sin embargo, existen problemas con los DIPs para la terapia antiviral dado que se pueden producir partículas infecciosas por complementación en el caso de VSV (García et al 2004).

Una alternativa en el desarrollo de terapias antivirales efectivas en el uso de mutagénicos y DIPs como se argumenta arriba. Dado que la vacuna diseñada contra Rotavirus presenta graves problemas, como lo demuestran los informes realizados por el CDC entre el primero de septiembre de 1998 y el siete de julio de 1999, donde se reportaban quince casos de obstrucción intestinal luego de haberse administrado la vacuna del rotavirus (Programa Nacional de Vacunación del CDC de 2000). El sistema de reacciones adversas a las vacunas (VAERS) detectó un número elevado de reportes de casos de invaginación luego de haberse recibido la vacuna del rotavirus. El CDC inició investigaciones para responder a la señal de alerta emitida por el VAERS. En julio de 1999, el CDC recomendó suspender el uso de la vacuna hasta que se estudiara a fondo el asunto. El 22 de octubre de 1999 se dejó de recomendar la vacuna para niños pequeños en los Estados Unidos, basándose en las investigaciones realizadas por el VAERS.

Actualmente la vacuna contra Rotavirus no funciona y tiene graves efectos secundarios por lo que la terapia antiviral basada en cuasiespecies sería una buena alternativa dadas las dificultades de la vacuna. Es posible generar extinción por la catástrofe informática (Eigen 2002) y el trinquete de Muller o al menos disminuir la eficacia biológica de la población (Chao 1990, Duarte et al 1994) como lo muestran los resultados obtenidos. Se sugiere el uso de simultáneo de antivirales que inhiben la entrada y mutagénicos que incrementen la tasa de error y conduzcan a la población a la extinción. Sin embargo este tipo de afirmación debe ser sometida a pruebas experimentales *in vitro* e *in vivo* dado que según las predicciones realizadas según la simulación los mutagénicos no serían la mejor opción para el tratamiento de Rotavirus.

Los mutagénicos tienen problemas en el tratamiento de Rotavirus (al menos VP1 y VP2) dado que al utilizar tasas de mutación muy altas (alrededor de $10e^{-3}$) en la simulación, existen periodos de estabilidad o estasis en los cuales no se acumulan

mutaciones por efecto de la recombinación homóloga bajo sucesivos cuellos de botella (Gráfica 9) indicando que la población se adaptaría fácilmente al uso de un mutagénico.

Es imperativo evidenciar la organización clonal tipo cuasiespecie en Rotavirus mediante el desarrollo de experimentos *in Vitro* realizando sucesivos pases (ciclos de replicación) de virus a partir del lisado obtenido de la infección de una sola partícula que representa la población inicial y a partir de la cual se realizan los sucesivos cuellos de botella en la simulación.

Los virus deben ser cosechados en presencia y ausencia de anticuerpos contra mutantes y deben ser revelados con anticuerpos secundarios con fluoresceínas en los ensayos de eficacia Biológica realizando el respectivo conteo de placas, esto con el fin de calcular la eficacia biológica como se muestra en los trabajos de Holland et al 1991 y Duarte et al 1994 (*Fitness assays*). Lo anterior teniendo en cuenta los protocolos de cultivo de células MA 104 y los ensayos de infección en Rotavirus necesarios para titular el virus y lograr estandarizar ensayos de eficacia biológica para Rotavirus Rf y RRV que crecen muy bien en célula MA104 (Guerrero et al., 2000).

Existen buenos indicios de la organización clonal tipo cuasiespecie en Rotavirus dado que los resultados encontrados en los experimentos *in sillico* -la pérdida de eficacia por efecto del trinquete de Muller (Chao, 1990) y los periodos de estabilidad y cambios abruptos (Stuart, Row and Fitch 1996)- concuerdan con hallazgos realizados *in Vitro* en poblaciones virales tipo cuasiespecie reportados en la literatura como VSV (Domingo et al 1998) y FMDV (Martinez et al 1993; Escarmis et al 1998). Al evidenciar la cuasiespecie en poblaciones de Rotavirus *in vitro* se podrían diseñar estrategias antivirales basadas en mutagénicos y partículas que interfieren en la replicación con el fin de inducir la catástrofe por error (Eigen 2002) en la población clonal y así lograr la extinción (Domingo et al., 2005) o reducir la eficacia biológica, o al menos identificar puntos (número de cuellos) tanto vulnerables como resistentes a extinción que afectan la entrada o la replicación y que son determinantes de la supervivencia del virus.

DOTHEEVOLUTIONVIRUS es un a herramienta bioinformática que permite predecir en que momento el virus se hace mas eficaz o menos eficaz en su replicación basado en

los criterios de selección utilizados (se cambian dependiendo del virus) durante el transcurso de los cuellos de botella.

DOTHEEVOLUTIONVIRUS permite adelantarse al proceso de evolución viral determinando puntos vulnerables resistentes a extinciones mediante la evaluación de nucleótidos (promotores) y péptidos –altamente conservados- implicados en la entrada y replicación del virus que evolucionan por efecto de las mutaciones puntuales y la recombinación bajo sucesivos cuellos de botella, influenciados por la densidad viral o m.o.i. Dichos puntos vulnerables y resistentes dependen exclusivamente de los criterios de selección utilizados que en este caso presentan evidencia experimental.

Evaluando diferentes péptidos o nucleótidos específicos reportados en la literatura, implicados en una adaptación específica como la entrada (Arias et al 2001), la replicación (Chen et al 1997), la resistencia a un antiviral (Novella et al 1996) y la adaptación a un nuevo hospedero (Elena, 2002), se puede llegar a conocer la generación y número del cuello de botella en el cual dicha adaptación *desaparece* o se *mantiene* (neutralidad) dentro de la secuencia consenso de la población (similar al silvestre) determinando puntos de resistencia y de vulnerabilidad a extinción (Sole et al., 1999) en el proceso de evolución de poblaciones de Rotavirus bajo sucesivos cuellos de botella.

DOTHEEVOLUTIONVIRUS realiza sucesivos ciclos de replicación por célula, esto podría ser extrapolado a ciclos de replicación por huésped infectado utilizando tamaños poblacionales muy grandes y por ende puede llegar a simular una epidemia si se tiene en cuenta el ciclo de replicación del virus, es decir, si los Rotavirus tienen un ciclo de replicación de 12 horas, 2 ciclos dentro de la simulación indicarían un día de infección por tanto en los datos obtenidos se podría intuir que la infección es fuerte durante los primeros 5 días (gráficas 11, 13 y 14) como lo muestra el cuadro clínico de los Rotavirus (Field et al 1996). Esto implica la gran aplicabilidad del modelo a la realidad teniendo en cuenta que la simulación fue realizada solo con dos genes determinantes de la replicación del virus.

La simulación realizada en DOTHEEVOLUTIONVIRUS permite dilucidar cual de los operadores genéticos es el causante de del predominio de una adaptación (nucleótidos o

péptidos), esto con el fin de contribuir al diseño de nuevas estrategias antivirales basadas en la vulnerabilidad de las poblaciones virales a la extinción, dadas las altas tasas de mutación tan cercanas al umbral del error que hacen posible la catástrofe informática (Briebricher and Eigen 2005).

Si los criterios de selección son selectivamente fuertes (pocas secuencias lo cumplen) se observa que en ciertos momentos (número de cuello o generación) las poblaciones de RNA virus (Rotavirus) son más susceptibles a catástrofe informática (Eigen 2002) o al menos llegan a disminuir su eficacia biológica por efecto del trinquete de Muller (Chao 1990, Duarte et al 1994) y la influencia del efecto negativo de los cuellos de botella (Manrubia et al 2005). Claro está que la dinámica poblacional natural influye en este tipo de procesos por las intensas interacciones entre virus-reservorio, virus-hospedero y virus-vector en el ecosistema, por lo que existe la necesidad de realizar estudios ecológicos para modelar el ciclo natural y porque no; simular el ciclo natural para el desarrollo de modelos epidemiológicos más reales que los actuales.

Es imperativo el conocimiento del ciclo natural del Rotavirus A dada la importancia de este en estudios epidemiológicos que contribuyan al conocimiento de su dinámica poblacional basado en las interacciones del virus en el ecosistema.

Un ecosistema ideal y bastante representativo de la dinámica del ciclo de vida de los Rotavirus es el humedal dado que las aguas residuales desembocan en estos y existe gran cantidad de interacciones entre la fauna del humedal (aves, bovinos, porcinos, murinos), los Rotavirus, el cuerpo de agua contaminado, los humanos y otros humedales por intermedio de las aves.

Cuando los Rotavirus (virus generalistas muy estables en el medio ambiente) infectan seres humanos, aves, bovinos, porcinos y murinos se generan tamaños poblacionales muy grandes y las deposiciones de los individuos afectados (cuellos de botella naturales de Rotavirus) tienen gran poder infectivo como en el caso de los estornudos en la influenza (cuellos de botella). Estas poblaciones pequeñas llegan a cuerpos de aguas residuales donde hay gran heterogeneidad poblacional (dados los diferentes orígenes) y donde existe mayor probabilidad de contacto con huéspedes susceptibles (consumo de

agua y alimentos) y por tanto se incrementa la probabilidad de generar nuevas variantes por mutación (inherente en el virus) y/o recombinación (si se da coinfección) que en algún momento pueden verse beneficiadas ante algún cambio en las condiciones ambientales o por la interacción con la fauna gracias al balance mutación-selección..

Los vertimientos de aguas residuales cargadas de rotavirus desembocan en aguas no contaminadas donde el ambiente amortigua la carga viral mediante procesos de filtración (20 litros en 1 hora) realizados por moluscos acumulando materia orgánica en el estómago y las branquias (Ley, Higgins y Fayer, 2002; Enríquez 1992). De esta forma disminuyen la cantidad de virus en el agua. Como consecuencia de este flujo se retienen todo tipo de partículas sólidas, muchas de las cuales son flóculos sedimentarios que poseen adheridas partículas virales (Metcalf, 1982). De esta manera moluscos como mejillones, lapas, almejas y ostras, actúan como reservorios y concentradores virales naturales que disminuyen la carga viral en el agua.

Los procesos de bioacumulación realizados por gasterópodos, moluscos y bivalvos garantizan reservorios virales bastante diversos y heterogéneos; las aves, los bovinos, los porcinos y los murinos son huéspedes susceptibles a la infección cuyas deposiciones altamente infecciosas terminan en el agua, la vía principal de transmisión. Lo anterior muestra la importancia de la realización de estudios ecológicos de Rotavirus para determinar la influencia de la bioacumulación y las interacciones virus-reservorio, virus-hospedero y virus-vector en el proceso evolutivo; esto con el fin de plantear modelos del ciclo natural del virus, teniendo en cuenta las interacciones ecológicas contribuyendo de esta forma a el desarrollo de modelos epidemiológicos más reales.

Los humedales con el transcurso del tiempo serán una seria amenaza para la salud pública dado que la capacidad de amortiguamiento del ecosistema por efecto de la bioacumulación es limitada, por esta razón se deben emprender monitoreos que permitan ver los estados poblacionales de los Rotavirus y su poder infectivo en las aguas residuales, humedales y los ríos en donde desembocan esas aguas.

Dada la posibilidad de infecciones diarreicas emergentes y reemergentes de Rotavirus A, es imperativo la modelación del ciclo natural argumentando los factores genéticos poblacionales y ecológicos que influyen en el proceso evolutivo de Rotavirus A.

Para llegar a modelar ecológicamente la dinámica poblacional del virus es necesario (i) diseñar modelos teóricos y bioinformáticos (*in silico*) sometiendo sus resultados a pruebas experimentales *in vitro* e *in vivo*, esto con el fin de refinar los datos del modelo en escalas más cercanas a la realidad; (ii) monitorear constantemente el efecto de la mutación, la recombinación y la mutación-recombinación en poblaciones virales evaluadas mediante el cálculo de la eficacia biológica; (iii) aplicar los resultados refinados *in silico*, *in vitro* e *in vivo* planteando la dinámica de las poblaciones virales a escala ecológica confrontado estos datos con caracterizaciones de hábitats funcionales de virus, esto con el fin de mapificar focos de infección teniendo en cuenta los cambios genéticos en las poblaciones de virus y así poder simular el surgimiento de epidemias y pandemias, que contribuyan al mantenimiento de la bioseguridad global formulando estrategias antivirales y modelos epidemiológicos mas reales desde una perspectiva biológica.

7. CONCLUSIONES

+ DOTHEVOLUTIONVIRUS permite simular una epidemia de Rotavirus SA11 en una población celular de tamaño definido a partir de la infección de una partícula viral basado en el efecto de los cuellos de botella y los fundamentos teóricos del Darwinismo y los sistemas Adaptativos Complejos.

+ Según los resultados obtenidos en la simulación, los Rotavirus A poseen mecanismos de resistencia ante mutagénicos y DIPs (partículas que interfieren en la replicación)

•

+ El modelo de las cuasiespecies aplicado en poblaciones de Rotavirus A presenta nuevas alternativas para el desarrollo de terapias antivirales basadas en el efecto del trinquete de Muller y rebajamiento del umbral del error por incremento en la tasa de mutación y por ende la pérdida inexorable de la información genética.

•

+DOTHEVOLUTIONVIRUS permite mutar secuencias de nucleótidos y traducirlas, generar cuellos de botella y determinar el tamaño poblacional al igual que la densidad viral. Permite simular la evolución por mutación puntual y recombinación y diferenciar sus efectos. Además de esto cada módulo del programa (mutate.pl, consensus, etc) puede actuar de forma independiente.

+Cada módulo del programa tiene una función específica (mutar, recombinar, evaluar, seleccionar, y realizar cuellos de botella, etc) y puede ejecutarse de forma independiente.

+ La *recombinación homóloga* corrige los errores de las secuencias mutadas de forma puntual y al azar dado que la acumulación de mutaciones bajo recombinación es mucho menor que las mutaciones producidas por el azar. La *recombinación homóloga* mantiene el *consenso* dentro de la población e incluye mutantes de baja eficacia.

+ Los periodos de *estabilidad* (éstasis) es un posible indicio del efecto del *Equilibrio puntuado* en la evolución de secuencias (VP1 y VP2) de Rotavirus. Sin embargo hay

problemas en la interpretación por efecto de la escal (los cambios puntuados pueden verse graduales).

+ *La eficacia biológica* se pierde con el transcurso de los cuellos de botella dado que se acumulan mutaciones deletéreas por efecto del trinquete de Muller en poblaciones pequeñas con altas tasas de mutación (Muller 1964 revisado en Domingo 1996).

+ Si la *eficacia inicial* es alta esta se pierde con el transcurso de los cuellos de botella, si esta es baja se incrementa con el transcurso de los cuellos de botella (Novella et al 1995). Un *mutante de baja eficacia* se puede *mantener* dentro del consenso de la población y gana eficacia con el transcurso de los cuellos de botella según la hipótesis de la Reina roja.

•

+ La tendencia a los periodos de neutralidad o estasis evolutivo en todas las simulaciones es explicado porque todas las secuencias fueron seleccionadas por el mismo criterio y por tanto con el pasar de los cuellos de botella esta se estabiliza alcanzando su pico adaptativo.

8. RECOMENDACIONES

+ Realizar una simulación en Red (*Web Biology*, v.gr todos los computadores de la Universidad) para obtener datos significativos de la evolución de todo el genoma de Rotavirus SA11 generando bases de datos de genomas mutados y recombinados dada la limitante que se presentó en el almacenamiento de la información (solo se realizó la simulación con VP1 y VP2) .

+ Realizar simulaciones en DOTHEVOLUTIONVIRUS que impliquen la competencia de genomas o secuencias de diferentes historias evolutivas y eficacia biológica bajo diferentes criterios de selección con el fin de evidenciar exclusión competitiva y el efecto de la Reina roja .

+ Realizar modelos teóricos del efecto de la coevolución virus-hospedero y los cambios de hospedero en la eficacia biológica de poblaciones de RNA virus.

+ Diseñar modelos que permitan interpretar el ciclo natural de los Rotavirus y el flujo de sus poblaciones en estado natural, tomando como modelo las aguas residuales y su relación e interacción ecológica con los humedales .

+ Estandarizar metodologías experimentales *in Vitro* para calcular la eficacia biológica en poblaciones de Rotavirus en competencia con el fin de evidenciar poblaciones clonales tipo cuasiespecie (Ensayos de eficacia biológica).

+ Diseñar bioensayos que permitan observar los efectos de mutagénicos y defectores (DIPs) en la extinción de Rotavirus teniendo en cuenta la catástrofe por error de la información genética y los efectos deletéreos del trinquete de Muller.

9. REFERENCIAS

Arias C., Pavel I., Guerrero C., Mendez E., Zarate S., Lopez T., Espinosa R., Romero P. y Lopez S.. 2002. Molecular biology of Rotavirus Cell entry. *Archives of medical research*: 356-361.

Borgan M., Yoshio M., Naoto I., y Makoko S. 2003. Antigenic análisis of NSP4 of group A Avian Rotavirus Strain PO 13. *Microbiology immunology* 47(9): 661-668.

Briebricher C and Eigen Manfred. 2005. The error threshold. *Virus Research* 107: 117-127.

Brown et al 2001. Collective actions. *Journal of Evolution biology* 14: 821-828.

Bruyere A., Wantriba M., Flasiński S., Dzianot A., and Bujarski J. 2000 Frequent homologous recombination event between molecules of one RNA component in a múltiple RNA virus. *Journal of virology* 74(9): 4214-4219.

Bonhoeffer S., Barbour D., and De Boer J. 2002. Predures for realiable estimation of viral fitness from time - series data. *Proceedings of the Royal Society of London* 269: 1887-1893.

Chao L. 1988. Evolution of sex in RNA viruses. *Jornal of Theoretical Biology* 133:99-112

Chao L. 1990. Fitness of RNA virus decrease by Muller s ratchet. *Nature* 348:454-455.

Chao L., Rang C., and Wong L.. 2002. Distribution of spontaneous mutants and infection about the replication mode of RNA bacteriofago o6. *Journal of virology* 76(7): 3276-3281.

Chen D, Patton JT. 2000 De novo synthesis of minus strand RNA by the rotavirus RNA polymerase in a cell-free system involves a novel mechanism of initiation. *RNA*: 6(10):1455-67

Cichutek K., Merget H., Linde R., Krews W., Kurt R. et. al, 1992. Development of quasispecies in HIV virus population type1. *Journal of Virology* 89: 7365-7369.

Clarke D., Duarte E., Noya A., Elena S., Domingo E., and Holland J. 1993 Genetic bottlenecks and population passajes cause profound fitness differences on RNA viruses. *Journal of virology* 67(1) 222-228.

Clarke D., Duarte E., Elena S., Moya A., and Domingo E. . 1994. The red queen reigns in the kingdom of RNA viruses. *Proceedings National Academic of Sciences* 91: 4821-4824.

Coulson B., Londrigan S., and D. Lee. 1997 Rotavirus contain integrin ligand sequence and desintegrin like domain that are implicated in virus entry into cells. 1997. *Proceedings National Academic of Sciences*. 94:5389-5394.

Crotty S., Craig K, and R. Andino. 2001. RNA virus catastrophe; Direct molecular test by using ribavirin. *Proceedings National Academic of Sciences* 98(12).6895-6900.

Darwin C. 1859. The origins of species

De la Peña M., Elena S., and Moya A. 2000 Effect of deleterious mutation accumulation on the fitness of RNA bacteriophage MS2. *Evolution* 54(2) 686-691.

Dockter J, Evans C., Tishon A, Oldstone M. 1996. Competitive selection in vivo by a cell for one variant over another: implications for RNA virus quasispecies in vivo. *Journal of Virology*: Mar;70(3):1799-803.

Domingo E., Escarmis C., Sevilla N., Moya A., Elena S., Quer J., Novella I., and Holland J. 1996. Basic concepts in RNA virus evolution *FASEB Journal* 10: 859-864p.

Domingo E. and Holland J. 1997. RNA virus mutation and fitness for survival. *Annuals Review Microbiology* . 51:151-178.

Domingo E., Baranowsky E., Ruiz C., Martín a., Saiz C., and Escarmis C. 1998 Quasispecies structure and persistence of RNA virus. *Emerging infection disease* 4(4): October-december 589-595.

Domingo E., Webster R and J. Holland. 1999. Origins and evolution of viruses. *Academic press*. London (England).

Domingo E. 2002. Quasispecies theory in virology. *Journal of Virology* 76(1): 463-465.

Domingo E., Escarmis C., Lázaro E., Manrubia S. 2005. Quasispecies dynamics and RNA virus extinction. *Virus Research* 107: 129-139.

Drake J. 1993. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proceedings National Academic of Sciences* 90: 4171-4175.

Drake J. Charlesworth B., Charlesworth D., and Crow J. 1998. Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 148: 1667-1686.

Drake J. and Holland J. 1999. Mutation rates among RNA viruses *Proceedings National Academic of Sciences* 96(24): 13910-13913.

Dowling W., Denisova E., LaMónica R., and E. Mackow 2000. Selective membrane permeabilization by Rotavirus VP5 protein is abrogated by mutation in an internal hydrophobic domain. *Journal of Virology* 74(18): 6368-6376.

Duarte E., Clarke D., Moya A., Domingo E., and Holland J. 1992 Rapid fitness losses in mammalian RNA virus clones due to Muller's ratchet. *Proceedings National Academy of Sciences* 89:6015-6019.

Duarte E., Clarke D., Moya A., Elena S., Domingo E., and Holland J. 1993. Many trillionfold amplification of single RNA virus particles fail to overcome the Muller's Ratchet effect. *Journal of Virology* 67(6): 3620-3623.

Duarte E., Novella I., Ledesma S., Clarke D., Moya A., Elena S., Domingo E., and Holland J. 1994. Subclonal components of consensus fitness in an RNA virus clone. *Journal of virology*. 68(7): 4295-4301.

Eigen M. 1971. Self organization of Matter and the evolution of biological molecules. *Naturwissenschaften* 58: 465-522

Eigen M., Winkler R. 1992. Steps Towards Life: A perspective of evolution. *Oxford University Press*.

Eigen 1993a. Quasispecies Viricas. 1993. *Investigación y ciencia* 204(4): 14-22.

Eigen 1993b. The origin of genetics information: viruses as models. *Gene* 135: 37-47.

Eigen M. and Schuster. 1979. The hypercycle a principle of natural self organization. *Sprig Verlag, Berlin*.

Eigen M.. 2002. Error catastrophe and antiviral strategy. *A commentary in Proceeding National Academy of Science*. 99(21) 13374-13376.

Elena S., González F., Novella I., Duarte E., Clarke D., Domingo E., Holland J., and Moya A., 1996. Evolution of fitness in experimental population of VSV. *Genetics* 142: 673-679.

Elena S., Miralles R. Y Moya A. 1997. Frequency dependent selection in mammalian RNA virus. *Evolution* 51(3): 984-987.

Elena S., 1998. Evolutionary dynamics of fitness recovery of the debilitation effects of Muller's Ratchet. *Evolution* 52(2):309-314.

Elena S. 2002. Restriction to RNA virus adaptation: An experimental approach. Review in *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 135-142.

Elena S., Cordero F., San Juan R., 2003. Intracolonial genetic variation; ecological and evolutionary aspects. *Biological Journal of the Linnean Society* 79 17-26.

Enriquez R., Frösner G., Hochstein-Mintzel V., Riedemann C and G., Reinhardt. 1992. Accumulation and persistence of hepatitis A virus in mussels. *Journal of Medical Virology*, 37: 174-179.

Escarmis C., Davila M., Charpentier N., Brancho A., Moya A. and Domingo E. 1996. Genetic lesions associated with Muller ratchet in a RNA virus. *Journal of Molecular Biology* 264: 255-267.

Escarmis C, Davila M, Domingo E .1998. Multiple molecular pathway for fitness recovery of an RNA virus debilitated by operation of Muller s Ratchet. *Journal of Molecular Biology*. 285:495-505.

Farsi P., Strazzeria R., Alter J., Farsi S, Deggioanis D., et. al. 2002 Early changes in hepatitis C during interferon therapy outcome. *Proceedings National Academy of Sciences*. 99(5): 3081-3086.

Fields B. N, knipe P, Hoeley et al. 1996 Virus evolution : Fields virology. Loppincott-Raven publisher philadenphia. 157-171.

Flints S., Enqusit L., Krug R., Raaniello V. Skalka A. 2000. Principles of Virology Molecular biology pathogenesis and control: Chapter 6. 163-195.

García-Ariaza J., Manrubia S., Toja M., Domingo E., and Escarmis C. 2004. Evolutionary transition toward Defectives RNAs that are infectious by complementation. *Journal of Virology* 78(21): 11678-11685

Graham K., Halasz P., Ta Ya., Hewish M., Yosuko T., Macrov E., Robinson M., and Coulson B. 2003. Integrin-using rotavirus bind a2b1 integrina, a2 I domain via VP4 DGE sequence and recognize axb2 by using VP7 during cell entry. *Journal of virology* 77(18): 9969-9978.

González C., Arias A., Pariente N., Gómez G. ,and Domingo E., 2004. Preextinction viral RNA can interfere with infectivity. *Journal of virology* 71(6); 4479-4484.

Grande-Pérez A., Lázaro E., Lowenstein P., Domingo E., and Manrubia S. 2005. Supresión of viral infectivity through lethal defection. *Proceeding National Academy of Sciences* 102(12): 4458-4452

Guerrero C., Zarate S., Corkidi G., López S., y Arias C. Biochemical characterization if rotavirus receptors in MA104 cells. 2000. *Journal of Virology* 74(20): 9362-9771

Guerrero C., Boyssounade D., Zarate S., Pavel I., Lopez T., Espinosa R., Rimero P., Mendez E., Lopez S., and Arias C., 2002 Heat shock cognate protein 70 in involved in rotavirus cell entry. *Journal of Virology* 76(8): 4093-4102.

Holsbin C 1996 Complex Adaptative Systems and Fitness landscapes. *Principia Cibernetica*1996 on line <http://pespmc1.vub.ac.be/CAS.html>

Holmes and Moya A.. 2002 Is the quasispecies concept relevant to RNA virus? . Letters to editor in *Journal of Virology* 73(1): 460-462.

Holland J., De la Torre J., Clarke D., and Duarte E. 1991 . Relative fitness and great adaptability of clonal population of RNA viruses *Journal of Virology* 65(6): 2960-2967.

Holland J. 1993 Hidden order. First edition. Oxford University press.

Hoshino Y, Kapikian AZ, Chanock RM. Selection of cold-adapted mutants of human rotaviruses that exhibit various degrees of growth restriction in vitro. *Journal of Virology* . 1994 Nov;68(11):7598-602..

Kauffman S. 1993. The origins of the order: selforganization and selection in evolution 33-40p.

Karyeija R., Kreuze J. F., Gibson R. W., and Valkonen J. P. T. 2000. Synergistic Interactions of a Potyvirus and a Phloem-Limited Crinivirus in Sweet Potato Plants. *Virology* 269:26-36.

Kichler K. Holder A and J. Bull. 2001. Profiles adaptation in two similar viruses. *Genetics* 159 1393-1404.

Kuritzkes D. A fossil record of Zidovudine resistant isolates of HIV. 2001. *Proceeding National Academy of Science* 98(24): Comentary 13485-13487.

Lazaro E., Escarmis C., Domingo E., and Manrubia S. 2002. Modeling viral genomes fitness evolution associated with serial bottlenecks events; evidence of stationary states of fitness. *Journal of Virology* 76(17): 8675-8681.

Lázaro E., Escarmis C., Mercader J., Manrubia S., Domingo E. 2003. Resistance of virus to extinction on bottlenecks passages: Study of decaying and fluctuating patterns of fitness. *Proceedings National Academic of Sciences* 100(19):10830-10835.

López S. Y Arias C. 2001 Los Rotavirus. Los Rotavirus. Departamento de Genética y biología molecular del instituto de biotecnología UNAM Mexico. On line www.unam.edu.mx Lev S Tsimiring and Herbert Levine 1996. RNA virus evolution via fitness space model *Physical review letters* 3 June; 76(5): 4440-4443p

Ley V. Higgins J and Fayer R. 2002. Bovine enterovirus in fecal contamination. *Applied Environmental Microbiology* 68(7): 3455-3461.

Maree A., Kewlen W., Boucher C., and Boer R. 2000. Estimating relative fitness in viral competition experiments. *Journal of Virology* 74(23): 11067-11072.

Mayr E. 1997. This is biology, the science of the living world . Oxford University Press.

Malpica J., Fraile A., Moreno I., Obies C., Drake J., and Garcia F. 2002. The rate of spontaneous mutation in RNA virus. *Genetics* 162 : 1505-1511.

Martínez M, Carrillo C., González, A. Moya,, Domingo E. and Sobrino F.. 1993. Fitness alteration of FMDV mutants: Measure of adaptability in viral quasispecies. *Journal of Virology* 65(7): 3954-3957.

Méndez E, López S., Cuadras M., Romero P., y Arias C., 1999. Entry of rotavirus is a multiple process. *Virology* 263: 450-459.

Merelo J. 2002. Algoritmos evolutivos en línea
www.es.tldp.org/Presentaciones/200211hispalinux/merelo/ae-hispalinux2002.html.

Metcalf, T.G. 1982. Viruses in self-growing waters. *Environment International*, 7: 21-27.

Mirales R, Andres Moya and Elena S. 1999. Effect of population patchiness and migration rates on the adaptation and divergence of VSV quasispecies population. *Journal of Virology* 80: 2051-2059

Moya A. Y Brancho A. 1995. Virus RNA como modelos para el estudio de la evolución experimental. *Innovación y ciencia* 4(1):38-43.

Moya A. Elena S., Brancho A., Mirales R., and Barrio E.. 2000, The evolution of RNA virus: a population genetics view. *Colloquium in Proceedings National Academic of Sciences* 97(13): 6967-6973.

Morimoto et. al. 2000 Algoritmos evolutivos. Ed Universidad Autonoma de Barcelona

Novella I., Elena S., Moya A., Domingo E., and Holland J. 1995a. Size of genetic bottlenecks leading to virus fitness loss is determined by mean initial population fitness. *Journal of Virology*. 69(5): 2869-2872.

Novella I., Duarte E., Elena S., Moya A., Domingo E., and Holland J. 1995b. Exponential increase of RNA virus fitness during large population transmission. *Proceedings National Academic of Sciences* : 5841-5844.

Novella I., Clins, M., Elena, S., Moya A., Domingo, E., Holland j., 1996 . Large population passages of VSV in interferon treated cells select variant only limited resistance. *Journal of Virology*. 70(9): 5799-5804

Novella I., Quer J., Domingo E., and Holland J.. 1999. Exponential fitness of RNA virus population are limited by bottleneck effects. *Journal of Virology* 73(2): 1668-1671.

Novella I., Reisig W., and C. Wilke 2004 . Density depend of selection in VSV . *Journal of Virology*. 78(11): 5799-5804

Novella Isabel. 2004 Negative effect of genetic bottlenecks on the adaptability of VSV. *Journal of Molecular Biology* 336(1): 61-67.

Novella I., Reisig W., and C. Wilke 2004 . Density depend of selection in VSV . *Journal of virology*. 78(11): 6414-6417.

Novella I., Andrew L., and Wertz G. 2004. Fitness analysis of VSV strains rearranged genomes replicative disadvantages. *Journal of Virology* 78(18): 9837-9841

Pariante N., Sierra S., Lowenstein P., and Domingo E. 2001. Efficient virus extinction by combination of a mutagenesis and antiviral inhibitions. *Journal of Virology* 75(20): 9723-9730.

Pavel I., Lopez S, Segovia L, Arias C. 1997. Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses. *Journal of Virology*. 1997 Sep;71(9):6749-56.

Patton J., Jones M., Kalbach A., He Y., and Xiaobo J. 1997. Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. *Journal of Virology*. 71(12):9618-26

Pfeiffer J., y Kinkergard K. 2003. A single mutation in poliovirus RNA dependent RNA polimerase confers resistance to mutagenic nucleotide analogs via increase fidelity. *Proceeding National Academic of Sciences* 100(12): 7289-7294.

Quer J., Hershey C., Domingo E., Holland J., and Novella I. 2001. Contingent neutrality in competing viral population *Journal of virology* 75(16): 7315-7320.

Ramírez Fidel. 2004 Hacia una comprensión de la acción de la recombinación genética y la mutación en el origen de la variación fenotípica, mediante el análisis de la computación evolutiva. Trabajo de grado Presentado para optar por el título de Biólogo. Universidad Nacional de Colombia.

Ray T. 1997 TIERRA - Evolution Simulator Announcement University of Delaware School of Life & Health Sciences ray@brahms.udel.edu. On line <http://www.talkorigins.org/faqs/tierra.html>

Ribeiro R. and Bonhoeffer S. 2000. Production of resistant mutants during antiretroviral therapy. *Proceeding National Academy of Science* 97(14): 7681-7686

Rodriguez L Fitch W, and Nichol S. 1993. Ecological factors rather than temporal factors dominate the evolution of VSV. *Proceedings National Academic of Sciences* 93: 13030-13035p.

Ritchman D., Wrin T., Little S., and Petropoulos C. 2003. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proceeding National Academy of Science* 100(7): 4144-4149.

Ruiz-Jarabo C., Arias A., Baraonski E., Escarmis C., and Domingo E.. 2000 Memory in viral quasispecies *Journal of Virology* 74(8):3543-7.

Sandino AM, Fernandez J, Pizarro J, Vasquez M, Spencer E. 1994. Structure of rotavirus particle: interaction of the inner capsid protein VP6 with the core polypeptide VP3. *Biology Research*. 27(1):39-48.

San Juan R., Moya A. and Elena S.. 2004. The distribution of fitness effects caused by single nucleotide substitution in RNA virus. *Proceeding National Academic of Sciences* 101(22): 8396-8401.

Sanchez-San martin A., López T., Arias C., y López S. 2004. Characterization of rotavirus cell entry *Journal of Virology*, 78(5): 2310-2318.

Sevilla N., Ruiz-Jarabo C., Gome G., and Baranouski E.. 1998. An RNA virus can adapt to multiplicity of infection. *Journal of Virology* 79:2971-2980.

Strauss H and Strauss H. 2001. Virus evolution how does an developed virus make a regular structure *Cell* :105 5-8p.

Solé E., Ferrer R., Gonzales I., Quer J., and Domingo E. 1999. Red queen dynamics competition and critical points in model of RNA virus. *Journal of Theoretical. Biology*. 198:47-59

Steinhauer, De la torre, and Holland J. 1989. Extreme heterogeneity in population of VSV. *Journal of Virology*. 63_ 2072-2080.

Schneideider W. and Rossinick M. 2001 Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions *Journal of Virology*. 75(14) 6566-6571.

Stuart N., Rowe J, and Fitch W. 1993. Punctuated equilibrium and positive darwinian evolution in VSV. *Proceedings National Academic of Sciences* 10424-10428.

Tian Y, Tarlow O, Ballard A, Desselberger U, McCrae MA. 1993. Genomic concatemerization/deletion in rotaviruses: a new mechanism for generating rapid genetic change of potential epidemiological importance *Journal of Virology*. 67(11):6625-32.

Turner P. And Chao L. 1998. Sex and the evolution of intrahost competition in RNA virus o6. *Genetics* 150: 523-532.

Turner P, Chao L. 1999. Prisoner's dilemma in RNA virus. *Nature* April 398: 441-443p.

Turner P. and Elena. S. 2000. Cost of host radiation in an RNA virus. *Genetics* 156:1465-1470.

Weaver S., Brault A., Kang W., and Holland J. 1999. Genetics fitness changes accompanying adaptation of arbovirus to vertebrate and invertebrate cells. *Journal of Virology* 73(5): 4316-4326.

Wilke C. 2003. Probability of fixation of an advantageous mutant in viral quasispecies. *Genetics* 163: 467-474.

Wilke C. and Novella I. 2003. Phenotypic mixing and hiding may contribute to memory in viral quasispecies. *BMC Microbiology* 3: 1-10.

Xavier F., Kéou M., Bélec L., Chong G., Scully C., and S. Porter. 2002 HIV in the mouth *The Lancet:infection diseases* 2: 416-435.

Yang H. 2004. RNA-dependent RNA Polymerases of Cystoviruses. Institute of Biotechnology Department Biological and Environmental Sciences: Department of Virology, Haartman Institute Viikki Graduate School in Biosciences University of Helsinki (Finlandia)

Yuste E., Moya A., López-Galíndez C. 2002. Frequency depend selection in HIV type I. *Journal of General Virology* 83: 103-106.

Zarate S., Cuadras M., Espinosa R., Romero P., Juárez C., Camacho M., Arias C. and López S. 2003. Interaction of rotavirus with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *Journal of Virology* 77(13): 7254-7260.