



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA INTEGRATIVA DE SISTEMAS
(I²SysBio)**

**IMPLICACIONES EVOLUTIVAS DE LA TRANSMISIÓN
COLECTIVA DE VIRUS**

IVÁN ANDREU MORENO

Diciembre 2021

Programa de Doctorado en Biodiversidad y Biología Evolutiva

Director: **Rafael Sanjuán Verdeguer**

ÍNDICE

PRÓLOGO	8
INTRODUCCIÓN	14
Transmisión colectiva de virus.....	16
Tipos de transmisión colectiva	17
Posibles implicaciones evolutivas de la transmisión colectiva de virus...	25
Coste intrínseco de la transmisión colectiva	25
Beneficios y costes vehiculares	26
Beneficios de la coinfección.....	28
Costes de la coinfección	34
Evolución social y cooperación en virus	37
El virus de la estomatitis vesicular	46
Características generales: clasificación, distribución, serotipos, ecología y transmisión de VSV.....	46
Características del virion y del genoma.....	50
El ciclo infectivo de VSV	52
OBJETIVOS.....	59
METODOLOGÍA	63
Cultivos, virus y agregación viral.....	65
Líneas celulares	65
Virus	66
Agregación de VSV.....	67
Técnicas básicas de cultivo celular.....	69
Condiciones de cultivo celular	69
Subcultivo.....	70
Mantenimiento celular, congelación y descongelación.....	70
Infecciones y ensayos virales	72

Infecciones en medio líquido	72
Cuantificación viral	73
Medio con citoquinas: purificación e inducción celular.....	76
Ensayo de reducción de rendimiento viral	77
Infecciones seriadas y evolución experimental	78
Obtención de DIPs de VSV	78
Mutagénesis química de poblaciones de VSV	79
Evolución experimental de VSV en régimen de agregación.....	80
Concentración de partículas virales.....	80
Concentración de RSV por centrifugación.....	80
Purificación de VSV por centrifugación por gradiente de densidad	81
Microscopía y citometría de flujo	82
Microscopía de fluorescencia automatizada a tiempo real.....	82
Curvas de propagación viral.....	83
Ensayos de competencia.....	83
Análisis cuantitativo de focos de infección	84
Citometría de flujo: preparación de muestras y análisis.....	85
Microscopía electrónica de transmisión	86
RT-qPCRs	87
Optimización de las reacciones de RT-qPCR	87
Detección de respuesta antiviral contra VSV	89
Detección de DIPs de VSV	90
Secuenciación masiva illumina	92
Preparación de la muestra.....	92
Análisis de datos de secuenciación masiva	94
Modelización matemática.....	95
Modelo determinista de replicación viral	95

Modelo determinista de replicación no viral	96
Simulaciones estocásticas de replicación viral.....	97
Modelo multiescala: planteamiento general	98
Modelo multiescala: Competencias con entrada determinista	99
Modelo multiescala: Competencias con entrada estocástica.....	101
Implementación de modelos de la literatura para HIV-1, HCV e IVA	102
Análisis estadístico de datos.....	105
Análisis de datos experimentales de IVA.....	105
Capítulo 1. Infección colectiva y dinámica viral.....	108
Replicación cooperativa en la infección colectiva	110
Infección colectiva e infectividad.....	120
El efecto de la replicación cooperativa en la eficacia biológica viral	123
La cooperatividad en modelos detallados de importantes patógenos humanos	128
Evidencia experimental de replicación cooperativa en distintos virus...	132
Capítulo 2. Consecuencias de la agregación a corto plazo.....	137
La infección colectiva de VSV en BHK-21 y MEF	139
El efecto de la agregación sobre la eficacia biológica viral	141
El efecto de la agregación sobre la capacidad dispersiva viral.....	145
El efecto positivo de la agregación y permisividad celular	148
El efecto positivo de la agregación y respuesta antiviral.....	152
La complementación genética no promueve la ventaja del agregado	157
La agregación sin saliva también acelera la infección	160
Capítulo 3. Consecuencias no inmediatas de la agregación	165
La selección desfavorece intensamente la agregación sostenida.....	167
La capacidad de agregación probablemente no disminuye con los pases	170

La agregación promueve la proliferación de DIPs	175
La eliminación de las variantes defectivas recupera la agregación	179
DISCUSIÓN.....	182
La replicación viral es cooperativa.....	184
Condiciones para que la replicación cooperativa incremente la eficacia biológica viral.....	186
Factores limitantes de la replicación cooperativa.....	192
La replicación cooperativa y la dinámica viral intracelular	197
La transmisión colectiva y los eventos de colonización.....	201
El origen de los efectos beneficiosos de la agregación	207
Los efectos no inmediatos de la agregación	212
Consecuencias evolutivas de la transmisión colectiva	216
Perspectivas futuras	223
CONCLUSIONES	229
BIBLIOGRAFÍA.....	234
ANEXO.....	264
Abundancia de las variantes genéticas con frecuencia > 0,1% en al menos una de las poblaciones virales evolucionadas	266

PRÓLOGO

Agradecimientos

La culminación de este proyecto de tesis no podría haber tenido lugar sin la acción directa e indirecta de múltiples personas. Basta con echar la vista atrás para notar la repercusión de mis mentores, compañeros y amigos en mi progreso personal y profesional. Por ello, la realización de esta tesis es un logro que también pertenece a todos aquellos que confiaron en mí, a los que invirtieron su tiempo para instruirme o ayudarme, a los que me apoyaron y animaron en los momentos difíciles, y también a los que estuvieron presentes haciendo más agradable este camino. Aunque todas estas personas merecen y tienen mi gratitud, para no extenderme demasiado y evitar que se me olvide alguien me centraré en aquellos que quizá han tenido un papel más importante y merecen una mención especial por ello.

El primero de ellos es mi director, Rafael Sanjuán, quien me acogió en su laboratorio, primero como colaborador en 2014, y después como estudiante de prácticas externas, trabajo de fin de grado, trabajo de fin de máster y, finalmente, de doctorado. Durante todos estos años su guía y consejo me han ayudado a desarrollarme como científico y a aprender a pensar, pero además le agradezco su trato y haber sido capaz de hallarme virtudes a pesar de mis defectos. Por todo ello, tiene mi aprecio personal y mi admiración profesional. Tampoco puedo olvidar a Ron Geller, quien se hizo cargo de mí y me enseñó, con buen humor e infinita paciencia, a trabajar en el laboratorio cuando apenas sabía coger una pipeta sin que me temblase el pulso. Recuerdo con gran cariño aquellos tiempos bajo su tutela, pues de él aprendí las bases del trabajo de laboratorio y también fue responsable directo de mis inicios en la programación en R. Después de aquello siempre me ha ayudado y aconsejado cuando lo he necesitado. También merece una mención María Durán, la técnico polifacética, y policía ocasional del laboratorio, que tanto me ha ayudado y enseñado, en especial con todo lo relacionado con microscopía, citometría y análisis de imagen, pero también por su compañía en la sala de bioseguridad y por otros buenos momentos fuera de ella. Además, ella sabe que sin sus contribuciones esta tesis posiblemente sería muy distinta. Del mismo modo, Pilar Domingo me ha brindado su amistad y me ha contagiado su entusiasmo y energía. A ella le agradezco todos esos buenos momentos dentro y fuera del laboratorio, y también a José Manuel Cuevas, quien no se limitó a humillarnos a todos durante las jornadas deportivas, sino

que estuvo ahí desde el principio, transmitiendo su buen rollo al laboratorio y ayudando con todo lo posible.

No quisiera cerrar esta sección sin dedicar algunas palabras a mis compañeros y amigos de doctorado, con los que he aprendido y disfrutado, y en los que me he apoyado durante este tiempo. En primer lugar, a Jennifer Risso, con quien no sólo compartí buenos momentos, sino también nuestras mutuas inquietudes y ofuscaciones experimentales. Jenni, has demostrado ser una buena amiga a pesar de mirarme siempre los zapatos. ¡Jolín! ¡Que lo de ponerme uno de cada sólo me pasó una vez! En segundo lugar, Ernesto Segredo, un tipo fenomenal, compañero de mil discusiones, con quien comparto, entre otras cosas, mi interés por las matemáticas. Gracias por todos los buenos momentos en nuestros viajes y en las “quedadas” en el piso para ver películas, cenar y jugar a juegos de mesa (como la insufrible expansión del Catán), y por evitar que me perdiese en los congresos a causa de mi terrible orientación espacial. En tercer lugar, a mi compañero de carrera, piso y laboratorio Juan Vicente Bou. ¡Cuántas cosas hemos pasado juntos todos estos años! Hemos permanecido unidos, haciendo prácticamente las mismas cosas, desde que realizamos aquel magnífico herbario en segundo de carrera. Después de compartir tantas conversaciones y vivencias, de celebrar juntos nuestros éxitos y de apoyarnos en nuestros problemas y miedos, va a ser difícil separarnos. Si estos años han sido particularmente geniales ha sido en gran parte gracias a ti y también a Dévora. Esta tesis no sería sin tu apoyo, y no sé si seré capaz de agradecértelo lo suficiente.

Además de todas las personas anteriores, otras muchas han contribuido a que el ambiente en el laboratorio no haya podido ser mejor durante estos años. Entre ellas, destacaré a mis compañeras doctorandas Alejandra, Salomé y María, pero también a Silvia, Layla, Ahmed, Valesca, Victor y Florian. También quiero agradecer a mi madre, por aguantarme en mis malos ratos, y por apoyarme siempre.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Transmisión colectiva de virus

La unidad estructural básica que permite la propagación de los virus es el virión o partícula infecciosa madura. Los viriones empaquetan el genoma viral en el interior de una cubierta proteica protectora (o cápside) que en algunos casos puede incorporar una envuelta lipídica de origen celular. Tradicionalmente se ha considerado que la transmisión viral involucra únicamente viriones que difunden libremente por el medio extracelular, transportando un único genoma viral desde una célula infectada hasta otra susceptible, dentro del mismo hospedador o en otro distinto (Sanjuán, 2017). Esta visión ha cambiado en los últimos años a la luz de una creciente evidencia que demuestra que esta propagación independiente mediada por viriones individuales convive con otras estructuras y estrategias dispersivas muy extendidas entre los virus que permiten la transmisión colectiva de genomas o partículas virales (Altan-Bonnet, 2016; Mothes et al., 2010; Sanjuán, 2017; Sattentau, 2008; Zhong et al., 2013).

La consecuencia directa y común a todas estas formas alternativas de transmisión viral es el aumento del número de genomas virales que inician la infección de una célula, es decir, de la multiplicidad de infección celular (cMOI; Aguilera et al., 2017; Chen et al., 2015; Combe et al., 2015; Sanjuán, 2017; Zhong et al., 2013). Este hecho contradice la asunción de que las coinfecciones son consecuencia necesaria de la entrada independiente de viriones libres en una misma célula y que, por tanto, dependen completamente de la densidad de la población viral. Podemos diferenciar dos grupos de estrategias de transmisión colectiva: el de las unidades infecciosas colectivas (CIUs), que incluyen estructuras que permiten la libre difusión de conjuntos de viriones o genomas virales por el medio extracelular (Sanjuán, 2017), y el

de la transmisión célula a célula, que implica la propagación de la infección de manera directa y masiva, generalmente a través de contactos entre células (Zhong et al., 2013). Como veremos a continuación, cada una de estas estrategias presenta ciertas propiedades particulares, pero se predice que todas ellas afecten la eficacia viral y repercutan sobre la dinámica, patogénesis, ecología y evolución de las poblaciones virales.

Tipos de transmisión colectiva

Entre los distintos tipos de CIUs conocidas se encuentran los agregados virales, los viriones poliploides, los cuerpos de oclusión y las vesículas extracelulares (**Fig. 0.1A-D**), mientras que las estrategias de transmisión célula a célula son mucho más diversas (**Fig. 0.1E**).

INTRODUCCIÓN

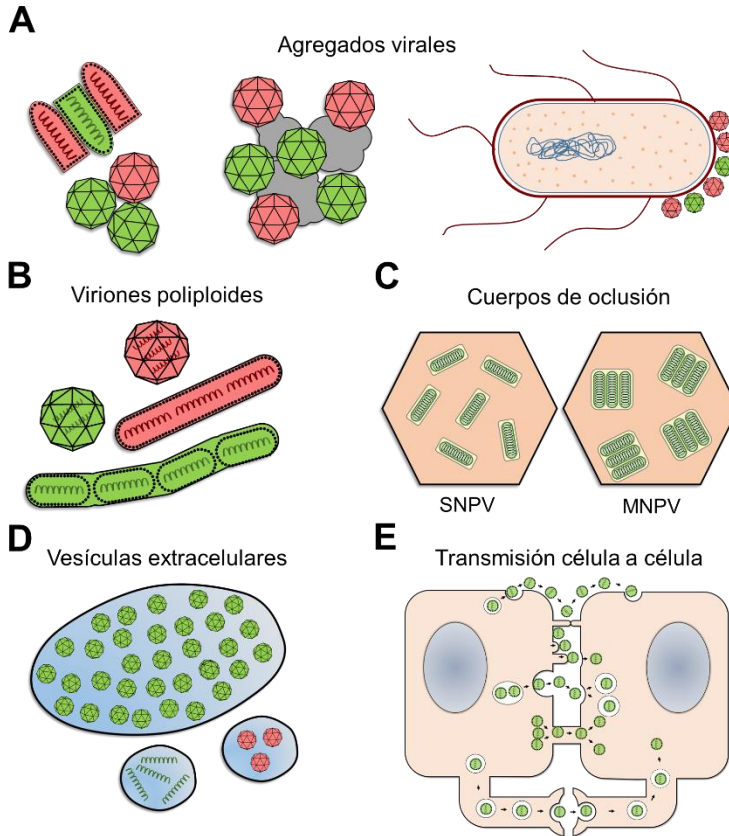


Figura 0.1 Estrategias para la transmisión colectiva de virus. **A.** Agregados virales entre viriones, por interacción directa, mediada por materia orgánica (gris) o por bacterias. Permiten la co-transmisión de viriones originados en distintas células (rojos y verdes). **B.** Viriones poliploides con cápsides icosaédricas (ploidía máxima definida) y helicoidales (ploidía laxa). **C.** Los cuerpos de oclusión de los baculovirus contienen múltiples viriones embebidos en una matriz de poliedrina. Los viriones de nucleopoliedrovirus simples (SNPV) contiene una única nucleocápside, mientras que los de nucleopoliedrovirus múltiples (MNPV) pueden contener varias. **D.** Las vesículas extracelulares pueden tener distintos orígenes y tamaños. Algunos virus pueden utilizar exosomas para propagar sus genomas en ausencia de virión. **E.** La transmisión célula a célula permite la transferencia masiva de viriones entre células vecinas. Algunas de las posibles estrategias se representan de arriba abajo: propagación asociada a membranas empleando filopodios como puentes entre células; inducción de la polimerización de colas de actina (poxvirus); liberación de viriones en el dominio basolateral de la membrana celular; utilización de canales preexistentes

o inducidos entre células; y transmisión a través de sinapsis nerviosas o inmunológicas preexistentes o inducidas (sinapsis virológicas).

Agregados virales

Los agregados virales son cúmulos de viriones que se mantienen unidos físicamente a través de contactos directos o indirectos (**Fig. 0.1A**). En general, la agregación requiere unas condiciones particulares que dependen tanto de las propiedades físico-químicas de los viriones como de variables ambientales. El pH, la temperatura o la concentración de iones son algunos factores clave que promueven la unión entre viriones en condiciones de laboratorio. No obstante, en la naturaleza los viriones también pueden agregar uniéndose a restos celulares u otra materia orgánica cargada presente, por ejemplo, en las heces (Gerba and Betancourt, 2017). En este contexto, se ha descrito recientemente la transmisión colectiva de poliovirus y otros virus de transmisión fecal-oral mediante su unión a la superficie de distintas bacterias intestinales, lo que podría considerarse un caso particular de agregación, aunque con la particularidad de presentar cierto tropismo hacia las células diana (Erickson et al., 2018).

Los agregados virales llamaron la atención de los virólogos hace más de 50 años, cuando empleaban la microscopía electrónica para cuantificar los viriones de las soluciones purificadas de distintos virus como el virus del mosaico del tabaco (Bald and Briggs, 1937), el virus vaccinia (Galasso and Sharp, 1962) o el virus de la estomatitis vesicular (VSV; Galasso 1967), entre otros. Ya entonces, estos investigadores observaron que probablemente los agregados no eran un mero artefacto de la preparación microscópica porque la razón entre las partículas virales totales y las unidades infecciosas determinadas por ensayo en placa era mucho más modesta cuando

INTRODUCCIÓN

comenzaron a considerar la presencia de agregados en sus stocks y, sobre todo, porque el número de estas unidades infecciosas o formadoras de calvas (PFUs) aumentaba al tratar las suspensiones virales con métodos disgregantes como la sonicación. Además, vieron que su tamaño era muy variable incluso para un mismo virus, ya que algunos contenían un par de viriones y otros involucraban cientos o miles de partículas virales. También descubrieron que la neutralización con antiseros de suspensiones virales de picornavirus, influenzavirus, adenovirus, poxvirus, reovirus y herpesvirus era incompleta en todos los casos, salvo si previamente se eliminaban los agregados mediante ultrafiltración (Wallis and Melnick, 1967). Actualmente los agregados de todo tipo de virus eucariotas y procariotas son bien conocidos en el campo de la seguridad alimentaria y el tratamiento de aguas por su resistencia a las condiciones ambientales y a la acción de desinfectantes, entre otros efectos (Gerba and Betancourt 2017).

Viriones poliploides

Generalmente se considera que los viriones son haploides, es decir, que sólo contienen una copia del genoma viral. Sin embargo, muchos virus incumplen esta regla, pudiendo transportar desde dos hasta decenas de genomas virales en cada virión (**Fig. 0.1B**). Un caso ampliamente conocido es el de los retrovirus, que transmiten dos copias de su genoma, aunque generalmente sólo una genera un provirus. Por ello se les suele considerar pseudodiploides, aunque algunos estudios han sugerido verdadera diploidía para HIV-1 (Iglesias-Sánchez and López-Galíndez, 2005). Otros casos de poliploidía viral se han descubierto en fagos filamentosos (Lopez and Webster, 1983), filovirus (Beniac et al., 2012), paramixovirus (Rager et al., 2002) o birnavirus (Lago et al., 2016; Luque et al., 2009). El número máximo

de genomas virales que se pueden cotransmitir depende en buena medida de si la nucleocápside es icosaédrica o helicoidal (Knipe and Howley, 2013). En el primer caso, un número determinado de capsómeros se ensamblan formando una cápside de tamaño fijo con una capacidad máxima para transportar ácidos nucleicos. En el segundo caso, el ensamblaje modular de los capsómeros en torno al material genético no limita el tamaño ni la capacidad del virión. Por ello, mientras que el virus icosaédrico de la bursitis infecciosa puede transportar un máximo de dos dotaciones genéticas completas (Luque et al., 2009), se han observado viriones de ebolavirus (nucleocápside helicoidal) con hasta 22 genomas virales (Beniac et al., 2012).

Cuerpos de oclusión

Los baculovirus son un grupo de virus de insectos muy virulentos que han sido ampliamente estudiados como sistemas de expresión de proteínas recombinantes (Kost et al., 2005) y de control de plagas (Bonning and Hammock, 1996). Estos virus se caracterizan por generar una matriz proteica de granulina o poliedrina con la que recubren los viriones que se producen en los estadios de infección tardíos, generando los denominados cuerpos de oclusión (**Fig. 0.1C**). Estas estructuras presentan una resistencia elevada a la radiación UV y a la desecación, y pueden conservar los viriones en estado latente por periodos de tiempo superiores al año (Slack and Arif, 2007). Además, son necesarios para la transmisión entre hospedadores, donde la matriz proteica se disuelve en el tubo digestivo alcalino de las larvas. Curiosamente, en el género de los nucleopoliedrovirus, los cuerpos de oclusión no protegen a un único virión sino a decenas de ellos. Además, un subconjunto de este género de virus, los llamados nucleopoliedrovirus múltiples (MNPVs), producen cuerpos de oclusión que incorporan viriones

INTRODUCCIÓN

poliploides que se generan por la asociación de nucleocápsides que luego adquieren una membrana derivada, presumiblemente, de la envoltura nuclear (Rohrmann, 2019). Por tanto, parece que la transmisión colectiva ha evolucionado a dos niveles distintos en algunos baculovirus. Sin embargo, a pesar de que se han propuesto algunas hipótesis, su significado biológico todavía no se comprende (Rohrmann, 2014).

Vesículas extracelulares

Recientemente se ha demostrado que múltiples virus pueden codispersar en el interior de distintos tipos de vesículas extracelulares (Altan-Bonnet, 2016; Mutsafi and Altan-Bonnet, 2018; Sanjuán and Thoulouze, 2019; **Fig. 0.1D**). Este hecho cambia nuestra comprensión de la dinámica de las infecciones, especialmente de aquellas causadas por virus no envueltos, que ahora sabemos que pueden no depender completamente de la lisis celular para alcanzar el medio externo.

Con un diámetro menor de 200 nm, los exosomas son las vesículas más pequeñas y se derivan de los cuerpos multivesiculados (endosomas tardíos). Se ha observado que múltiples virus de distintas familias son capaces de viajar en su interior para infectar otras células, aunque su pequeño tamaño impide el transporte de un gran número de viriones. Por ejemplo, el virus de la hepatitis A es un virus no envuelto que promueve su liberación previa a la lisis celular en el interior de exosomas (Feng et al., 2013). Curiosamente, este es el principal modo de dispersión del virus en el torrente sanguíneo, que le protege de ser neutralizado por los anticuerpos del suero, mientras que los viriones libres abundan en las heces. Además de otros virus no envueltos, como el virus de la hepatitis E (Nagashima et al., 2014) o los norovirus (Santiana et al., 2018), algunos virus envueltos pueden transferir su material

genético libre, junto con algunas proteínas, en el interior de exosomas. Este es el caso de patógenos importantes como el virus de la hepatitis C (Ramakrishnaiah et al., 2013), herpesvirus-1 (Bello-Morales et al., 2020), o HIV-1 (Kadiu et al., 2012), que puede emplear los exosomas para infectar y transmitirse a través de macrófagos derivados de monocitos en ausencia del receptor CD4.

Otros virus pueden viajar en vesículas enriquecidas en fosfatidilserina que presentan tamaños superiores a 500 nm y pueden albergar decenas o cientos de viriones. Este es el caso de enterovirus como poliovirus, coxsackievirus y rinovirus, que emplean vesículas derivadas de autofagosomas que probablemente proceden de membranas del retículo endoplasmático donde se encuentran los centros de replicación de estos virus (Bou et al., 2019; Chen et al., 2015; Mutsafi and Altan-Bonnet, 2018). Asimismo, los rotavirus utilizan microvesículas derivadas de la membrana plasmática que se han detectado con frecuencia en las heces (Santiana et al., 2018).

Transmisión célula a célula

La transmisión célula a célula incluye un conjunto de estrategias dispersivas para la transferencia directa y masiva de viriones o genomas virales de una célula a otra, evitando la difusión aleatoria de los virus por el medio extracelular (Mothes et al., 2010; Sattentau, 2008, 2011; Zhong et al., 2013; **Fig. 0.1E**). Algunos virus se transmiten de una célula a otra empleando las conexiones naturales que las células establecen entre sí. Así pues, los virus que infectan células vegetales circulan de unas células a otras a través de los plasmodesmos que las conectan (Carrington et al., 1996; Kumar et al., 2014). Otros virus que infectan células epiteliales polarizadas son capaces de

INTRODUCCIÓN

focalizar su liberación en el dominio basolateral de la membrana plasmática, donde las células mantienen un contacto íntimo gracias a las uniones estrechas. Este tipo de estrategia es la empleada por herpesvirus (Johnson et al., 2001) y flavivirus como HCV (Xiao et al., 2014) o el virus del dengue (Cheng et al., 2020).

Las sinapsis neuronales e inmunológicas representan otro tipo de contactos celulares explotados por distintos virus. Las primeras pueden ser aprovechadas por virus neurotrópicos como herpesvirus (Zaichick et al., 2011), el virus del sarampión (Lawrence et al., 2000) o el virus de la rabia (Ugolini, 2011), mientras que las segundas son explotadas por retrovirus inmunotópicos como HIV-1 o el virus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1; Q. Sattentau 2008; Zhong et al. 2013).

En algunos casos, los virus no dependen de la existencia previa de contactos intercelulares, sino que pueden inducirlos. Para ello, los viriones de poxvirus (Dodding and Way, 2009), como el virus vaccinia (Smith et al., 2003), permanecen unidos sobre la superficie celular tras su liberación e inducen la polimerización de colas de actina provocando protrusiones de la membrana plasmática que los impulsan hacia las células vecinas (Doceul et al., 2010, 2012). Otro mecanismo similar consiste en la proyección de filopodios o de nanotubos de membrana que utilizan muchos virus respiratorios como influenzavirus, el virus respiratorio sincitial, o el virus del sarampión (Cifuentes-Muñoz et al., 2018), pero también retrovirus como HTLV-1 (Gross and Thoma-Kress, 2016) y HIV-1 (Bracq et al., 2018), entre otros. Además, estos dos retrovirus también pueden inducir sinapsis entre linfocitos T, fenómeno conocido como sinapsis virológicas (Bracq et al., 2018; Gross and Thoma-Kress, 2016). En el caso de HTLV-1 se ha observado

que favorece la transferencia colectiva de viriones durante las sinapsis virológicas induciendo la formación de una matriz extracelular densa que mantiene a los viriones asociados a la superficie celular en un ambiente protector denominado biofilm viral (Gross and Thoma-Kress, 2016; Pais-Correia et al., 2010). Por último, la fusión de membranas inducida representa otra posible vía para la transmisión colectiva entre células próximas. La fusión puede ser parcial, creando canales, o total, formando sincitios, y es empleada por múltiples virus, entre otros, herpesvirus, paramyxovirus, poxvirus, reovirus, retrovirus y coronavirus, entre los cuales se encuentran importantes patógenos humanos como HIV-1 y SARS-CoV-2 (Cifuentes-Muñoz et al., 2018; Doms et al., 1990; Leroy et al., 2020; Symeonides et al., 2015).

Todas estas estrategias de transmisión célula a célula parecen ir dirigidas a superar distintas barreras que limitan la diseminación del virus, como las paredes celulares en los virus de plantas, el ambiente hostil de las mucosas, o la neutralización por el sistema inmunitario.

Posibles implicaciones evolutivas de la transmisión colectiva de virus

Coste intrínseco de la transmisión colectiva

La transmisión colectiva puede resultar enormemente costosa para la dispersión viral si asumimos que no genera ningún tipo de beneficios respecto a la monodispersión de genomas virales (Sanjuán, 2018; Sanjuán and Thoulouze, 2019). A modo ilustrativo, consideremos un virus que produce N genomas o partículas virales que se transmiten únicamente en grupos de tamaño K (V_c) y otro que genera progenie monodispersa (V_m). Al dispersar en grupo, V_c alcanzará K veces menos células u hospedadores que V_m en cada evento de transmisión. Pero, además, V_c también producirá K veces menos progenie en las nuevas células infectadas, por lo que V_m crecerá

INTRODUCCIÓN

exponencialmente más rápido si el número de hospedadores no es limitante, obteniendo así una ventaja competitiva de K^{t+1} veces más progenie, donde t es el número de ciclos de infección (**Fig. 0.2**). Evidentemente, este coste puede reducirse, pero no eliminarse, estableciendo un régimen de transmisión colectiva episódico y/o mediante una estrategia mixta en la que no toda la progenie viral se transmita colectivamente. La diversidad y ubicuidad de las estrategias virales para la transmisión colectiva sugiere que deben proporcionar beneficios que compensen sus costes, los cuales pueden proceder de las propiedades del modo de transmisión (beneficios vehiculares), pero también de la interacción entre los virus en coinfección.

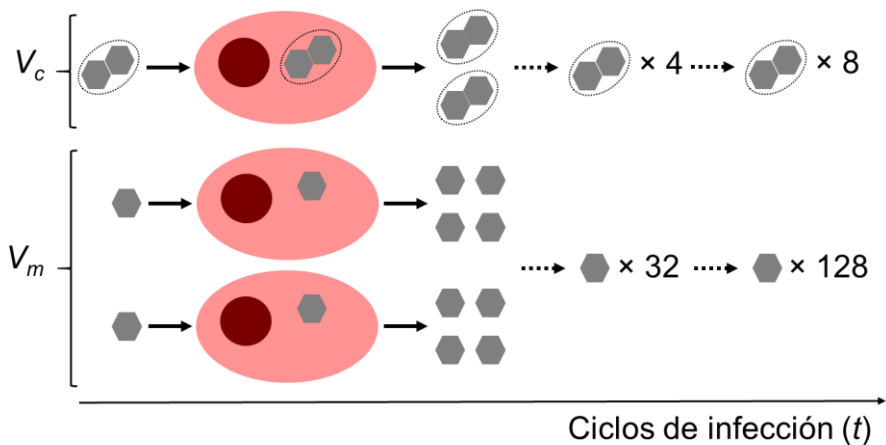


Figura 0.2 El coste intrínseco de la transmisión colectiva. En este ejemplo ilustrativo, el virus V_c sólo dispersa en grupos de tamaño $K = 2$ y en cada ciclo de infección se producen $N = 4$ viriones. Por tanto, con el mismo número de viriones, el virus que monodispersa (V_m) tiene una ventaja de 2:1 unidades infecciosas en t_0 , la cual aumenta a ritmo 2^{t+1} con los ciclos de infección (véase texto).

Beneficios y costes vehiculares

En la sección anterior hemos visto que, de manera independiente de los efectos de la propia coinfección, la mayoría de estrategias para la

dispersión colectiva muestran ventajas frente a los viriones libres, como una mayor estabilidad frente a condiciones ambientales adversas, o una mayor facilidad para el escape inmunitario (Altan-Bonnet, 2016; Gerba and Betancourt, 2017; Sanjuán, 2017; Sanjuán and Thoulouze, 2019; Sattentau, 2008; Slack and Arif, 2007; Zhong et al., 2013). Además, en algunos casos, pueden presentar otras propiedades como facilitar la infección (Chen et al., 2015; Erickson et al., 2018; Münch et al., 2007) o tropismos nuevos o extendidos (Arantes et al., 2016; Bello-Morales et al., 2020; Kadiu et al., 2012; Ramakrishnaiah et al., 2013).

No obstante, no todas las propiedades son beneficiosas respecto a la monodispersión. Por un lado, a causa de su mayor tamaño, las unidades infecciosas colectivas dispersarán más lento de acuerdo con las leyes de la difusión, y podrían presentar dificultades para penetrar las barreras físicas del hospedador. Por ejemplo, se ha observado que HIV-1 agrega con fibras amiloides cargadas positivamente que resultan de la proteólisis de la fosfatasa ácida prostática en el semen. Estas fibras fueron denominadas potenciador de la infección viral derivado del semen (SEVI) porque incrementaban la adsorción y los títulos alcanzados por HIV-1 *in vitro* varios órdenes de magnitud (Münch et al., 2007). Sin embargo, su relevancia *in vivo* se ha cuestionado porque estos agregados apenas logran penetrar el epitelio escamoso vaginal *in vivo* (Allen et al., 2015). Por otro lado, las estrategias de transmisión célula a célula presentan otro tipo de coste adicional al limitar la transmisión localmente, dificultando la diseminación del virus dentro del hospedador y entre hospedadores (Sanjuán, 2018; Sanjuán and Thoulouze, 2019). Los virus lifotrópicos como HIV-1 podrían ser la excepción, ya que los linfocitos T infectados en la circulación sanguínea diseminan la infección con

INTRODUCCIÓN

gran eficacia a nodos linfáticos distantes (Murooka et al., 2012) e incluso contribuyen a la colonización de nuevos hospedadores formando sinapsis virológicas con células de las mucosas (Real et al., 2018).

Se desconoce si el coste intrínseco de dispersar en grupo puede ser compensado enteramente por beneficios vehiculares, pero, en cualquier caso, éstos no constituyen una explicación general para la transmisión colectiva: si el beneficio reside en el vehículo ¿por qué compartirlo? En particular, cabría preguntarse por qué algunos virus incorporan decenas o cientos de viriones en una única vesícula en lugar de repartirlos en un número mayor de éstas o maximizar la progenie libre; o por qué los nucleopoliedrovirus producen cuerpos de oclusión múltiples si otros baculovirus (granulovirus) y otros virus de artrópodos de diferentes familias virales (*Reoviridae*, *Poxviridae* y *Nudiviridae*) producen cuerpos de oclusión simples (Rohrmann, 2014); o por qué algunos virus producen viriones poliploides si, *a priori*, no aportan beneficios vehiculares. Se ha propuesto que, si sintetizar el “vehículo” es costoso para el virus, compartirlo es una forma de reducir el coste/beneficio (Leeks et al., 2019; Sanjuán and Thoulouze, 2019). No obstante, que exista tal balance no es incompatible con la posibilidad de que la infección colectiva proporcione otras ventajas adicionales.

Beneficios de la coinfección

Las interacciones virales en coinfección pueden proporcionar beneficios mediante dos tipos de cooperación: uno inespecífico, basado en un efecto masa, donde el beneficio sólo depende de la cantidad de genomas virales que inician la infección; y otro específico, donde los efectos positivos dependen de la interacción entre distintas variantes o especies virales.

El efecto masa

El efecto masa ocurre cuando una mayor densidad de individuos permite que éstos superen cierta limitación o barrera. En este sentido, el destino de la infección depende críticamente de procesos estocásticos y barreras tempranas impuestas por las células, ya que buena parte de los viriones dan lugar a infecciones abortivas a pesar de ser perfectamente funcionales (Klasse, 2015; Sanjuán, 2018). Esto se debe a que, durante las primeras etapas del ciclo infectivo, los virus o sus componentes pueden perderse o degradarse estocásticamente, o ser bloqueados por algunos componentes constitutivos de la inmunidad innata de la célula (Klasse, 2015; Paludan et al., 2021; Sanjuán, 2018). Por otro lado, la infección puede desencadenar una respuesta antiviral celular que, de no bloquearse completamente o con tiempo suficiente, puede tener importantes consecuencias negativas para la productividad y/o la propagación viral a células vecinas, especialmente teniendo en cuenta que la difusión de citoquinas e interferones es más rápida que la de los virus (Domingo-Calap et al., 2019; Segredo-Otero and Sanjuán, 2020; Voigt et al., 2016). Por tanto, se ha propuesto que iniciar la infección con múltiples viriones o genomas virales podría reducir la probabilidad de experimentar escenarios abortivos, y adelantar el ciclo infectivo favoreciendo la evasión y/o bloqueo de la respuesta antiviral de la célula (Sanjuán, 2017, 2018; Sanjuán and Thoulouze, 2019).

Múltiples estudios sugieren que la transmisión colectiva resulta en una mayor infectividad o productividad que la monodispersión (Chen et al., 2015; Erickson et al., 2018; Lago et al., 2016; Luque et al., 2009; Münch et al., 2007; Sanjuán, 2017; Santiana et al., 2018), pero en la mayoría de ocasiones no está claro que se compense su coste intrínseco (Boullé et al., 2016; Chen et al.,

INTRODUCCIÓN

2015; Erickson et al., 2018; Lago et al., 2016; Münch et al., 2007; Santiana et al., 2018). Para ello, es necesario demostrar que la transmisión colectiva proporciona un beneficio per cápita, es decir, que mejora la eficacia biológica individual de cada virión o genoma viral involucrado en el proceso. Además, con frecuencia es complicado diferenciar si los efectos observados proceden de la coinfección o de beneficios vehiculares como, por ejemplo, una mayor viabilidad de la CIU (Santiana et al., 2018), o mejor capacidad de unión a la célula (Arantes et al., 2016; Chen et al., 2015; Münch et al., 2007). Sin embargo, algunos estudios si ofrecen una evidencia más clara de que los virus pueden experimentar un incremento en su eficacia biológica al transmitirse en grupo. Por ejemplo, la transmisión célula a célula de HIV-1 permite al virus infectar con éxito al saturar la actividad de distintos antiretrovirales (Agosto et al., 2015; Sigal et al., 2011), o la de factores inmunitarios constitutivos como el TRIM5 α del mono Rhesus (Richardson et al., 2008). Otras observaciones también sugieren un aumento notable del éxito infectivo. Por ejemplo, los viriones poliploides del virus de la bursitis infecciosa con dos equivalentes genómicos son casi 17 veces más infectivas que aquellos con sólo uno (Luque et al., 2009).

Otros trabajos han descrito efectos netamente beneficiosos de la coinfección, aunque en ausencia de transmisión colectiva. Por ejemplo, se han reportado efectos colectivos en la infectividad y productividad de influenzavirus A que van más allá de lo esperable por la simple complementación de la dosis de segmentos genómicos al comienzo del ciclo (Heldt et al., 2015; Jacobs et al., 2019; Martin et al., 2020; Phipps et al., 2020). Asimismo, se ha determinado que la infectividad del virus vaccinia en cultivos HeLa aumenta sinérgicamente al inocular múltiples viriones en cada célula

empleando un sistema microfluídico (Stiefel et al., 2012). También se ha observado que el sistema CRISPR-Cas bacteriano restringe la infectividad de los bacteriófagos, que son incapaces de infectar por sí solos a pesar de codificar proteínas anti-CRISPR (Acr). Sin embargo, la expresión de estas proteínas Acr durante la coinfección, o en infecciones secuenciales, permite a los virus cooperar para debilitar y superar esta barrera inmunitaria bacteriana (Borges et al., 2018; Landsberger et al., 2018). Por tanto, estos trabajos también soportan la hipótesis de que los virus puedan beneficiarse de coinfectar a causa del efecto masa, aunque desconocemos si los sistemas empleados se transmiten colectivamente (influenzavirus y fagos) o en qué medida obtienen beneficios de ello (virus vaccinia).

Cooperación basada en diversidad

Además de las interacciones cooperativas que se producen en el efecto masa, los virus en coinfección también podrían establecer interacciones específicas entre variantes virales distintas (Aguilera and Pfeiffer, 2019; Altan-Bonnet, 2016; Leeks et al., 2018; Sanjuán, 2018; Shirogane et al., 2019). En principio, estas interacciones serán menos habituales que las del efecto masa, pues no solo dependen de la cantidad de viriones que inician la infección, sino de la diversidad genética (Sanjuán, 2018). Además, podrán ser positivas, dando lugar a lo que llamaremos cooperación basada en diversidad, pero también negativas, dando lugar a fenómenos como la interferencia o la dominancia negativa, que describiremos más adelante.

INTRODUCCIÓN

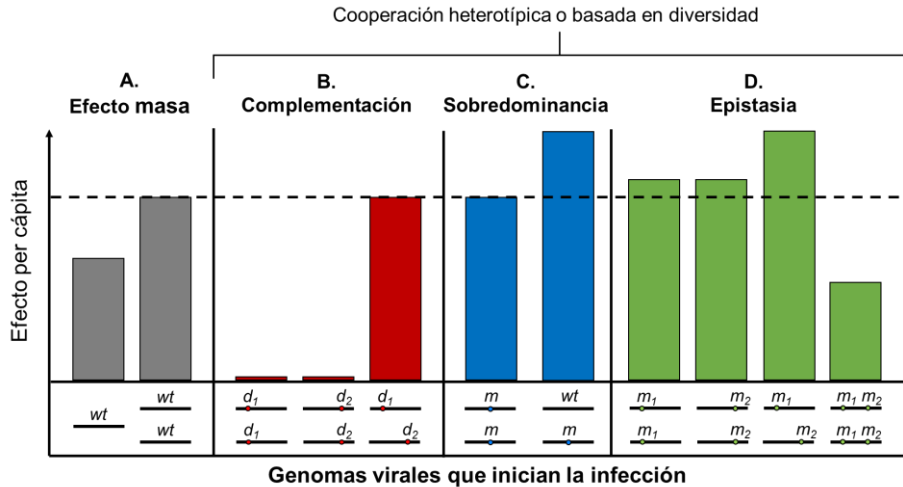


Figura 0.3. Efectos positivos de la infección colectiva. **A.** Una mayor cantidad de genomas virales en coinfección podría contribuir a superar barreras infectivas y producir un efecto masa que otorgue un beneficio neto (per cápita) sobre la eficacia biológica viral. Además del efecto masa, la cooperación entre distintas variantes en coinfección podría contribuir con otros efectos positivos adicionales **B.** La complementación genética entre mutantes deletéreos de distintos genes (d_1 y d_2) podría recuperar la eficacia biológica de la coinfección hasta los niveles observados en coinfecciones con el virus salvaje (wt). **C.** La heterocigosis de la coinfección causada por distintas versiones de un mismo gen (wt y m), *a priori* neutras, podría generar un fenotipo intermedio más beneficioso. **D.** Mutaciones en distintos genes o posiciones genómicas (m_1 y m_2) podrían mostrar interacciones sinérgicas (epistáticas) positivas. Aunque estos mutantes podrían recombinar en un mismo genoma, el beneficio podría ser dependiente de la transmisión colectiva de los mutantes simples si la recombinación produce una epistasia negativa a nivel genómico.

La cooperación basada en diversidad, o cooperación heterotípica, es un proceso conceptualmente equivalente al fenómeno de la heterosis, término empleado en genética para referirse a la mayor eficacia biológica que tienden a presentar los organismos híbridos. Los tres principales mecanismos tradicionalmente propuestos para explicar la heterosis son la dominancia sobre alelos deletéreos recesivos (complementación), la sobredominancia, y las interacciones epistáticas (Birchler et al., 2003; Fujimoto et al., 2018; Kaeppler, 2012). Algunos ejemplos aplicados a la infección colectiva de virus

se incluyen en la **figura 0.3B-D**. Según modelos matemáticos fundados en la genética de poblaciones, la transmisión colectiva de virus debería promover la coexistencia de los mutantes implicados en este tipo de interacciones incluso si replican a ritmos distintos (Leeks et al., 2018).

La complementación genética es probablemente el mecanismo más común (Sanjuán, 2017; Sanjuán and Thoulouze, 2019), pues una fracción frecuentemente mayoritaria de las poblaciones virales está formada por viriones con defectos genéticos o estructurales (Klasse, 2015; Sanjuán, 2018) que podrían complementarse en coinfección. Aunque la complementación *per se* sólo recupera la eficacia biológica del genotipo salvaje (wt) en el mejor de los casos, cuando se da entre dos variantes virales con defectos genéticos deletéreos o letales en diferentes genes la eficacia de la coinfección aumenta sinérgicamente respecto de ambas variantes por separado (**Fig. 0.3B**). Además, la complementación también podría ser un factor primordial para la eficacia de los virus con genomas segmentados, que con frecuencia producen viriones sin una dotación genética completa (Brooke, 2017; Jacobs et al., 2019; Sanjuán, 2018) y, especialmente, para los virus multipartidos, que encapsidan cada segmento genómico por separado (Lucía-Sanz and Manrubia, 2017; Sanjuán, 2018; Sicard et al., 2019). Por tanto, la transmisión colectiva podría contribuir a recuperar la infectividad y la eficacia biológica de parte de la fracción defectiva de la población viral.

Los casos de cooperación heterotípica debida a la sobredominancia entre alelos, o a interacciones epistáticas entre genes o mutaciones son todavía poco conocidos. Se ha observado que los viriones poliploides del virus del sarampión desarrollan una nueva capacidad fusogénica únicamente si cotransmiten un alelo mutante del gen F(G264R) junto a su versión salvaje

INTRODUCCIÓN

(Shirogane, Watanabe, and Yanagi 2012; **Fig. 0.3C**). La cooperación entre variantes virales de distintos genes favorece la propagación rápida en infecciones mixtas de influenzavirus H3N2, donde una variante de la hemaglutinina promueve la entrada del virus en la célula y otra variante de la neuraminidasa facilita su salida (Xue et al., 2016). Cabe tener en cuenta que la cooperación entre mutaciones situadas en distintas posiciones genómicas puede no requerir transmisión colectiva si éstas acaban incorporándose sobre un mismo genoma por recombinación o mutación *de novo*. Sin embargo, en ocasiones las mutaciones sufren una epistasia negativa al combinarse en una misma secuencia genómica, especialmente si concurren en un mismo gen codificante. Este efecto se ha encontrado en coxsackievirus B3, donde dos mutaciones beneficiosas resultan deletéreas si se combinan en el mismo genoma viral (Bordería et al. 2015; **Fig. 0.3D**).

Costes de la coinfección

Aunque la coinfección pueda proporcionar beneficios a partir del efecto masa o de la cooperación entre variantes virales, también puede ser costosa. Parte de su coste se debe a la competencia entre los genomas en coinfección por los recursos finitos de la célula, que ya se incluye en el coste intrínseco de la transmisión colectiva. No obstante, las interacciones entre variantes virales pueden producir efectos negativos adicionales por distintas vías. Como efecto general, la complementación genética reduce la acción de la selección purificadora y con ello promueve la acumulación de mutaciones deletéreas en la población viral, lo que puede repercutir negativamente en su eficacia biológica a largo plazo (Froissart et al., 2004; Sardanyés and Elena, 2010; Segredo-Otero and Sanjuán, 2019). Por otro lado, las variantes virales en coinfección pueden interferirse mediante distintos tipos de interacciones

perjudiciales. Un ejemplo es la dominancia negativa, que ocurre cuando el fenotipo del mutante de menor eficacia biológica se impone parcial o totalmente. Esto se ha observado, por ejemplo, en coinfecciones de variantes de poliovirus resistentes y susceptibles a antivirales, que producen cápsides mixtas susceptibles (Tanner et al., 2014). También se han obtenido resultados similares en agregados mixtos de viriones de VSV susceptibles y resistentes a anticuerpos monoclonales (Cuevas et al., 2017).

La infección colectiva, además de permitir la cooperación entre variantes virales, también puede promover la emergencia de variantes no cooperadoras (en adelante, desertoras). Los genomas virales en coinfección llevan a cabo dos tareas fundamentales: expresar productos génicos y replicarse. Los productos génicos a menudo actúan en *trans* (de lo contrario los virus no experimentarían la complementación genética) y pueden beneficiar al conjunto de genomas virales que infectan la célula (Díaz-Muñoz et al., 2017). En este contexto, cualquier variante que obtenga una menor relación contribución/beneficio proliferará más que el resto (Chao and Elena, 2017). Turner y Chao (1999) demostraron que las infecciones seriadas a una densidad viral constante y elevada promovía la evolución de variantes desertoras que se fijaban en la población viral disminuyendo su eficacia biológica. Un tipo de variantes desertoras muy comunes y conocidas en virología son las partículas interferentes defectivas (DIPs). Las DIPs son virus que albergan grandes deleciones genómicas y no pueden replicar por sí mismos (Chao and Elena, 2017; Huang et al., 1966; Manzoni and López, 2018; Marriott and Dimmock, 2010; Rezelj et al., 2018; Thompson et al., 2010; Timm et al., 2014). Sin embargo, en coinfección con un virus funcional proliferan de manera desproporcionada, al centrarse fundamentalmente en

INTRODUCCIÓN

replicar un genoma que, además, tiende a ser mucho más corto (Chao and Elena, 2017). Aunque las DIPs no pueden fijarse en la población viral (Chao and Elena, 2017), pueden invadir rápidamente una población de virus funcionales, causando una interferencia sobre éstos que resulta en una reducción drástica de la eficacia media de la población viral y en fluctuaciones demográficas (Frensing et al., 2013; Kirkwood and Bangham, 1994; Murray et al., 1975; Palma and Huang, 1974; Szathmáry, 1993; Thompson et al., 2010) que podría conducirla a su extinción, por lo que se han propuesto como una buena herramienta para el desarrollo de terapias antivirales (Yang et al., 2019). No obstante, todavía se desconoce si la transmisión colectiva permite la evolución de la cooperación entre variantes o, por el contrario, favorece la propagación de estas variantes desertoras. Para abordar esta cuestión es importante disponer del marco teórico que ofrece la teoría de la evolución social, que describiremos en la siguiente sección.

En resumen, los distintos modos de transmisión colectiva tienen un fuerte coste intrínseco para la dispersión de los virus que requiere de grandes beneficios para ser compensado. Estos posibles beneficios podrían proceder de distintas vías. Por un lado, de las propiedades del vehículo o medio de transmisión colectiva, aunque en ocasiones también puede causar costes adicionales. Por otro lado, en el corto plazo, la infección colectiva puede beneficiarse de superar barreras infectivas a través del efecto masa. Si la coinfección involucra distintas variantes virales pueden aparecer ventajas adicionales a partir de la cooperación heterotípica, aunque éstas también pueden interferirse. Sin embargo, la sostenibilidad de estas interacciones positivas y, por tanto, de los beneficios de la transmisión colectiva a largo

plazo dependen de que existan mecanismos que eviten la proliferación de variantes desertoras.

Evolución social y cooperación en virus

Las interacciones entre virus son diversas y ubicuas (DaPalma et al., 2010; Díaz-Muñoz, 2019; Díaz-Muñoz et al., 2017; Dolgin, 2019; Mascia and Gallitelli, 2016), a pesar de que sus mecanismos y consecuencias evolutivas apenas han sido estudiados. La célula representa un ambiente en el que los virus pueden interactuar directamente a través de sus genomas y productos génicos, como ya hemos planteado en la sección anterior. No obstante, las interacciones indirectas también pueden ocurrir a causa de los efectos producidos sobre el hospedador y/o su sistema inmunitario (DaPalma et al., 2010; Díaz-Muñoz et al., 2017). A diferencia de la libre difusión de viriones, la transmisión colectiva facilita que las interacciones se mantengan a pesar de las frecuentes y drásticas reducciones en el tamaño poblacional (cuellos de botella) que los virus experimentan continuamente (Gutiérrez et al., 2012, 2015; McCrone and Luring, 2018; Zwart and Elena, 2015a), lo que podría permitir que la cooperación evolucione. La teoría de la evolución social representa el marco teórico adecuado para analizar estas interacciones atendiendo a sus orígenes, mecanismos y presiones selectivas subyacentes, para así poder comprender, predecir y manipular sus trayectorias evolutivas (Díaz-Muñoz, 2019; Díaz-Muñoz et al., 2017). Para que una interacción pueda denominarse social debe evolucionar tanto por sus efectos sobre la eficacia biológica de los individuos que la efectúan (actores) como por sus consecuencias sobre la de otros individuos (receptores). Según afecten a la eficacia biológica de las partes implicadas, las interacciones sociales se clasifican como: egoístas, cuando benefician a sus actores y perjudican a sus

INTRODUCCIÓN

receptores; altruistas, cuando perjudican a sus actores y benefician a sus receptores; mutualistas, cuando son mutuamente beneficiosas; y maliciosas, cuando resultan mutuamente perjudiciales.

La búsqueda de una explicación para la evolución de las interacciones cooperativas constituiría un rompecabezas para la biología evolutiva que perduraría más de 100 años desde que Charles Darwin publicara “El origen de las especies” en 1859. Aunque la cooperación proporciona un beneficio a nivel poblacional, éste no explica su evolución, pues la selección actúa sobre los individuos favoreciendo la invasión por desertores (egoístas). Este escenario, en el que la selección natural conduce a una pérdida de eficacia media de la población, se conoce como dilema social, y suele representarse a través de uno de los problemas fundamentales de la teoría de juegos evolutiva: el dilema del prisionero (Maynard Smith, 1974; Nowak, 2006). En este juego, los individuos interactúan aleatoriamente y pueden desarrollar dos estrategias: cooperar (C) o desertar (D). Durante la interacción, los cooperadores pagan un coste (c) y otorgan un beneficio (b), mientras que los desertores sólo reciben los beneficios de los cooperadores sin incurrir en costes. Así pues, aunque la interacción entre cooperadores es más beneficiosa que entre desertores si el beneficio de cooperar es mayor que su coste ($b > c$) y, por tanto, la cooperación como única estrategia (estrategia pura) maximiza la eficacia biológica poblacional, para un individuo siempre es más conveniente desertar porque obtiene un mayor beneficio con independencia de la estrategia seguida por el otro contendiente. En términos de Maynard Smith y Price (Smith and Price, 1973), desertar representa la única estrategia evolutivamente estable, ya que es capaz de invadir una población pura de cooperadores (**Fig. 4A**).

Para que la cooperación pueda evolucionar, evitando el dilema social, debe favorecerse la interacción entre cooperadores. William D. Hamilton introdujo el concepto de eficacia biológica inclusiva, que es clave para comprender la evolución de la cooperación, especialmente la altruista (Hamilton, 1964a, 1964b). La eficacia inclusiva tiene en cuenta que los individuos pueden transmitir sus genes cooperadores de forma directa, a través de su éxito reproductivo, pero también indirecta, favoreciendo el de otros individuos que compartan esos mismos genes. Por tanto, la selección actúa incrementando la eficacia inclusiva, cuyo componente indirecto determina la evolución de las estrategias altruistas (Gardner et al., 2011, 2016; Nowak, 2006; West et al., 2007a, 2007b). De acuerdo con esto, el altruismo puede evolucionar si se cumple la condición $r > c/b$, conocida como regla de Hamilton, donde r es la probabilidad promedio de que los individuos que interactúan compartan los mismos genes altruistas (**Fig. 4B**). El valor promedio de r en las interacciones entre individuos puede aumentar a través de una característica ligada a los genes del altruismo que guíe la asociación entre cooperadores no necesariamente emparentados (*green-beards*), o favoreciendo la interacción entre individuos emparentados, ya sea mediante mecanismos para el reconocimiento de familiares o debido a la “viscosidad” poblacional o estructura poblacional espacial en la que el parentesco aumenta localmente debido a limitaciones dispersivas (Gardner et al., 2016; West et al., 2007a, 2007b). Una perspectiva alternativa, pero matemáticamente equivalente, a la teoría de la eficacia inclusiva (o selección de parentesco) es la teoría de la selección multinivel, fundamentada por D. S. Wilson (Gardner, 2015; Wilson, 1975). De acuerdo con ella, los individuos de una población que interactúan libremente definen subgrupos poblacionales o demes. En este contexto, la cooperación puede evolucionar cuando el cambio en la eficacia

INTRODUCCIÓN

poblacional dependa principalmente de la acción de la selección sobre los grupos formados, y no sobre los individuos que los conforman.

Por otro lado, la evolución del mutualismo no requiere de efectos indirectos en la eficacia inclusiva, pero sí de mecanismos que limiten la proliferación de desertores (represión de la competencia o *enforcement*). Tales mecanismos son diversos, y generalmente se basan en la supervisión y penalización de la deserción y la recompensa de la cooperación (Ågren et al., 2019; Gardner et al., 2016; West et al., 2006, 2007a). Por ejemplo, la cooperación condicional, o reciprocidad, representa un caso en el que los individuos cooperan con la esperanza de ser correspondidos en futuros encuentros (Nowak, 2006; Trivers, 1971; West et al., 2007b). El “toma y daca” representa un ejemplo clásico de estrategia simple y exitosa para la cooperación condicional bajo la cual un individuo comienza cooperando con otro para después hacer lo último que haya hecho éste (**Fig. 0.4C**; Axelrod and Hamilton, 1981).

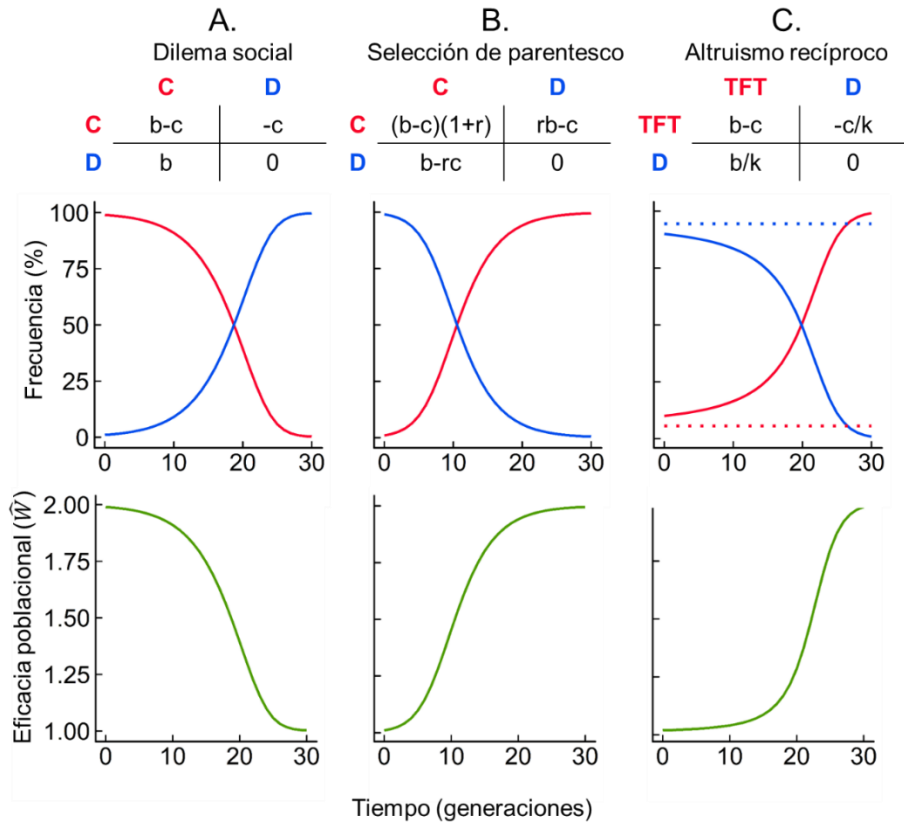


Figura 0.4 La teoría de juegos evolutiva permite estudiar la evolución de las estrategias sociales en distintos escenarios. En la parte superior se incluyen la forma general de las matrices de pagos para distintos juegos. Cada cuadrante de estas matrices representa el pago que recibirá el individuo focal según la estrategia que lleve a cabo (filas) frente a la de su oponente o contexto (columnas). Este pago modificará su eficacia biológica basal (en ausencia de interacciones), que asumimos que es $w_0 = 1$. Las acciones cooperativas (altruistas) incurren en un coste (c) para proporcionar un beneficio (b) a los receptores de su acción, mientras que la desertión se limita a recibir los beneficios de la cooperación. Para estos juegos asumimos que $b > c > 0$. La ecuación del replicador permite determinar cómo evoluciona la frecuencia poblacional de cada estrategia (cooperar, C; desertar, D; y *tit-for-tat*, TFT) a lo largo de las generaciones para casos particulares de cada juego (gráficas centrales), y permite calcular la eficacia media de la población (\hat{W}) en cada momento (gráficas inferiores). **A.** En el dilema del prisionero desertar es la única estrategia evolutivamente estable (EES) porque $b > (b-c)$ y $0 > -c$. Por ello, una población constituida inicialmente por cooperadores es invadida por un desertor emergente,

INTRODUCCIÓN

aunque ello conlleve una pérdida de \bar{W} . **B.** Para la selección de parentesco, la matriz de pagos incorpora los efectos indirectos de la eficacia inclusiva, cuya magnitud depende del parentesco genético promedio entre interactores (r). En este caso, cooperar es la única EES si $(b-c)(1+r) > b-rc$ y $rb-c > 0$, lo cual ocurre si se cumple la regla de Hamilton, es decir, si $r > c/b$. En consecuencia, la cooperación puede evolucionar en una población constituida inicialmente por desertores, lo que conlleva un aumento de \bar{W} . **C.** El altruismo recíproco asume que b y c se obtienen de k interacciones a lo largo de la vida de los individuos. La estrategia TFT solo cooperará con D la primera vez, proporcionándole un beneficio b/k e incurriendo en un coste $-c/k$. TFT no puede invadir D, ya que $-c/k < 0$, pero D tampoco invade TFT si $k > b/(b-c)$, por lo que ninguna estrategia es una EES. No obstante, existe una proporción umbral de ambas (líneas de puntos) que determina si TFT se fija o no en la población. Parámetros utilizados en las figuras: $w_0 = 1$, $b = 1,5$; $c = 0,5$; $r = 0,75$; $k = 10$. Frecuencia inicial de C o TFT: $f_0 = 0,99$ en **A**; $f_0 = 0,01$ en **B**; $f_0 = 0,1$ en **C**.

Estos principios básicos de la teoría de la evolución social, que permiten explicar la evolución de la cooperación, se han aplicado principalmente al estudio de comportamientos observados en comunidades de vertebrados e insectos, y sólo en las últimas tres décadas se han incorporado, con gran éxito, al estudio de microorganismos. Así, por ejemplo, las bacterias secretan moléculas por el bien común, como toxinas, sideróforos, antibióticos, inmunomoduladores, enzimas para la nutrición, la defensa o la comunicación entre células (*quorum sensing*), y forman complejos biofilms en los que, a veces, pueden participar varias especies (Crespi, 2001; Leggett et al., 2014; West et al., 2006, 2007c). Sin embargo, la dimensión social de los virus ha permanecido altamente inexplorada. En parte, la carencia de perspectiva social en virología puede deberse a la falta de intuición sobre qué considerar rasgos cooperativos en un virus, y al conocimiento limitado tanto de los mecanismos de los que pueden emerger como de los que permiten su evolución. Por otro lado, nuestra concepción antropocéntrica de lo que es un “comportamiento social”, parece requerir de complejos sistemas de comunicación, reconocimiento y memoria que son difícilmente atribuibles a los virus (Díaz-Muñoz et al., 2017). Pero esto último sólo es un prejuicio falaz,

pues la cooperación se observa en todas las escalas de complejidad, y está detrás de grandes hitos evolutivos como la organización de moléculas en replicadores, de genes en genomas, de células procariotas en eucariotas, del salto a la multicelularidad, del origen del sexo, o de la estructura de ecosistemas y sociedades (Szathmáry and Smith, 1995).

Según la teoría, para que la cooperación pueda evolucionar en los virus, deben existir factores o mecanismos que promuevan la asociación preferente entre cooperadores. Para ello, una opción es el reconocimiento de los cooperadores mediante interacciones moleculares específicas, como a veces se ha observado en bacterias (Leggett et al., 2014; Strassmann et al., 2011; West et al., 2006). No obstante, este mecanismo podría ser especialmente inestable debido a la enorme capacidad adaptativa de los virus. Por otro lado, la diversidad de las poblaciones virales no suele encontrarse bien mezclada, y se estructura espacialmente en una extensa jerarquía de niveles a través de la cual aumenta la correlación genética entre individuos. Así pues, la población viral puede establecerse a nivel global, como una metapoblación que involucra múltiples subpoblaciones de hospedadores distribuidas geográficamente, pero también a nivel de cada hospedador, órgano, tejido, o célula infectado (Gallagher et al., 2018; Gutiérrez et al., 2012). De hecho, incluso en el interior celular, las interacciones virales podrían estar limitadas espacialmente debido a la compartimentación en orgánulos o centros replicativos (den Boon and Ahlquist, 2010; den Boon et al., 2010; Fernández de Castro et al., 2021; Schmid et al., 2014; Shulla and Randall, 2016). Probablemente sea esta estructura espacial el factor clave que restringe la proliferación de desertores y promueve la cooperación en las poblaciones virales a través de la selección de parentesco o multinivel. Sin

INTRODUCCIÓN

embargo, otros mecanismos activos dirigidos a reducir la presencia de desertores no pueden ser descartados, pues estos se han descrito en todas las escalas de complejidad, desde replicadores moleculares hasta sociedades de organismos complejos (Ågren et al., 2019). En este sentido, los mecanismos para la compartimentación subcelular y para la exclusión de la superinfección (Bergua et al., 2016; Díaz-Muñoz, 2017; Doceul et al., 2010; Guo et al., 2020; Labrie et al., 2010) podrían haber evolucionado en algunos virus por restringir la proliferación de desertores a nivel subcelular y celular, respectivamente.

Posiblemente, la forma más común de cooperación en virus en la célula es la producción de “bienes públicos” durante la replicación, que son aquellos productos génicos virales cuyo uso o efecto proporciona un beneficio compartido por todos los genomas virales (individuos) en coinfección. Estos productos génicos son ampliamente reconocidos por los virólogos como elementos que actúan en *trans*, los cuales permiten la complementación genética. Las proteínas anti-CRISPR de algunos fagos, que suprimen colectivamente la inmunidad adaptativa bacteriana, constituyen un ejemplo establecido de bien público (Borges et al., 2018; Landsberger et al., 2018). De acuerdo con la teoría, se ha observado en multitud de ocasiones que una elevada densidad viral en ausencia de estructura espacial u otros mecanismos que favorezcan la interacción entre cooperadores conducen a una rápida invasión por desertores como las DIPs u otros mutantes interferentes (Chao and Elena, 2017; Leeks et al., 2020; Szathmáry, 1993; Turner and Chao, 1999, 2003). Otras formas de cooperación mutualista pueden emerger entre distintas variantes virales en coinfección, a través de la división de labores, en las que cada variante se especializa en realizar un proceso que beneficia a la otra, o mediante la evolución de interacciones con propiedades emergentes. Como

hemos descrito previamente, este tipo de interacciones mutualistas se han detectado en el influenzavirus H3N2 (Xue et al., 2016) y en el virus del sarampión (Shirogane et al., 2012), respectivamente. Sin embargo, la evolución de tales variantes cooperadoras, cuyas características resultan costosas por separado, requieren de mecanismos que promuevan su interacción frecuente y continua para poder evolucionar, lo cual todavía no se ha demostrado que ocurra en la naturaleza.

Estudios recientes muestran cómo la cooperación en virus puede trascender el nivel celular. Por ejemplo, se ha observado que el bloqueo de la respuesta antiviral causado por VSV responde a un rasgo altruista, pues representa un coste para el virus y sus beneficios se manifiestan principalmente en los ciclos de infección subsiguientes (Domingo-Calap et al., 2019; Segredo-Otero and Sanjuán, 2020). Otra forma de cooperación es la explotación prudente de los recursos del hospedador, la cual es muy susceptible a la invasión por desertores. Se ha demostrado en distintos virus que la estructura poblacional generada por la viscosidad del medio (Boots and Meador, 2007) o una tasa de migración limitada (Kerr et al., 2006) promueven la evolución de variantes de menor virulencia y/o transmisibilidad que explotan de manera sostenible los hospedadores disponibles. Algunos fagos regulan su virulencia mediante sistemas de comunicación análogos al *quorum sensing* bacteriano que les permiten tomar decisiones colectivas respecto a la lisis (Erez et al., 2017; Gallego del Sol et al., 2019; Stokar-Avihail et al., 2019), pero también sobre otros menesteres (Bernard et al., 2021). Por otro lado, los bacteriófagos a menudo adquieren sistemas de defensa típicamente bacterianos para establecer conflictos con otros virus (Koonin et al., 2020). Un caso particularmente interesante es el de los sistemas de infección abortiva

INTRODUCCIÓN

(Lopatina et al., 2020) que emplean múltiples fagos para inducir el bloqueo metabólico y, frecuentemente, la muerte de su hospedador en respuesta a la entrada de virus heterólogos en la misma célula (Bregegere, 1974; Dedrick et al., 2017; Gentile et al., 2019; Montgomery et al., 2019; Owen et al., 2020; Susskind and Botstein, 1980). Esta interacción maliciosa también representa un ejemplo del altruismo indirecto hacia otros congéneres (West and Gardner, 2010), al evitar que el fago invasor prolifere en la colonia bacteriana previamente infectada por los virus excluyentes.

El virus de la estomatitis vesicular

Características generales: clasificación, distribución, serotipos, ecología y transmisión de VSV

El virus de la estomatitis vesicular (VSV) posee un genoma de ARN monocatenario de polaridad negativa que pertenece al orden *Mononegavirales*. Dentro de éste, se clasifica en la familia *Rhabdoviridae* y en el género *Vesiculovirus*.

Los *Vesiculovirus* se distribuyen globalmente e infectan todo tipo de mamíferos e insectos. Sin embargo, VSV es endémico del continente americano, concretamente de las regiones cálidas del sur de México y del norte de América del Sur. En estas regiones, el virus se mantiene en nichos ecológicos estables a partir de los cuales genera brotes anuales que suceden en la interfase entre la estación húmeda y la seca de las zonas tropicales y subtropicales, aunque ocasionalmente se extienden hacia zonas templadas de Estados Unidos e incluso Canadá. En el sureste de Estados Unidos, los ganaderos sufrieron brotes anuales hasta la década de 1970, mientras que en el suroeste siguen ocurriendo brotes importantes cada 10 años, el último en 2015.

Los dos serotipos principales de VSV se denominan Indiana y New Jersey en referencia a los estados en los que fueron aislados en 1925 y 1926, respectivamente (Knipe and Howley, 2013; Letchworth et al., 1999). Posteriormente se aislaron en Sudamérica otros serotipos menos conocidos que derivan de VSV Indiana, por ejemplo, el virus Cocal en Brasil y Argentina (Indiana 2) y VSV Alagoas (Indiana 3) en Brasil (Letchworth et al., 1999). El serotipo Indiana es el más estudiado, y existen multitud de cepas adaptadas al laboratorio (Glasgow, Orsay, San Juan o Mudd-Summers), mientras que VSV New Jersey es más virulento y causa el 80% de los brotes de VSV en Estados Unidos (Hanson et al., 1968). En 2015, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus renombró un gran número de especies virales mediante la pauta “serotipo y género”, por lo que es frecuente encontrar referencias a Indiana vesiculovirus, New Jersey vesiculovirus, Alagoas vesiculovirus o Cocal vesiculovirus, entre otros.

VSV es un virus muy generalista que puede infectar todo tipo de mamíferos salvajes y domésticos, incluyendo humanos, pero también algunas especies de insectos y aves como el pato o el pavo. En el ganado bovino, equino y porcino causa la estomatitis vesicular, que cursa con un periodo febril corto durante el cual aparecen pápulas que se inflaman y estallan produciendo ulceraciones principalmente en los tejidos de la cavidad oral, que inducen salivación excesiva, pero también en el hocico, pezuñas, ubres y prepucio. Aunque la enfermedad no es mortal y los animales se recuperan en pocas semanas, genera alarma entre los ganaderos ya que, excepto en caballos, los signos clínicos son indistinguibles de los causados por el virus de la fiebre aftosa (FMDV), ya erradicado en los Estados Unidos (Hanson et al., 1968; Letchworth et al., 1999; Rozo-Lopez et al., 2018). Además, el dolor de las úlceras dificulta la alimentación y el movimiento de los animales, que con

INTRODUCCIÓN

frecuencia sufren drásticas pérdidas de peso, lo que unido al impacto de las cuarentenas repercute muy negativamente en la productividad y economía del sector ganadero. En humanos, la infección puede cursar de forma asintomática o causar un cuadro clínico gripal. En ocasiones pueden aparecer ulceraciones en la faringe, cavidad oral o manos. Sin embargo, en niños puede complicarse y producir encefalitis (Letchworth et al., 1999).

La transmisión de VSV puede ocurrir entre animales por contacto directo, a través de fómites (material, alimentos o agua contaminados), e incluso por aerosoles (**Fig. 0.5**). Sin embargo, se piensa que los insectos representan una vía de transmisión importante, lo que queda respaldado por el carácter estacional de los brotes, su tendencia a ocurrir cerca de fuentes de agua y la rápida dispersión de la enfermedad en ausencia de movimiento del ganado (revisado en Letchworth et al., 1999; Rozo-Lopez et al., 2018). Muchos dípteros se posan sobre zonas contaminadas de animales infectados y pueden actuar como vectores mecánicos para la transmisión del virus. También se ha propuesto que algunos dípteros hematófagos puedan actuar como vectores biológicos, a pesar de la baja o nula viremia que causa VSV en sus hospedadores. Se ha determinado experimentalmente que estos insectos pueden adquirir el virus al alimentarse sobre zonas contaminadas del animal y contagiarse entre sí al compartir una misma fuente de sangre. Además, en algunos casos el virus puede transmitirse verticalmente vía transovárica, favoreciendo su perpetuación en la población de insectos.

En esta tesis emplearemos agregados de VSV inducidos por incubación en saliva humana como modelo experimental de transmisión colectiva. Estos agregados muestran una notable capacidad para contranmitir variantes virales a una misma célula (Cuevas et al., 2017). La incubación en saliva de una población mixta de variantes de VSV con distintos genes

reporteros fluorescentes aumenta la frecuencia de infecciones mixtas observable por microscopía de fluorescencia o citometría de flujo, que se desvía drásticamente de lo esperable asumiendo que los viriones dispersan e infectan independientemente (Cuevas et al., 2017).

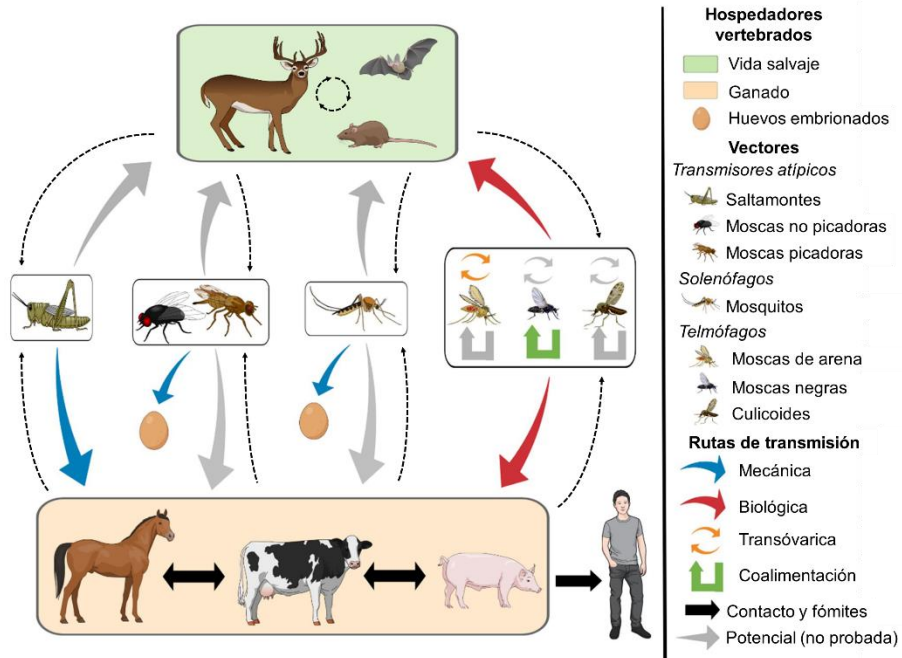


Figura 0.5 Transmisión de VSV en la naturaleza. Las distintas rutas de transmisión que intervienen en la circulación de VSV entre hospedadores vertebrados e insectos vectores se indican con flechas coloreadas o grises, según estén probadas o propuestas, respectivamente. Las moscas no picadoras incluyen moscas domésticas, moscas oculares (género *Hippelates*) y antomíidos. Las moscas picadoras incluyen los géneros *Tabanus*, *Chrysops*, y *Stomoxys*. Los vectores solenofagos (acceden a la sangre a través de los vasos sanguíneos) incluyen mosquitos de los géneros *Aedes* y *Culex*. Los vectores telmofagos (acceden a la sangre a través de exudados y heridas superficiales) representados incluyen los géneros *Lutzomyia*, *Simulium* y *Culicoides*, respectivamente. La transmisión biológica involucra la infección del vector, la amplificación del virus y su transmisión al hospedador vertebrado durante el acceso a la sangre, mientras que la vía mecánica requiere la diseminación del virus por contacto, pero no necesariamente la infección y la amplificación. La transmisión de VSV a huevos embrionados ha sido demostrada en laboratorio. Las vías menos

INTRODUCCIÓN

convencionales de transmisión del virus son la ingesta accidental de saltamontes infectados por hospedadores vertebrados, y la alimentación conjunta (coalimentación) y la transmisión transovárica en insectos. Las flechas discontinuas completan la circulación del virus entre sus distintos hospedadores o portadores sin especificar la vía. Adaptada de Rozo-Lopez, Drolet, y Londoño-Rentería 2018.

Características del virion y del genoma

Los viriones de VSV tienen una característica forma de bala, típica de muchos miembros de la familia *Rhabdoviridae*, y unas dimensiones aproximadas de 180 nm de longitud y 70 nm de anchura (**Fig. 0.6**; Knipe and Howley, 2013; Whelan, 2008). Cada virión está constituido por las cinco proteínas virales compactadas alrededor del genoma viral siguiendo aproximadamente la siguiente estequiometría: 1258 N, 466 P, 1826 M, 1205 G y 50 L (Thomas et al., 1985). Así, en su envoltura lipídica, adquirida de la membrana plasmática, contiene trímeros de la glicoproteína de la envuelta del virus (proteína G). Bajo su superficie se encuentra la proteína de matriz (proteína M), que enrosca y compacta la ribonucleoproteína viral (RNP) que se forma, a su vez, del ensamblaje de las subunidades de la nucleocápside (proteínas N) en torno al ARN viral. Esta compactación de la RNP otorga la forma al virión y evita la transcripción y replicación del genoma. Junto a la RNP se incluyen complejos proteicos formados por la subunidad grande de la polimerasa viral (proteína L) y su cofactor tetramérico conformado por la fosfoproteína del virus (proteína P).

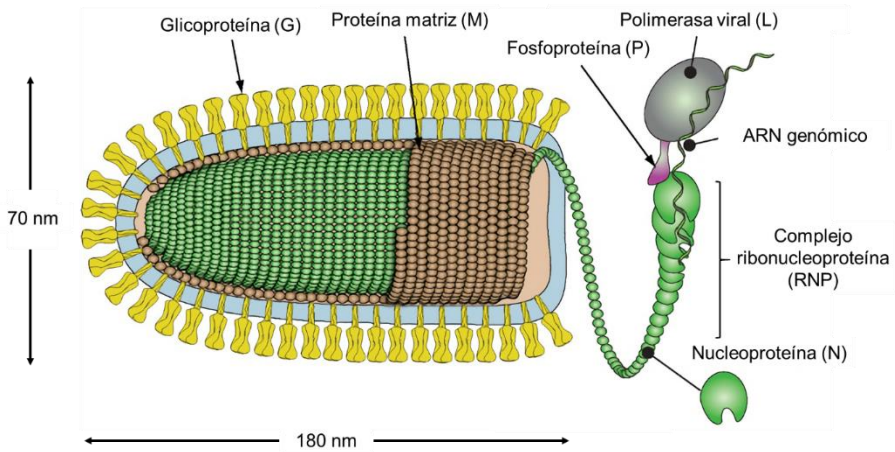


Figura 0.6 Características del virión de VSV. Componentes, estructura, forma y tamaño del virión. Imagen modificada de ViralZone (viralzone.expasy.org).

El genoma del virus consiste en una única molécula de ARN de polaridad negativa con 11 161 nucleótidos. En ella se codifican los cinco genes virales (N, P, M, G y L), que abarcan casi la totalidad de su secuencia. No obstante, las regiones no codificantes, aunque minoritarias, son fundamentales y las hay de dos tipos: las adyacentes a los genes virales, que regulan la transcripción, y las constituidas por las 50-60 bases de los extremos genómicos, conocidas como 3' leader y 5' trailer, que regulan la replicación y la encapsidación del ARN viral (**Fig. 0.7**). Por tanto, a pesar de la ausencia de pautas de lectura solapantes relevantes, la densidad de información en el genoma de VSV es alta, ya que la práctica totalidad del ARN viral tiene un papel codificante o regulador en el ciclo infeccioso.

INTRODUCCIÓN

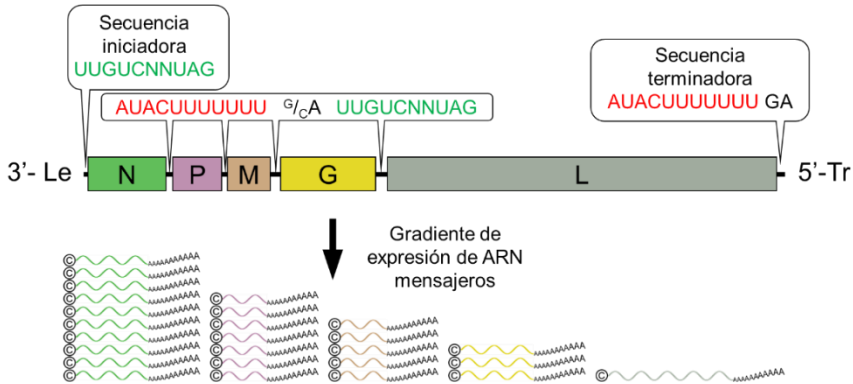


Figura 0.7 Características genómicas de VSV. El genoma de VSV (de polaridad negativa) se representa en dirección 3' – 5' de acuerdo con el orden de transcripción de los distintos genes del virus, que se indican en las cajas coloreadas. Las regiones no codificantes y reguladoras aparecen como segmentos adyacentes a los genes. Estas regiones incluyen elementos reguladores que actúan en *cis*, de los cuales se muestran las secuencias iniciadoras (verde) y terminadoras (rojo) de la transcripción de cada gen. Las bases no transcritas en las regiones intergénicas se muestran en negro. En los extremos genómicos se indican las secuencias 3' – Le (leader) y 5' – Tr (trailer), que actúan como promotores de la replicación y de la encapsidación del ARN naciente, respectivamente. Debajo del genoma viral, se muestra el gradiente de expresión de mensajeros del virus, los cuales son madurados por la proteína L del virus, adquiriendo una caperuja 5' y una cola poliA. Figura inspirada en Whelan, 2008 y ViralZone (viralzone.expasy.org).

El ciclo infeccioso de VSV

El ciclo infeccioso de VSV se desarrolla con rapidez. Así, la liberación de progenie viral puede comenzar tras 3-4 horas de haber iniciado la infección de la célula y la duración total del ciclo puede rondar unas 12-18 horas, dependiendo de la célula hospedadora. Muchos de los procesos del ciclo infeccioso suceden de manera concurrente o solapada en el tiempo, dificultando su categorización en distintos pasos o fases sucesivas. Aun así, conviene dividir el ciclo en sus pasos lógicos: adsorción, entrada y liberación de componentes virales en la célula, expresión génica y replicación viral, y ensamblaje y liberación de progenie (**Fig. 0.9**).

La entrada del virus en la célula comienza con la adsorción del virión a la superficie celular a través de interacciones electrostáticas entre el ectodominio de la glicoproteína G y las cargas negativas de lípidos como la fosfatidilserina, antaño considerada el receptor del virus (Carneiro et al., 2002). Actualmente conocemos que VSV interactúa con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) y, con ello, desencadena su entrada en la célula por endocitosis mediada por clatrina (Finkelshtein et al., 2013). El virión, que sigue la vía endocítica, puede liberar sus componentes al citoplasma de al menos dos maneras. La principal consiste en la fusión de la envuelta viral con la membrana del endosoma primario, que ocurre a través de un cambio conformacional en la glicoproteína G desencadenado por la acidificación endosomal ($\text{pH} \leq 6,2$; Kim et al., 2017; White et al., 1981). Cuando el virión no logra fusionar su membrana con la del endosoma primario y avanza en la vía endocítica, puede acabar fusionándose con las vesículas internas de los cuerpos multivesiculados. Así, la segunda vía de entrada del virus consiste en la fusión de estas vesículas internas con la membrana del cuerpo multivesiculado, que puede no ocurrir y acabar con la degradación del virus en los lisosomas (Albertini et al., 2012; Whelan, 2008). Por tanto, distintos procesos estocásticos pueden afectar tanto al tiempo como al éxito en la entrada de VSV en la célula independientemente de la capacidad infectiva del virión.

Cuando los componentes virales alcanzan el citoplasma, la proteína M se disocia de la RNP y comienza la transcripción primaria de mensajeros, como es típico de los virus no segmentados de ARN de polaridad negativa, pues la replicación no puede ocurrir hasta que los niveles de nucleoproteína N permitan la encapsidación cotranscripcional de las hebras genómicas y

INTRODUCCIÓN

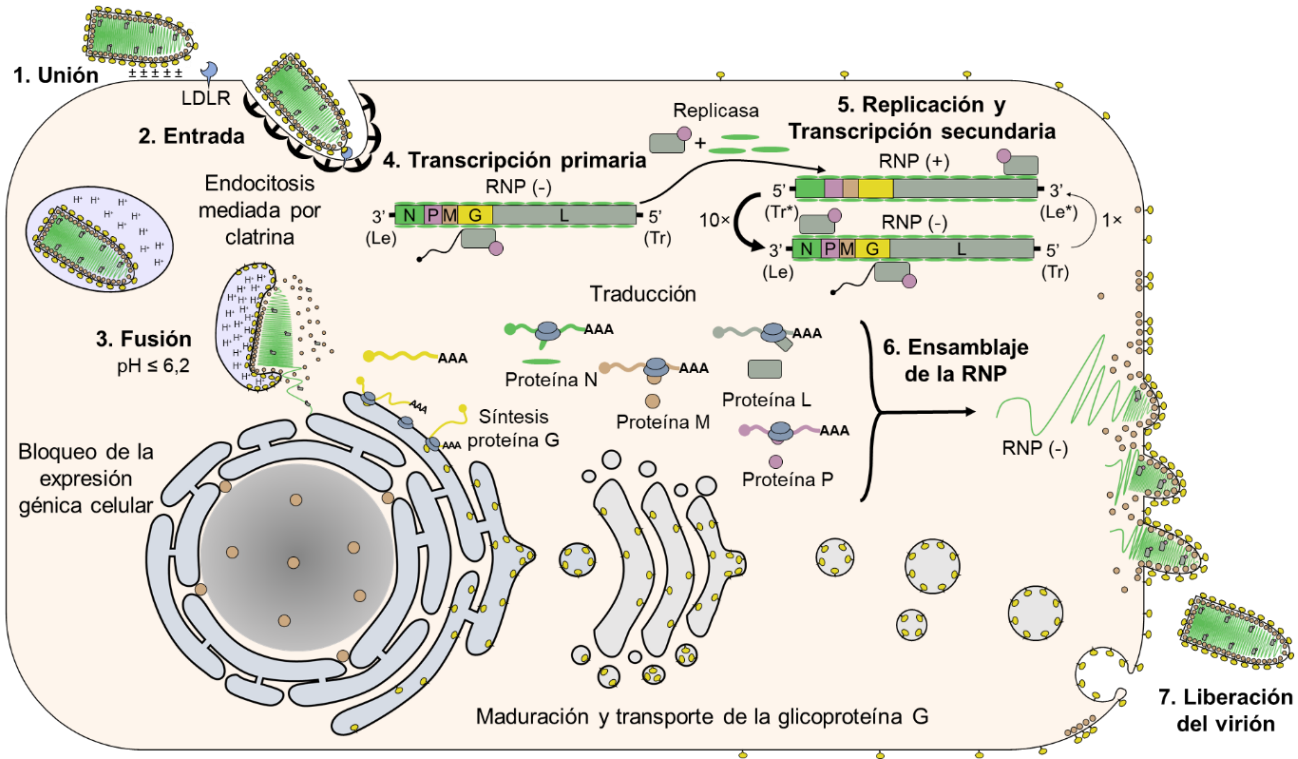


Figura 0.8 Ciclo infeccioso de VSV. Se indican numerados en orden secuencial los principales procesos del ciclo infeccioso del virus. También se incluyen otros procesos no secuenciales como el bloqueo de la expresión génica celular por la proteína M y la síntesis, maduración y transporte de la proteína G hacia la membrana. Véase el texto para más detalles. LDLR: Receptor de lipoproteínas de baja densidad; RNP (-): ribonucleoproteína con genoma; RNP (+): ribonucleoproteína con antigenoma; Le: 3' líder genómico; Le*: 3' líder antigenómico; Tr: 5' trailer genómico; Tr*: 5' trailer antigenómico.

antigenómicas nacientes (Knipe and Howley, 2013; Whelan, 2008). Se han identificado dos complejos polimerasa distintos en células infectadas por VSV: uno formado exclusivamente por las proteínas L, P y N, que se encarga de la replicación viral, y otro que incorpora algunos factores celulares, participa en la transcripción, y puede obviar la secuencia 3' leader para comenzar a transcribir desde el gen N (Knipe and Howley, 2013; Qanungo et al., 2004).

La transcripción de mensajeros está regulada por las secuencias no codificantes que marcan el inicio y la terminación de cada gen (**Fig. 0.7**). Además, también regulan los niveles de expresión de cada proteína, ya que causan que la polimerasa se desprenda del molde en las regiones intergénicas con una probabilidad del 25-30% (mayor entre G y L, aunque no se sabe por qué; Ball et al., 1999) y tenga que reiniciar la transcripción desde el gen N. Esto provoca un gradiente en los niveles de expresión de las proteínas virales según su ordenación genómica ($N > P > M > G > L$; **Fig 0.7**). Por otro lado, la proteína L es capaz de madurar los mensajeros mientras transcribe, incorporando una caperuza 5' metilada y una cola poliA. Para ello, lleva a cabo una serie de reacciones poco convencionales sobre el extremo 5' del ARNm (Ogino and Banerjee, 2007; Whelan, 2008), mientras que la cola poliA la incorpora mediante un proceso denominado "tartamudeo" que consiste en el copiado repetitivo (unas 200 veces) del séptimo uracilo de la señal terminadora (Barr and Wertz, 2001; Hwang et al., 1998; Whelan, 2008).

La replicación viral comienza tras la transcripción primaria, y produce nuevos genomas que contribuirán a la transcripción de más mensajeros. En la regulación de la replicación están implicadas las secuencias no codificantes 3' leader y 5' trailer de los extremos genómicos. Estas secuencias son

INTRODUCCIÓN

parcialmente complementarias, por lo que actúan como promotores de la replicación en los extremos 3', y desencadenan la encapsidación inmediata del ARN naciente en los extremos 5' tanto en los genomas como en los antigenomas. Además, el extremo 5' genómico también está implicado en el ensamblado del virión. No obstante, las diferencias en la complementariedad entre el leader y el trailer justifican que el extremo 3' antigenómico actúe como un promotor la replicación unas 10 veces más potente que el del extremo 3' genómico, lo que favorece la producción de un exceso de ARN genómico (Li and Pattnaik, 1997). Los extremos genómicos producidos durante la formación de genomas interferentes defectivos de tipo *panhandle* o *snap-back* son completamente complementarios (Marriott and Dimmock, 2010). Esto puede resultar en que el genoma y el antigenoma posean el promotor 3' leader antigenómico, aumentando considerablemente la replicación y, con ello, la interferencia.

Durante la infección de VSV, la proteína M impide la expresión génica de la célula interfiriendo con la transcripción, el transporte núcleo-citoplasma y la traducción a través de la interacción con el factor de exportación de ácido ribonucleico (Rae-1) y otras proteínas celulares (Ahmed et al., 2003; Knipe and Howley, 2013; Rajani et al., 2012; Redondo et al., 2015). A consecuencia de ello, la proteína M activa indirectamente la apoptosis por la vía intrínseca o mitocondrial, aunque los mutantes de VSV que no bloquean la expresión génica de la célula pueden desencadenar la apoptosis por la vía extrínseca a partir de receptores de muerte (Pearce and Lyles, 2009). Las proteínas G maduran en su viaje hacia la membrana plasmática a través de la vía secretora, que involucra el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi. Las regiones de la membrana que

acumulan trímeros de glicoproteínas G atraen a las proteínas M citoplasmáticas para formar complejos M-RNP. Este proceso enrolla y compacta las RNPs implicadas bloqueando la replicación y transcripción viral. Finalmente, el motivo PPPY de la proteína M desencadena la gemación de los viriones al medio extracelular al reclutar la maquinaria ESCRT, responsable de procesos topológicamente similares como la formación de las vesículas internas de los cuerpos multivesiculados (Redondo et al., 2015).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo fundamental de esta tesis es el de analizar si la transmisión colectiva permite compensar sus costes en el corto plazo gracias a beneficios derivados de la coinfección y si promueve la evolución de variantes cooperadoras o la invasión por virus defectivos.

De acuerdo con esto se derivan tres objetivos principales:

1. Estudiar las propiedades de la infección colectiva combinando modelos matemáticos y experimentos para dilucidar si existe un mecanismo que justifique la existencia de un efecto masa que compense el coste dispersivo de incrementar el número de genomas o partículas virales que inician la infección.
2. Emplear agregados virales de VSV como modelo de estudio para determinar experimentalmente el efecto neto e inmediato de la transmisión colectiva sobre la eficacia biológica viral, discerniendo los mecanismos que los originan.
3. Utilizar la evolución experimental de VSV en régimen de agregación para determinar las consecuencias de la transmisión colectiva sobre la evolución de interacciones sociales y la diversidad viral.

METODOLOGÍA

Cultivos, virus y agregación viral

Líneas celulares

Para el desarrollo experimental de esta tesis se han empleado nueve líneas celulares distintas, todas ellas adherentes, procedentes tanto de tejidos tumorales como sanos de humanos y de otros mamíferos. Como se indica a continuación, todas las líneas celulares salvo MEF fueron adquiridas de la colección americana de cultivos tipo (ATCC).

Con origen en tumores humanos empleamos las células epiteliales HeLa H1 (ATCC: CRL-1958), procedente de cáncer cervicouterino; y A549 (CCL-181), aisladas de adenocarcinoma pulmonar. De tumores del ratón utilizamos las células epiteliales 4T1 (ATCC: CRL-2539), originarias de cáncer de la glándula mamaria; los fibroblastos CT26 (ATCC: CRL-2639), aislados de carcinoma colorrectal; y las células Neuro2a (ATCC: CCL-131), procedentes de un neuroblastoma originado en células madre de la cresta neural.

Con origen en tejido sano empleamos los fibroblastos MRC5 (ATCC: CCL-171), aislados de tejido pulmonar fetal humano; los fibroblastos BHK-21 (ATCC: CCL-10), procedentes de tejido renal de hámster neonato (*Mesocricetus auratus*); las células epiteliales Vero (ATCC: CCL-81), con origen en el epitelio renal del mono verde africano (*Chlorocebus aethiops*); y los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), que fueron inmortalizadas y cedidas por la Dra. Carmen Rivas (Universidad de Santiago de Compostela, España). Sin embargo, a pesar de su originarse en tejido sano, tanto BHK-21 como Vero son células de crecimiento continuo que se asemejan más a cultivos tumorales, pues presentan distintas alteraciones genéticas y ambas células son defectivas en la producción de interferones. Por otro lado, MRC5

y MEF son células diploides e inmunocompetentes, que pueden mantenerse en cultivo por un número limitado de pases. Por ejemplo, aunque el procedimiento de immortalización aplicado a MEF alarga su vida en cultivo (Palmero and Serrano, 2001), no es recomendable cultivarlas más allá de las 20 divisiones.

Virus

El virus de la estomatitis vesicular (VSV) procede del clon infeccioso creado originalmente por Lawson y colaboradores (Lawson et al., 1995) que nos proporcionó el Dr. Valery Z. Grdzlishvili (Universidad de Calorina del Norte, EEUU). Las dos variantes fluorescentes empleadas en esta tesis (VSV-GFP y VSV-mCherry) se produjeron insertando el gen reportero correspondiente en la región intergénica situada entre los genes G y L del virus. Puntualmente, empleamos el mutante oncolítico VSV-GFP- Δ 51 y el mutante VSV-mCherry-MARM. El mutante Δ 51 contiene un triplete deletado que afecta al aminoácido 51 de la proteína M del virus que le impide bloquear correctamente expresión génica de la célula y, con ello, la respuesta antiviral (Quan et al., 2014; Rajani et al., 2012; Stojdl et al., 2003). VSV contiene varias regiones de la proteína G que representan los principales epítomos (A₁, A₂ y B) reconocidos por distintos anticuerpos monoclonales. Al conjunto de mutantes resistentes a alguno de estos anticuerpos se les llama MARM (del inglés, *Monoclonal Antibody Resistant Mutant*; Vandepol et al., 1986). En nuestros ensayos empleamos el mutante MARM-C, que se puede generar introduciendo la sustitución A3853C que produce el cambio de aminoácido D259A que afecta al epítomo A₁ del virus. Una ventaja de este mutante es que puede considerarse neutral respecto al WT en la mayoría de

situaciones que no involucren una competencia a muy largo plazo entre ambos virus (Quer et al., 2001; Sanjuán et al., 2004a).

Además de VSV, de manera puntual empleamos los siguientes virus de humanos y mamíferos. El coxsakievirus B3 Nancy (CVB3), que fue obtenido de un clon infeccioso proporcionado por el Dr. Marco Vignuzzi (Instituto Pasteur, Francia). La variante con GFP de adenovirus humano tipo 5 (hAdv5), que fue facilitada por el Dr. Ramón Alemany (Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge, España). El virus respiratorio sincitial (RSV) de la cepa A2-Linea19F y con el gen reportero mKate, que fue cedido por el Dr. Ron Geller (Universidad de Valencia, España). El virus vaccinia (VacV) recombinante, que codifica la ARN polimerasa del fago T7, fue otorgado por el Dr. G.W. Wertz (Universidad de Alabama, EEUU).

Agregación de VSV

Durante el desarrollo experimental de esta tesis se emplearon dos métodos para inducir la agregación de VSV descritos por Cuevas y colaboradores (Cuevas et al., 2017): la agregación en saliva humana y la agregación espontánea entre viriones purificados por centrifugación con gradiente de densidad.

Obtención de saliva y agregación viral

La capacidad de la saliva humana o de vaca para agregar viriones de VSV varía ampliamente entre donantes (Anschau and Sanjuán, 2020; Cuevas et al., 2017). Por ello, toda la saliva utilizada en los experimentos de esta tesis fue obtenida de un único donante humano voluntario donada voluntariamente por una única persona cuya saliva presentaba el mayor efecto agregante de entre todas las analizadas por Cuevas y colaboradores (Cuevas et al., 2017).

Para preparar stocks de saliva se estableció un protocolo en el que el donante debía proporcionar la saliva por la mañana, tras haberse lavado los dientes y haber permanecido un mínimo de 1 h sin ingerir alimentos o líquidos. A continuación, se filtraba la saliva por membranas de éster de celulosa con poros de 0,45 µm de diámetro, se alicuotaba y se congelaba a -70 °C.

La capacidad agregante de la saliva es óptima si se parte de una suspensión viral con un título de aproximadamente 1×10^9 partículas formadoras de calvas por mililitro (PFU/ml; véase cuantificación viral). El procedimiento seguido consistía en diluir esta suspensión viral a razón 1:10 en saliva e incubarla a 37 °C durante 1 h empleando, preferentemente, un termobloque con agua.

Agregación de viriones purificados

La purificación de VSV por gradiente de densidad de iodixanol (Optiprep; *Sigma-Aldrich*) permite obtener suspensiones muy concentradas (10^{11} - 10^{12} PFU/ml; véase el apartado de concentración de partículas virales) que agregan espontáneamente al ser incubadas a 37 °C en el medio de purificación. Sin embargo, este método promueve una fuerte degradación de los viriones que se cuantificó a fin de corregir el sesgo introducido por este hecho en nuestros experimentos. Para ello se diluyeron las suspensiones virales concentradas de VSV-GFP y VSV-mCherry en medio de purificación hasta alcanzar un título de 10^5 PFU/ml y se estimó la pérdida de título a distintos tiempos de incubación. Además, se determinó la ausencia de agregación analizando la fracción de infecciones mixtas (GFP y mCherry) por microscopía de fluorescencia. Esta degradación fue de 3,8 veces tras 30 minutos de incubación y de 22 veces tras 1 hora.

Además de cuantificar la degradación, comparamos el porcentaje de infecciones mixtas promovido por la agregación de VSV con este método y con saliva. Con estos datos decidimos emplear tiempos de incubación de 30 minutos, pues ofrecían un mejor balance entre la similitud con la inducción con saliva en cuanto a niveles de coinfección mixta y la exposición a la degradación.

Técnicas básicas de cultivo celular

Condiciones de cultivo celular

Todas las células se cultivaron utilizando medio DMEM (el medio de Eagle modificado por Dulbecco) en su versión con alto contenido en glucosa (4,5 g/l), piruvato sódico (110 mg/l), L-glutamina (584 mg/l) y tamponado con bicarbonato sódico (3,7 g/l) y CO₂ a pH 7,4. Previamente a su uso, el medio se esterilizaba por filtración mediante membranas con poros de 0,2 µm de diámetro y se completaba añadiéndole los aminoácidos no esenciales L-Prolina, L-Alanina, L-Asparagina, L-Aspartato y L-Glutamato a una concentración final de 0,4 mM y un 10 % v:v de suero bovino fetal (FBS) previamente inactivado a 56 °C durante 30 min. Además, para prevenir contaminaciones se añadían los antibióticos penicilina (10 unidades/ml) y estreptomycinina (10 µg/ml), y el antifúngico anfotericina B (25 ng/ml).

Las condiciones de cultivo fueron, en todos los casos, 37°C, 5 % CO₂ y 95 % de humedad relativa. Para ello, se utilizaron placas de cultivo de poliestireno pretratadas con polipéptidos, ya que todas las líneas celulares empleadas son adherentes. Los formatos utilizados fueron el disco de 100 mm (p100) y 60 mm (p60), placas multipocillo de 6 y 12 pocillos (w-6 y w-12) y, ocasionalmente, frascos de con base de 175 cm² (T-175).

Para asegurar el crecimiento correcto de las células y evitar su senescencia, los cultivos se renovaban periódicamente y se comprobaba la ausencia de contaminación con micoplasmas por PCR.

Subcultivo

La subcultivación es el método empleado para mantener las células en crecimiento continuo, generalmente llevado a cabo de placas p100. Para ello, primero se precalentaba medio DMEM completado, tampón fosfato salino (PBS) y tripsina-EDTA (0,25%) en un baño de agua a 37 °C. Después se eliminaba el medio de los cultivos confluentes (80-100%) y se lavaban las monocapas con 10 ml PBS para eliminar tanto los restos celulares como los inhibidores de la tripsina contenidos en el FBS residual. A continuación, se despegaban las células del fondo de la placa utilizando 2 ml de tripsina-EDTA e incubando durante 2 min a 37 °C o hasta observar el desprendimiento de la monocapa. La tripsina se neutralizaba al añadir 10 ml de medio DMEM completo, el cual permitía homogenizar las células en suspensión aspirando y soltando todo el volumen contra el fondo de la placa 3-6 veces. Finalmente, se transfería todo el volumen a un frasco con el medio necesario para repartir las células en nuevas placas a la dilución deseada, que depende de la línea celular y de los días que se pretenda esperar hasta el próximo subcultivo. Tras dicho reparto, las placas se agitaban en cruz para asegurar una distribución homogénea de las células y se introducían en el incubador.

Mantenimiento celular, congelación y descongelación

Las células se pueden alicuotar y criopreservar por largos periodos de tiempo en presencia de un agente crioprotector como el dimetilsulfóxido (DMSO). Para producir cada alícuota se tripsinizaba – como se ha descrito para el subcultivo – una monocapa de una placa p100 al 80 % de confluencia

y se resuspendían las células en, al menos, 6 ml de DMEM completo. A continuación, las células se sedimentaban por centrifugación a 300 x g durante 5 min para resuspenderlas en 1 ml de nuevo medio DMEM completo con un 5 % v:v de DMSO. Esta concentración es válida para todas las líneas celulares empleadas salvo para MEF. En este caso se recomienda incrementar el DMSO al 10 % v:v y el FBS del medio completo al 50 % v:v. Finalmente, las células se introducían en un criotubo y se congelaban a -70 °C. La congelación es mucho más benigna si ocurre lentamente. Para ello se pueden emplear contenedores especiales dentro de los cuales la temperatura desciende 1°C/min, imitando los antiguos baños de isopropanol actualmente en desuso. Una vez congeladas las células, si se desean almacenar por un tiempo indefinido, conviene transferir los viales a nitrógeno líquido o, en nuestro caso, a un arcón a -150 °C.

Para descongelar una alícuota se sumergía parcialmente en un baño de agua a 37 °C, agitando suavemente hasta justo antes de que todo el volumen se descongelase. En ese momento, se extraía la alícuota del baño, se limpiaba con alcohol 70 %, y se transfería el volumen a un tubo con 5-6 ml de DMEM completo precalentado a 37 °C. Para evitar el choque térmico, se añadían lentamente unas cuantas gotas del medio caliente al vial descongelado y, posteriormente, se transfería todo el volumen de éste al tubo con el medio. Como el DMSO es tóxico para las células conviene eliminarlo. Para ello se centrifugaba el tubo con las células en suspensión a 150-200 x g durante 5 min, tras lo cual se resuspendía el sedimento en 12 ml de DMEM completo limpio y se extendían las células en una placa p100.

Infecciones y ensayos virales

Infecciones en medio líquido

Las infecciones en medio líquido permiten inocular un cultivo con una cierta cantidad de partículas virales infecciosas y recoger muestras del sobrenadante de la infección. Para mejorar el rendimiento de la infección y la reproducibilidad del experimento, es importante infectar monocapas al 80-100 % de confluencia, pero nunca sobrecrecidas. Esto es especialmente importante para células que muestran inhibición por contacto, como por ejemplo MEF, MRC-5, Vero y A549.

Para infectar una monocapa de células, primero se retiraba el medio y luego se añadía un inóculo con el número de partículas infecciosas deseado. El volumen del inóculo debe ser pequeño pero suficiente para cubrir la monocapa. En nuestro caso utilizamos 100 μ l, 200 μ l, 400 μ l, 1,2 ml y 4 ml para los formatos w-12, w-6, p60, p100 y T175, respectivamente. A continuación, se incubaba el cultivo en condiciones estándar (37 °C, 5 % CO₂ y 95 % humedad) durante el tiempo adecuado para el virus empleado. Este tiempo es de 45 min para VSV y CVB3, 2 h para RSV y VacV y 4 h para hAdv5. También es importante mover los cultivos en cruz cada 30 minutos para evitar que se des sequen cuando el tiempo de incubación es superior a 1 h. Cuando el tiempo de incubación es menor, como ocurre para VSV y CVB3, este movimiento es omisible, aunque puede resultar oportuno realizarlo cada 15 minutos. Por otra parte, en el caso de hAdv5 se optó por incrementar 5 veces el volumen del inóculo y no mover. Tras el periodo de incubación se añadía el volumen apropiado de DMEM completo, pero con un 2 % de FBS, y se devolvía el cultivo al incubador. En las infecciones realizadas con VSV

sobre células MEF, el FBS se mantenía al 10% porque reducirlo perjudica notablemente el rendimiento del virus.

En los experimentos que requerían medir la progenie viral temprana de cultivos infectados a una elevada densidad viral, se retiraba el inóculo tras el periodo de incubación aspirándolo con ayuda de una bomba de vacío para evitar que contaminase la progenie viral medida. Además, las monocapas infectadas se lavaban dos veces con PBS – que se retiraba por el mismo procedimiento que el inóculo – antes de añadir el medio de cultivo.

Cuantificación viral

A lo largo de esta tesis empleamos tres formas distintas de cuantificación viral: el ensayo en placa, el ensayo de focos de infección y la determinación del número de partículas virales totales por métodos físicos.

El ensayo en placa

Los ensayos en placa permiten cuantificar el número de partículas infecciosas de una suspensión de virus. El método se basa en limitar la libre difusión del virus incorporando agar al medio de cultivo, de modo que las partículas infecciosas inoculadas que consiguen iniciar y extender la infección (PFUs) producen halos de lisis, o calvas, que pueden visualizarse sobre la monocapa del cultivo infectado. Este es el procedimiento rutinario que empleamos para la cuantificación de VSV, CVB3 y VacV. Aunque para los tres casos puede emplearse la línea celular HeLa H1, para VSV lo más habitual fue utilizar BHK-21.

Para realizar un ensayo en placa primero se preparan diluciones seriadas, generalmente 1:10, de las suspensiones virales a cuantificar. La infección procede igual que en medio líquido, pero tras la incubación del

inóculo, las monocapas se cubren con DMEM completo con FBS al 2 % y agar al porcentaje adecuado para el virus. VacV representa un caso excepcional donde es preferible no incorporar agar al medio de infección. En cambio, VSV y CVB3 requiere una concentración final del 0,4-0,6% de agar y del 0,8% de agar noble en el medio de cultivo, respectivamente. Los tiempos de incubación apropiados para cada virus son 20-24 hpi para VSV, 48 hpi para CVB3 y 72 hpi para VacV. Pasado este tiempo, cada partícula infecciosa habrá formado un halo de infección o calva en la monocapa. Para observarlo, las células se fijan con formaldehído 10 % durante 15 min, la cubierta de medio con agar se decanta y las células se tiñen con una solución de cristal violeta al 2 % en formaldehído 10 % durante 5 min.

El cristal violeta se retira, las monocapas se enjuagan con agua y, tras dejarlas secar, se cuentan las calvas con un contador de colonias. Para los ensayos en placa de w-6, es apropiado contar aquellas diluciones del virus con más de 20 calvas, pero no muchas más de 100. Si se trabaja con placas de w-12, el rango se reduce de 20-80, por lo que es preferible utilizar diluciones 1:5. El título de la suspensión viral original se obtiene mediante el siguiente cálculo:

$$\frac{PFU}{ml} = \frac{Calvas}{Factor\ de\ dilución \times inóculo\ (ml)}$$

El ensayo de focos

De forma análoga al ensayo en placa, el ensayo de focos de infección permite cuantificar aquellos virus que expresan reporteros fluorescentes, pero observando células infectadas o focos de infección incipientes en un tiempo mucho más corto, lo que facilita la cuantificación (en unidades formadoras de

focos, FFUs) de virus que no forman calvas o que tardan mucho tiempo en formarlas, como ocurre para RSV y hAdv5, respectivamente. En el caso de VSV, el recuento de focos de infección a las 10-12 hpi en preparaciones típicas para el ensayo en placa en BHK-21 ofrece títulos virales comparables y permite evaluar los niveles de coinfección alcanzados tras la agregación en suspensiones virales de VSV-GFP y VSV-mCherry.

La cuantificación de los focos de infección de hAdv5 y RSV se realizó sobre imágenes representativas de las monocapas infectadas de células HeLa H1 (generalmente en placas w-12) adquiridas mediante el equipo de microscopía de fluorescencia automatizada a tiempo real IncuCyte S3 (*Sartorius*; véase apartado de microscopía y citometría). En infecciones en medio líquido estándar, el número de células infectadas, o pequeños focos de infección, se estabiliza a las 48-72 hpi para hAdv5 y a las 36 hpi para RSV. En ese momento estimamos su número (generalmente entre 100 y 1000) en una fracción significativa y conocida de la monocapa con ayuda de la función *Find maxima* de la aplicación Fiji (ImageJ), que permite encontrar puntos máximos de fluorescencia en la imagen. Estos máximos coinciden con los focos o células infectadas tras una adecuada sustracción de ruido que puede realizarse con el software de IncuCyte S3.

Cuantificación de partículas virales

La cuantificación del número total de partículas en una suspensión viral puede realizarse mediante métodos físicos. En nuestro caso determinamos el número de viriones de VSV en suspensiones obtenidas por purificación por gradiente de densidad (véase apartado metodológico) mediante la técnica de análisis del seguimiento de nanopartículas (NTA) utilizando un equipo NanoSight NS300 (*Malvern*). Este equipo monitoriza la

dispersión de la luz causada por nanopartículas individuales que fluyen a través de una cámara de adquisición de video. A partir de la dispersión de la luz se caracteriza el movimiento Browniano de las partículas y se obtiene su diámetro hidrodinámico mediante la ecuación de Einstein-Stokes. Además, el equipo calcula la concentración de las partículas de interés en la muestra. En nuestro caso, fijamos partículas de VSV purificado por gradiente de densidad al diluirlas 1:1 en PB-PFA (8%), y las inyectamos en el equipo con ayuda de una jeringa para generar flujo en la cámara de adquisición. Los datos recogidos se analizaron sobre cinco capturas de video de 10 s cada una, utilizando el software del equipo con todos los parámetros ajustados por defecto.

La combinación de este método de cuantificación de partículas virales con el ensayo de focos en VSV en distintas líneas celulares (BHK-21, MEF, MRC5, A549, 4T1, CT26, Vero y Neuro2a) permitió calcular la infectividad de las partículas virales en cada tipo celular, expresada como la fracción focos formados/partículas virales.

Medio con citoquinas: purificación e inducción celular

La variante oncolítica VSV- Δ 51, al no bloquear la respuesta inmunitaria innata de la célula, permite obtener un medio enriquecido en interferones y otras citoquinas proinflamatorias que se puede utilizar para inducir la respuesta inmunitaria en otros cultivos.

El procedimiento empleado consistía en infectar monocapas confluentes de células MEF con 10 PFU/célula de VSV- Δ 51 y recolectar el sobrenadante de la infección a las 24 hpi. A continuación, el medio se purificaba de restos celulares y progenie viral aplicando una centrifugación a $5000 \times g$ durante 10 min y un filtrado por membranas de éster de celulosa con

tamaño de poro de 50 nm de diámetro. El medio resultante se alícuotaba y congelaba a -70 °C. Posteriormente se comprobaba la ausencia de virus mediante ensayo en placa sin diluir sobre células BHK-21.

Ensayo de reducción de rendimiento viral

El ensayo de reducción de título viral es una técnica introducida por Bellet y Cooper en 1959 que permite detectar la presencia de virus interferentes en una muestra – por ejemplo, partículas interferentes defectivas (DIPs) u otros mutantes – y cuantificarlos bajo ciertas asunciones (Bellet and Cooper, 1959; Thompson et al., 2009). En nuestro caso, utilizamos este ensayo para detectar virus interferentes en nuestras muestras de evolución experimental.

Para este ensayo se realizaron infecciones en medio líquido utilizando VSV-mCherry-MARM como virus reportero. Este virus se inoculaba en monocapas confluentes de BHK-1 a razón de 10 PFU/célula, ya fuese en solitario o junto a distintas diluciones seriadas de nuestras muestras problema. Tales muestras problema eran el stock inicial de VSV-GFP no mutagenizado, las muestras del tercer ciclo de evolución en régimen de agregación y un control positivo de DIPs que se obtuvo a partir de tres infecciones seriadas con VSV-GFP a alta densidad viral (10 PFU/ml). Los cultivos infectados se incubaron hasta las 16 hpi, tras lo cual se cuantificó la reducción en el rendimiento del virus reportero mediante ensayo en placa estándar con y sin presencia en el medio de anticuerpo monoclonal contra VSV no MARM. Este anticuerpo procede de una línea de hibridomas de ratón obtenida como se describe en el trabajo de Lefrancois y Lyles (1982).

Los títulos obtenidos del ensayo en placa en ausencia de anticuerpo muestran la progenie viral total, mientras que al incorporar anticuerpo sólo se

detecta la progenie del virus reportero. Como el virus reportero está presente en la mayoría de células debido a la alta densidad viral, los virus de las muestras problema necesariamente coinfectan células junto con él. En ausencia de mutantes interferentes, y dado que todos los virus tienen, a priori, la misma eficacia biológica, la frecuencia del virus reportero en la progenie viral total debe ser equivalente a su frecuencia en el inóculo. En cambio, si las muestras problema contienen virus interferentes, el rendimiento del reportero será menor del esperado bajo esta asunción.

Infecciones seriadas y evolución experimental

Las infecciones seriadas consisten perpetuar la infección en el tiempo transvasando sucesivamente parte de la progenie viral de un cultivo a otro. Este es el procedimiento típico que se emplea para inducir y estudiar el cambio de una población viral que replica continuamente bajo ciertas condiciones experimentales. En nuestro caso, utilizamos infecciones en medio líquido seriadas en la obtención de poblaciones de VSV enriquecidas en DIPs, en la producción de stocks de VSV mutagenizados, y en el ensayo de evolución experimental dirigido a observar el efecto de sostener en el tiempo la inoculación de cultivos con agregados virales.

Obtención de DIPs de VSV

Para obtener un stock de VSV enriquecido en DIPs se realizaron infecciones seriadas sobre monocapas de células BHK-21 inoculadas con VSV-GFP a una densidad viral de 10 PFU/célula. Este es un procedimiento típico para la obtención de DIPs de VSV que se ha utilizado previamente en otros estudios (Thompson et al., 2010; Timm et al., 2014). En cada ciclo, los sobrenadantes de infección se recolectaban a las 12-16 hpi. El sobrenadante del tercer ciclo de infección ya era óptimo para preparar un stock muy

enriquecido en DIPs, pues su título era 3-4 órdenes de magnitud inferior al alcanzado por la población original.

Mutagénesis química de poblaciones de VSV

Los stocks de VSV-GFP y VSV-mCherry que se utilizaron para evaluar la relevancia de la complementación genética para la transmisión colectiva de los virus se mutagenizaron químicamente utilizando 5-fluorouracilo (5-FU).

Esta molécula de uso extendido en quimioterapia contra el cáncer es un antimetabolito similar al uracilo que la célula metaboliza dando lugar a distintos metabolitos como la 5-fluorodesoxiuridina monofosfato (5-FdUMP) y 5-fluorouridina trifosfato (5-FUTP). La 5-FdUMP actúa como un inhibidor irreversible de la timidilato sintasa y, en consecuencia, bloquea la síntesis de ADN y la replicación celular. Sin embargo, el 5-FUTP actúa como análogo de nucleótido mutagénico que se incorpora en el ARN viral y celular e incrementa su tasa de mutación (Machon et al., 2021; Sanjuán et al., 2007).

Para mutagenizar VSV-GFP y VSV-mCherry se realizaron tres infecciones seriadas de cada virus por separado en células BHK pretratadas con 40 µg/ml del mutágeno en el medio durante 6 h. A continuación, se inocularon las monocapas confluentes con 0,1 PFU/célula y, tras la incubación, se reemplazó el medio de cultivo por medio de infección (2% FBS) con la misma concentración de 5-FU. Las células se incubaron durante 24 hpi antes de recolectar el sobrenadante y cuantificar la progenie viral mediante ensayo en placa. Para eliminar el 5-FU presente en las suspensiones virales del último (tercer) ciclo de infección, los virus se sedimentaron a $30\,000 \times g$ durante 1,5 h y se resuspendieron en DMEM sin aditivos.

Como los títulos obtenidos eran muy bajos (10^5 - 10^6 PFUs/ml) y la saliva humana agrega de forma óptima a títulos virales altos (idealmente 1×10^9 PFU/ml) fue necesario someter los virus a un paso de amplificación extra en BHK-21, que se realizó a densidad viral elevada (10 PFU/célula) para minimizar la pérdida de variantes deletéreas. El sobrenadante se recolectó a las 8 hpi y se concentró 10 veces por centrifugación a $30\,000 \times g$ durante 1,5 h para alcanzar el título deseado.

Evolución experimental de VSV en régimen de agregación

La evolución experimental se inició con una mezcla 1:1 de VSV-GFP y VSV-mCherry que permitía comprobar la agregación de los virus por microscopía de fluorescencia. La infección se llevó a cabo por triplicado, inoculando monocapas confluentes de BHK-21 en formato p100 a una densidad viral $\leq 0,01$ PFU/célula, y bajo dos condiciones: agregando los virus en saliva por el procedimiento estándar (líneas agregadas, A) y sin agregarlos (líneas control, C). Tras proceder como en cualquier infección en medio líquido, se recuperó el sobrenadante a las 20-22 hpi y se almacenó en alícuotas a -70 °C. Estas muestras se titularon mediante ensayo en placa para poder extender la infección a un nuevo cultivo manteniendo las mismas condiciones.

Concentración de partículas virales

Concentración de RSV por centrifugación

Los sobrenadantes de infección de RSV rara vez superan las 1×10^7 PFU/ml. Por ello, fue necesario concentrar el virus por centrifugación para poder realizar los ensayos a altas densidades virales. Para ello, se inocularon 8 monocapas de células HeLa H1 cultivadas en frascos T175 a una densidad viral aproximada de 1 PFU/célula. El sobrenadante se recuperó a las 60 hpi y

se centrifugó a $3000 \times g$ y $4^\circ C$ durante 5 min para eliminar los restos celulares grandes. Después, los virus en suspensión se sedimentaron a $50\,000 \times g$ y $4^\circ C$ durante 90 min utilizando la centrífuga Sorvall LYNX 6000 (*Thermo Fisher Scientific*) con rotor de ángulo fijo A27-8 \times 50 ml. El virus sedimentado fue resuspendido en 1 ml de DMEM sin completar suplementado con un 10% de DMSO para reducir la caída de título causada por la congelación de las alícuotas a $-70^\circ C$.

Purificación de VSV por centrifugación por gradiente de densidad

Los stocks concentrados de VSV-GFP y VSV-mCherry, que empleamos para estudiar el efecto de la agregación viral no inducida por saliva, habían sido purificados por gradiente de densidad por la Dra. María Durán siguiendo el siguiente protocolo.

Para cada stock, se inoculan con 0,1 PFU/célula ocho monocapas confluentes de BHK-21 cultivadas en frascos T175 y se recogen los sobrenadantes a las 14 horas post-inoculación (PFU), cuando el efecto citopático del virus se vuelve evidente. A continuación, se eliminan los restos celulares grandes por centrifugación a $780 \times g$ durante 5 min y posterior filtración de los sobrenadantes por membranas de $0,22 \mu m$ de diámetro. Seguidamente, los viriones se sedimentan a $30\,000 \times g$ y $4^\circ C$ durante 1,5 h en una centrífuga Sorvall LYNX 6000 (*Thermo Fisher Scientific*) con rotor de ángulo fijo A27-8 \times 50 ml, y se resuspendieron en 2 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) con NaCl 100 mM y EDTA- $Na_2 \cdot 2H_2O$ 0,5 mM. Todo este volumen se deposita cuidadosamente sobre un gradiente de iodixanol (Optiprep; *Sigma Aldrich*) preparado en un tubo Nalgene Oak Ridge de policarbonato (*Thermo Fisher Scientific*) y se centrifuga a $80\,000 \times g$ a $4^\circ C$ durante 4,5 h. Al final del proceso deben recuperarse aproximadamente 700

μl de la banda blanquecina observable a media altura en el tubo, que podrá alicuotarse y almacenarse a -70 °C.

Microscopía y citometría de flujo

Microscopía de fluorescencia automatizada a tiempo real

La adquisición de imágenes de microscopía de fluorescencia automatizada a tiempo real se realizó en el equipo IncuCyte S3 Live-Cell Analysis System (*Sartorius*) colocado en el interior de un incubador HeraCell 240i (*Thermo Fisher Scientific*) ajustado a las condiciones estándar de cultivo (37 °C, 5% CO₂ y 95% humedad relativa). La adquisición y tratamiento de imágenes se realizó con el software integrado en el equipo, empleando el objetivo 4X y los canales contraste de fases, verde (300 ms de exposición) y rojo (400 ms de exposición). Para estos ensayos se emplearon generalmente placas w-12 o w-6. En todos los casos se tomaron imágenes representativas de las monocapas cultivadas, en ocasiones de toda la superficie del pocillo, que se adquirirían automáticamente a los tiempos programados. Para el análisis cuantitativo del área fluorescente se emplearon máscaras de análisis ajustadas para cada canal de adquisición y tipo celular empleando múltiples imágenes a distintos tiempos y condiciones experimentales. En el proceso creación de las máscaras las imágenes se segmentan por umbral de fluorescencia tras aplicar una corrección de ruido por el método Top-Hat. Otros criterios de discriminación de las células como el área máxima o mínima de cada objeto detectado o su excentricidad podían emplearse cuando fuese conveniente para refinar el ajuste.

Curvas de propagación viral

El seguimiento de la infección mediante microscopía de fluorescencia a tiempo real y el tratamiento de las imágenes obtenidas mediante máscaras permite generar curvas de invasión viral que describen la propagación de VSV-GFP y/o VSV-mCherry por el cultivo infectado a través de la señal fluorescente adquirida. Para inferir los parámetros de invasión del cultivo utilizamos un modelo de crecimiento logístico con la forma $P_t = P_M / (1 + e^{c-rt})$, donde t es el tiempo de infección, P_t es el % de células infectadas, P_M es el máximo valor de P_t , r es la tasa de crecimiento exponencial y c es un parámetro que indica las condiciones iniciales. Así pues, se puede calcular el tiempo promedio que tarda el virus en infectar la mitad de la monocapa, o tiempo de invasión media, como $t_{1/2} = c/r$. Para ajustar el modelo a los datos se emplearon mínimos cuadrados no lineales utilizando la función *nls* implementada en R base.

Ensayos de competencia

Nuestros ensayos de competencia consistieron en inocular un mismo cultivo con 5000 PFUs totales de VSV-GFP y VSV-mCherry, agregando por separado una de las dos variantes virales. En los ensayos de competencia se siguió la propagación de las variantes por el cultivo cuantificando la fluorescencia producida por cada una de ellas, y se calculó la fracción de área verde (fracción GFP) respecto del área total fluorescente, es decir, $GFP/(GFP+mCherry)$. Para estimar la eficacia del virus agregado se eligió la fracción GFP en el momento de mayor fluorescencia total, es decir, cuando el crecimiento y propagación del virus era máximo (P_M). Así pues, la eficacia de los virus agregados relativa a los monodispersos se definió como $w = P_V/P_R$, donde P_V es la fracción GFP en las competencias entre VSV-GFP agregado

frente a VSV-mCherry monodisperso, y P_R es la fracción GFP en competencias entre VSV-mCherry agregado frente a VSV-GFP monodisperso.

Análisis cuantitativo de focos de infección

A partir de imágenes de microscopía de fluorescencia se realizó un análisis cuantitativo de la propagación temprana del virus en focos de infección generados al inocular monocapas confluentes de células BHK-21 o MEF (formato w-6) con aproximadamente 300 PFUs de mezclas 1:1 de VSV-GFP y VSV-mCherry en estado monodisperso o agregado. Para ello, las monocapas se fijaron a diferentes tiempos (entre 4-12 hpi) con PFA 4% a 4 °C durante toda la noche. A continuación, se tiñeron los núcleos celulares con DAPI (*Roche*). Para ello, se retiró el PFA y se lavaron las monocapas dos veces con PBS y una con agua destilada. Después, las monocapas se incubaron con solución de DAPI (1 µg/ml) durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se aplicaron los mismos lavados previos, pero en orden inverso. Finalmente, para poder realizar la adquisición de imágenes durante varios días, las monocapas se preservaron en PB con azida al 0,05%.

La adquisición de imágenes de un área representativa de cada monocapa se realizó en un equipo IN Cell Analyzer 2000 (*GE Healthcare*) de microscopía por monitoreo de alto contenido (HCS). Se utilizaron los filtros FITC con emisión en 490/20 nm y absorción en 525/36 nm para la fluorescencia GFP, Texas Red con emisión en 579/34 nm y absorción en 624/40 nm para la fluorescencia mCherry, y DAPI con emisión en 350/50 nm y absorción 455/50 nm para la fluorescencia DAPI. Las imágenes adquiridas para estos tres canales se visualizaron con Fiji (*ImageJ*), aunque el número de células por foco de infección se determinó manualmente porque la confluencia

celular dificultaba enormemente la discriminación automatizada de células individuales, especialmente en cultivos de BHK-21.

Citometría de flujo: preparación de muestras y análisis

La citometría de flujo permite detectar con precisión la fracción de células de primer ciclo coinfectadas con VSV-GFP y VSV-mCherry como resultado de la agregación con saliva. Para llevar a cabo el ensayo, se inocularon monocapas de células BHK-21, cultivadas en placas p60, con las mezclas 1:1 de VSV-GFP y VSV-mCherry agregadas y controles oportunos a una densidad viral aproximada de 0.1 PFU/célula. Para limitar el análisis al primer ciclo de infección, las infecciones se incubaron durante 6 hpi. Después, las células se resuspendieron en 1 ml de DMEM completo con 10% de FBS mediante el procedimiento de tripsinización habitual, y se lavaron con PBS mediante centrifugación a $700 \times g$ durante 5 min. Finalmente, las células se resuspendieron en 1 ml de PFA al 4% y se incubaron a 4 °C durante toda la noche. Cabe resaltar la importancia de realizar este último paso de añadir el PFA con una pipeta Pasteur desechable que servirá para remover inmediatamente el sedimento de células aspirando y expeliendo el volumen varias veces antes de terminar de homogenizarlo con un vórtex. No remover inmediatamente las células al añadir el PFA causará la formación de grumos y reducirá en gran medida la cantidad de muestra disponible para el análisis citométrico.

Al día siguiente, el fijador se elimina y las células se aclaran con PBS mediante dos centrifugaciones a $700 \times g$ durante 5 min. El sedimento celular se resuspende en 1 ml de PBS con ayuda de un vórtex. Para el análisis se empleó un citómetro LSRFortessa (*Becton Dickinson*) equipado con láseres con longitud de onda de 488 y 561 nm para la excitación del GFP y el

mCherry, respectivamente. Las células se separaron en cuatro cuadrantes ajustados para clasificarlas según estuviesen no infectadas, infectadas sólo con VSV-GFP, sólo con VSV-mCherry o coinfectadas con ambas variantes. La calibración de los cuadrantes se realizó manualmente añadiendo muestras control con células no infectadas, infectadas con cada virus por separado y coinfectadas con ambos. Finalmente, se adquirieron aproximadamente 100 000 eventos por muestra.

Microscopía electrónica de transmisión

La presencia de DIPs en las líneas evolucionadas en régimen de agregación se pudo confirmar visualmente empleando microscopía electrónica de transmisión.

Para obtener suspensiones virales suficientemente concentradas para observarlas al microscopio electrónico, las líneas evolucionadas se amplificaron a una densidad viral de 0,1 PFU/célula en células BHK-21 sembradas en pocillos w-6. Los sobrenadantes de los cultivos infectados se recolectaron a las 24 hpi y se sometieron a dos centrifugaciones seriadas a $3000 \times g$ durante 10 minutos para eliminar la mayor parte de los restos celulares que pudiesen entorpecer en las ultramicrografías. Seguidamente, el medio se centrifugó a $35\,000 \times g$ durante 2,25 h para sedimentar los virus. Los sedimentos se lavaron cuidadosamente con 1 ml de PBS y se resuspendieron en 120 μ l de DMEM (sin completar) que fueron, a su vez, centrifugados a $10\,000 \times g$ durante 3 minutos para eliminar más restos celulares de menor tamaño antes de ser alícuotados y almacenados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las muestras para el microscopio electrónico se prepararon diluyendo las alícuotas de las líneas evolucionadas en tampón fosfato (PB) en proporciones 1:5 y 1:10 para los regímenes agregado y monodisperso,

respectivamente. Para cada muestra se mezclaron 20 μ l 1:1 con solución de fijación, que consistía en PB con un 4 % de PFA y un 5 % de glutaraldehído, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, se repartieron 5 μ l para cada muestra sobre rejillas recubiertas de Formvar/carbono (*Ted Pella*) y se dejaron secar durante al menos 1 h. A continuación, las rejillas se lavaron tres veces con agua Milli-Q filtrada por membranas de celulosa de 0,2 μ m de diámetro, apoyando la cara con muestra de cada rejilla sobre una gota de agua depositada, a su vez, sobre la superficie hidrofóbica del parafilm (*Merck*). Finalmente, las muestras se tiñeron con una solución de ácido fosfotúngstico al 2% durante menos de 1 min y, sin aclarado previo, se secaron con papel de filtro y se observaron en el microscopio electrónico.

RT-qPCRs

Optimización de las reacciones de RT-qPCR

La validez de cualquier ensayo de RT-qPCR (o qPCR) depende críticamente de una correcta optimización de la reacción de amplificación. La cuantificación por qPCR asume que cada ciclo de copiado duplica el número de moléculas presentes en la mezcla, pero esto sólo ocurre en condiciones óptimas. La cantidad y calidad de la muestra, la concentración y diseño de los cebadores, o el perfil térmico empleado pueden afectar notoriamente a los resultados.

En nuestro caso, al trabajar con muestras de ARN resultó importante evaluar si la concentración de las mismas se encontraba en el rango lineal de sensibilidad de la transcriptasa reversa (RT) empleada. Para ello, a partir de la muestra más concentrada del ARN extraído, se prepararon un conjunto de diluciones seriadas que cubriese todo el rango posible de concentraciones de

nuestras muestras. A continuación, se realizaron las mismas diluciones seriadas con el ADN complementario (ADNc) obtenido de la muestra menos diluida. De esta manera, los dos conjuntos de diluciones pre- y post-RT se amplificaron por qPCR para construir dos rectas patrón, las cuales mostraron una pendiente muy similar en los ensayos realizados, indicando que la RT no introduce un sesgo por cuestiones de sensibilidad (en cuyo caso debería optimizarse la reacción de RT o cambiar de enzima a otra más sensible).

La optimización de la reacción de qPCR se llevó a cabo de manera similar, analizando la pendiente de la recta patrón obtenida al amplificar un conjunto de diluciones seriadas con ADN (por ejemplo, las realizadas con el ADNc). Estas rectas patrón se expresan, generalmente, como la disminución en el número de ciclo umbral (C_T) de la qPCR al incrementar la concentración inicial de muestra en un orden de magnitud. Por tanto, la pendiente (m) debe ser $-\log(10)/\log(2) = -3,322$ si la amplificación es perfecta, y la eficiencia de la reacción se puede calcular mediante la pendiente obtenida aplicando la fórmula $E = 10^{-\frac{1}{m}} - 1$. Todos los valores de eficiencia de amplificación obtenidos con nuestros cebadores se encuentran dentro del rango del 90% y el 110% típicamente aceptado como válido. En caso de no cumplir este requisito es común evaluar distintas concentraciones de cada cebador individual, o cambiar las condiciones de hibridación y amplificación (temperatura y/o tiempo). En nuestro caso optamos por el segundo procedimiento cuando fue necesario, manteniendo una concentración estándar de 500 nM para cada cebador.

Detección de respuesta antiviral contra VSV

Para evaluar el efecto de los agregados de VSV en la respuesta inmunitaria innata de las células se utilizaron RT-qPCRs. Para ello, primero se inocularon cultivos de MEF con una misma cantidad de viriones de VSV-GFP en estado monodisperso o agregado que equivalía a una densidad de 0,1 PFUs/célula antes de la agregación con saliva. Tras 6 hpi, el sobrenadante se descartó y el ARN del cultivo se purificó por el método clásico del tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo utilizando TRI Reagent Solution (*Invitrogen*) según las instrucciones del fabricante.

Para realizar la RT-qPCR, primero se ajustó la concentración de ARN total en cada muestra a 150 ng/ μ l. A continuación, se añadieron a las reacciones de transcripción reversa (RT) 3 μ l de ARN total junto a un cebador específico, indicado en la tabla, para el ARNm del gen *Mx2* (gen problema) o del gen de la β -actina (*ACTB*; control interno de qPCR) del ratón, y se incubaron a 55 °C utilizando la transcriptasa reversa SuperScript IV (*Invitrogen*) según las indicaciones del fabricante.

Cebadores RT^a	Secuencia (5'→3')
Mx2_Rev	tggagtcggattgacatctctg
ACTB_Rev	cagaggcatacagggacagc

^aLa nomenclatura indica el gen para el que fue utilizado el cebador (*Mx2* o *ACTB*), y la dirección del cebador (Directo o Reverso).

Para las posteriores reacciones de qPCR se utilizó la mezcla 2X Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (*Agilent*), añadiendo 2 μ l de ADN complementario (ADNc) resultante de cada reacción de RT y los cebadores apropiados que se incluyen en la siguiente tabla. Además, para

asegurar la ausencia de contaminaciones cruzadas se incluyeron controles sin muestra y controles sin reacción de RT.

Cebadores qPCR^a	Secuencia (5'→3')
Mx2_Dir	acacggtcactgaaattgtacg
Mx2_Rev	tggagtcggattgacatctctg
ACTB_Dir	ctggcaccacaccttctaca
ACTB_Rev	tcacttttcacggttggctt

^aLa nomenclatura indica el gen para el que fue utilizado el cebador (Mx2 o ACTB), y la dirección del cebador (Directo o Reverso).

Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado en el aparato AriaMx (*Agilent*) bajo el perfil térmico que aparece más abajo. Además, se determinaron las curvas de disociación de los amplicones para comprobar que no ocurrían amplificaciones inespecíficas o dimerización de cebadores.

Fase	T^a (°C)	Tiempo (mm:ss)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3:00	-
Desnaturalización	95	0:15	40
Hibridación – Extensión	60	0:20	

Detección de DIPs de VSV

Las DIPs de VSV presentan grandes deleciones del extremo 3' del genoma del virus que tienden a eliminar todos los genes del virus salvo parte del gen L. Por tanto, amplificando regiones cercanas a los dos extremos del genoma viral (5' y 3') y comparando su abundancia se puede estimar la fracción de genomas defectivos. En nuestro caso, utilizamos pares de cebadores que hibridan en la primera mitad del gen P (cerca del extremo 5') y

al final del gen L (cerca del extremo 3'). Utilizando el primer par, detectamos genomas completos y probablemente funcionales, mientras que utilizando el segundo par cuantificábamos el total de genomas virales. Así, la abundancia de genomas defectivos se pudo calcular como la diferencia de abundancia de genomas totales y genomas completos.

Cebadores RT-qPCR^a	Secuencia (5'→3')	Posición de hibridación (bp)
VSV_P_Dir	cgccagagggtttaagtggag	1772 – 1792
VSV_P_Rev	ttctgattgggacggatgtgtg	1971 – 1950
VSV_L_Dir	aacgattccccacaagatccc	9882 – 9902
VSV_L_Rev	gcaagagggtggtggaatagag	10081 – 10059

^aLa nomenclatura indica la región génica de VSV sobre la que hibrida el cebador (VSV_P o VSV_L), y la dirección del cebador (Directo o Reverso). Los cebadores directos se emplearon para la reacción de transcripción reversa sobre el genoma de VSV (polaridad negativa).

Para aplicar esta técnica, el ARN viral se extrajo de sobrenadantes de cultivos infectados (alícuotas virales) utilizando el Quick-RNA viral kit (*Zymo Research*) según las instrucciones del fabricante. Las reacciones de transcripción reversa (RT) se prepararon con enzima AccuScript Hi-Fi RT (*Agilent*), añadiendo 2 µl de muestra a una concentración de 10-20 ng/µl y el cebador directo específico del gen P o del gen L de VSV. Las reacciones se incubaron a 42 °C siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las reacciones de qPCR se prepararon por triplicado empleando la mezcla PowerUp SYBR Green master mix (*Thermo Fisher Scientific*) y añadiendo a cada una 2 µl del ADN complementario obtenido de la RT junto con el par de cebadores correspondientes para el gen P o el gen L de VSV. Además, se incluyeron controles sin muestra para cada par de cebadores. Para

la amplificación tuvo lugar en el aparato QuantStudio 3 (*Thermo Fisher Scientific*), en el que se configuró un perfil térmico en tres pasos (por resultar más eficiente), que se incluye en la siguiente tabla, y se determinaron las curvas de disociación de los amplicones para comprobar que no ocurrieran amplificaciones inespecíficas o dimerización de cebadores.

Fase	T^a (°C)	Tiempo (mm:ss)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	10:00	-
Desnaturalización	95	0:05	
Hibridación	55	0:10	40
Extensión	60	0:20	

Secuenciación masiva illumina

Preparación de la muestra

El ARN viral se aisló utilizando el *Quick-RNA viral kit* (*Zymo Research*) según las instrucciones del fabricante. Después, el ARN genómico de VSV se retrotranscribió y se amplificó por PCR dando lugar a tres amplicones solapantes de aproximadamente 4 kb cada uno que cubrían la totalidad del genoma del virus salvo los extremos 5' y 3' que fueron utilizados como zona de hibridación de los cebadores para la transcripción reversa (RT). En la tabla que se muestra a continuación se incluyen los cebadores empleados para la RT y posterior amplificación por PCR de los tres amplicones.

Cebador^a	Secuencia (5'→3')	Posición de hibridación (bp)
----------------------------	--------------------------	-------------------------------------

Amp1_Dir_RT	acgaagacaacaacca	1 – 18
Amp2_Dir_RT	ggaaagcattgaacaacg	3404 – 3422
Amp3_Dir_RT	gcttgacagttctacttc	8093 – 8112
Amp1_Dir_PCR	ccattattatcattaaaaaggctc	16 – 38
Amp1_Rev_PCR	agctaagatgaagatcggag	4323 – 4304
Amp2_Dir_PCR	ctaccacagaaaggaactg	4174 – 4193
Amp2_Rev_PCR	gtcttaacaagttcgtgg	8393 – 8374
Amp3_Dir_PCR	cagatcccgtaacagaaagt	8195 – 8214
Amp3_Rev_PCR	acgaagaccacaaaaccag	11922 – 11904

^aLa nomenclatura indica el amplicón para el que fue utilizado el cebador (Amp1, 2 y 3), la dirección del cebador (Directo o Reverso), y la reacción en la que fue empleado (Transcripción reversa o PCR).

Las reacciones de RT se realizaron a 42 °C utilizando la enzima de alta fidelidad AccuScript Hi-Fi (Agilent), siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación por PCR de los ADN complementarios obtenidos se llevó a cabo empleando la polimerasa de alta fidelidad Phusion (*Thermo Fisher Scientific*). Las reacciones se prepararon en un volumen total de 50 µl y añadiendo un 3 % de DMSO como adyuvante. La configuración del perfil térmico para la amplificación se incluye a continuación.

Fase	T ^a (°C)	Tiempo (mm:ss)	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	1:00	-
Desnaturalización	98	0:10	
Hibridación	variable ^a	0:20	35
Extensión	72	2:00	
Extensión final	72	5:00	-

^aLa hibridación óptima es de 56 °C para el amplicón 1, y de 58 °C para los amplicones 2 y 3.

Los productos de PCR se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y, posteriormente, se purificaron con el kit *DNA Clean and Concentrator* (Zymo Research) y se cuantificaron por espectrometría utilizando un NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific). Finalmente, se preparó una muestra equimolar de los tres amplicones para cada línea experimental y se secuenciaron por Illumina en una máquina MiSeq utilizando librerías de tipo *paired-end* y un tamaño de lectura de 250 bases.

Análisis de datos de secuenciación masiva

Los datos de secuenciación masiva Illumina consisten en archivos con extensión FastQ que contienen las lecturas de secuenciación en bruto. Previamente al análisis, se comprobó la calidad general de las lecturas mediante la herramienta FastQC 0.11.7 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). A continuación, para cada lectura se eliminaron los primeros 10 y los últimos dos nucleótidos con Cutadapt (<https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/>). Además, se utilizó FASTQ quality filter (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) para desechar las lecturas con calidad $\leq Q30$, y PrinseqLite 0.20.4 (Schmieder and Edwards, 2011) para filtrar las lecturas por longitud mínima de 200 nucleótidos y por ausencia de artefactos de la secuenciación (lecturas duplicadas o con bases indefinidas). A continuación, se utilizó el *pipeline* ViVan 0.43 (Isakov et al., 2015), que está especialmente diseñada para identificar y comparar la variabilidad en las secuencias de poblaciones de virus. Con ella, se mapearon las lecturas contra la secuencia de referencia del virus fundador y se extrajeron las variantes genéticas.

Se empleó la aplicación QuasiRecomb 1.2 (Töpfer et al., 2013) para la reconstrucción de los principales haplotipos formados por múltiples cambios ligados, es decir, que por estar situados en un mismo genoma se transmiten conjuntamente a la descendencia. Para ello, se ajustaron los parámetros para incorporar los valores de calidad Phred al análisis y se asumió ausencia de recombinación, ya que ésta rara vez ocurre en VSV y considerarla incrementa en gran medida el coste computacional. Además, para acelerar el proceso de reconstrucción se realizó un muestreo aleatorio sin reemplazamiento de las lecturas de los archivos BAM para reducir la cobertura a una octava parte empleando SAMtools 1.9 (<http://samtools.sourceforge.net/>). Además, los análisis se fraccionaron en cuatro regiones solapantes de 3,5 kb que cubrían el genoma del virus.

Modelización matemática

Modelo determinista de replicación viral

El siguiente sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias (EDOs) representa la replicación de viral:

$$\begin{aligned}\dot{G} &= 2\alpha C - \gamma GRE - \delta_g G \\ \dot{R} &= \alpha C + \kappa GE - \gamma GRE - \delta_r R \\ \dot{C} &= \gamma GRE - \alpha C - \delta_c C \\ \dot{E} &= -E(\gamma GR + \kappa G)\end{aligned}$$

Primero asumimos que los genomas virales libres dentro de la célula (G) producen recursos codificados por el virus (R) utilizando recursos de la célula (E) en una reacción agrupada con coeficiente κ . Luego, estos productos virales recién sintetizados interactúan con los genomas virales a una tasa con coeficiente γ para asociarse formando complejos replicativos (C) que

consumen recursos de la célula para producir copias del genoma viral. Durante el copiado, los componentes virales permanecen secuestrados en C (G actúa como molde y R como polimerasa u otros factores de replicación codificados por el virus) hasta su disociación que ocurre a una tasa lineal con coeficiente α y duplica la cantidad de G involucrada en el proceso. Para comprometer el éxito de la replicación viral sometimos todos los componentes virales a decaimiento exponencial empleando tasas lineales con coeficientes δ_g , δ_r y δ_c para G , R y C , respectivamente. Para simplificar el modelo, asumimos que no había producción de E durante la infección y que todas las reacciones consumían la misma cantidad de E (producir una unidad G o R consume una unidad E). El modelo se implementó y analizó en R utilizando el paquete deSolve (*CRAN R-Project*) para la integración numérica empleando el algoritmo LSODA. Las condiciones iniciales evaluadas en todos los casos fueron $N_0 = G_0 + C_0 = G_0$, $R_0 = 0$, $C_0 = 0$ y $E_0 = 2000$.

Modelo determinista de replicación no viral

Si eliminamos el término κGE de la ecuación diferencial de producción de R en el modelo de replicación viral, se obtiene el siguiente modelo:

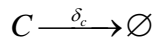
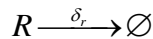
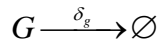
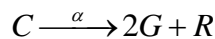
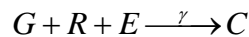
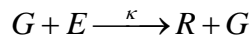
$$\begin{aligned}\dot{G} &= 2\alpha C - \gamma GRE - \delta_g G \\ \dot{R} &= \alpha C - \gamma GRE - \delta_r R \\ \dot{C} &= \gamma GRE - \alpha C - \delta_c C \\ \dot{E} &= -\gamma GRE\end{aligned}$$

En este modelo elimina la retroalimentación positiva no lineal entre genomas y recursos virales del modelo de replicación viral. R ya no son productos codificados en los genomas virales sino recursos celulares que, a

diferencia de E , son reutilizables. Ahora, los complejos replicativos se forman por la interacción de los genomas con una cantidad constante de R que depende de la célula. Para compararlo con el modelo de replicación viral se estableció $G_0 = 1$ y $C_0 = 0$ para ambos y se ajustaron los valores de R_0 y E_0 en el modelo no viral para minimizar tanto la diferencia temporal en alcanzar el máximo crecimiento de los genomas virales como la diferencia en la abundancia final de genomas virales, eliminando las tasas de degradación para facilitar el ajuste y manteniendo el resto de parámetros y condiciones iniciales sin cambios.

Simulaciones estocásticas de replicación viral

Para obtener una versión estocástica del modelo de replicación viral, convertimos el sistema de ecuaciones diferenciales en un proceso de Markov en tiempo continuo que se simuló utilizando el algoritmo exacto de simulación estocástica de Gillespie (Gillespie, 1977, 2007) implementado en el paquete *adaptivetau* (*CRAN R-Project*) de R. El siguiente conjunto de reacciones químicas representa esta conversión:



Para las simulaciones se empleó el mismo conjunto de condiciones iniciales que en el modelo determinista y la propensión de las reacciones se calculó asumiendo la ley de acción de masas y utilizando coeficientes

estocásticos (parámetros) con los mismos valores que los coeficientes cinéticos del modelo determinista.

Modelo multiescala: planteamiento general

Para contruir nuestro modelo multiescala primero se incorporó una reacción de producción de viriones al modelo de replicación viral. En esta reacción se asume que las partículas de progenie viral (V) se producen y se liberan de la célula cuando los genomas y recursos virales interaccionan a una tasa con coeficiente ρ . Esta asunción mantiene el modelo sencillo y refleja la regla general de que los virus incorporan muchos de sus productos en los viriones. Nótese que G y R se eliminan de la célula cuando se incorporan a la progenie viral. Así pues, tras modificar el modelo de replicación viral se tiene:

$$\begin{aligned}\dot{G} &= 2\alpha C - \gamma GRE - \rho GR - \delta_g G \\ \dot{R} &= \alpha C + \kappa GE - \gamma GRE - \rho GR - \delta_r R \\ \dot{C} &= \gamma GRE - \alpha C - \delta_c C \\ \dot{E} &= -E(\gamma GR + \kappa G) \\ \dot{V} &= \rho GR\end{aligned}$$

Dado que no todas las células se infectan en el mismo momento y que la cantidad de progenie viral liberada por una célula infectada varía con el tiempo, el modelo se estructuró en K clases de edad para las células infectadas según el tiempo transcurrido desde su infección. En consecuencia, consideramos simultáneamente dos escalas temporales: la edad de la infección celular (a) y el tiempo absoluto (t). Los viriones libres, con infectividad β , interaccionan con las células susceptibles para producir células recién infectadas, $I_{t,a}=I_{t,0}$, que luego envejecen con el tiempo. Este proceso se describe con el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\begin{aligned}
I_{t+1,0} &= \beta S_t V_t \\
I_{t+1,1} &= I_{t,0} \\
&\dots \\
I_{t+1,K-1} &= I_{t,K-2} \\
I_{t+1,K} &= I_{t,K} + I_{t,K-1}
\end{aligned}$$

La tasa de producción de viriones libres en cada clase de edad celular, \dot{V}_a , se obtiene del modelo intracelular previo. Con estas tasas se conectó la dinámica intracelular del virus a un modelo sencillo de dinámica viral intercelular limitada por las células susceptibles y se obtuvo el siguiente modelo multiescala:

$$\begin{aligned}
S_{t+1} &= S_t + \lambda - \beta S_t V_t - \delta_s S_t \\
I_{t+1} &= I_t + \beta S_t V_t - \delta_i \sum_{a=1}^K I_{t,a} \\
V_{t+1} &= V_t + \sum_{a=1}^K \dot{V}_a I_{t,a} - \beta S_t V_t - \delta_v V_t
\end{aligned}$$

Las células susceptibles se introducen en la población celular a tasa λ y mueren con tasa de mortalidad δ_s . Para simplificar, la tasa de mortalidad de las células infectadas δ_i también se mantuvo constante. Finalmente, los viriones libres se degradan con tasa de decaimiento exponencial δ_v .

Modelo multiescala: Competencias con entrada determinista

Para competir dos subpoblaciones virales se partió del modelo multiescala presentado anteriormente. La primera subpoblación (con subíndice c) procede de una única coinfección inicial con N_0 genomas virales. Esta célula produce viriones libres V_c a una tasa V_{c_a} , donde a es la edad de la célula infectada. La segunda subpoblación (con subíndice m) se origina a

partir de N_0 células monoinfectadas, que producen progenie viral V_m a tasa V_{m_a} . Las tasas de producción de viriones V_{c_a} y V_{m_a} se obtuvieron resolviendo el modelo intracelular de EDOs mediante el paquete deSolve de R (*CRAN R-Project*) con condiciones iniciales $N_0 = G_0 + C_0 = G_0$ para los virus c y $N_0 = 1$ para los virus m . El resto de condiciones iniciales y de parámetros usados fueron $R_0 = 0$, $C_0 = 0$, $E_0 = 2000$, $K = 2000$, $V_0 = 0$, $\alpha = 5 \cdot 10^{-1} \text{ t}^{-1}$, $\kappa = 5 \cdot 10^{-4} \text{ unidades}^{-1} \cdot \text{t}^{-1}$, $\gamma = 10^{-6} \text{ unidades}^{-2} \cdot \text{t}^{-1}$, $\rho = 3 \cdot 10^{-4} \text{ viriones} \cdot \text{unidades}^{-2} \cdot \text{t}^{-1}$ y $\delta_g = \delta_c = \delta_r = 10^{-2} \text{ t}^{-1}$. La distinción entre la dinámica intracelular de los virus c y m , es decir, el diferente número de genomas iniciales por célula, sólo se aplicó al primer ciclo de infección. En los siguientes ciclos, ambas poblaciones virales se trataron igual, asumiendo que todas las células se infectan con un único genoma viral de uno u otro virus y producen nuevos viriones a una tasa común V_{m_a} . El siguiente sistema de ecuaciones representa la competencia descrita:

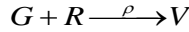
$$\begin{aligned}
 S_{t+1} &= S_t + \lambda - \beta S_t (V_{c_t} + V_{m_t}) - \delta_s S_t \\
 I_{c_{t+1}} &= I_{c_t} + \beta S_t V_{c_t} - \delta_i \sum_{a=1}^K I_{c_{t,a}} \\
 I_{m_{t+1}} &= I_{m_t} + \beta S_t V_{m_t} - \delta_i \sum_{a=1}^K I_{m_{t,a}} \\
 V_{c_{t+1}} &= V_{c_t} + \sum_{a=1}^K v_{m_a} I_{c_{t,a}} + v_{c_{a=t}} (1 - \delta_i)^t - \beta S_t V_{c_t} - \delta_v V_{c_t} \\
 V_{m_{t+1}} &= V_{m_t} + \sum_{a=1}^K v_{m_a} I_{m_{t,a}} - \beta S_t V_{m_t} - \delta_v V_{m_t}
 \end{aligned}$$

Las condiciones iniciales utilizadas fueron $S_0 = 10^4$, $V_{c_0} = 0$, $V_{m_0} = 0$, $I_{m_0} = I_{m_{0,0}} = N_0$, y $I_{c_0} = I_{c_{0,0}} = 0$. Nótese que $I_{c_0} = 0$ porque la dinámica de

producción de progenie viral de la célula coinfectada fundadora de la subpoblación c se describe por separado con el término $v_{c_{a=t}}(1 - \delta_i)^t$, ya que en el primer ciclo de infección $a=t$. Los parámetros empleados fueron $\lambda = 25$ células \cdot t⁻¹, $\beta = 3 \cdot 10^{-6}$ t⁻¹ \cdot viriones⁻¹, $\delta_s = 2 \cdot 10^{-3}$ t⁻¹, $\delta_i = 7 \cdot 10^{-3}$ t⁻¹, y $\delta_v = 4 \cdot 10^{-2}$ t⁻¹. La resolución del sistema se programó en R, considerando $K = 2000$ clases de edad no nula en el intervalo $[0 + \Delta t, 1000]$. Para evaluar los efectos de la coinfección inicial se calculó la razón I_c/I_m en el equilibrio (tras 10 000 unidades de tiempo). Esta ratio es equivalente a V_c/V_m pero tiende a converger más rápido.

Modelo multiescala: Competencias con entrada estocástica

Para tener en cuenta el componente estocástico de la infección se compitieron las subpoblaciones virales c y m simulando la progenie viral producida por cada célula infectada inicial con el modelo estocástico de replicación viral previamente descrito. Para ello fue necesario incorporarle la reacción de producción de viriones:



Las tasas de producción de viriones $v_{c_{a=t}}$ y $v_{m_{a=t},n}$ con $n \in \{1, \dots, N_0\}$ se calcularon aplicando diferencias finitas centradas a la progenie viral acumulada que fue simulada para $K + 2$ clases de edad. Luego, el valor de la clase de edad nula se añadió como $v_{c_{a=0}} = v_{m_{a=0},n} = 0$. La muerte de las células infectadas iniciales también se simuló considerando que una célula infectada sólo puede ser productiva antes de alcanzar cierta clase de edad $a_{\delta_i} \sim \text{Exp}(\lambda = \delta_i)$ de modo que $v_{a \geq a_{\delta_i}} = 0$. Tras aplicar esta consideración, la tasa estocástica de producción de viriones de cada subpoblación, $v_{c_{a=t}}$ y

$\hat{v}_{m_{a=t}} = \sum_{n=1}^{N_0} v_{m_{a=t},n}$, se introdujo en el modelo como términos separados e

independientes de $I_{c_{t,a}}$ y $I_{m_{t,a}}$. Al igual que en las competencias deterministas, los siguientes ciclos de infección se simularon considerando una tasa única para ambas subpoblaciones $\hat{v}_{M_{a=t}}$, que en esta ocasión se calculó a partir de 10 000 simulaciones estocásticas iniciadas con $N_0 = 1$ genomas virales y sin incorporar la muerte aleatoria de las células. La consideración de un primer ciclo estocástico afecta a las dos últimas ecuaciones del modelo determinista previo que resultan como sigue:

$$V_{c_{t+1}} = V_{c_t} + \sum_{a=1}^K \hat{v}_{M_a} I_{c_{t,a}} + v_{c_{a=t}} - \beta S_t V_{c_t} - \delta_v V_{c_t}$$

$$V_{m_{t+1}} = V_{m_t} + \sum_{a=1}^K \hat{v}_{M_a} I_{m_{t,a}} + \hat{v}_{m_{a=t}} - \beta S_t V_{m_t} - \delta_v V_{m_t}$$

Todos los parámetros y condiciones iniciales que se emplearon para simular este modelo se mantuvieron idénticos a su versión determinista con la excepción de que $I_{m_0} = 0$, porque las células mono infectadas iniciales se describen con el término $\hat{v}_{m_{a=t}}$.

Implementación de modelos de la literatura para HIV-1, HCV e IVA

Para determinar si la replicación viral resultaba ser cooperativa en modelos más complejos y cuantitativos, se analizaron dos modelos deterministas, basados en EDOs, de los virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1) y de la hepatitis C (HCV), y un modelo estocástico del influenza virus A (IVA). Los dos primeros se implementaron en R mediante el paquete deSolve (*CRAN R-Project*), mientras que el último se simuló utilizando los

scripts de MATLAB originales que amablemente nos proporcionó el Dr. Frank S. Heldt (Sensyne Health, UK). Toda la información sobre las ecuaciones y los parámetros de estos modelos se puede consultar en las publicaciones originales. No obstante, los detalles más importantes de cada modelo se resumen a continuación:

Modelo de HIV-1

Este modelo describe el ciclo completo de infección de HIV-1, desde la unión del virión al receptor celular hasta la liberación y maduración de la progenie viral (Shcherbatova et al., 2020). Para su calibración, los autores emplearon datos de la literatura. Cabe destacar que el modelo incluye una regulación no lineal de la transcripción viral mediada por las proteínas virales Tat y Rev. Dado que Tat es un transactivador que incrementa la transcripción del ADN proviral del virus, esta proteína debe generar un bucle de retroalimentación positiva similar al que se da en nuestro modelo sencillo entre la producción de G y R . Por otro lado, la proteína Rev es necesaria para transportar ARN sometido a *splicing* incompleto y ARN genómico viral desde el núcleo al citoplasma. En consecuencia, esto aumenta la traducción de proteínas estructurales del virus e incrementa el número de genomas virales libres en el citoplasma, lo cual es esperable que tenga un efecto cooperativo en la producción de nuevas partículas virales. Para analizar el efecto de la multiplicidad de infección celular en la dinámica viral, modificamos las condiciones iniciales de la variable V_{free} , que representa los viriones extracelulares que inicial la infección. El número total de genomas de la progenie (N_t) se obtuvo de la suma del ARN genómico viral en el núcleo ($mRNA_g$), en el citoplasma ($mRNAC_g$) y en la membrana plasmática (RNA_{mem}), los complejos pre-virion ($V_{pre-virion}$), los viriones liberados (V_{bud}) y los viriones

extracelulares maduros (V_{mat}). Para obtener el número de partículas virales de la progenie (V_t), sólo se consideró V_{mat} .

Modelo de HCV

Este modelo describe el ciclo infeccioso de HCV, partiendo de genomas virales en el citoplasma, hasta la liberación de nuevas partículas virales (Aunins et al., 2018). Por tanto, asumimos que $V_0 = N_0$. A diferencia de otros modelos previos, este no describe la dinámica del replicón de HCV sino de la replicación del virus completo en células Huh-7 (hepatocarcinoma). Para ello, los autores ajustaron el modelo utilizando datos de la literatura, pero también de experimentos que realizaron mediante el aislado JFH1 de HCV que replica en cultivo. Para analizar dinámica viral a diferentes multiplicidades de infección celular, cambiamos las condiciones iniciales que los autores emplearon para los genomas positivos en el citoplasma ($R_p^{cyt} = 1$ molécula) y para las proteínas core del virus ($S = 180$ moléculas), multiplicando estos valores por el N_0 estudiado. Para calcular la producción de nuevos genomas virales (N_t) se sumaron los genomas de ARN positivo libres en el citoplasma (R_p^{cyt}), en complejos de traducción (TC), en complejos de ARN/NS5B ($Rp5B$), en complejos replicativos (R_{ip}), como ARN de doble cadena libre ($dsRNA$), en complejos de ARN de doble cadena (R_{ids}), como genomas de ARN positivo libres en estructuras membranosas vesiculares (R_p^{VMS}) o como parte de los viriones liberados ($V_{created}$). Para cuantificar la progenie viral (V_t) utilizamos $V_{created}$.

Modelo de IVA

Este modelo estocástico describe el ciclo completo de infección de IVA desde la unión del virus al receptor celular hasta la liberación de nuevos viriones (Heldt et al., 2015). Al ser IVA un virus segmentado, la producción de progenie infecciosa está condicionada a la disponibilidad de un conjunto completo de los ocho segmentos genómicos y de las proteínas necesarias para la formación del virión. En consecuencia, la pérdida de cualquier segmento conduce a una infección improductiva. Para analizar el modelo empleando distintos números de partículas virales por célula modificamos número inicial de viriones extracelulares (V_{ex}). Para calcular el número de genomas virales replicados (N_t) sumamos, para cada segmento i por separado, los segmentos genómicos de ARN negativo libres en el núcleo (R_i^V), formando un complejo con ARN polimerasas virales dependientes de ARN ($R_{RdRp,i}^V$), como ribonucleoproteínas virales en el núcleo ($V_{p,i}^{nuc}$), como complejos nucleares M1-vRNP ($V_{pM1,i}^{nuc}$), como complejos citoplasmáticos NEP-M1-vRNP ($R_{pM1,i}^{cyt}$), y dentro de los viriones liberados (V_{rel}). Se consideró como número efectivo de genomas replicados al número de copias del segmento menos abundante. La progenie viral (V_t) se obtuvo directamente de V_{rel} . Para condición estudiada realizamos 3000 simulaciones, siguiendo las recomendaciones de la publicación original.

Análisis estadístico de datos

Análisis de datos experimentales de IVA

Los datos recogen el título alcanzado por el virus de la cepa Pan/99-WT a diferentes tiempos tras inocular células MDCK (epitelio de riñón de perro) a distintas densidades virales. Los autores permiten el libre acceso a

estos datos mediante GitHub (https://github.com/njacobs627/Pan99_IVGs_Spatial_Structure). Dado que únicamente se facilita la media y su error estándar (SEM) de datos log-transformados, ambos parámetros se reconvirtieron a escala lineal mediante la función `bt.log` incluida en el paquete de R `fishmethods` (*CRAN R-Project*). En nuestros análisis se asume que en las monocapas confluentes cultivadas en placas w-6 contienen 10^6 células MDCK.

Capítulo 1. Infección colectiva y dinámica viral

Replicación cooperativa en la infección colectiva

Como se ha mencionado, una característica común a todas las estrategias de transmisión colectiva es, por definición, el aumento de la multiplicidad de infección celular (cMOI). Parece intuitivo pensar que incrementar la cMOI adelanta el ciclo infectivo. Sin embargo, para que tal adelanto resulte beneficioso en términos de eficacia replicativa viral debe aumentar la producción per cápita de nuevos viriones. Esto equivale a preguntarse si una única célula infectada con N_0 genomas virales produce más progenie viral que N_0 células infectadas con un único genoma viral cada una. Teniendo presente que los genomas virales en coinfección compiten por los recursos finitos de una única célula, cabría esperar que la coinfección resulte claramente desventajosa al reducirse proporcionalmente la cantidad de progenie que cada genoma inicial puede llegar a generar, es decir, la progenie per cápita. No obstante, si los genomas virales interactuasen cooperativamente para acelerar la infección, los efectos negativos de la competencia por los recursos podrían compensarse y superarse durante cierto periodo de tiempo en el que, siendo los recursos celulares abundantes, la cooperación fuese más intensa que la competencia.

El origen de la cooperatividad entre genomas coinfectantes representa el problema fundamental que abordaremos en este capítulo, para el cual propondremos una solución general: la replicación viral es inherentemente cooperativa. Esta hipótesis se fundamenta, como veremos, en que la replicación viral depende positivamente tanto de la abundancia de genomas virales, que actúan como molde de replicación, como de los productos génicos que codifican y que contribuyen directa o indirectamente a ésta. Para estudiar la validez de tal hipótesis y sus implicaciones primero construimos un modelo

sencillo de replicación viral basado en un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias (EDOs) que emplea cuatro variables: genomas virales libres (G), recursos virales (R), complejos replicativos (C), y recursos celulares (E , **Fig. 1.1**).

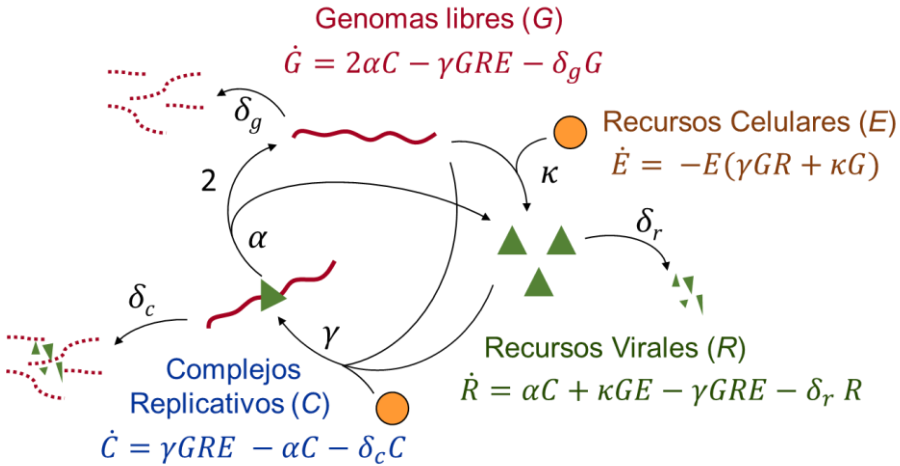


Figura 1.1 Modelo de replicación cooperativa. Diagrama del modelo de replicación viral planteado junto con sus ecuaciones diferenciales (véase Metodología para más información).

Este modelo sencillo tiene en cuenta las dos reacciones fundamentales en las que participan los genomas virales: la expresión génica y la replicación. Ambas reacciones consumen una porción de los recursos celulares finitos. La expresión génica produce recursos virales a partir de genomas libres y recursos celulares (aminoácidos y energía). La replicación de los genomas se divide en dos fases, una para la formación de complejos replicativos y otra para el proceso de copiado. En la primera fase los genomas libres (moldes) se asocian temporalmente con los recursos virales (polimerasa, cofactores virales...) para formar complejos replicativos que consumen los recursos celulares necesarios para el copiado (nucleótidos y energía). En la segunda

fase, los complejos replicativos se disocian a cierta tasa que responde al tiempo promedio de copiado, liberando así los recursos y genomas virales inicialmente secuestrados y las nuevas hebras genómicas. Cabe tener presente que el número total de genomas es $N = G + C$, que los procesos de expresión génica y replicación ocurren hasta que se consumen todos los recursos celulares, y que todos los componentes virales (G , R y C) están sujetos a degradación (**Fig. 1.2A**).

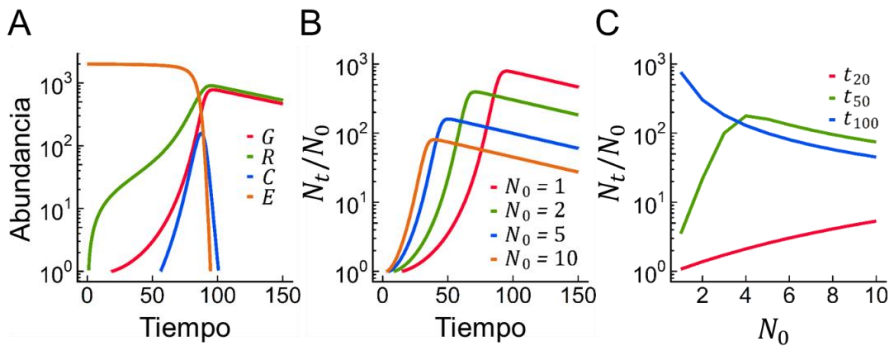


Figura 1.2 Dinámica del modelo de replicación cooperativa. La dinámica del modelo se muestra en unidades arbitrarias (U) empleando el conjunto de parámetros $\alpha = 5 \times 10^{-1} \text{ t}^{-1}$, $\kappa = 5 \times 10^{-4} \text{ U}^{-1} \text{ t}^{-1}$, $\gamma = 10^{-6} \text{ U}^{-2} \text{ t}^{-1}$, and $\delta_g = \delta_c = \delta_r = 10^{-2} \text{ t}^{-1}$, y condiciones iniciales $N_0 = G_0$, $C_0 = 0$, $R_0 = 0$, y $E_0 = 2000 \text{ U}$. **A.** Dinámica general de la monoinfección ($N_0 = 1$) para cada variable del modelo. **B.** Dinámica de la producción de genomas per cápita (N_t/N_0) para distintos valores de N_0 . **C.** Efecto de incrementar N_0 sobre N_t/N_0 cuantificado a distintos tiempos post-infección (t_{20} , temprano; t_{50} , intermedio; t_{100} , tardío).

Este sistema muestra que la cooperatividad entre los genomas que inician la infección puede ser muy intensa durante su curso temprano, ya que incrementar N_0 produce una aceleración desproporcionada del ciclo infeccioso y, en consecuencia, un aumento sinérgico en la producción de genomas virales per cápita (N_t/N_0 ; **Fig. 1.2B**). No obstante, los genomas iniciales también compiten por una cantidad fija de recursos celulares (E_0). Por tanto, el proceso

Capítulo 1. Infección colectiva y dinámica viral

de replicación sigue una dinámica fundamentalmente cooperativa cuando los recursos celulares abundan y la concentración de los componentes virales es baja, y se vuelve progresivamente más competitiva conforme el ciclo avanza. Esto implica que al final del ciclo infectivo, si las tasas de degradación no son muy elevadas, la producción total de genomas (N_t) será aproximadamente independiente de la cMOI inicial, por lo que la producción per cápita N_t/N_0 resultará inversamente proporcional a N_0 . Por tanto, como la cooperación y la competencia son dos fuerzas contrarias que varían inversamente en su intensidad a lo largo de la infección, existen tiempos intermedios del ciclo infectivo para cada uno de los cuales un $N_0 > 1$ maximiza N_t/N_0 (**Fig. 1.2C**).

Los valores de los parámetros empleados para ilustrar el comportamiento del modelo se eligieron arbitrariamente para representar un perfil de replicación viral cualquiera, no abortivo, y sin un sesgo marcado hacia una producción preferente de genomas o recursos virales. Sin embargo, tratándose de un modelo conceptual, otros valores para los parámetros habrían sido igualmente válidos. Para mostrar que la replicación cooperativa es un resultado general y cualitativamente robusto a variaciones en los parámetros examinamos 100 000 conjuntos aleatorios de parámetros (**Fig. 1.3**). Al representar, a distintos tiempos, la producción de genomas per cápita de una célula coinfectada (Eje ordenadas; $N_0 \geq 2$) frente a la de otra mono infectada (Eje abscisas) para cada conjunto de parámetros, los puntos se situarán por encima de la diagonal mientras el beneficio de la cooperación compense la competencia por los recursos. Así, a un tiempo globalmente temprano ($t = 20$), se observa el beneficio de la cooperación en todos los conjuntos de parámetros. A tiempos más avanzados ($t = 50$ y $t = 100$) la ventaja de la coinfección va desapareciendo progresivamente, cuando los recursos

celulares se han consumido. Además, el efecto de incrementar o reducir el rango de muestreo de los parámetros empleados sólo repercute de forma proporcional en la velocidad promedio de los ciclos infectivos, es decir, en los tiempos de muestreo apropiados (**Fig. 1.4**).

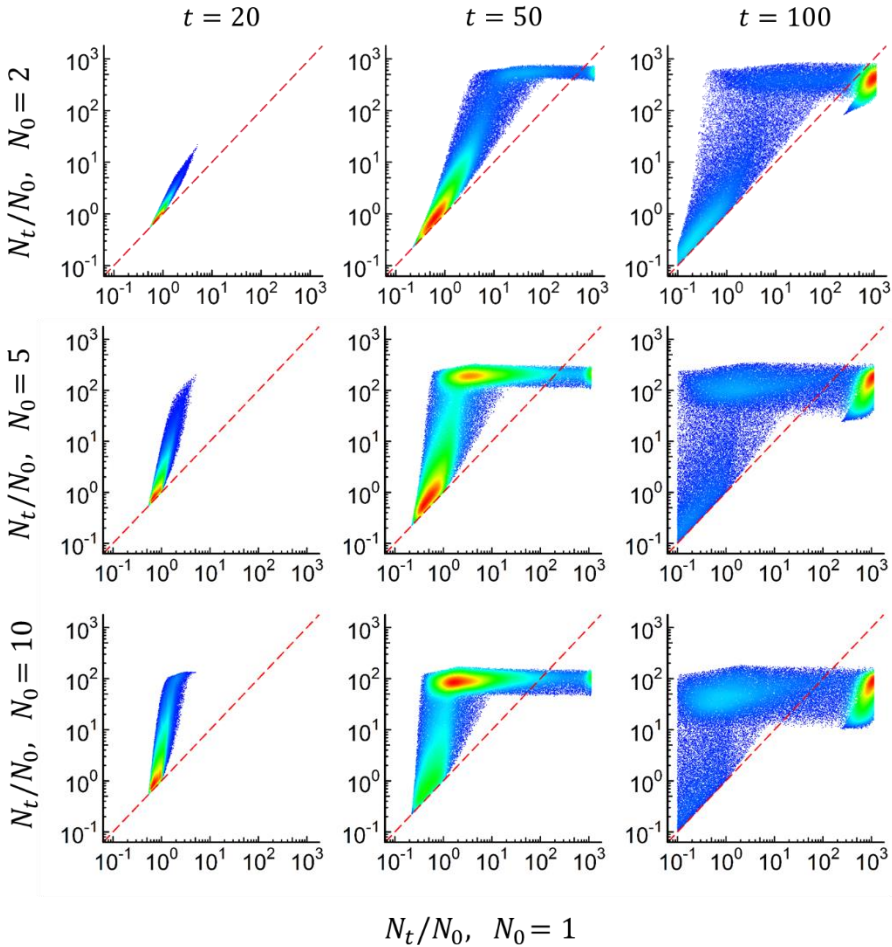


Figura 1.3 La cooperatividad es robusta frente a cambios en los parámetros. Producción de genomas per cápita, N_t/N_0 , para $N_0 = 2, 5$ y 10 (coinfección) frente a $N_0 = 1$ (monoinfección) a distintos tiempos post-infección empleando 100 000 conjuntos de valores aleatorios para los parámetros dentro de los siguientes rangos: α ($0 - 1$), κ ($0 - 5 \times 10^{-4}$), γ ($0 - 5 \times 10^{-6}$), δ_g ($0 - 3 \times 10^{-2}$), δ_c ($0 - 3 \times 10^{-2}$), y δ_r ($0 - 3 \times$

10^{-2}). Cada punto representa un conjunto de parámetros analizado. La línea roja discontinua indica la misma producción de genomas per cápita para la coinfección y la mono infección (ausencia de cooperación y competencia). Los puntos situados por encima de esta línea indican que, en ese momento del ciclo infeccioso, la cooperatividad predomina sobre la competencia, mientras que los situados por debajo indican lo contrario. En los rangos de parámetros analizados, incrementar más los valores de degradación (parámetros δ) en relación al resto de parámetros causa infecciones abortivas frecuentes.

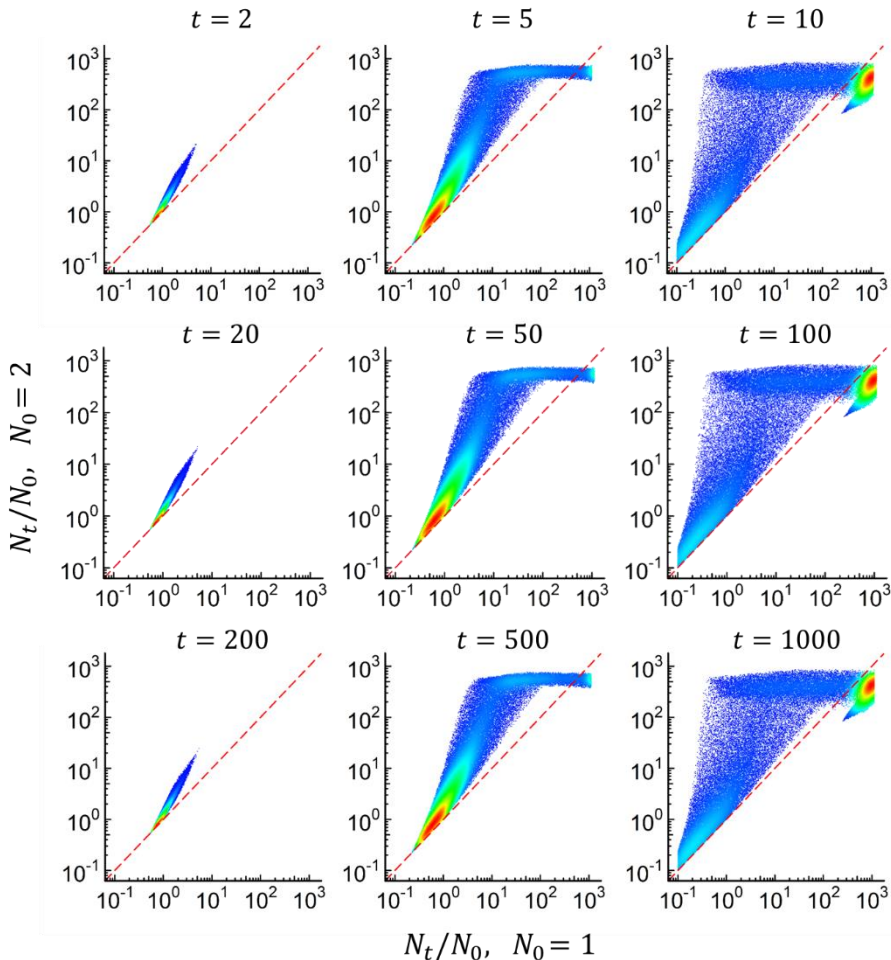


Figura 1.4 La cooperatividad es robusta bajo otros rangos de parámetros. Producción de genomas per cápita, N_t/N_0 , para $N_0 = 2$ (coinfección) frente a $N_0 = 1$ (mono infección) empleando distintos rangos de valores de parámetros. Arriba, el

Capítulo 1. Infección colectiva y dinámica viral

rango se ha extendido diez veces respecto a la **figura 1.3** (centro): α (0 - 10), κ ($0 - 5 \times 10^{-3}$), γ ($0 - 5 \times 10^{-5}$), δ_g ($0 - 3 \times 10^{-1}$), δ_c ($0 - 3 \times 10^{-1}$), y δ_r ($0 - 3 \times 10^{-1}$). Abajo, el rango se ha reducido diez veces respecto a la **figura 1.3**: α (0 - 0,1), κ ($0 - 5 \times 10^{-5}$), γ ($0 - 5 \times 10^{-7}$), δ_g ($0 - 3 \times 10^{-3}$), δ_c ($0 - 3 \times 10^{-3}$), y δ_r ($0 - 3 \times 10^{-3}$). Cada punto representa un conjunto de parámetros analizado. La línea roja discontinua indica la misma producción de genomas per cápita para la coinfección y la monoinfección (ausencia de cooperación y competencia).

La clave de la cooperatividad del modelo reside en que los propios genomas virales son, en última instancia, responsables de la producción de recursos virales. Esto causa una realimentación no lineal entre ambos (recursos y genomas virales) durante la formación de complejos replicativos. Evitar que G dependa de R conduce a un modelo de replicación no cooperativo. Para mostrarlo, redefinimos R como una cantidad fija de recursos celulares reutilizables, manteniendo E como recursos celulares consumibles. De este modo, la replicación depende únicamente de los recursos de la célula, lo que podría representar la replicación de un plásmido (**Fig. 1.5A-B**). En este modelo, empleado como control de replicación no viral, iniciar la infección con un mayor número de genomas no acelera desproporcionalmente el ciclo infectivo (**Fig. 1.5C**), y la producción de genomas per cápita en la coinfección es siempre menor que en la monoinfección para cualquier combinación de parámetros (**Fig. 1.5D-E**).

Que la replicación sea inherentemente cooperativa en nuestro modelo bajo cualquier combinación de parámetros no implica que éstos no afecten a su intensidad, es decir, al beneficio que un virus puede llegar a experimentar al coinfectar bajo un conjunto de parámetros particular. Para determinar el efecto de los parámetros en la cooperatividad del sistema analizamos los efectos de variarlos por parejas sobre el máximo beneficio en N_i/N_0 alcanzado al comparar la coinfección frente a la monoinfección (**Fig. 1.6**). Los mapas de

Capítulo 1. Infección colectiva y dinámica viral

calor resultantes indican que la coinfección resulta más ventajosa cuando los complejos replicativos y la producción de recursos virales es lenta, y cuando el copiado de los genomas y la degradación de los componentes virales es rápida. También se observa un valor crítico para las tasas de degradación por encima del cual la replicación no puede ocurrir. Sin embargo, la replicación cooperativa permite superar esta limitación incrementando la cMOI.

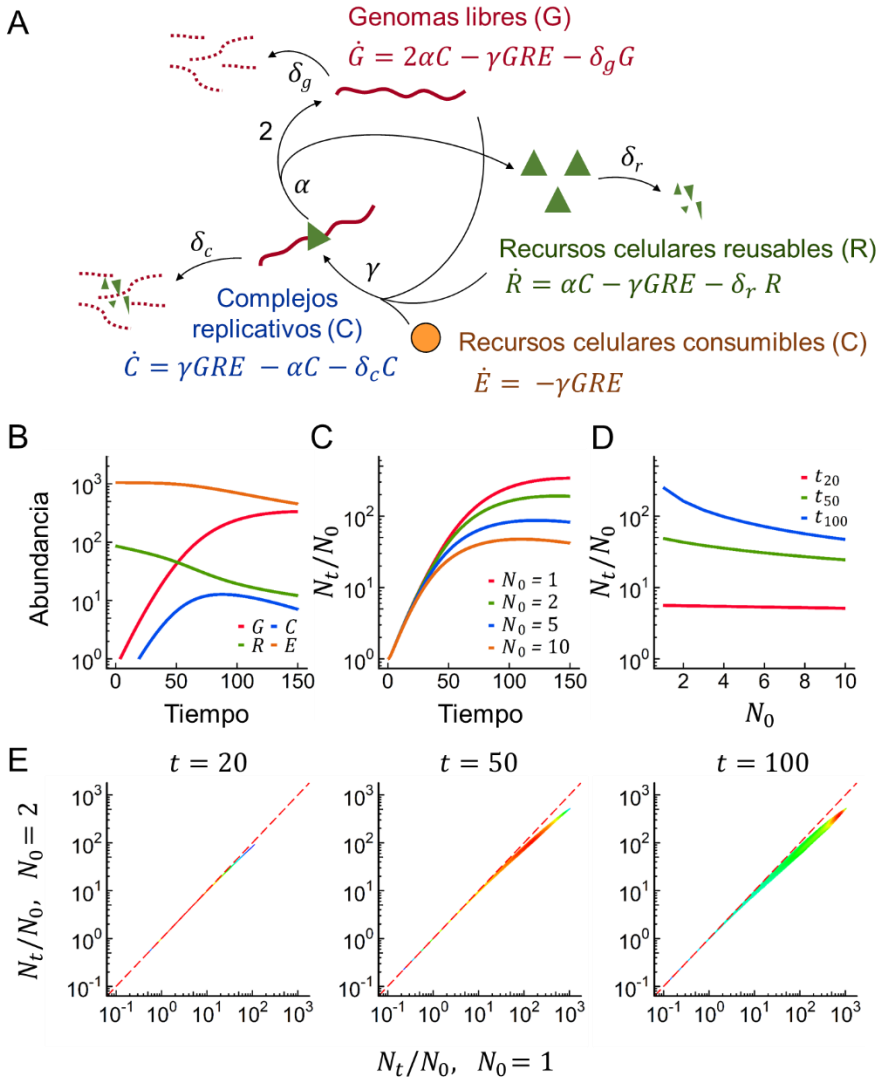


Figura 1.5 Dinámica de un modelo de replicación no cooperativo. **A.** Diagrama del modelo de replicación no viral (no cooperativa) planteado junto con sus ecuaciones diferenciales. En este modelo, a diferencia de su versión cooperativa mostrada en la **figura 1.1**, R ya no son recursos virales producidos a partir de la expresión génica de los genomas virales libres (G), sino recursos celulares reutilizables que están presentes en cantidad fija (véase Metodología para más detalles). La dinámica del modelo se muestra en unidades arbitrarias (U) empleando el conjunto de parámetros $\alpha = 5 \times 10^{-1} \text{ t}^{-1}$, $\gamma = 10^{-6} U^{-2} \text{ t}^{-1}$, and $\delta_g = \delta_c = \delta_r = 10^{-2} \text{ t}^{-1}$,

y condiciones iniciales $N_0 = G_0$, $C_0 = 0$, $R_0 = 86$, y $E_0 = 1047$ U. Los valores de R_0 y E_0 se ajustaron para que el modelo mostrase un tiempo medio de ciclo y una abundancia final de genomas virales similar al del modelo cooperativo. **B.** Dinámica general de la monoinfección ($N_0 = 1$) para cada variable del modelo. **C.** Dinámica de la producción de genomas per cápita (N_t/N_0) para distintos valores de N_0 . **D.** Efecto de incrementar N_0 sobre N_t/N_0 cuantificado a distintos tiempos post-infección (t_{20} , temprano; t_{50} , intermedio; t_{100} , tardío). **E.** Producción de genomas per cápita, N_t/N_0 , para $N_0 = 2$ (coinfección) frente a $N_0 = 1$ (monoinfección) a distintos tiempos post-infección empleando 100 000 conjuntos de valores aleatorios para los parámetros dentro de los siguientes rangos: α (0 - 1), γ ($0 - 5 \times 10^{-6}$), δ_g ($0 - 3 \times 10^{-2}$), δ_c ($0 - 3 \times 10^{-2}$), y δ_r ($0 - 3 \times 10^{-2}$). Cada punto representa un conjunto de parámetros analizado. La línea roja discontinua indica la misma producción de genomas per cápita para $N_0 = 2$ y $N_0 = 1$ (ausencia de cooperación y competencia). Los puntos por encima de la línea indican cooperatividad, y por debajo competencia.

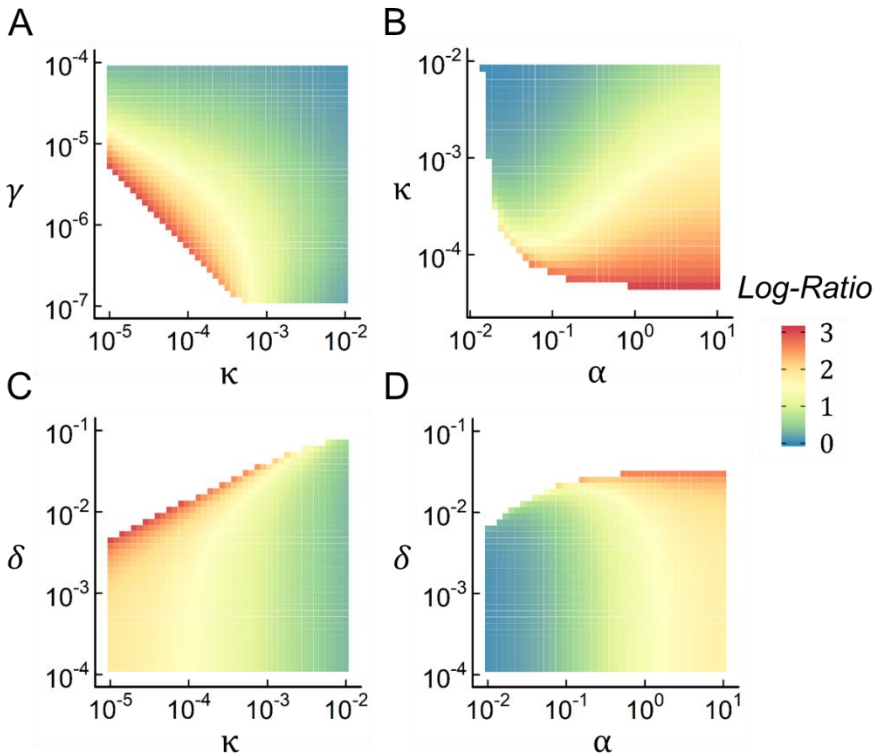


Figura 1.6 Efectos de los valores de los parámetros del modelo de replicación viral sobre la intensidad de la cooperatividad. En cada mapa de calor se compara la producción de genomas virales per cápita (N_t/N_0) para una célula infectada con un

Capítulo 1. Infección colectiva y dinámica viral

único genoma ($N_0 = 1$) frente a una célula coinfectada con dos genomas ($N_0 = 2$), y se muestra el logaritmo de la máxima ratio entre esas dos cantidades. Los valores obtenidos en todos los casos son superiores a cero, lo que indica cooperatividad. Las áreas azuladas corresponden a combinaciones de parámetros que resultan en una cooperatividad poco intensa, mientras que las áreas rojizas indican una gran cooperatividad en la producción de genomas virales per cápita. Las regiones en blanco corresponden a infecciones abortivas. Las combinaciones de parámetros cercanas a estas regiones abortivas, donde la replicación ocurre con mayor dificultad, tienden a mostrar un efecto cooperativo más intenso. Se muestran los mapas de calor para κ - γ (A), κ - α (B), κ - δ (C) y α - δ (D) con $\delta = \delta_g = \delta_c = \delta_r$. Los parámetros κ y γ (que controlan la tasa de producción de recursos virales y de formación de complejos replicativos, respectivamente) mostraron un efecto similar en la intensidad de la cooperatividad, de modo que las combinaciones γ - α y γ - δ produjeron mapas de calor similar a los obtenidos para las combinaciones κ - α y κ - δ (no mostradas). Los valores de los parámetros invariantes en cada mapa de calor fueron $\alpha = 5 \cdot 10^{-1} \text{ t}^{-1}$, $\kappa = 5 \cdot 10^{-4} \text{ U}^{-1} \cdot \text{t}^{-1}$, $\gamma = 10^{-6} \text{ U}^{-2} \cdot \text{t}^{-1}$, and $\delta = 10^{-2} \text{ t}^{-1}$.

Infección colectiva e infectividad

La cinética de acción de masas empleada en nuestro modelo determinista requiere concentraciones homogéneas de todos los reactantes, lo que implica que el número de moléculas en el sistema deba ser muy elevado. Evidentemente, esto no se cumple en nuestro caso, especialmente al comienzo del ciclo infectivo, cuando sólo unos pocos componentes virales están presentes. Además, la pérdida estocástica de componentes virales esenciales al comienzo del ciclo infectivo puede definir el destino de la infección. No obstante, la cooperación entre los genomas que inician la infección podría reducir considerablemente la presión de las fluctuaciones estocásticas sobre el éxito de la infección al acelerar las etapas iniciales del ciclo infectivo.

Para considerar la aleatoriedad inicial de la infección viral transformamos nuestro sistema de EDOs en un conjunto de reacciones químicas que evolucionan según un proceso de Markov en tiempo continuo cuyas trayectorias obtuvimos mediante el algoritmo de simulación estocástica de Gillespie (Gillespie, 1977, 2007). Curiosamente, las fluctuaciones

estocásticas de las primeras reacciones del ciclo infectivo generaron gran variabilidad en los perfiles de replicación con respecto al tiempo (**Fig. 1.7A**), consistente con datos experimentales previos obtenidos del análisis de células individuales (Combe et al., 2015; Guo et al., 2017; Heldt et al., 2015; Schulte and Andino, 2014; Timm and Yin, 2012; Xin et al., 2018, véase Discusión). A pesar de esta variabilidad, la dinámica promedio del ciclo infectivo y los efectos de aumentar N_0 resultaron consistentes con los del modelo determinista (**Fig. 1.7B-D**).

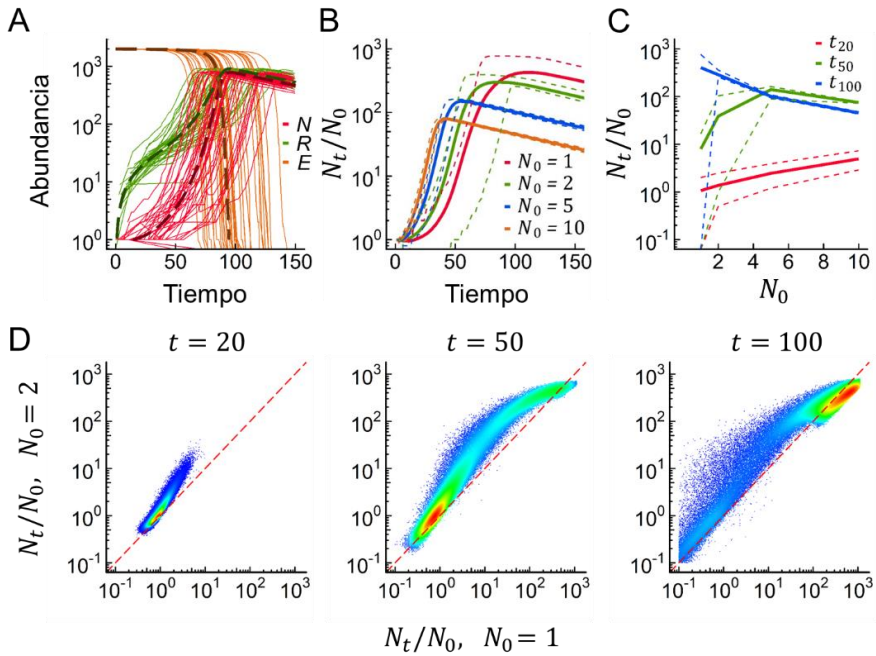


Figura 1.7 Dinámica del modelo estocástico de replicación viral cooperativa. Los resultados aquí mostrados son análogos a los presentados en las **figuras 1.2, 1.3 y 1.4** para la versión determinista del modelo de replicación cooperativa, y se han obtenido empleando los mismos conjuntos de parámetros y condiciones iniciales. **A.** Dinámica de los genomas virales totales (N) y de los recursos virales (R) y celulares (E) para 50 trayectorias individuales (simulaciones). Las líneas discontinuas muestran las predicciones deterministas. **B.** Dinámica de la producción de genomas per cápita

Capítulo 1. Infección colectiva y dinámica viral

(N_t/N_0) para distintos valores de N_0 . **C.** Efecto de incrementar N_0 sobre N_t/N_0 cuantificado a distintos tiempos post-infección (t_{20} , temprano; t_{50} , intermedio; t_{100} , tardío). En **B** y **C** las líneas sólidas indican valores promedio de 1000 simulaciones, mientras que las líneas discontinuas indican los percentiles del 10% y 90%. **D.** Producción de genomas per cápita, N_t/N_0 , para $N_0 = 2$ (coinfeción) frente a $N_0 = 1$ (monoinfección) a distintos tiempos post-infección empleando 100 000 conjuntos de valores aleatorios para los parámetros. Cada punto representa un conjunto de parámetros analizado. La línea roja discontinua indica la misma producción de genomas per cápita para $N_0 = 2$ y $N_0 = 1$ (ausencia de cooperación y competencia). Los puntos situados por encima de esta línea indican cooperatividad, y por debajo competencia.

A diferencia de los modelos deterministas, las simulaciones estocásticas permiten cuantificar el efecto de la coinfección sobre el éxito infectivo, es decir, la frecuencia de infecciones no abortivas para un inóculo N_0 . Si asumimos que los genomas virales en coinfección actúan independientemente (no cooperan), cada uno tiene una probabilidad p de causar una infección abortiva. Por tanto, la probabilidad de que N_0 genomas infecten con éxito debería calcularse como $1 - p^{N_0}$. Sin embargo, nuestras simulaciones muestran que la infectividad aumenta más rápido de lo que este cálculo predice, lo cual indica cooperatividad. Además, como se deduce del estudio de los parámetros del modelo, el efecto cooperativo se magnifica cuando las tasas de degradación son más elevadas (**Fig. 1.8**). Esto ocurre porque los componentes virales se degradan a una tasa constante mientras que se producen cooperativamente, es decir, su producción depende de su densidad. Por ello, mientras que durante los primeros instantes del ciclo infectivo la degradación de componentes virales puede ser relativamente intensa e incluso dominar frente a su producción, ésta se vuelve menos relevante conforme el sistema evoluciona favorablemente. En consecuencia, incrementar la multiplicidad de infección celular reduce sinérgicamente la probabilidad de que se produzca un escenario abortivo.

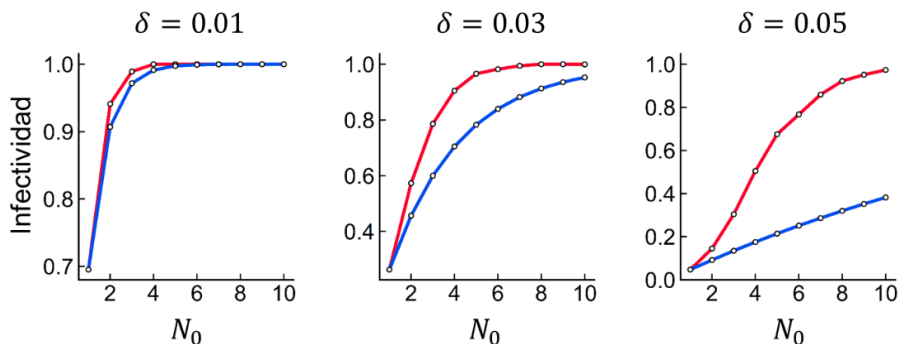


Figura 1.8 Efecto de la infección colectiva sobre la infectividad. Se muestra la probabilidad de éxito en la infección (infectividad) para distinto número de genomas virales iniciales (N_0) asumiendo distintas tasas de degradación de los componentes virales ($\delta = \delta_g = \delta_r = \delta_c$). La línea roja muestra los valores obtenidos a partir de 1000 simulaciones realizadas con el modelo estocástico de replicación viral. La línea azul muestra la probabilidad de éxito esperable si los genomas virales actuasen independientemente, calculada como $P_{N_0} = 1 - (1 - P_1)^{N_0}$, donde P_1 es la probabilidad de infección exitosa obtenida para $N_0 = 1$.

El efecto de la replicación cooperativa en la eficacia biológica viral

Prever el impacto de la replicación cooperativa sobre la eficacia biológica viral no es trivial. Como hemos visto, en términos de productividad per cápita, la infección colectiva resulta inicialmente ventajosa, cuando predomina la cooperatividad, pero finalmente tiende a ser costosa debido a la competencia por los recursos celulares. Por tanto, salvo si la coinfección conlleva un aumento de la infectividad per cápita, la existencia de un beneficio neto para el virus dependerá de cómo éste aproveche su ventaja temporal. Para poder analizar este aspecto empleamos una aproximación multiescala que permite acoplar la dinámica replicativa intracelular con la producción y transmisión intercelular de viriones de manera integrada en el tiempo.

Capítulo 1. Infección colectiva y dinámica viral

Para ello, primero incorporamos a nuestro modelo de EDOs la producción de viriones extracelulares infecciosos (V) formados a partir de genomas y recursos virales. Después, construimos un modelo de dinámica viral intercelular en el que se consideran células susceptibles (S), células infectadas (I) y viriones extracelulares (V). Este tipo de modelos limitados por las células susceptibles son comúnmente utilizados para estudiar la propagación de las infecciones (Perelson, 2002; Perelson and Nelson, 1999). En nuestro caso, para poder incorporar la dinámica intracelular al modelo, estructuramos las células infectadas por su edad, que corresponde al tiempo de infección. Este tipo de enfoque estructurado en tiempo y edad continuos lleva directamente a un modelo multiescala en el que la dinámica de las células infectadas se describe mediante la ecuación diferencial en derivadas parciales de McKendrick-von Foerster (Abia et al., 2005; Quintela et al., 2018). Para facilitar su resolución e incrementar el rendimiento computacional optamos por construir la versión aproximada que se muestra en la **figura 1.9**, en la que empleamos tiempo discreto y clases de edad (véase Metodología).

Basándonos en esta aproximación multiescala competimos dos subpoblaciones con N_0 genomas virales cada una. Al inicio de la infección, en una subpoblación todos los genomas coinfectan una única célula, mientras que en la otra se distribuyen infectando N_0 células. Sin embargo, en los siguientes ciclos asumimos que ambas subpoblaciones producen progenies virales monodispersas que causan monoinfecciones. De esta forma, es posible cuantificar la ventaja (si la hay) de un único ciclo de coinfección inicial comparando la progenie viral o el número de células infectadas de cada subpoblación en el equilibrio (véase Metodología). Debe notarse que esta comparación es justa a pesar de que no tratamos con valores normalizados per

Capítulo 1. Infección colectiva y dinámica viral

cápita, ya que partimos de una única coinfección frente a N_0 monoinfecciones, por lo que ya se está teniendo en cuenta el coste dispersivo inherente a la infección colectiva. Así pues, los resultados muestran que la replicación cooperativa temprana tiende a conferir un beneficio neto a los N_0 virus que inicialmente coinfectan una sola célula (**Fig. 1.10**).

Al estudiar el efecto de los parámetros de modelo sobre el resultado de la competencia se observa que la ventaja de la coinfección depende de la velocidad tanto de las etapas post-replicativas como de la propagación del virus, de modo que si estos procesos son muy lentos respecto a la replicación, la ventaja temporal obtenida de la cooperación no se aprovecha y la coinfección resulta perjudicial (**Fig. 1.10B-C**). Otro factor a tener en cuenta es la tasa de muerte de las células infectadas, ya que limita la producción de progenie viral cuando la esperanza de vida de la célula infectada es menor que la duración del ciclo infeccioso. En estos casos la coinfección tiende a obtener una ventaja mayor que deriva de la aceleración cooperativa del ciclo infeccioso (**Fig. 1.10C**).

Por otra parte, los eventos estocásticos tempranos que afectan a la replicación viral, especialmente los que ocurren en las células infectadas iniciales, pueden afectar los resultados de la competencia. Para tener en cuenta este factor determinamos la dinámica intracelular acoplada al modelo multiescala mediante simulación estocástica (véase Metodología). Los resultados así obtenidos fueron similares en promedio, pero no idénticos, a los obtenidos con

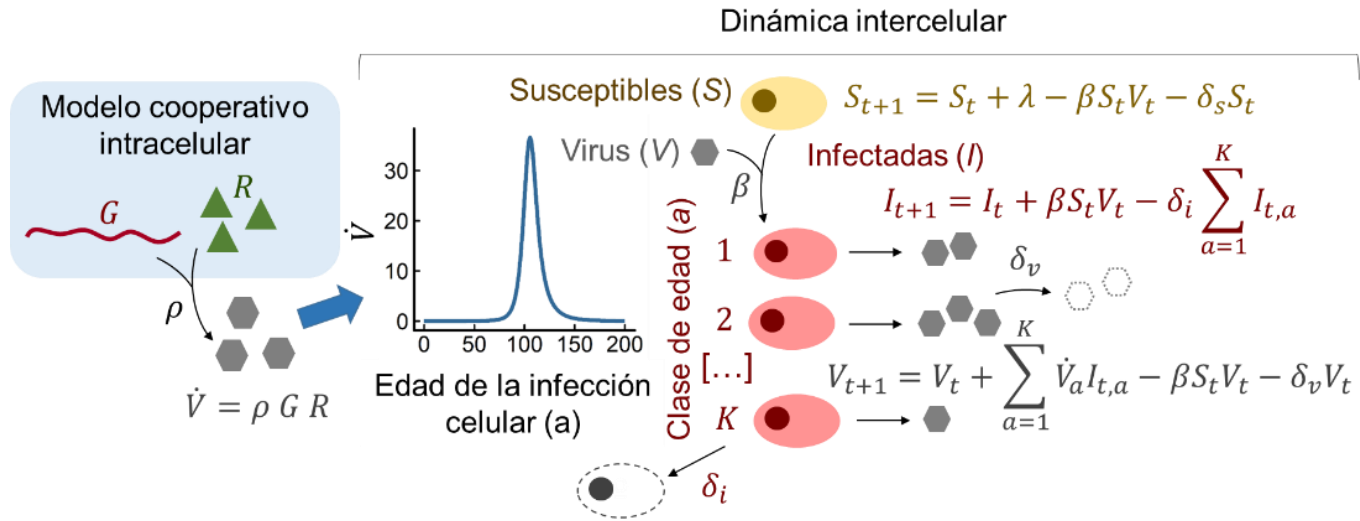


Figura 1.9 Modelo multiescala. Diagrama general del modelo multiescala planteado para estudiar los efectos de la replicación cooperativa en la eficacia biológica viral. La dinámica intracelular se describe a partir del modelo de replicación cooperativa (**Fig. 1.1**) modificado para incluir la producción de viriones a partir de genomas y recursos virales, lo que permite obtener una distribución en la tasa de producción de viriones (\dot{V}) en función del tiempo de infección (edad de la infección celular). Esta distribución se conecta a la dinámica intercelular a través de las células infectadas (I) que se clasifican en K clases discretas de edad (a), y permite definir los viriones (V) producidos por las células de cada clase. La interacción de estos viriones con células susceptibles (S) producirá nuevas células infectadas. Las células susceptibles se generan a tasa constante (λ) y todos los componentes del modelo están sujetos a degradación (véase Metodología para más información).

la versión determinista del modelo. Al representar en histograma el porcentaje en el equilibrio de células infectadas a partir de la coinfección inicial (% I_c) en 1000 simulaciones, y para distintos valores de N_0 , se observa que éste varía enormemente entre 0 y 100%, aunque la mayor parte de su área representa situaciones donde la coinfección resulta beneficiosa ($I_c > 50\%$; **Fig. 1.11**).

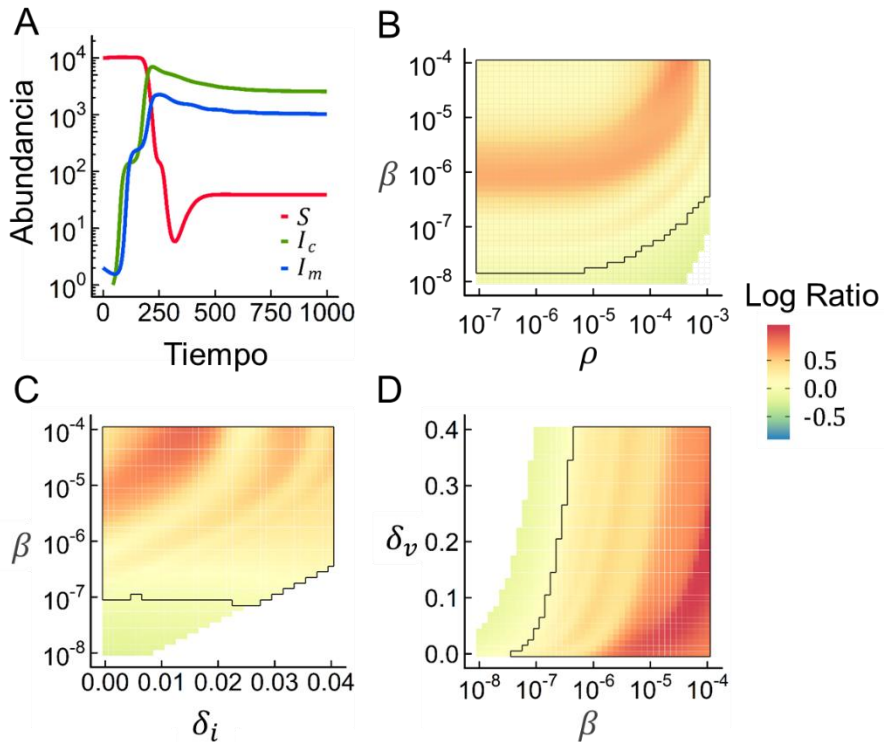


Figura 1.10 Efecto en la eficacia biológica viral de la replicación cooperativa. El modelo multiescala adaptado para competir dos subpoblaciones virales (véase Metodología para más detalles) permite estudiar los efectos de la replicación cooperativa para la eficacia biológica del virus. **A.** Competencia entre una subpoblación viral c que parte de una única célula coinfectada (I_c) con $N_0 = 2$ genomas virales y una subpoblación viral m que inicia la infección con $N_0 = 2$ genomas distribuidos en distintas células mono infectadas (I_m). Las poblaciones competidoras solo difieren es las condiciones iniciales mencionadas y, tras el primer ciclo de infección, ambas progresan de manera idéntica. Los mapas de calor muestran el efecto

de variar los valores de parámetros responsables del ensamblaje y liberación de viriones (ρ), la infectividad (β), la muerte de células infectadas (δ_i), y la degradación de viriones libres (δ_v) sobre la ratio entre ambos competidores en el equilibrio, $\log_{10}(I_c/I_m)$. **B.** ρ frente a β . **C.** δ_i frente a β . **D.** β frente a δ_v . El área bordeada en negro indica la región de parámetros en la que coinfección inicial resultó beneficiosa, mientras las regiones en blanco corresponden a combinaciones de parámetros que producen infecciones abortivas a nivel poblacional.

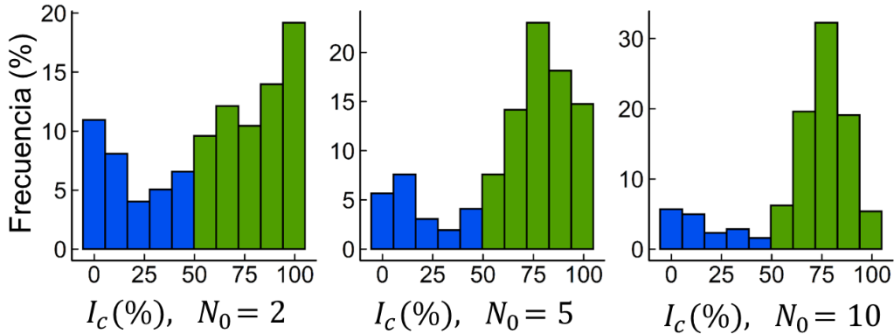


Figura 1.11 Distribución del porcentaje de células I_c en el equilibrio para distintos valores de N_0 usando el modelo multiescala con dinámica intracelular estocástica. Las áreas coloreadas engloban las simulaciones no abortivas en las que la coinfección inicial resultó beneficiosa (verde) o perjudicial (azul). Para cada N_0 analizado, el porcentaje indicado de simulaciones no abortivas en las que la coinfección inicial fue beneficiosa se desvía significativamente de la neutralidad (Test binomial: $P < 0,001$).

La cooperatividad en modelos detallados de importantes patógenos humanos

Nuestra modelización captura lo que parece ser una característica general de la replicación viral: su cooperatividad. Sin embargo, representa una versión muy simplificada de los ciclos infectivos virales, que ignora cualquier detalle específico. Algunos trabajos previos ya han creado modelos de alta resolución para el ciclo infectivo de ciertos virus que se encuentran particularmente bien estudiados (Canini and Perelson, 2014; Yin and Redovich, 2018). Para comprobar si la cooperación emerge en un escenario más realista obtuvimos tres modelos recientes de la literatura que describen la

Capítulo 1. Infección colectiva y dinámica viral

dinámica del ciclo infectivo completo del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1, Shcherbatova et al., 2020), el de la hepatitis C (HCV, Aunins et al., 2018), y el de la gripe A (IVA, Heldt et al. 2015). Los dos primeros son modelos deterministas basados en sistemas de ecuaciones diferenciales, mientras que el último es estocástico. Más detalles sobre estos modelos y los procesos que consideran pueden encontrarse resumidos en la sección de Metodología o bien en sus respectivas publicaciones originales.

Empleando estos modelos, examinamos la producción de partículas infecciosas (V_t) en función del número de viriones que inician la infección (V_0), utilizando para ello los valores de parámetros proporcionados en las publicaciones originales. En los modelos de HIV-1 y IVA, la progenie viral per cápita (V_t/V_0) aumentó con V_0 a tiempos tempranos, reproduciendo el comportamiento observado en nuestro modelo sencillo (**Fig. 1.12**). Además, también en consonancia con nuestras simulaciones, el modelo estocástico de IVA mostró un incremento desproporcionado de la infectividad al aumentar V_0 . Por ejemplo, el porcentaje de infecciones exitosas para IVA pasó de un 9,2 % al iniciar la infección con $V_0 = 1$, a un 66,4% al hacerlo con $V_0 = 5$. Este porcentaje es notablemente superior al 38,3 % ($1-0,908^5$) esperado asumiendo la acción independiente de los genomas virales. Por otro lado, el modelo de HCV no mostró efectos cooperativos perceptibles en la producción de progenie viral.

Sin embargo, al analizar la producción per cápita de genomas virales (N_t/N_0) se observó que ésta era cooperativa en los tres modelos. Cabe mencionar que para calcular N en estos tres modelos se sumaron los genomas virales libres con los secuestrados en cualquier complejo intermediario y en la progenie viral (véase Metodología). Así pues, HCV representa un caso en el

que el efecto cooperativo de la replicación se pierde en la producción de viriones a causa de un ensamblado y liberación comparativamente lentos respecto a la replicación, al menos en el modelo estudiado (**Fig. 1.13**). La emergencia de cooperatividad en los tres modelos, ninguno de ellos diseñado específicamente para tener en cuenta el mecanismo de la replicación cooperativa, refuerza la idea de que los ciclos virales son inherentemente cooperativos.

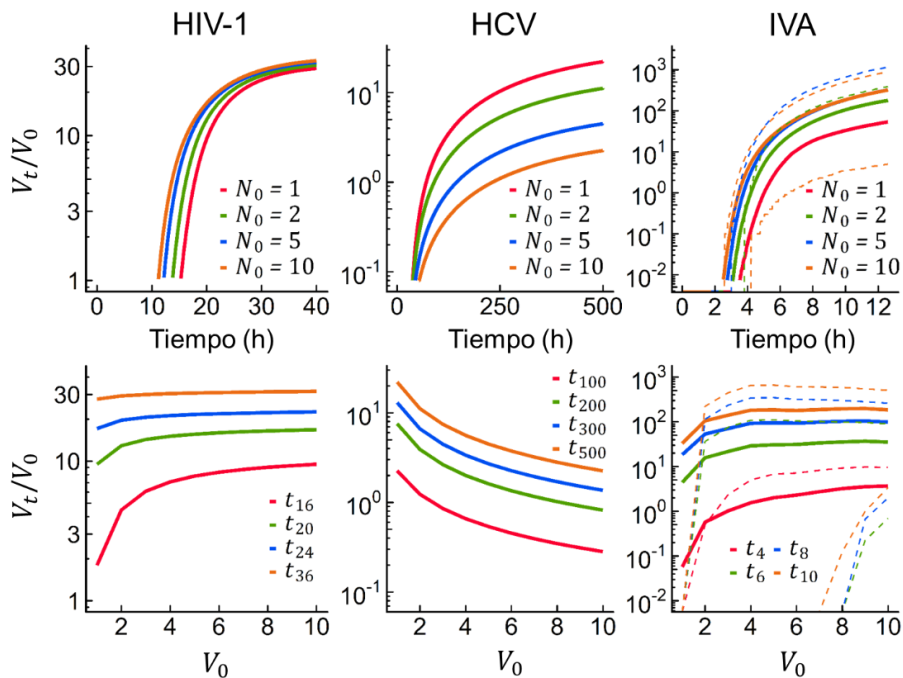


Fig. 1.12 Análisis de la cooperatividad en la producción de progenie viral per cápita en modelos detallados de la literatura para los ciclos infecciosos de HIV-1, HCV e IVA. Se muestra la dinámica de producción per cápita de progenie viral (V_t/V_0) para distintos valores de V_0 y el efecto de V_0 sobre V_t/V_0 a distintos tiempos post-infección. Los ciclos de HIV-1 y HCV están descritos por modelos deterministas basados en sistemas de EDOs, mientras que el de IVA se emplea la simulación

estocástica. En este caso, los valores V_t/V_0 representados proceden de promediar los resultados de 3000 simulaciones, incluyendo infecciones abortivas. Las líneas discontinuas indican los percentiles del 10% y 90%. En todos los casos se emplearon los valores de parámetros de las publicaciones originales (véase Metodología para más información).

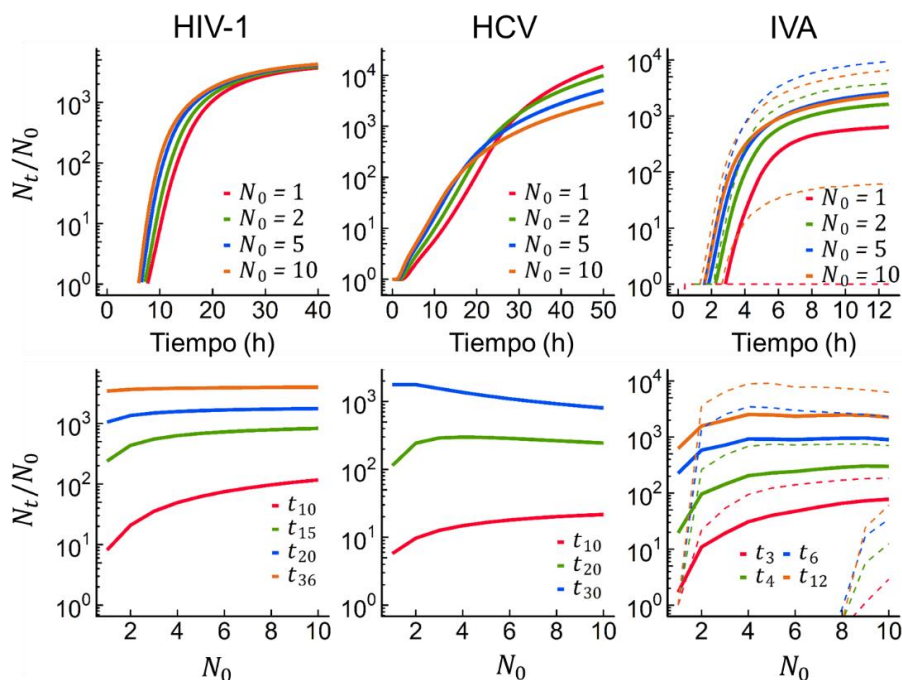


Fig. 1.13 Análisis de la cooperatividad en la producción de genomas virales per cápita en modelos detallados de la literatura para los ciclos infectivos de HIV-1, HCV e IVA. Se muestra la dinámica de producción per cápita de genomas virales (N_t/N_0) para distintos valores de N_0 y el efecto de N_0 sobre N_t/N_0 a distintos tiempos post-infección. En cada virus, se define N_t como el número total de genomas virales presentes en un momento del ciclo, ya sea asociados a la progenie viral o secuestrados en compartimentos o complejos moleculares intermedios (véase Metodología). Además, en el caso de IVA, N_t queda determinado por el segmento genómico menos frecuente. En el modelo estocástico de IVA, los valores N_t/N_0 representados proceden de promediar los resultados de 3000 simulaciones, incluyendo infecciones abortivas. Las líneas discontinuas indican los percentiles del 10% y 90%. En todos los casos se emplearon los valores de parámetros de las publicaciones originales (véase Metodología para más información).

Evidencia experimental de replicación cooperativa en distintos virus

Para dar soporte experimental a nuestras predicciones teóricas empleamos cinco virus de mamíferos: el virus de la estomatitis vesicular (VSV), el virus respiratorio sincitial (RSV), el coxsackievirus B3 (CVB3), el adenovirus humano tipo 5 (hAdV5) y el virus vaccinia (VacV). Estos virus representan un conjunto particularmente adecuado para nuestros análisis por varias razones. Por un lado, son virus que podemos cultivar fácilmente en nuestro laboratorio y que crecen bien en una línea celular común (HeLa H1), lo que facilita la interpretación de los resultados. Por otro lado, se trata de un conjunto muy diverso, ya que disponemos de representantes de distintos tipos de virus. Por ejemplo, tenemos dos virus envueltos y con genoma de ARN de polaridad negativa, un virus no envuelto y con genoma de ARN de polaridad positiva (lítico), un virus no envuelto y con genoma de ADN (lítico) y un virus de gran tamaño, envuelto, y con genoma de ADN, respectivamente.

Los experimentos se encaminaron a detectar la cooperatividad replicativa temprana midiendo la progenie viral per cápita (V_t/V_0) en cultivos de HeLa H1 infectados a distintas densidades virales (m), definidas como la razón entre el número inicial de partículas infecciosas y el de células. Para ello, fue necesario titular previamente los *stocks* de cada virus en células HeLa H1, empleando el ensayo de calvas o el de focos de infección según el virus en cuestión (véase Metodología). Así pues, para calcular los valores de V_t/V_0 fue necesario tomar muestras de las infecciones al tiempo deseado, cuantificar sus títulos (V_t) y normalizarlos por la cantidad de partículas infecciosas en el inóculo. El número promedio inicial de viriones en las células infectadas, es decir, la multiplicidad de infección celular, se estimó como $V_0 = m/(1-e^{-m})$. Esto equivale a la m promediada asumiendo una distribución de Poisson para

Capítulo 1. Infección colectiva y dinámica viral

el número de partículas infecciosas por célula y excluyendo la fracción de células no infectadas (nótese que $Poisson(n=0, \lambda=m) = e^{-m}$).

Es necesario matizar dos aspectos clave de la toma de muestras. Por un lado, se muestrearon varios tiempos que corresponden al primer ciclo de infección. El más temprano analizado es el mínimo muestreado en el cual fue posible detectar crecimiento del virus en todas las condiciones de multiplicidad o densidad viral. Por otro lado, se tuvo en cuenta la diferencia fundamental en la liberación de progenie entre virus envueltos y no envueltos. Mientras que los virus envueltos (como VSV, RSV, VacV, pero también HIV-1, HCV y IVA) suelen liberar las partículas por gemación continua a lo largo del ciclo, los virus no envueltos (como CVB3 y hAdV5) tienden a acumular los viriones maduros en el interior celular hasta que se produce la lisis. Nuestras predicciones sugieren que el efecto de la replicación cooperativa puede debilitarse e incluso desvanecerse de la progenie viral en este último caso. Por ello, para los virus líticos (CVB3 y hAdV5) se tomaron muestras del sobrenadante de infección (como en el resto de virus), pero también del cultivo completo tras homogenizarlo mediante varios ciclos de congelación-descongelación. Esto permitió cuantificar tanto los viriones maduros liberados como los viriones totales producidos.

Para extender más nuestro análisis incluimos datos experimentales de libre acceso procedentes de una publicación previa realizada con IVA (Jacobs et al., 2019). Esto añade un nuevo tipo de virus a nuestro conjunto: envuelto y con genoma segmentado de ARN de polaridad negativa. Los datos brutos de IVA se obtuvieron en el trabajo original mediante un ensayo similar al nuestro en el que infectaron células MDCK a distintas densidades virales (m) y cuantificaron la progenie en el sobrenadante del cultivo a distintos tiempos.

Al menos para uno de los tiempos analizados, la V_t/V_0 calculada a partir de la progenie total de los virus no envueltos y de la liberada por los envueltos se maximizó para algún valor intermedio de V_0 , de acuerdo con las predicciones de nuestro modelo sencillo (**Fig. 1.14**). El caso de VacV podría ser la excepción, ya que el valor óptimo de V_0 , aunque estadísticamente significativo, fue muy cercano a 1.

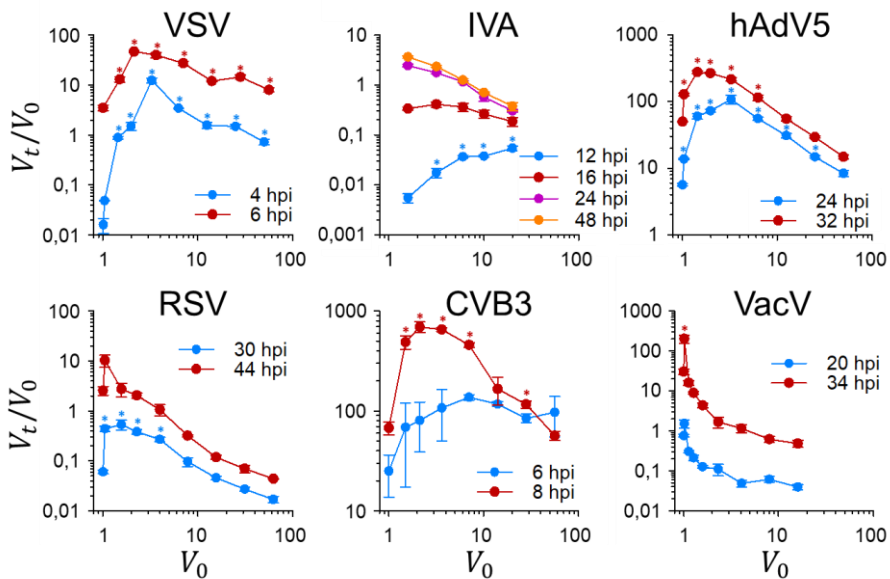


Figura 1.14. Determinación experimental del efecto cooperativo de la coinfección en la producción de progenie viral per cápita en distintos virus de mamíferos usando un mismo tipo celular (HeLa H1). Para cada virus se muestra la progenie viral per cápita (V_t/V_0) en función del número promedio de partículas infecciosas iniciales en cada célula infectada (V_0) a diferentes tiempos (horas post-infección, hpi) comprendidos dentro del primer ciclo infeccioso. Muestramos más tempranos no resultan productivos para todos los valores de V_0 ensayados, mientras que muestramos más tardíos producen funciones decrecientes de V_t/V_0 debidas a la intensa competencia por agotamiento de recursos celulares, e introducen un sesgo debido al comienzo de ciclos secundarios en las densidades virales bajas. V_t/V_0 se obtuvo al ponderar los títulos virales por el inóculo empleado y V_0 se calculó ponderando la densidad viral empleada (m) por la fracción de células infectadas asumiendo que el número de viriones por

célula sigue la distribución de Poisson, es decir, $m/(1 - e^{-m})$. Los valores de V_t/V_0 marcados con un asterisco muestran son significativamente mayores que aquel obtenido para el menor V_0 analizado (test de Welch con transformación logarítmica y corrección de Dunn-Sidak para comparaciones múltiples, $P < 0,05$).

Por otra parte, para determinar la V_t/V_0 a partir de la progenie liberada por los virus no envueltos (CVB3 y hAdV5) fue necesario muestrear tiempos más tardíos y, como esperábamos, la fuerte relación positiva entre V_t/V_0 y V_0 observada al considerar la progenie total desapareció en ambos casos (**Fig. 1.15**).

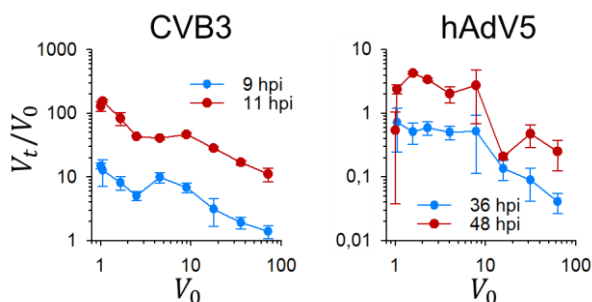


Figura 1.15. Efecto de la infección colectiva sobre la fracción extracelular de la progenie viral producida per cápita en HeLa para virus no envueltos. Se muestran resultados análogos a los presentados para CVB3 y hAdV5 en la **figura 1.14**, pero considerando únicamente la fracción de V_t/V_0 que se hallaba en el medio extracelular, para lo cual se tomaron muestras de sobrenadante de infección sin romper las células mediante ciclos de congelación-descongelación. En ningún caso se observa un valor de V_t/V_0 que resulte significativamente mayor que aquel obtenido en las mismas condiciones para el menor V_0 analizado (test de Welch con transformación logarítmica y corrección de Dunn-Sidak para comparaciones múltiples: $P > 0,05$).

Capítulo 2. Consecuencias de la agregación a corto plazo

La infección colectiva de VSV en BHK-21 y MEF

Para explorar en mayor detalle las consecuencias de la agregación sobre la eficacia viral, nos centramos en el modelo VSV. Realizamos los experimentos en dos líneas celulares con características diferentes. Los fibroblastos de riñón de hámster neonato (BHK-21) son células que presentan un crecimiento marcadamente tumoral a pesar de proceder de tejido sano. Con frecuencia se emplean para el trabajo rutinario con VSV, ya que su metabolismo es muy activo, su permisividad a la infección es elevada y no producen interferones α y β , por lo que no generan respuesta antiviral. Por el contrario, los fibroblastos de embrión de ratón (MEF) son células con comportamiento más normal, a pesar de haber sido inmortalizadas en el laboratorio (Palmero and Serrano, 2001). En comparación con BHK-21, estas células son menos activas y permisivas a la infección y son capaces de generar una respuesta antiviral potente. En consecuencia, la infectividad de VSV en MEF decae 5-10 veces y el título máximo es aproximadamente un orden de magnitud inferior.

Para comprobar el efecto de la coinfección con VSV en ambas líneas celulares, con características diferenciadas, analizamos la relación entre la multiplicidad de infección celular (V_0) y la producción temprana de progenie viral per cápita (V_t/V_0) como se muestra en el capítulo anterior para distintos virus en células HeLa H1. Al igual que entonces, inoculamos los cultivos con un rango amplio de densidades virales (entre 0,01 y 50 PFU/célula) y tomamos muestras de sobrenadante de infección a dos tiempos dentro del primer ciclo infectivo; uno muy temprano (4 hpi) y otro intermedio-tardío (6 hpi). La coinfección resultó ser cooperativa en ambos contextos celulares, pero marcadamente más intensa en el menos favorable (**Fig. 2.1**). En BHK-21 la

coinfeción solo fue beneficiosa en el tiempo 4 hpi para $V_0 < 5$ PFUs, y la progenie viral per cápita (V_t/V_0) se maximizó en $V_0 = 2$ PFUs, aproximadamente. Sin embargo, a las 4 hpi, el beneficio de coinfectar MEF fue estadísticamente significativo para a todo $V_0 > 1,58$ PFUs, y máximo en $V_0 = 3$ PFUs. A las 6 hpi la coinfección seguía siendo como mínimo neutra para $V_0 \leq 5$ PFUs, mientras que el valor de V_0 para el pico en V_t/V_0 se mantuvo invariable. Además de corroborar la observación previa de que la infección colectiva con VSV puede comportar un beneficio temprano para el virus, estos datos demuestran experimentalmente que éste depende en buena medida de las características del hospedador.

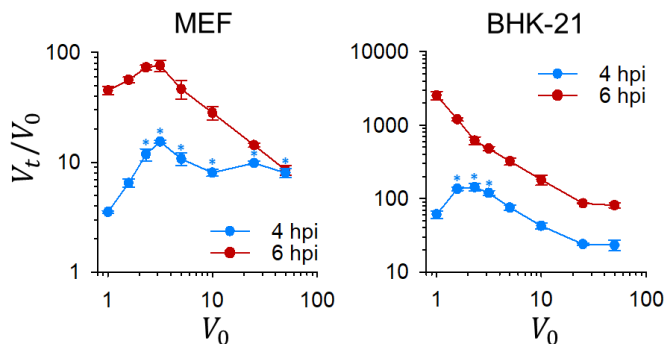


Figura 2.1 Efecto de la infección colectiva en la producción temprana de progenie viral per cápita en MEF y BHK-21. La progenie viral per cápita (V_t/V_0) se determinó para dos tiempos dentro del primer ciclo de infección (4 y 6 hpi) mediante la razón entre el título alcanzado por el cultivo al tiempo correspondiente y el título del inóculo. La multiplicidad de infección celular o V_0 , se define como el número promedio inicial de partículas virales en células infectadas. Para su cálculo se asumió que la cantidad de viriones por célula (m) sigue una distribución de Poisson, lo que permite calcular V_0 ponderando m por la fracción de células infectadas: $m/(1 - e^{-m})$. Cada punto es el promedio de tres réplicas y las barras de error representan el SEM.

El efecto de la agregación sobre la eficacia biológica viral

Como se ha indicado en la introducción de esta tesis, los viriones de VSV pueden formar agregados virales infecciosos y con capacidad para transmitir conjuntamente distintas variantes genéticas (Combe et al., 2015; Cuevas et al., 2017). No obstante, la agregación de VSV depende del fluido en el que se encuentre el virus. Por ejemplo, aunque en el medio de cultivo apenas el 1% de la población viral se encuentra agregada, esta proporción aumenta drásticamente, pudiendo sobrepasar el 90%, tras incubarla a 37 °C durante 1 h en la saliva de algunos donantes (vacas o personas; Cuevas et al., 2017). Utilizamos este procedimiento para inducir la agregación del virus con saliva humana y determinamos si los agregados de VSV también causan un aumento temprano en la progenie viral producida per cápita y, con ello, compensan su coste dispersivo. Para ello, inoculamos ambas líneas celulares (BHK-21 y MEF) con el mismo número total de viriones infecciosos individuales (5000 PFUs), pero en distinto estado: monodisperso o agregado. Los resultados de titular los sobrenadantes de infección a las 4 y 6 hpi resultaron compatibles con los obtenidos previamente al inocular viriones libres a distintas densidades virales (**Fig. 2.2**).

En BHK-21, la progenie total producida por los agregados virales respecto a la de los viriones monodispersos fue ligeramente mayor (1,2 veces) a las 4 hpi (Test de Welch: $P = 0,037$; **Fig. 2.2**) y aproximadamente igual a las 6 hpi ($P = 0,101$). Nótese que el hecho de que la progenie de los agregados sea similar a la de los viriones libres a pesar del coste dispersivo de los primeros sugiere cooperatividad durante el ciclo infeccioso. Curiosamente, en los ensayos previos a 6 hpi en BHK-21 (**Fig. 2.1**), la progenie viral per cápita disminuía para todo V_0 , por lo que cabría esperar un título claramente inferior

en las infecciones iniciadas con agregados. Entre los posibles factores que podrían causar este efecto es probablemente clave la presencia de progenie temprana de segundo ciclo en el sobrenadante, la cual no puede tener lugar en cultivos inoculados a elevada densidad viral, pero sí en estos ensayos con agregados. Por otra parte, las infecciones iniciadas por agregados virales en MEF aceleraron marcadamente la producción de progenie viral, mostrando un título promedio a las 4 hpi casi 27 veces mayor que el alcanzado por las infecciones iniciadas con viriones libres, las cuales todavía no mostraban un crecimiento neto respecto al inóculo (Test de Welch: $P < 0,001$; **Fig. 2.2**). El efecto beneficioso también se mantuvo a las 6 hpi, cuando las células inoculadas con agregados seguían produciendo aproximadamente 6,5 veces más progenie ($P < 0,001$).

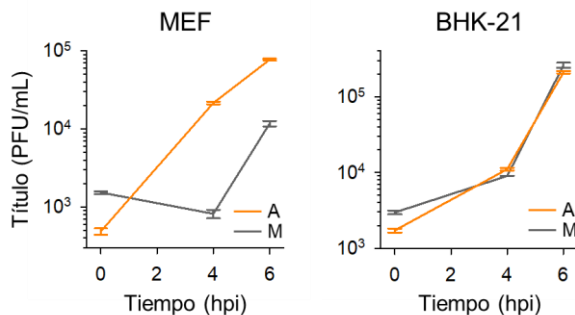


Figura 2.2 Progenie viral de primer ciclo en cultivos MEF y BHK-21 inoculados con viriones agregados (A) y monodispersos (M). El título a tiempo cero representa la cantidad de unidades infecciosas inoculadas ponderadas por el volumen de sobrenadante (2 ml). Los resultados corresponden a tres réplicas experimentales y las barras de error representan el SEM.

Para analizar mejor cómo la transmisión en agregados determina la eficacia biológica viral competimos dos poblaciones de VSV, cada una diferenciable de la otra por codificar un marcador fluorescente distinto (GFP o mCherry). Estas competencias son conceptualmente muy similares a las

Capítulo 2. Consecuencias de la agregación a corto plazo

realizadas *in silico* con el modelo multiescala en el capítulo anterior. Para ello, agregamos VSV-GFP con saliva, mantuvimos VSV-mCherry monodisperso (sin incubar en saliva), y los mezclamos a una ratio 1:1 de partículas infecciosas totales que cuantificamos previamente al tratamiento con saliva mediante el ensayo en placa. Con esta mezcla inoculamos BHK-21 y MEF a baja densidad viral ($< 0,02$ PFU/célula o, aproximadamente 5000 partículas infecciosas totales). El progreso de la infección se monitorizó empleando un sistema de microscopía de fluorescencia a tiempo real hospedado en el interior de un incubador (véase Metodología). Los cultivos se mostraron completamente infectados tras aproximadamente 24 hpi. En ese momento, la fracción del área fluorescente de la monocapa que correspondía a la población GFP fue del $58,9 \pm 0,1$ % en BHK-21 y del $71,3 \pm 3$ % en MEF. Sin embargo, al realizar el ensayo a la inversa, compitiendo VSV-GFP monodisperso contra VSV-mCherry agregado, la fluorescencia GFP respecto al total descendió al $50,3 \pm 0,2$ % en BHK-21 y al $29,3 \pm 2$ % en MEF (**Fig. 2.3A**). Este descenso fue significativo en ambos casos (Test de Welch: $P < 0,001$), indicando que un mismo número de partículas virales obtienen mayor eficacia biológica en competencia si inician la infección de forma agregada.

La microscopía de fluorescencia a tiempo real también permitía tomar datos de la progresión de la infección en los cultivos, permitiendo comparar las curvas de propagación (o de invasión del cultivo) de los virus agregados frente a los monodispersos. Para ello, obtuvimos datos de fluorescencia a distintos tiempos, a partir de cultivos inoculados con 5000 viriones infecciosos en estado agregado o monodisperso, y los ajustamos a un modelo de crecimiento logístico. A partir de los parámetros del modelo ajustado se calculó el tiempo de invasión media del cultivo ($t_{1/2}$; véase Metodología), es

decir, el tiempo promedio que tarda el virus en propagarse y emitir fluorescencia en la mitad de la superficie de la monocapa de cultivo. Se observó que los virus agregados aceleraban la infección adelantando $t_{1/2}$ más de 2 h en MEF ($16,7 \pm 0,2$ h en los agregados frente a $19,1 \pm 0,1$ h los virus libres; Test de Welch: $P = 0,002$; **Fig. 2.3B**). En cambio, en BHK-21, los agregados compensaban el coste en la dispersión, pero no eran capaces de adelantar significativamente $t_{1/2}$ ($13,1 \pm 0,3$ h en los agregados frente a $13,7 \pm 0,04$ h en los virus libres; $P = 0,164$; **Fig. 2.3B**).

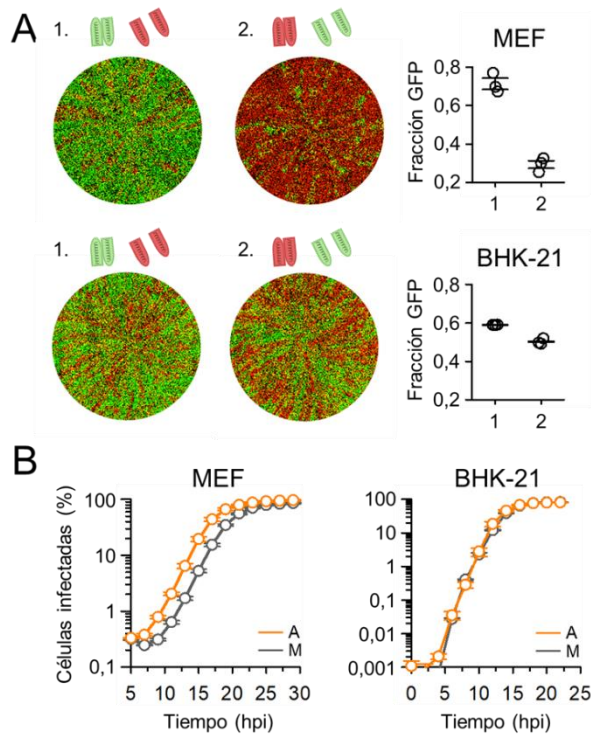


Figura 2.3 La agregación de VSV contribuye positivamente a la eficacia biológica viral en MEF y BHK-21. A. Ensayos de competencia entre agregados virales y viriones libres inoculados en MEF y BHK-21. Los cultivos se coinocularon con una misma cantidad de viriones totales de (1) VSV-GFP agregado y VSV-mCherry monodisperso, o (2) VSV-GFP monodisperso y VSV-mCherry agregado. La invasión

Capítulo 2. Consecuencias de la agregación a corto plazo

del cultivo se analizó mediante microscopía de fluorescencia a tiempo real. Las imágenes mostradas corresponden al estado de la monocapa de una de las tres réplicas realizadas tras aproximadamente 24 hpi. Los gráficos de la derecha indican la fracción de fluorescencia GFP respecto del total para las tres réplicas y las barras de error muestran el SEM. **B.** Curvas de invasión de la monocapa completa de cultivos MEF y BHK-21 inoculados con viriones agregados (A) o monodispersos (M). El porcentaje de células infectadas a cada tiempo se determinó analizando el área fluorescente mediante microscopía de fluorescencia a tiempo real de toda el área cultivada. Cada punto corresponde al promedio de tres réplicas y las barras de error muestran el SEM.

El efecto de la agregación sobre la capacidad dispersiva viral

Asumimos que la agregación comporta un coste dispersivo debido a que al agrupamiento de partículas virales debería dar lugar, en principio, a un número menor de unidades infecciosas. Sin embargo, esto podría no ser así si la infectividad de los agregados es notablemente superior a la de los viriones libres. Para analizar si el número de células que un conjunto de viriones puede infectar disminuye tras la agregación, comparamos el número de focos de infección producidos al inocular cultivos de BHK-21 y de MEF con una mezcla equilibrada de VSV-GFP y VSV-mCherry antes y después de incubarla en saliva. En ambas líneas celulares, a pesar del bajo número de viriones inoculados, una gran proporción de los focos mostraron doble fluorescencia GFP y mCherry (focos bicolors), confirmando la formación de agregados infecciosos que liberan múltiples genomas virales al penetrar en la célula (**Fig. 2.4**). Aunque, como cabría esperar, la agregación redujo el número de focos de infección en BHK-21, sorprendentemente no lo hizo en MEF.

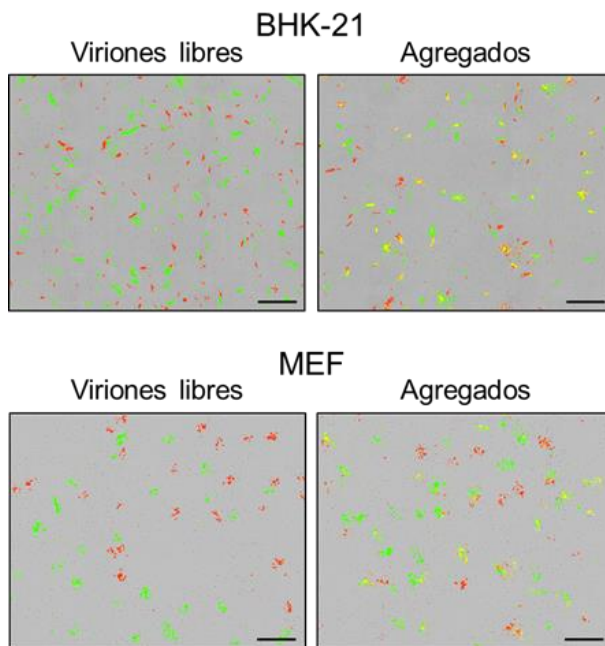


Figura 2.4 Focos de infección producidos por una misma cantidad de viriones en estado monodisperso o agregado en cultivos de BHK-21 y MEF. VSV-GFP y VSV-mCherry se mezclaron previamente a la agregación, lo que permite su asociación que se percibe como focos bicolors (amarillentos). Las imágenes fueron tomadas a las 10 hpi en BHK-21 y a las 14 hpi en MEF. La monocapa de células de muestra en contraste de fases y la barra de escala representa 1 mm.

Para explorar con mayor precisión el efecto de la agregación sobre la cantidad y el crecimiento de los focos, repetimos la infección de monocapas de $9,6 \text{ cm}^2$ (w6) con un inóculo mínimo de aproximadamente 100 partículas infecciosas. De esta manera aseguramos la visualización de focos individuales para contar las células infectadas en cada uno de ellos a distintos tiempos tempranos. A las 5 hpi en BHK-21, los agregados produjeron 19 focos de $2,2 \pm 0,4$ células infectadas en promedio, mientras que los viriones libres formaron 66 focos de menor tamaño ($1,1 \pm 0,04$ células; Test de Welch de los tamaños log-transformados, $P = 0,006$; **Fig. 2.5A**). A las 8 hpi observamos

Capítulo 2. Consecuencias de la agregación a corto plazo

resultados similares, pues los agregados formaron aproximadamente 3,5 veces menos focos que los viriones libres (20 frente a 66 focos), aunque con alrededor del doble de células infectadas por foco ($41,8 \pm 11,4$ células frente a $19,6 \pm 2,0$; $P = 0,007$). Por otro lado, a las 6 hpi en MEF, observamos que los virus monodispersos solo habían infectado 9 células individuales, mientras que los agregados ya habían alcanzado 30 células repartidas en 21 focos de infección con tamaño medio de $1,4 \pm 0,2$ células (**Fig. 2.5B**; $P = 0,031$). En cambio, a las 12 hpi, encontramos que el número de focos en los cultivos infectados con viriones libres era similar al de los inoculados con agregados (28 y 26, respectivamente), y que éstos últimos mostraban focos con tamaños medios ligera, pero no significativamente mayores ($31,5 \pm 2,8$ y $38,7 \pm 4,0$ células, respectivamente; $P = 0,236$).

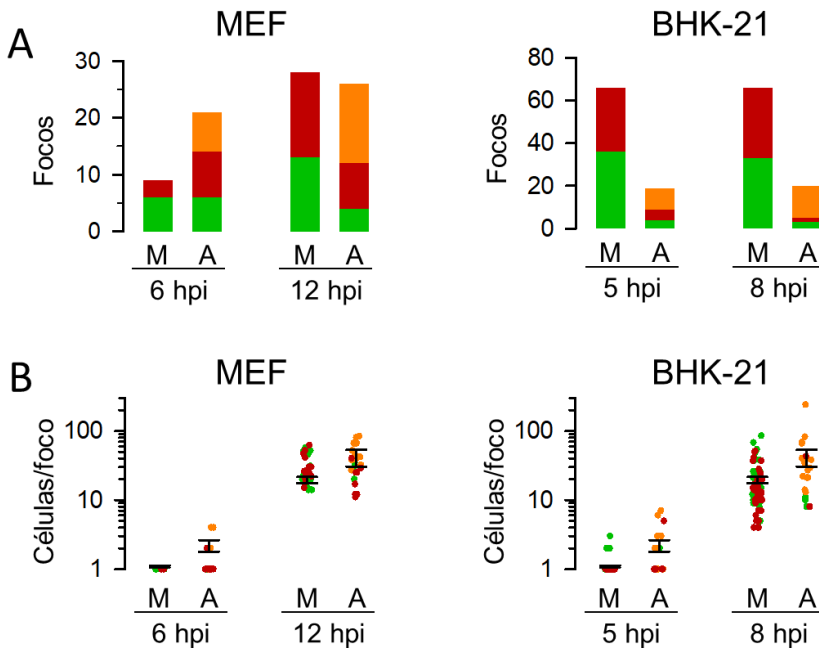


Figura 2.5 Análisis de focos de infección y efecto de la agregación sobre la infectividad. **A.** Número de focos de infección determinados a distintos tiempos en BHK-21 y MEF. Las barras indican el total de focos de infección clasificados según la fluorescencia mostrada: mCherry (rojo), GFP (verde) o mixta (naranja). **B.** Número de células infectadas en cada foco a distintos tiempos en BHK-21 y MEF. Cada punto representa un foco y las barras de error muestran el SEM asociado al valor promedio de cada condición. Obsérvese que los focos mixtos (naranja) tienden a ser más grandes que aquellos monocolor.

El efecto positivo de la agregación y permisividad celular

Todos los resultados obtenidos hasta ahora apoyan nuestra hipótesis de que los agregados tienden a ser más beneficiosos cuando las células imponen unas condiciones más adversas para la replicación viral. Recapitulando, hemos observado que en células MEF la infección colectiva, tanto mediada por agregados virales como por una elevada densidad viral, produce una ventaja en la producción temprana de progenie viral per cápita más intensa y duradera que en BHK-21. Además, en los ensayos de competencia, los agregados también causan un efecto positivo mayor en la eficacia biológica viral cuando infectan células MEF. Más aún, los análisis de curvas de propagación y de focos de infección revelan que sólo cuando los agregados virales infectan células MEF provocan un adelanto significativo en el tiempo de invasión media del cultivo y una mejora drástica de la infectividad, respectivamente.

A fin de examinar en mayor detalle el efecto de las barreras tempranas impuestas por el hospedador sobre la eficacia biológica de los agregados incorporamos otras seis líneas celulares. Así pues, incluimos en nuestro análisis células tumorales de ratón procedentes de cáncer mamario metastásico (4T1, epiteliales), cáncer de colon (CT26, fibroblastos) y neuroblastoma (Neuro2a, neuroblastos); células humanas procedentes de

Capítulo 2. Consecuencias de la agregación a corto plazo

adenocarcinoma pulmonar (A549, epitelio alveolar) y de tejido pulmonar sano (MRC5, fibroblastos), y células de riñón de mono verde africano (Vero, epiteliales). En esta ocasión sólo reproducimos los ensayos de competencia con las variantes virales fluorescentes (VSV-GFP y VSV-mCherry), y cuantificamos la producción temprana de progenie viral a 4 y 6 hpi. Además, a fin de poder correlacionar los resultados de estos ensayos con el grado de permisividad a la infección de las distintas líneas celulares, cuantificamos la eficiencia del virus para formar focos de infección (infectividad) en cada una de ellas. De esta manera, estimamos la permisividad celular calculando la razón entre los focos generados y las partículas virales inoculadas (totales, no únicamente infecciosas). Para ello, estimamos la concentración de partículas virales de VSV en nuestros *stocks* mediante la técnica física conocida como análisis del seguimiento de nanopartículas (NTA; véase Metodología).

En los ensayos de competencia medimos la fracción GFP de la fluorescencia total a tiempo final de la infección, como habíamos hecho previamente. Con ello, estimamos la eficacia biológica del agregado mediante la razón entre la fracción GFP alcanzada al agregar VSV-GFP frente a la alcanzada al agregar VSV-mCherry. De esta manera, observamos que iniciar la infección con agregados proporcionaba una ventaja competitiva en células MRC5, CT26, A549 y 4T1 (además de BHK-21 y MEF), mientras que resultaba perjudicial en células Vero y Neuro2a (**Fig. 2.6; Tabla 2.1**; Test de Welch: $P < 0,001$ en todos los casos). Cabe resaltar que los agregados mostraron mayor ventaja en MEF y en MRC5, es decir, en las dos únicas líneas celulares analizadas que no proceden de tejido tumoral y no albergan grandes alteraciones genéticas. Las estimaciones de eficacia biológica del agregado correlacionaron inversamente con los valores de infectividad de

VSV obtenidos en cada línea celular (Correlación de Pearson en escala log: $r = -0,770$; $P = 0,025$; **Fig. 2.7**), indicando así un mayor beneficio de agregar al infectar células menos permisivas.

En los ensayos de producción temprana de progenie viral, la mayoría de células inoculadas con viriones libres no produjeron progenie detectable a las 4 hpi, mientras que los agregados tendían a ser ligeramente más productivos salvo en células Neuro2a (Tabla 2.1). A las 6 hpi, el efecto de la agregación sobre los títulos virales fue más fácil de cuantificar, y mostró un aumento significativo en MEF y en MRC5 (Test de Welch: $P < 0,05$), y una reducción en Neuro2a, Vero y 4T1 ($P < 0,05$; Tabla 2.1). En general, la agregación aceleró la producción de progenie viral a 6 hpi en las células menos productivas, ya que la razón entre los títulos producidos por los inóculos agregados y monodispersos también correlacionó inversamente con la infectividad ($r = -0,795$; $P = 0,018$; **Fig. 2.7**). Por lo tanto, observamos, una vez más, que la transmisión agregada tiende a resultar más favorable cuando las células oponen resistencia a la infección.

Capítulo 2. Consecuencias de la agregación a corto plazo

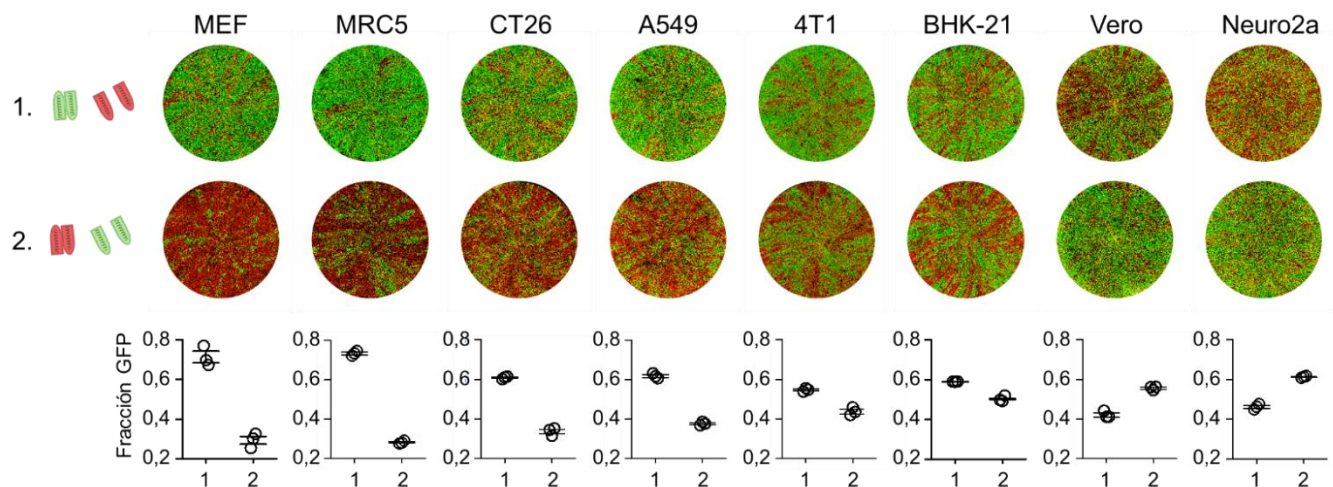


Figura 2.6 Efecto de la agregación en la eficacia biológica viral en distintas líneas celulares. Ensayos de competencia entre agregados virales y viriones libres inoculados en MEF y BHK-21. Los cultivos se coinocularon con una misma cantidad de viriones totales de (1) VSV-GFP agregado y VSV-mCherry monodisperso, o (2) VSV-GFP monodisperso y VSV-mCherry agregado. La invasión del cultivo se analizó mediante microscopía de fluorescencia a tiempo real. Las imágenes mostradas corresponden al estado de la monocapa en el tiempo de máxima fluorescencia total en una de las tres réplicas realizadas. Los gráficos subyacentes indican la fracción de fluorescencia GFP respecto del total para las tres réplicas y las barras de error muestran el SEM. Los valores de eficacia biológica obtenidos de estos ensayos se proporcionan en la **Tabla 2.1**. Con estos valores se calculó la eficacia del agregado (f) como la ratio entre la fracción GFP obtenida en la condición (1) y la obtenida en la condición (2).

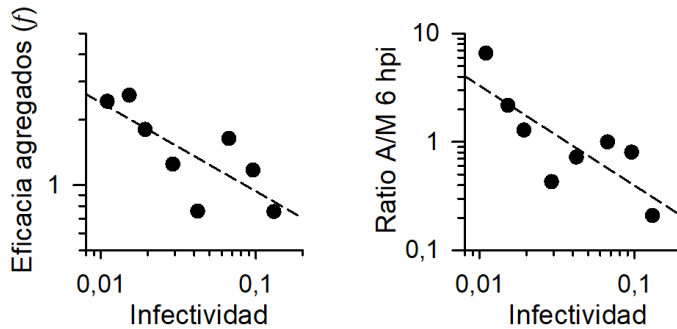


Figura 2.7 Los efectos de la agregación en la eficacia biológica viral correlacionan negativamente con la permisividad celular. Cada punto corresponde al valor promedio de tres réplicas obtenido en una de ocho líneas celulares (MEF, BHK-21, MRC5, 4T1, CT26, A549, Vero y Neuro2a), y la línea discontinua representa la recta de regresión lineal. En la izquierda se correlaciona la eficacia del agregado (f) obtenida en los ensayos de competencia (véase **Figura 2.6**), y la infectividad o capacidad de las partículas virales para producir focos de infección en cada línea celular (véase texto y Metodología para más detalles). En la derecha, se correlaciona la infectividad con la ratio generada por un inóculo en estado agregado (A) o monodisperso (M) a las 6 hpi. Todos los datos empleados para cada línea celular pueden hallarse en la **Tabla 2.1**.

El efecto positivo de la agregación y respuesta antiviral

La capacidad de un cultivo dado para alzar una potente respuesta antiviral es uno de los factores que limitan con mayor intensidad la proliferación de VSV. Para explorar la relación entre la eficacia biológica de los agregados y la respuesta inmunitaria innata de la célula, empleamos la variante VSV- $\Delta 51$. Esta variante presenta una deleción en la metionina 51 de la proteína de matriz (M), que le impide bloquear el transporte núcleo-citoplasma y, con ello, inhibir la expresión génica celular y la respuesta antiviral de la célula (Ahmed et al., 2003; Rajani et al., 2012; Redondo et al., 2015). Por ello, VSV- $\Delta 51$ es una variante atenuada en células normales, pero no en aquellas con defectos en su capacidad inmunitaria innata, como ocurre con muchas líneas tumorales (Lichty et al., 2004; Stojdl et al., 2003).

Capítulo 2. Consecuencias de la agregación a corto plazo

Aprovechando esta propiedad obtuvimos información sobre la capacidad de cierta línea celular para generar una respuesta antiviral frente a VSV comparando los títulos alcanzados por VSV-WT y VSV- Δ 51 a tiempo final (24 hpi, **Tabla 2.1**). Así pues, la ratio de los títulos virales WT/ Δ 51 obtenidos para cada línea celular mediante esta estrategia correlacionó positivamente con la eficacia biológica de los agregados, sugiriendo que la infección por agregados favorece que el virus se adelante y supere la respuesta inmunitaria innata de la célula ($r = 0,722$; $P = 0,043$; **Fig. 2.8A**).

Otra forma posiblemente más directa de determinar si la agregación realmente favorece que el virus se adelante a la respuesta antiviral consiste en estimular los cultivos con interferón β y otras citoquinas previamente a la infección. Para ello, primero obtuvimos un medio rico en citoquinas e interferones inoculando células MEF con VSV- Δ 51 y filtrando el sobrenadante de infección por membranas de 50 nm de diámetro para eliminar la progenie viral (véase Metodología). Después, utilizamos este medio para estimular un nuevo cultivo MEF durante 1 h antes de inocular el virus. Debido a la activación de la respuesta innata de las células, la propagación de VSV fue muy ineficiente y el título alcanzado por el virus a tiempo final se redujo en más de dos órdenes de magnitud respecto a cultivos no estimulados ($< 10^6$ frente a $>10^8$ PFU/ml; **Fig. 2.8B**). En estas condiciones, la aceleración del ciclo infectivo causada por los agregados virales les permitió superar en cinco veces el título final (48 hpi) alcanzado por los viriones libres (Test de Welch: $P = 0,006$), mientras que los títulos finales fueron similares en las células no estimuladas ($P = 0,097$). Por lo tanto, el beneficio de la agregación se exacerbó al inducir una fuerte respuesta antiviral.

Es posible prever al menos dos posibles maneras de que la agregación mejore el rendimiento del virus en células con capacidad de respuesta

antiviral. Por un lado, favoreciendo un bloqueo más rápido de dicha respuesta y, por otro lado, permitiendo que el virus disperse antes de que las células vecinas tengan tiempo de alzar una barrera inmunitaria. Sin embargo, probablemente sólo el segundo caso tiene relevancia para VSV, ya que un único virus limita la expresión génica celular mucho antes de que la célula pueda bloquear la infección, por lo que los efectos de la respuesta antiviral tienden a manifestarse en los ciclos infectivos subsiguientes (Domingo-Calap et al., 2019; Segredo-Otero and Sanjuán, 2020; Voigt et al., 2016).

Para determinar la relevancia del bloqueo de la respuesta antiviral, inoculamos células MEF con viriones libres o agregados virales y medimos los niveles de expresión del gen *Mx2* de ratón a las 6 hpi mediante RT-qPCR. Este gen se expresa en respuesta al interferón inducido por el virus y da lugar a la proteína Mx2 del ratón, una GTPasa citoplasmática de gran tamaño con una potente capacidad inhibitoria de la replicación viral (Meier et al., 1990; Sadler and Williams, 2008). En ambos casos, la expresión de este gen fue más de mil veces inferior a la del gen de la actina β (*Actb*), que fue empleado como control interno, indicando que los beneficios de la agregación preceden a la respuesta antiviral y no son consecuencia de su bloqueo. Además, la expresión de *Mx2* fue significativamente mayor en las células infectadas con agregados que en las infectadas con viriones monodispersos (\log_{10} de los niveles de expresión de *Mx2/Actb*: $-3,926 \pm 0,039$ frente a $-4,316 \pm 0,114$; Test de Welch: $P = 0,032$). Por lo tanto, los resultados parecen indicar que la agregación no contribuye a un bloqueo más eficaz de la respuesta antiviral, que parece simplemente aumentar con los niveles de replicación.

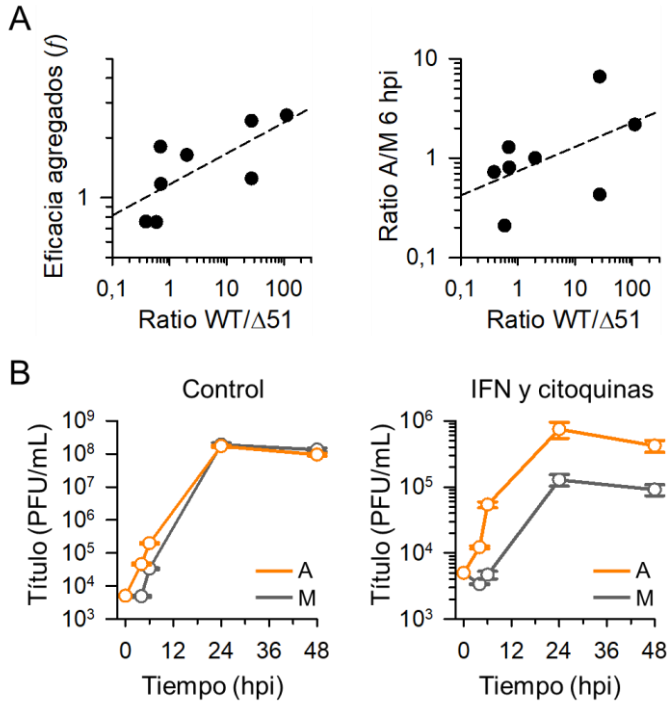


Figura 2.8 Los efectos de la agregación en la eficacia biológica viral dependen de la capacidad inmunitaria innata de la célula. **A.** La eficacia biológica viral (f ; izquierda) y progenie a 6 hpi (derecha) relativas al agregado correlacionan positivamente con la ratio entre los títulos finales (24 hpi) alcanzados por VSV WT y el mutante Δ 51, la cual sirve de indicador de la capacidad inmunitaria de la célula (véase texto). Cada punto corresponde al valor promedio de tres réplicas obtenido en una de ocho líneas celulares (MEF, BHK-21, MRC5, 4T1, CT26, A549, Vero y Neuro2a), y la línea discontinua representa la recta de regresión lineal. Los datos empleados para cada línea celular pueden hallarse en la **Tabla 2.1**. **B.** Curvas de crecimiento obtenidas al inocular células MEF con una misma cantidad de viriones en estado agregado (A) o monodisperso (M) en condiciones normales (control) y tras una hora de inducción de la respuesta antiviral con medio rico en interferones y citoquinas (véase Metodología). Cada punto representa el promedio de tres réplicas experimentales y las barras de error muestran el SEM.

Tabla 2.1 El beneficio de la agregación sobre la eficacia biológica viral depende de la permisividad a la infección y a la inmunidad innata de la célula.

	Título 4 hpi ($\times 10^4$)		Título 6 hpi ($\times 10^4$)		Ensayos de competencia (% GFP/total)		Eficiencia en la formación de focos % focos/partícula ^c	Título tiempo final ($\times 10^8$)	
	M	A	M	A	A-GFP vs. M-mCherry ^a	A-mCherry vs. M-GFP ^b		WT	$\Delta 51$
MEF	Inoc ^d	2.16 \pm 0.09	1.18 \pm 0.09	7.75 \pm 0.22	71.3 \pm 3.0	29.3 \pm 2.0	1.10 \pm 0.15	1.52 + 0.10	0.056 + 0.010
MRC5	Inoc ^d	Inoc ^d	5.52 \pm 0.26	12.0 \pm 1.8	73.3 \pm 0.7	28.3 \pm 0.4	1.52 \pm 0.10	4.97 + 0.65	0.045 + 0.011
CT26	Inoc ^d	1.52 \pm 0.19	40.2 \pm 2.9	51.7 \pm 3.0	60.8 \pm 0.4	33.7 \pm 1.1	1.93 \pm 0.31	1.97 + 0.38	2.83 + 0.34
A549	1.15 \pm 0.08	4.17 \pm 0.15	141 \pm 16	141 \pm 3	61.9 \pm 0.7	37.7 \pm 0.5	6.69 \pm 0.26	5.15 + 0.21	2.57 + 0.17
4T1	Inoc ^d	Inoc ^d	46.5 \pm 6.7	20.0 \pm 2.5	54.6 \pm 0.5	43.7 \pm 1.1	2.91 \pm 0.21	5.00 + 0.20	0.185 + 0.061
BHK-21	3.60 \pm 0.03	4.43 \pm 0.19	261 \pm 20	210 \pm 8	58.9 \pm 0.1	50.3 \pm 0.2	9.55 \pm 0.51	13.0 + 1.76	18.3 + 2.4
Vero	Inoc ^d	Inoc ^d	72.0 \pm 5.1	52.2 \pm 1.9	42.1 \pm 1.0	55.6 \pm 0.6	4.21 \pm 0.98	1.33 + 0.16	3.42 + 0.26
Neuro2a	2.22 \pm 0.53	1.68 \pm 0.27	202 \pm 21	42.2 \pm 4.7	46.2 \pm 0.8	61.2 \pm 0.3	13.0 \pm 0.2	11.8 + 1.9	20.2 + 1.6

^aPorcentaje de la fluorescencia total debida al GFP en los ensayos de competencia entre viriones iniciales agregados de VSV-GFP y monodispersos de VSV-mCherry.

^bPorcentaje de la fluorescencia total debida al GFP en los ensayos de competencia entre viriones iniciales agregados de VSV-mCherry y monodispersos de VSV-GFP.

^cPorcentaje de partículas virales que producen focos. Las partículas virales se cuantificaron mediante análisis del seguimiento de nanopartículas (*nanoparticle tracking analysis, NTA*), y los focos se visualizaron por microscopía de fluorescencia.

^dTítulo igual o inferior al del inóculo ($0,5 \times 10^4$ PFU/ml).

La complementación genética no promueve la ventaja del agregado

Hasta ahora hemos asumido que el efecto positivo de la agregación sobre la eficacia biológica viral es consecuencia, fundamentalmente, del efecto masa de la infección colectiva. La relación positiva entre la multiplicidad de infección celular y la producción temprana de progenie viral per cápita observada en BHK-21 y MEF (y HeLa H1 en el capítulo anterior) apoya esta hipótesis. Esto nos lleva a asumir que el mecanismo principal que genera los beneficios de la agregación es la replicación cooperativa. No obstante, como hemos comentado en la introducción de esta tesis, además del efecto masa, la coinfección también puede promover la cooperación basada en diversidad. En particular, la complementación es el mecanismo más sencillo propuesto, a veces bajo el pseudónimo de reactivación por multiplicidad (Andino and Domingo, 2015; Sanjuán and Thoulouze, 2019), que debería permitir a los virus obtener al menos una parte del beneficio de coinfectar. De acuerdo con ello, una fracción de los viriones con defectos génicos o estructurales podría rescatarse al agregar junto a otros viriones que no compartiesen esos mismos defectos. Por lo tanto, esta sería una manera alternativa a la replicación cooperativa (pero no incompatible con ella) de que la agregación incremente la proporción de genomas virales que inician la infección con éxito.

Dado que este proceso debería correlacionarse con la carga mutacional de la población viral, para estudiar el posible papel de la complementación genética en nuestros resultados, sometimos al virus a mutagénesis química a través de tres infecciones seriadas en presencia del mutágeno 5-fluorouracilo (5-FU), ya empleado en otras ocasiones con este mismo fin (Quer et al., 2001; Sanjuán et al., 2007; véase Metodología). Tras

mutagenizar poblaciones separadas de VSV-GFP y VSV-mCherry, repetimos los ensayos de competencia en MEF. Estas poblaciones mutagenizadas mostraron una señal fluorescente más tenue y su propagación fue más lenta de lo habitual, indicando mayor presencia de variantes virales deletéreas. Sin embargo, la agregación no tuvo un efecto significativo sobre la eficacia biológica viral, ya que la fluorescencia GFP respecto de la total a tiempo final (34 hpi) fue del $60,0 \pm 3,4$ % al competir VSV-GFP agregado y VSV-mCherry monodisperso, y del $65,2 \pm 2,0$ % al competir VSV-mCherry agregado y VSV-GFP monodisperso (Test de Welch: $P = 0,261$; **Fig. 2.9A**). Además, las curvas de propagación del virus por la monocapa mostraron que la agregación ralentizaba la invasión del cultivo, reduciendo tanto la tasa de intrínseca de crecimiento (r ; $0,553 \pm 0,009$ frente a $0,315 \pm 0,012$; Test de Welch: $P < 0,001$) como el área máxima fluorescente (P_M ; $58,1 \pm 2,0$ % frente a $20,0 \pm 1,6$ %; $P < 0,001$; **Fig. 2.9B**). Por lo tanto, incrementar la carga mutacional de la población viral no sólo no mejoró, sino que invirtió los efectos positivos de la agregación, refutando que la coinfección resulte selectivamente ventajosa debido a la complementación genética.

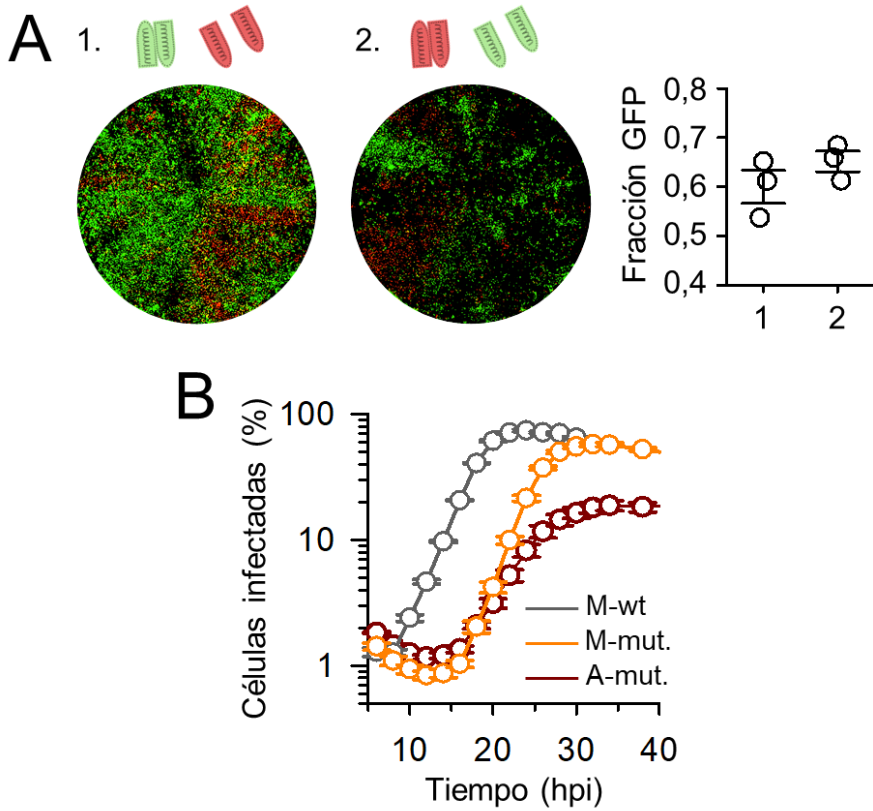


Figura 2.9 Los agregados virales reducen la eficacia biológica viral en poblaciones mutagenizadas. **A.** Ensayos de competencia en MEF entre agregados virales y viriones libres procedentes de poblaciones mutagenizadas químicamente con 5-fluorouracilo (véase Metodología). Los cultivos se coinocularon con una misma cantidad de viriones mutagenizados totales de (1) VSV-GFP agregado y VSV-mCherry monodisperso, o de (2) VSV-GFP monodisperso y VSV-mCherry agregado. La invasión del cultivo se analizó mediante microscopía de fluorescencia a tiempo real. Las imágenes corresponden al estado de la monocapa a las 34 hpi en una de las tres réplicas realizadas. El gráfico de la derecha indica la fracción de fluorescencia GFP respecto del total para las tres réplicas y las barras de error muestran el SEM. **B.** Curvas de invasión de la monocapa completa de células MEF inoculadas con los viriones no mutagenizados en estado monodisperso (M-wt), y mutagenizados en estado monodisperso (M-mut) y agregado (A-mut). El porcentaje de células infectadas a cada tiempo se determinó analizando el área fluorescente mediante microscopía de fluorescencia a tiempo real de toda el área cultivada. Cada punto corresponde al promedio de tres réplicas y las barras de error muestran el SEM.

La agregación sin saliva también acelera la infección

El estudio de los posibles beneficios vehiculares que pueden derivarse de los agregados virales de VSV está más allá del alcance de esta tesis. Sin embargo, existe la posibilidad de que parte de los beneficios de la agregación que hemos observado se deban a la utilización de saliva para inducirla. La saliva es una sustancia compleja con variedad de proteínas y sales. Al desconocer exactamente cómo promueve la asociación de viriones de VSV no cabe descartar que alguno de sus componentes incremente la infectividad y/o promueva la proliferación de los agregados al margen de la replicación cooperativa. En principio, no es esperable que la saliva produzca un efecto generalizado sobre el cultivo celular, porque ésta se diluye más de mil veces antes de inocular los virus y, en caso de no ser suficiente, en los ensayos de competencia debería afectar de igual modo a los virus monodispersos. Por tanto, si la saliva confiere un beneficio vehicular a los agregados virales, tendría que deberse a algún componente que permanece asociado a los viriones agregados. De esta manera, el efecto de la saliva quedaría confinado a aquellas células infectadas por agregados.

Para tratar de comprobar esta hipótesis, aprovechamos que las suspensiones virales de VSV a títulos elevados ($> 10^{11}$ PFU/ml) obtenidas por purificación en gradiente de densidad con iodixanol (OptiPrep) agregan espontáneamente en ese medio al incubarlas a 37°C (Cuevas et al., 2017, véase Metodología). Sin embargo, a diferencia de la saliva, este medio con iodixanol degrada fuertemente los viriones durante la incubación. Para tener en cuenta esta degradación, la cuantificamos diluyendo el virus en dicho medio hasta alcanzar una concentración de 10^5 PFUs/ml, lo cual evita la agregación. Después, cuantificamos la pérdida de título con el tiempo de incubación.

Capítulo 2. Consecuencias de la agregación a corto plazo

Además, estudiamos los niveles de coinfección mixta al agregar por este método una mezcla equilibrada de VSV-GFP y VSV-mCherry a distintos tiempos, y lo comparamos con la agregación con saliva. De este modo, determinamos que un tiempo de incubación de 30 minutos resultaba óptimo, pues producía un grado de coinfección similar al obtenido con saliva a la vez que minimizaba la exposición a la degradación. Finalmente, repetimos los ensayos de competencia en MEF, corrigiendo el inóculo para competir el mismo número de viriones agregados que monodispersos, y cuantificamos la producción temprana de progenie viral a 4 y 6 hpi.

Al competir VSV-GFP agregado frente a VSV-mCherry monodisperso el $43,9 \pm 3,8$ % de la señal fluorescente total correspondía al GFP tras 24 hpi, mientras que el porcentaje se redujo al $33,4 \pm 0,2$ % cuando el competidor agregado era VSV-mCherry (Test de Welch: $P = 0,107$; t-test: $P = 0,049$; **Fig. 2.10**). Aunque el resultado de la competencia no es estadísticamente significativo debido a la variabilidad en la señal de la condición VSV-GFP agregado, todavía se percibe un efecto beneficioso de la agregación en la eficacia biológica viral, tanto en los datos cuantitativos como al inspeccionar visualmente las imágenes tomadas.

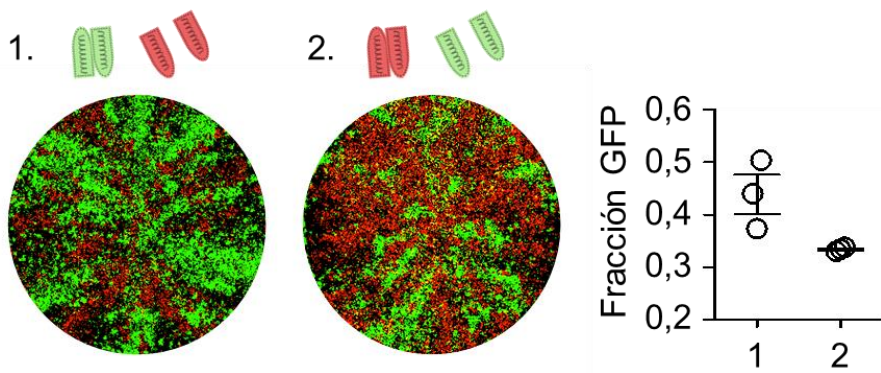


Figura 2.10 Efecto de la agregación espontánea de VSV (en ausencia de saliva) sobre la eficacia biológica viral. Ensayos de competencia en células MEF entre viriones libres y agregados en ausencia de saliva (véase texto y Metodología para más detalle). Los cultivos se coinocularon con una misma cantidad de viriones totales de (1) VSV-GFP agregado y VSV-mCherry monodisperso, o de (2) VSV-GFP monodisperso y VSV-mCherry agregado. La invasión del cultivo se analizó mediante microscopía de fluorescencia a tiempo real. Las imágenes corresponden al estado de la monocapa a las 24 hpi en una de las tres réplicas realizadas. El gráfico de la derecha indica la fracción de fluorescencia GFP respecto del total para las tres réplicas y las barras de error muestran el SEM.

Al cuantificar la progenie viral producida a las 4 y 6 hpi en células MEF, si se observa un incremento significativo en la progenie generada a 6 hpi (Test de Welch: $P < 0,001$) incluso sin corregir la degradación. Tras corregirla se observa un aumento en el título de 4,2 veces a las 4 hpi y de 8,6 veces a las 6 hpi (ambos $P < 0,001$; **Tabla 2.2**). Por tanto, la agregación también mostró un efecto positivo en la proliferación temprana del virus en ausencia de saliva, aunque, de nuevo, menos marcado. Que la agregación con saliva resulte más beneficiosa que con iodixanol no implica necesariamente que la saliva contenga un componente que se asocie junto a los viriones y estimule la replicación viral, aunque tampoco es posible descartarlo. Además de las diferencias en cuanto a la degradación de viriones, cabe tener presente que la distribución de tamaños de los agregados formados en cada medio agregante podrían tener medias, varianzas y formas muy distintas. La teoría del capítulo anterior y los resultados experimentales de infectar a distintas densidades virales sugieren que debe existir un V_0 óptimo que maximiza el beneficio de coinfectar. Por tanto, las poblaciones de agregados virales más eficaces deberían ser aquellas con tamaños menos dispersos y más próximos en promedio a este valor óptimo.

Tabla 2.2 Producción temprana de progenie viral determinada por ensayo de calvas (PFU/ml) en células MEF inoculadas con viriones purificados

Capítulo 2. Consecuencias de la agregación a corto plazo

monodispersos y agregados espontáneamente tras 30 minutos de incubación a 37 °C.

	Monodisperso	Agregado (No corregido)	Agregado (Corregido por la degradación)
4 hpi	$(7,6 \pm 0,5) \times 10^3$	$(8,2 \pm 0,7) \times 10^3$	$(3,1 \pm 0,3) \times 10^4$
6 hpi	$(2,6 \pm 0,1) \times 10^5$	$(5,8 \pm 0,3) \times 10^5$	$(2,2 \pm 0,1) \times 10^6$

Capítulo 3. Consecuencias no inmediatas de la agregación

La selección desfavorece intensamente la agregación sostenida

La evolución experimental permite estudiar los efectos a largo plazo de la agregación viral. Con esta idea en mente, comenzamos la evolución de VSV en cultivos de BHK-21 con tres líneas independientes para cada uno de los dos regímenes establecidos: infecciones seriadas (o pases de evolución) iniciadas con viriones agregados (A1, A2 y A3), e infecciones seriadas iniciadas con viriones libres (C1, C2 y C3; **Fig. 3.1**). Para agregar el virus empleamos el método estándar de incubación en saliva que aplicamos sobre una mezcla equilibrada de VSV-GFP y VSV-mCherry para poder realizar un seguimiento de la presencia de coinfecciones mixtas de ambas variantes virales (células bicolors) y detectar así posibles efectos sobre la capacidad de agregación del virus a lo largo de las generaciones.

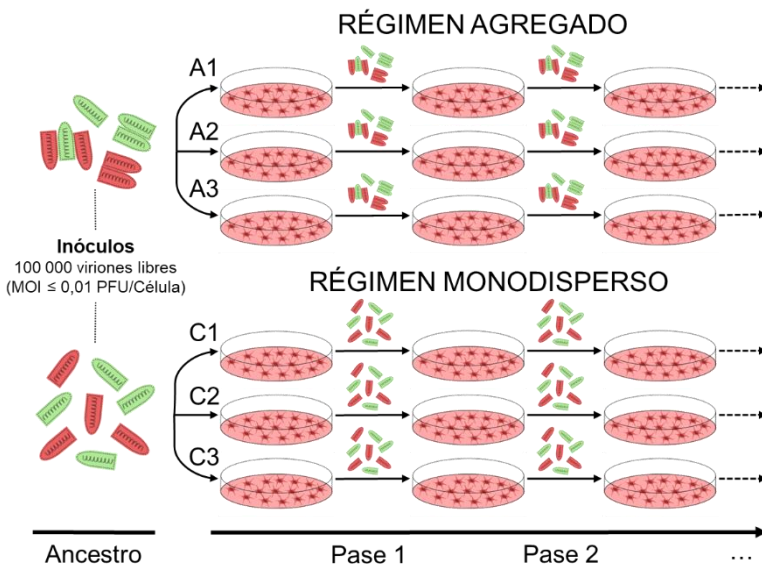


Figura 3.1 Diagrama del diseño de la evolución experimental en células BHK-21.

Comprobamos la correcta agregación de la población viral ancestral observando el número de focos de infección mixtos, que aumentaba marcadamente cuando el inóculo había sido incubado en saliva, indicando una mayor multiplicidad de infección celular (cMOI) debida a los agregados (**Fig. 3.2A**). Los títulos virales se determinaron tras cada pase de evolución a fin de asegurar que éstos eran óptimos para el siguiente ciclo de agregación con saliva ($\sim 10^9$ UFP/ml) y para poder inocular con una densidad viral constante a lo largo de los pases. Como esta densidad se mantuvo baja (aproximadamente 0,01 viriones infecciosos totales por célula), cabía esperar que la coinfección fuese elevada en las líneas A, pero muy infrecuente en las líneas control C (C1, C2 y C3). Sin embargo, al cabo de tres pases de evolución, la coinfección de las líneas A resultó ser prácticamente indetectable.

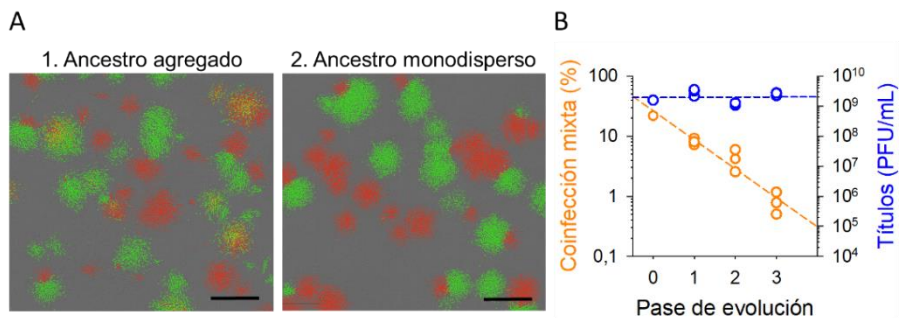


Figura 3.2 La frecuencia de coinfección mixta disminuye rápidamente durante la evolución experimental. **A.** Micrografías de focos de infección fluorescentes en células BHK-21 a las 12 hpi. La infección de célula con el virus ancestral incubado previamente en saliva (1) da lugar a múltiples focos de infección mixtos (amarillentos) que no aparecen al inocular con virus monodispersos (2), indicando que la agregación promueve la coinfección inicial con ambas variantes virales (VSV-GFP y VSV-mCherry). El fondo gris corresponde a las células no infectadas en contraste de fases y las barras de escala equivalen a 1 mm. **B.** Disminución progresiva de la coinfección observada en virus evolucionados en régimen de agregación con saliva (naranja) y título alcanzado por esas mismas líneas tras cada pase de evolución (azul). El porcentaje de células coinfectadas con ambas variantes virales se determinó por

Capítulo 3. Consecuencias no inmediatas de la agregación

citometría de flujo sobre cultivos infectados tras aplicar a los virus evolucionados el tratamiento con saliva. Los títulos virales se cuantificaron tras cada pase de evolución mediante ensayo en placa. El punto único inicial corresponde a la población ancestral (pase cero), el resto de puntos corresponden a las tres líneas independientes evolucionadas en régimen de agregación (A1, A2 y A3).

La presunta pérdida de la coinfección en las líneas A supuso el final prematuro de la evolución experimental, tras el cual determinamos cómo había disminuido la capacidad de la saliva para promover la coinfección a lo largo de los pases. Para ello, inoculamos cultivos de BHK-21 a baja densidad viral ($<0,1$ PFU/célula) con muestras incubadas en saliva procedentes de la población viral fundadora y de cada pase de evolución realizado con las líneas A. Después, analizamos la fluorescencia emitida por las células infectadas de primer ciclo (6 hpi) mediante citometría de flujo. La fracción de células coinfectadas que emitían señal GFP y mCherry (células bicolors) disminuyó progresivamente a lo largo de la evolución (Correlación de Pearson: $r = -0,951$; $P < 0,001$; **Fig. 3.2B**). En cambio, los títulos virales determinados tras cada pase permanecieron aproximadamente constantes (**Fig. 3.2B**). Además, aunque en las líneas A los niveles de coinfección se redujeron drásticamente al finalizar el ensayo de evolución ($0,82 \pm 0,19$ %), en las líneas C se mantuvieron comparables a los de la población ancestral ($21,2 \pm 2,2$ %; **Tabla 3.1**).

El hecho de que la coinfección mixta hubiese desaparecido en gran medida únicamente en las líneas A, en tan sólo tres pases y sin apenas variaciones en los títulos virales alcanzados nos llevó a plantear dos hipótesis explicativas. En primer lugar, la selección natural podría haber favorecido fuertemente la proliferación de variantes virales con capacidad de agregación nula o reducida. En segundo lugar, la agregación podría haber promovido la proliferación de virus desertores, que podrían interferir la capacidad de los

agregados para producir coinfecciones detectables, lo cual disminuiría los niveles aparentes de coinfección.

Tabla 3.1 Porcentaje de células coinfectadas con VSV-GFP y VSV-mCherry determinado por citometría de flujo tras incubar en saliva los virus de la población viral ancestral, evolucionadas en agregación (líneas A) y en monodispersión (líneas C).

Virus	% células coinfectadas	
	Incubación en saliva	Control
Ancestro	21,9	1,15
Líneas evolucionadas en agregación		
A1	0,80	0,53
A2	1,17	0,39
A3	0,50	0,19
Líneas control (monodispersión)		
C1	18,5	0,99
C2	19,7	1,59
C3	25,5	1,3

La capacidad de agregación probablemente no disminuye con los pases

Para comprobar si la reducción progresiva de la coinfección observable en las líneas A se debía a la emergencia de variantes virales no agregantes, secuenciamos la población viral ancestral y las seis poblaciones evolucionadas (último pase) empleando la plataforma MiSeq de secuenciación masiva Illumina (véase Metodología). En caso de que hubiesen proliferado variantes no agregantes, se esperaría que tuviesen afectado el gen G, que codifica la glicoproteína de la envuelta viral, ya que las características de la superficie del virión deberían determinar su capacidad para agregar. No obstante, la agregación también podría estar supeditada a otros cambios con

Capítulo 3. Consecuencias no inmediatas de la agregación

efectos más indirectos, por ejemplo, sobre la composición de la membrana celular.

Curiosamente, se pudo detectar y reconstruir un haplotipo con 57 cambios en los genes P, M y G en las líneas A2, A3, y C3 a unas frecuencias del 12, 24 y 16%, respectivamente (**Tabla 3.2**). De estos cambios, 10 afectaron a la secuencia de aminoácidos de la fosfoproteína P, 6 a la de la glicoproteína G y uno en la proteína de matriz M, y todos ellos se hallaban presentes en la población ancestral, aunque a una frecuencia muy inferior (aproximadamente del 0,5%; **Anexo 2**). Por tanto, aunque este haplotipo pudo haber sido favorecido por la selección natural, su relación con la capacidad de agregación es probablemente nula, porque no fue encontrado en las tres líneas A, pero sí en una línea C. Además, muchas de las mutaciones que lo conforman, como por ejemplo A1544G, C1622U, U1846C, G2925A, y A3351G han sido descritas en trabajos previos de evolución experimental de VSV que no guardan relación con la agregación o la exposición a saliva (Hernández-Alonso et al., 2015; Novella et al., 2010; Sanjuán et al., 2004b). A parte de las mutaciones del haplotipo, se encontraron dos sustituciones no sinónimas en la proteína L del virus únicamente en algunas líneas A; la L892S a una frecuencia del 10,8% en la línea A2 y del 1,3% en la línea A1, y la L1182I en la línea A2 en el 8,05% de las lecturas. Con todo, no hallamos variantes genéticas a alta frecuencia y exclusivas de las líneas A que sugieran que éstos virus pudiesen haber perdido su capacidad de agregación.

Tabla 3.2 Abundancia de las variantes genéticas con frecuencia > 2% en al menos una de las poblaciones virales evolucionadas.

Variantes	Gen(es)	Mutación	Abundancia (%) por población viral ^a						
			Ancestro	A1	A2	A3	C1	C2	C3
G103A	N	V14I	0,63	1,44	5,39	16,45	0,74	0,68	7,11
Haplotipo ^b	P, M, G	Múltiples	ND	ND	11,70	24,04	ND	ND	16,39
A3161G	G		0,32	ND	ND	2,81	0,39	ND	0,20
A3995G	G		4,45	2,02	2,09	2,05	3,24	3,79	3,85
A3999G	G	R308G	4,63	2,07	2,25	1,83	3,50	3,76	4,03
G6372A	L		4,51	3,64	3,50	6,92	4,18	0,94	3,75
U7454C	L	L892S	ND	1,29	10,82	ND	ND	ND	ND
C7458U	L		0,10	2,58	3,54	0,19	ND	0,14	ND
G7729A	L	V984M	1,75	1,57	1,47	1,17	2,20	2,63	1,74
U7966C	L		ND	ND	ND	23,73	ND	ND	ND
U8175C	L		22,37	10,08	12,07	10,60	18,16	18,94	19,00
C8323A	L	L1182I	ND	ND	8,05	ND	ND	ND	ND
A10098G	L		4,77	1,85	2,67	2,19	1,98	2,60	2,28

^aLas poblaciones de las líneas A evolucionaron en régimen de agregación, y las de las líneas C bajo monodispersión (control). ND indica no detectado por encima del 0,1%.

^b El haplotipo reconstruido contiene el siguiente conjunto de cambios ligados: U1437C, G1446A, U1524C, A1544G, C1622U, A1632G, A1692C, U1707C, U1740C, C1772U, C1814U, G1833U, U1846C, U1896C, G1899A, G1902A, G1903A, C1961A, A1974C, G2085A, G2104A, C2142U, A2148G, G2221A, C2918U, G2925A, A2949G, U2954C, C2988U, C3003U, A3068C, G3070U, C3071U, U3073A, U3077C, C3101U, U3113C, A3154G, U3182C, U3344C, A3351G, C3491U, U3499C, G3530U, U3591G, U3617C, U3632C, G3719A, G3772A, A3791G, A3938C, A4013C, C4069U, U4070C, C4073U, A4208U, y C4280U. Algunas de estas mutaciones no son sinónimas y causan los siguientes cambios de aminoácido en los genes indicados entre paréntesis: K49R (P), A75V (P), E98D (P), S125L (P), S139L (P), Y150H (P), M167I (P), E169K (P), S188Y (P), D236N (P), G225S (M), Q25R (G), K91E (G), V140A (G), Y171D (G), G231D (G) y A330V (G).

También analizamos si la agregación había causado algún efecto sobre la acumulación de diversidad genética a lo largo del genoma del virus durante los pases de evolución. Para ello, consideramos todas las sustituciones nucleotídicas a una frecuencia poblacional $> 0,1\%$, a pesar de que una parte de estos cambios podrían deberse a errores de secuenciación (**Anexo 2**). Usando estos datos, determinamos la frecuencia de mutaciones no sinónimas y el número de sitios polimórficos no sinónimos para cada gen de VSV. Los resultados de este análisis no mostraron cambios significativos en la distribución de diversidad genética entre las líneas evolucionadas para los genes N, P, M y G. Sin embargo, el gen L albergaba una mayor frecuencia de cambios no sinónimos ($94,3 \pm 13,7$ frente a $20,7 \pm 2,7$ mutaciones por millón de bases leídas; Test de Welch: $P = 0,029$; **Fig. 3.3A**) repartidos en un mayor número de sitios polimórficos en las líneas A ($219,7 \pm 14,0$ frente a $85,7 \pm 7,8$ sitios polimórficos; $P = 0,001$; **Fig. 3.3B**). Estos resultados sugieren que, posiblemente, estas variantes del gen L podría corresponder a mutaciones deletéreas mantenidas en las poblaciones virales de las líneas A por complementación genética promovida por el aumento de la cMOI a causa de la agregación.

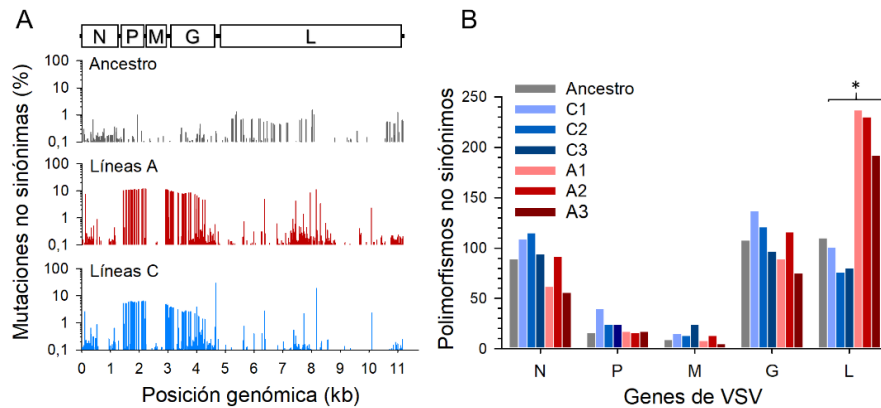


Figura 3.3 Análisis de la diversidad genética determinada por secuenciación masiva Illumina en las poblaciones evolucionadas de VSV. A. Frecuencia de mutaciones no sinónimas en cada posición del genoma de VSV. Estas frecuencias de mutación (bases mutadas/bases totales leídas por posición) se calcularon agrupando todas las lecturas de las líneas evolucionadas bajo un mismo régimen (A: agregación, y C: monodispersión). La distribución de los genes de VSV a lo largo de su genoma se representa a escala en la parte superior del gráfico. **B.** Número de polimorfismos no sinónimos a frecuencia >0.1% hallados en cada gen de VSV para el ancestro y las líneas evolucionadas. La diferencia entre el número de polimorfismos en el gen L entre líneas A y C es significativo (asterisco; Test de Welch, $P = 0,001$).

En general, nuestro análisis genético no aporta ninguna evidencia que apoye nuestra hipótesis de aparición de variantes no agregantes de VSV. Sin embargo, la hipótesis alternativa sobre la proliferación de virus desertores que reducen nuestra capacidad para detectar la coinfección parece ahora más plausible, especialmente si parte de los mutantes que la agregación podría mantener por complementación genética son interferentes. Las partículas interferentes defectivas (DIPs) se han descrito numerosas veces para VSV (Cureton et al., 2010; Huang et al., 1966; Thompson et al., 2010; Timm et al., 2014) y presentan grandes deleciones genómicas. En la mayoría de casos, el virus únicamente conserva los extremos de su genoma y parte del gen L, por lo que pueden acumular mutaciones no sinónimas libremente. Por ello, una

elevada frecuencia de DIPs en nuestras líneas A podría explicar el aumento de la diversidad genética observado exclusivamente en este gen.

La agregación promueve la proliferación de DIPs

Al descartar la pérdida de la capacidad agregante del virus, nos propusimos analizar si las líneas evolucionadas en régimen de agregación mostraban niveles elevados de DIPs u otros mutantes interferentes de VSV. Para ello, primero realizamos tres infecciones seriadas a una densidad de 10 PFUs/célula, partiendo del virus ancestral, para generar una población viral enriquecida en DIPs que sirviese de control positivo (Huang et al., 1966; Thompson et al., 2009; Timm et al., 2014). A continuación, analizamos la presencia de interferencia en las muestras evolucionadas mediante un ensayo de reducción de rendimiento viral. Esta técnica, que fue desarrollada inicialmente por Bellet y Cooper (1959), permite detectar la presencia de mutantes interferentes cuantificando la reducción en el título alcanzado por un virus reportero que se inoculara a alta densidad (10 PFU/célula) junto con diferentes diluciones seriadas de las muestras problema que se deseen analizar (véase Metodología). Esto permite asegurar que todas las células infectadas por los virus de las muestras problema estén también infectadas por el virus reportero. En nuestro caso empleamos como reportero un mutante de VSV resistente a un anticuerpo monoclonal (VSV-MARM), y las muestras problema estudiadas fueron el virus ancestral, las líneas evolucionadas en agregación y el control positivo de DIPs.

Las diluciones del virus ancestral redujeron el título del virus reportero de manera proporcional a su abundancia relativa en los inóculos, como se esperaría de dos virus que, mostrando la misma eficacia biológica en coinfección, compiten por los recursos celulares sin interferirse de otro modo

(Fig. 3.4). Sin embargo, esta proporcionalidad desaparece al coinocular el reportero junto a virus de las poblaciones virales de las líneas A. Como ejemplo de ello, con una presencia del 5% en el inóculo, los virus de las líneas A redujeron el rendimiento del reportero en un orden de magnitud, desde $(8,1 \pm 1,2) \times 10^8$ hasta $(7,5 \pm 0,4) \times 10^7$ PFUs/ml. Por tanto, estos virus interfirieron en la producción de progenie del virus reportero, lo que podría indicar un fuerte aumento de su capacidad competitiva en coinfección. El control positivo de DIPs mostró una interferencia todavía mayor. En este caso, sólo un 1% de estos virus en el inóculo redujo el título alcanzado por el reportero en dos órdenes de magnitud. Cabe tener en cuenta que la proporción del virus ensayado en el inóculo únicamente considera unidades infecciosas, y no refleja el número de DIPs coinoculadas, que podría ser mucho mayor.

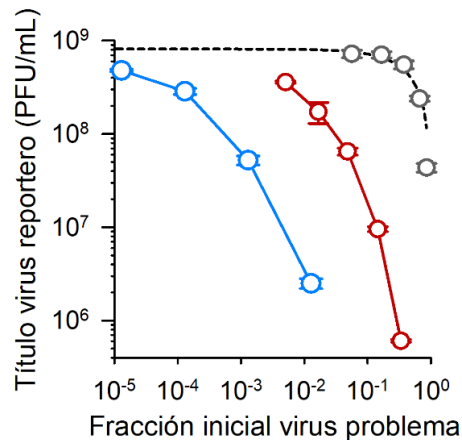


Figura 3.4. Las poblaciones evolucionadas en agregación contienen variantes interferentes. El ensayo de reducción en el rendimiento viral muestra el título del virus reportero (VSV-mCherry-MARM) a las 16 hpi como función de la fracción de virus problema/(problema+reportero) en el inóculo. El título del virus reportero decae proporcionalmente a la fracción del virus ancestral en el inóculo (gris), de acuerdo a lo esperado bajo competencia directa sin interferencia ($r^2 = 0,884$). Sin embargo, el título del virus reportero decae más rápido de lo esperable por competencia directa en presencia de virus de la línea A1 (rojo) y del control positivo

de DIPs (azul), indicando la presencia de virus interferentes en esas poblaciones virales.

Como hemos mencionado anteriormente, la mayoría de las DIPs de VSV contienen grandes deleciones de la región 3' del genoma que abarcan por completo los genes N, P, M, y G, mientras que parte del gen L se conserva (Cureton et al., 2010). Este hecho nos permitió diseñar un ensayo de RT-qPCR para cuantificar la fracción de genomas DIPs en nuestras poblaciones virales evolucionadas empleando dos pares de cebadores. Un par fue diseñado para hibridar hacia el final (conservado) del gen L, lo que permitiría cuantificar los genomas totales (defectivos y completos). El otro par hibridaría sobre el gen P, cercano al extremo 3' (delecionado) del genoma viral (posiciones 1772 – 1971), por lo que sólo cuantificaría genomas completos. La abundancia de genomas DIPs en las muestras analizadas mediante este ensayo de RT-qPCR se expresó calculando la ratio de la abundancia relativa de los amplicones L y P (L/P).

Así pues, mientras que $L/P \approx 1$ en la población viral ancestral, indicando la ausencia de genomas defectivos, en todas las líneas evolucionadas en agregación $L/P > 5$, es decir, al menos había cuatro veces más genomas defectivos que completos o funcionales (**Tabla 3.3**). El valor de L/P fue todavía mayor en nuestro control positivo de DIPs, indicando una elevada prevalencia de genomas defectivos, lo cual es consistente con los resultados obtenidos mediante el ensayo de reducción de rendimiento viral. Las tres líneas C mostraron valores de L/P ligeramente superiores a 1, por lo que la presencia de genomas defectivos era baja pero detectable. Aunque los pases de evolución se iniciaban a una densidad viral muy baja, es posible que la cMOI aumentase en los ciclos de infección subsiguientes, permitiendo así la replicación de algunos genomas defectivos.

Tabla 3.3 Detección de DIPs por RT-qPCR mediante el análisis de la abundancia relativa de regiones genómicas de VSV situadas en los genes L (genomas completos) y P (genomas totales).

Muestra	Línea	Razón L/P ^a	P ^b
Ancestro	-	1,008 ± 0,035	
Líneas evolucionadas C	C1	1,751 ± 0,041	0,000
	C2	1,132 ± 0,083	0,272
	C3	1,389 ± 0,094	0,043
Líneas evolucionadas A	A1	8,965 ± 0,167	0,000
	A2	5,117 ± 0,343	0,006
	A3	5,407 ± 0,219	0,002
Control positivo DIPs	-	23,211 ± 3,896	0,029

^aSe calculó empleando $2^{CT_P - CT_L}$, donde CT_P y CT_L corresponden a los valores de ciclo umbral (C_T) obtenidos de la amplificación por RT-qPCR de las regiones P y L del genoma de VSV, respectivamente. Para cada muestra se realizaron tres réplicas técnicas de qPCR y los valores muestran el promedio junto a su error estándar de la media (SEM).

^bTest de Student frente al ancestro.

Finalmente, confirmamos visualmente la presencia de DIPs observado los virus evolucionados al microscopio electrónico de transmisión (véase Metodología). Como ocurre en muchos otros virus que poseen nucleocápsides con simetría helicoidal, el tamaño de la partícula de VSV es proporcional al tamaño de su genoma. En consecuencia, mientras que los viriones de las líneas C y de la población ancestral mostraron tamaños de aproximadamente 180 × 60 nm y la típica forma de bala, en todas las líneas A encontramos gran abundancia de viriones mucho más cortos, con la forma de dedal propia de las DIPs (Cureton et al., 2010; Huang et al., 1966; Timm et al., 2014; **Fig. 3.5**).

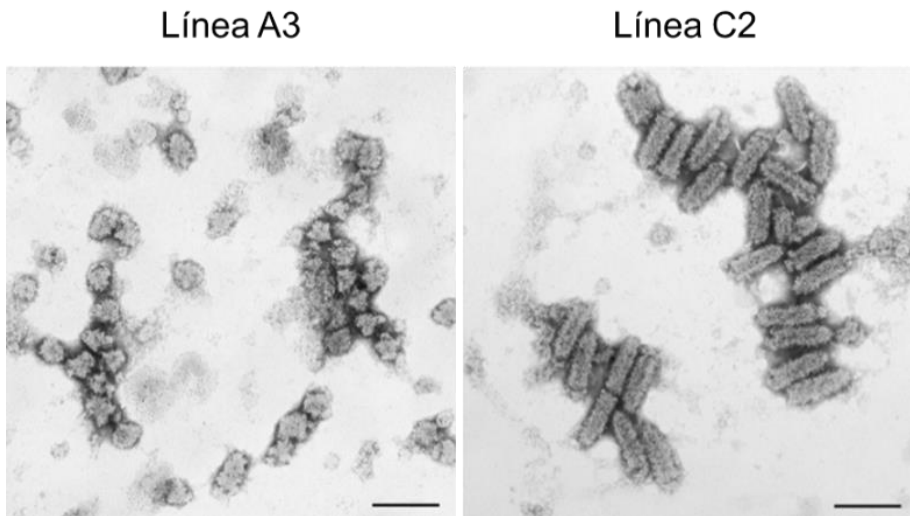


Figura 3.5 La microscopía electrónica confirma la presencia de DIPs en las líneas A. Mediante microscopía electrónica de transmisión se pudo observar que las poblaciones virales de todas las líneas A están constituidas principalmente por viriones acortados que corresponden a las DIPs (izquierda; línea A3), mientras que los viriones de las líneas control presentan el tamaño y la morfología normal de VSV (derecha, línea C2). Las barras de escala representan 200 nm.

La eliminación de las variantes defectivas recupera la agregación

Una vez observada la presencia de DIPs en nuestras líneas A faltaba comprobar si realmente limitaban la detección de las coinfecciones mixtas (GFP/mCherry) que deberían resultar de la agregación viral. Para ello, amplificamos los virus evolucionados de cada línea agregada mediante dos infecciones seriadas sin tratamiento con saliva e inoculando los virus a densidades muy bajas ($< 0,001$ PFU/célula). Este régimen imponía una fuerte selección purificadora sobre las DIPs, al ser su proliferación completamente dependiente de la coinfección con un virus funcional. Tras este procedimiento, tratamos las poblaciones resultantes y el virus ancestral con saliva y cuantificamos los niveles de coinfección por citometría de flujo como habíamos hecho previamente. Nuestra selección en contra de las DIPs en las

líneas agregadas recuperó los niveles de coinfección mixta (GFP/mCherry) mostrados por la población viral ancestral ($45,6 \pm 0,4$ % en el virus ancestral frente al $43,1 \pm 1,9$ % en las líneas agregadas; Test de Welch: $P = 0,305$). A la vista de estos resultados, se puede concluir que probablemente las DIPs causaron la disminución en los niveles observables de coinfección mixta.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La replicación viral es cooperativa

Una de las conclusiones generales que se derivan de nuestros estudios sobre la dinámica de la infección colectiva (y de la infección por agregados virales de VSV) es que el aumento de la multiplicidad de infección celular (cMOI) puede incrementar de forma neta la eficacia biológica de los virus. Como hemos resumido en la introducción de esta tesis, existen múltiples líneas de evidencia que sugieren que la infección colectiva puede acelerar y aumentar la productividad del ciclo infectivo (Arantes et al., 2016; Boullé et al., 2016; Chen et al., 2015; Cohen and Kobilier, 2016; Jacobs et al., 2019; Martin et al., 2020; Münch et al., 2007; Phipps et al., 2020) y, además, mejorar la infectividad al favorecer que se superen procesos estocásticos y barreras tempranas que dificultan el establecimiento de la infección (Agosto et al., 2015; Borges et al., 2018; Erickson et al., 2018; Lago et al., 2016; Landsberger et al., 2018; Luque et al., 2009; Phipps et al., 2020; Richardson et al., 2008; Santiana et al., 2018; Sattentau, 2008; Sigal et al., 2011; Zhong et al., 2013). Sin embargo, en la mayoría de estos trabajos no se tiene en cuenta si el efecto observado produce un aumento per cápita de la eficacia biológica viral (es decir, si la coinfección compensa sus costes). Tampoco suele ser posible diferenciar si su origen reside únicamente en el efecto masa o si también contribuyen posibles beneficios vehiculares o basados en diversidad. Además, ningún estudio proporciona un mecanismo general que explique la relación entre la eficacia biológica viral y la coinfección, y que sea congruente con los distintos resultados observados.

El marco teórico desarrollado en el primer capítulo de esta tesis sugiere que la replicación viral es un proceso inherentemente cooperativo que permite a la infección colectiva causar un adelanto desproporcionado del ciclo

infectivo (**Figs. 1.2, 1.7 y 1.13**) y una reducción sinérgica de la probabilidad de infección abortiva (**Fig. 1.8**). Hemos determinado que, bajo ciertas condiciones, estos efectos permiten que la coinfección *per se* proporcione una ventaja per cápita para los virus a pesar de incrementar su competencia por los recursos de la célula (**Figs. 1.10 y 1.11**). La cooperatividad de la replicación viral se manifiesta en nuestros modelos como una realimentación positiva no lineal entre los recursos y los genomas virales, que acelera la tasa de crecimiento per cápita conforme aumenta la densidad viral en la célula (**Fig. 1.1** frente a **Fig. 1.5A**) Este hecho explica los dos efectos observados en las infecciones colectivas. Por un lado, los virus que coinfectan evitan algunos ciclos de replicación iniciales, y como estos son más lentos que los subsiguientes, obtienen una ventaja temporal desproporcionada. Por otro lado, el éxito en el establecimiento de la infección (tras la entrada) debe depender de la ratio entre las tasas de producción y degradación (o bloqueo) de los componentes virales esenciales. Por tanto, si la productividad per cápita del virus aumenta con la densidad viral, los efectos relativos de las barreras tempranas que se oponen al establecimiento de la infección disminuirán con el avance de la misma. Así, coinfectar reduce la ventana temporal en la que el virus es más vulnerable.

En cierto modo y de manera implícita, la noción de que el ciclo infectivo viral es un proceso cooperativo ya se había formulado anteriormente desde la óptica de la evolución social, pues los productos génicos virales pueden actuar como bienes públicos que benefician al conjunto de genomas virales presentes en una misma célula (Chao and Elena, 2017; Díaz-Muñoz et al., 2017; Turner and Chao, 1999). Además, esta visión puede respaldarse en procesos ampliamente reconocidos que ocurren durante la coinfección. Por

DISCUSIÓN

ejemplo, la complementación genética es probablemente el mecanismo más fundamental que demuestra la actividad en *trans* de múltiples productos virales (Aguilera et al., 2017; Cicin-Sain et al., 2005; DaPalma et al., 2010; Gelderblom et al., 2008; Jacobs et al., 2019; Vignuzzi et al., 2006). Por otra parte, la emergencia de variantes desertoras, como las muy comunes partículas interferentes defectivas (Huang and Baltimore, 1970; Manzoni and López, 2018; Marriott and Dimmock, 2010; Vignuzzi and López, 2019), implica la existencia de cooperación. Sin embargo, los efectos de tal cooperatividad sobre la dinámica viral, y sus consecuencias para la eficacia biológica de las poblaciones virales, no habían sido abordados.

Condiciones para que la replicación cooperativa incremente la eficacia biológica viral

Al explorar cómo la cMOI y los parámetros de nuestros modelos afectan a la dinámica viral, hemos identificado algunos factores que determinan si la coinfección produce una ventaja adaptativa a través de la replicación cooperativa. Primero, aun si la replicación es siempre cooperativa en nuestros modelos (**Figs. 1.3 y 1.7D**), su intensidad varía dependiendo de la relación entre los valores de los distintos parámetros (**Fig. 1.6**). Segundo, para que el beneficio temporal que otorga la replicación cooperativa al coinfectar tenga un impacto positivo sobre la eficacia biológica viral, debe propagarse a través de las etapas post-replicativas, que incluyen tanto el ensamblaje y la liberación de los viriones como su transmisión a nuevas células (**Fig. 1.10**). No obstante, las etapas pre-replicativas, que ocurren desde que el virión se une a la célula hasta que penetra y libera sus componentes, son irrelevantes en este contexto. Tercero, el balance entre la cooperación y la competencia por los recursos celulares da lugar a un valor de N_0 óptimo para cualquier sistema

virus-hospedador en el que coinfectar pueda resultar ventajoso, ya sea debido a la aceleración de la infección o al aumento de la infectividad de los virus que coinfectan. A partir de nuestros resultados es posible especular sobre algunas características del virus, del hospedador e incluso del medio que pueden afectar a estos tres factores para determinar la magnitud del beneficio de coinfectar o limitarlo.

En nuestro modelo sencillo, la replicación viral consta de dos fases diferenciadas: la formación de los complejos replicativos, en la que intervienen recursos virales, y el copiado de los genomas virales (**Fig. 1.1**). La cooperación reside en la primera fase, que se acelera a medida que aumenta la concentración de componentes virales, mientras que la segunda ocurre con tiempo medio constante $1/\alpha$. Por ello, al iniciar la infección, cuanto más lenta sea la fase cooperativa respecto a la no cooperativa, es decir, cuanto menores sean los valores de κ (producción de recursos virales) y γ (formación de complejos replicativos) respecto de α (copiado de genomas virales), mayor margen de beneficio producirá coinfectar (**Fig. 1.6A-B**). Por otro lado, de la degradación de los componentes virales (δ) se deduce que cuanto más lábil sea el virus y más adversas las condiciones celulares al inicio de la infección, mayor es el beneficio de coinfectar (**Fig. 1.6C-D**). Cabe mencionar que la degradación incluida en nuestros modelos representa el caso más simple de barrera temprana a la infección, pues su impacto per cápita (por componente viral) es constante (δ). Sin embargo, otras barreras más complejas, como la respuesta innata celular o la presencia de algunos antivirales, pueden ser inducidas o inhibidas por el virus, por lo que su magnitud debería variar a lo largo del ciclo infectivo.

DISCUSIÓN

En general, cabe esperar que la adaptación de un virus a su hospedador tienda a minimizar el tiempo de replicación al comienzo del ciclo. Por un lado, la adaptación podría aumentar la velocidad de copiado (constante catalítica) de los complejos replicativos o minimizar el tamaño de los genomas virales. En ambos casos aumentaría α y, en consecuencia, la intensidad de la cooperatividad. Por otro lado, los valores de γ y κ también podrían aumentar al optimizar la funcionalidad de los componentes virales, volviendo la cooperación menos intensa. Sin embargo, aquellos mecanismos que incrementen la tasa per cápita de formación de complejos replicativos y la de producción de recursos virales de manera progresiva a lo largo del ciclo modificando γ y κ , respectivamente, contribuirían de forma indirecta a intensificar la cooperación (nótese que la replicación cooperativa produce este mismo efecto en nuestros modelos, pero de forma directa, conforme aumenta el número de componentes virales). A este respecto, muchos virus replican dentro de compartimentos celulares o forman los llamados centros replicativos o factorías virales donde los componentes virales se acumulan incrementando su concentración local (den Boon and Ahlquist, 2010; den Boon et al., 2010; Fernández de Castro et al., 2021; Schmid et al., 2014; Shulla and Randall, 2016). Al menos el valor de γ debería aumentar una vez establecidos estos centros que, además, pueden reducir la exposición del virus a elementos de la inmunidad celular, con lo que también podría disminuir δ .

Por otro lado, el estado energético de la célula y la fase del ciclo celular pueden alterar la expresión génica viral (κ), aunque su efecto podría depender del virus. Si bien se ha propuesto que las células poco activas disponen de menos energía o recursos para la replicación y expresión viral (Sanjuán, 2018), las muy activas pueden oponer mayor resistencia a la

infección, como se ha observado en un estudio con herpesvirus (Cohen and Kobiler, 2016). Esto podría deberse a la competencia entre la expresión génica celular y viral (menor κ inicial), o a que la célula produzca mayor cantidad de efectores inmunes constitutivos o una respuesta antiviral más rápida e intensa (mayor δ inicial). Distintos virus emplean diferentes mecanismos para evitar que su hospedador interfiera en su replicación, e inducen un incremento en κ . Así pues, algunos bloquean la expresión génica celular a distintos niveles (p. ej. VSV y poliovirus; Ahmed et al., 2003; Lyles, 2000), y otros pueden degradar o disrupir los mensajeros celulares (p. ej. herpesvirus e IVA; Dias et al., 2009; Feng et al., 2001). De igual modo, múltiples virus manipulan el ciclo celular en su propio beneficio, como adenovirus, retrovirus, herpesvirus, papilomavirus, parvovirus, hepacivirus, coronavirus y otros virus (Chaurushiya and Weitzman, 2009; Fan et al., 2018; Nascimento et al., 2012).

Los ensayos de competencia simulados con nuestro modelo multiescala muestran como la ventaja temporal de coinfectar tiende a aprovecharse mejor cuando las células infectadas mueren rápido (δ_i), de modo que la muerte celular interrumpe una parte del ciclo infeccioso sustancialmente mayor en las monoinfecciones que en las coinfecciones, lo que también favorece que estas últimas liberen más progenie (**Fig. 1.10C**). No obstante, debe tenerse en cuenta que no todos los virus desarrollan infecciones agudas ni liberan la progenie tan pronto como dispongan de los componentes necesarios para producirla. Algunos virus causan infecciones latentes (herpesvirus, retrovirus y fagos), en las que el genoma viral permanece inactivo, ya sea como episoma o integrado en el genoma celular, hasta que un estresor desencadena el inicio de la replicación (Grinde, 2013; Oppenheim et al., 2005; Siliciano and Greene, 2011). Otros muchos virus pueden regular la

DISCUSIÓN

respuesta celular frente a la infección e impedir o retrasar la apoptosis, pudiendo replicar por periodos más largos en una misma célula (García-Murria et al., 2020; Hay and Kannourakis, 2002; Zakeri et al., 2008). En estos contextos, incluso asumiendo que los virus liberan progenie viral de forma continua a lo largo del ciclo infeccioso, el beneficio temporal de coinfectar podría ser menos intenso o diluirse entre otros factores.

La velocidad y configuración de las etapas post-replicativas del ciclo infeccioso probablemente sean los factores principales que limitan el aprovechamiento de la aceleración causada por la coinfección sobre la producción temprana de genomas virales per cápita. En nuestro modelo sencillo, la replicación y la producción de progenie viral son dos procesos simultáneos, y existe un valor óptimo de ρ (producción de viriones libres) para el cual la coinfección resulta más provechosa (**Fig. 1.10B**). Esto es porque si ρ es muy pequeño, la replicación ocurre mucho más rápido que la producción de progenie viral y el beneficio temporal de la coinfección no se transfiere a la progenie liberada; en cambio, si ρ es muy elevado limita la disponibilidad de genomas y recursos virales para replicar. Sin embargo, en muchos virus la replicación y la liberación de viriones son procesos parcial o totalmente separados. Por ejemplo, en virus con genomas de ADN es común que los eventos del ciclo infeccioso se separen en al menos fases temprana y tardía (Knipe and Howley, 2013). Esto generalmente implica que las etapas replicativas y post-replicativas sean secuenciales, aunque a menudo solapantes. Por otro lado, independientemente de la estructura del ciclo infeccioso, otros muchos virus, típicamente no envueltos, retrasan la propagación de sus viriones maduros hasta el final de la infección al emplear la lisis celular como mecanismo principal para liberar su progenie. En todos

estos casos, el virus solo obtendrá una ventaja del avance desproporcionado del ciclo infectivo al coinfectar si éste reduce sinérgicamente la duración total del ciclo infectivo, de modo que se adelante la fase de liberación de progenie o la lisis. En caso contrario, la coinfección solo resultará beneficiosa si incrementa el establecimiento de la infección per cápita. Ninguno de estos efectos resultó compensatorio en el caso de nuestros virus líticos CVB3 y hAdv5 (**Fig. 1.15**).

Por último, una tasa de transmisión del virus (β) elevada favorece el aprovechamiento de la ventaja temporal de la coinfección y reduce el número de viriones que se degradan (δ_v) durante la dispersión (**Fig. 1.10D**). Sin embargo, si la transmisión es suficientemente lenta en comparación con la duración de la replicación o el ciclo infectivo viral, la ventaja temporal de coinfectar no se aprovecha y el virus monodisperso es más competitivo porque produce más progenie total per cápita (salvo si la muerte temprana de las células o el aumento de la infectividad favorece una mayor progenie promedio en la coinfección). La velocidad de la transmisión puede verse afectada por múltiples factores como el número de receptores disponibles para el virus, la afinidad entre éstos y sus ligandos, la densidad de hospedadores disponibles, la densidad del medio, o el modo de transmisión viral empleado. Los virus que emplean unidades infecciosas colectivas de gran tamaño podrán ver reducida su difusividad y, además, podrían contener más viriones de los abarcados por el rango de $N_0 > 1$ para el cual los beneficios de coinfectar compensan sus costes. También cabe tener en cuenta que nuestras competencias asumen que las coinfecciones liberan virus monodispersos. Si las coinfecciones fuesen causadas por virus que liberan la totalidad o parte de la progenie como unidades infecciosas colectivas, la progenie efectiva

DISCUSIÓN

liberada al final del ciclo (dada una misma cantidad de recursos celulares) sería menor, por lo que se magnificaría el coste intrínseco de la coinfección.

Factores limitantes de la replicación cooperativa

Hasta ahora hemos considerado que los genomas virales en coinfección replican cooperativamente. Sin embargo, es posible plantear ciertos escenarios que podrían limitar cualitativamente la cooperatividad de la replicación viral, al menos entre los genomas que inician la infección. Por ejemplo, la segregación espacial de los genomas virales tras su entrada en la célula podría impedir que interaccionen entre sí para cooperar. Posiblemente, el principal mecanismo para esta segregación sea la compartimentación y la formación de centros replicativos (den Boon and Ahlquist, 2010; den Boon et al., 2010; Fernández de Castro et al., 2021; Schmid et al., 2014; Shulla and Randall, 2016). Aunque anteriormente hemos planteado que la compartimentación podría contribuir a la replicación cooperativa, cabe matizar que ello requiere que no ocurra una segregación individual de los genomas que inician la infección. Algunos estudios realizados, por ejemplo, sobre HCV (Appel et al., 2005; Kazakov et al., 2015), poliovirus (Collis et al., 1992; Teterina et al., 1995) y coxsackievirus B3 (van Kuppeveld et al., 2002), muestran que los defectos génicos de algunas proteínas virales involucradas en los centros replicativos no pueden ser complementados mediante la coexpresión de sus variantes funcionales. Esto implica que, o bien estos recursos virales actúan únicamente en *cis*, o bien la *trans*-complementación está confinada a cada centro replicativo. En cualquiera de los casos, estas proteínas no interaccionan directamente con otros genomas o recursos virales espacialmente segregados. No obstante, estos estudios también indican que no todos los genes involucrados en la replicación viral son incapaces de *trans*-

complementar, por lo que la segregación espacial no debería limitar completamente la cooperación. Además, los genomas virales segregados todavía podrían cooperar indirectamente para promover la replicación alterando el metabolismo y la distribución de recursos de la célula (Chaurushiya and Weitzman, 2009; Fan et al., 2018; Nascimento et al., 2012), o bloqueando la respuesta antiviral (García-Sastre, 2017). Es más, la formación de centros replicativos no ocurre instantáneamente tras la infección, pues requiere de la acción de cierta cantidad de recursos virales. Por tanto, incluso si la segregación espacial limitase toda capacidad cooperativa, los genomas virales seguirían pudiendo cooperar en las etapas más tempranas de la infección, que son aquellas que confieren mayores beneficios.

La formación de distintos tipos de centros replicativos se ha descrito para la mayoría de virus para los que hemos ensayado experimentalmente la cooperatividad de la coinfección. Así pues, RSV forma cuerpos de inclusión en el citoplasma, presuntamente asociados a su replicación (Rincheval et al., 2017); VacV forma viroplasmatas en las regiones citoplasmáticas adyacentes a los centros organizadores de microtúbulos (MTOCs; Schmid et al., 2014); hAdv5 replica en factorías virales asociadas a los cuerpos nucleares de leucemia promielocítica (PML-NB; Schmid et al., 2014), y CVB3 aísla su replicación dentro de vesículas citoplasmáticas con doble membrana derivadas del retículo endoplasmático (den Boon et al., 2010). Sin embargo, nuestros resultados experimentales sugieren que todos ellos se benefician de la replicación cooperativa (**Fig. 1.14**). VacV representa una posible excepción, pero el escaso beneficio de coinfectar que se refleja en su producción de progenie per cápita no implica necesariamente una ausencia de cooperatividad a nivel replicativo, y es probablemente causa de un ciclo viral altamente

DISCUSIÓN

estructurado donde la progenie se libera de forma tardía y sólo parte de ello lo hace de forma no lítica (Roberts and Smith, 2008). Además, el aumento sinérgico de la infectividad de VacV al coinfectar, demostrado por Stiefel y colaboradores (2012), apoya nuestras conclusiones. Por tanto, conforme a lo discutido, no parece que el confinamiento de la replicación en factorías virales suponga una limitación estricta sobre la cooperatividad de la coinfección, al menos en la mayoría de casos.

Otra posible forma de impedir la replicación cooperativa es evitar la realimentación positiva no lineal entre genomas y recursos virales. Si bien hemos propuesto que ésta es una característica inherente a la naturaleza viral, podría pensarse que los diferentes modos de replicación empleados por distintos virus podrían afectar la cooperatividad. En nuestros modelos hemos asumido que la replicación viral es geométrica, es decir, que todos los genomas virales producidos actúan como molde de copiado con la misma probabilidad. Por el contrario, si los genomas virales se producen a partir de un número fijo de genomas fundadores, la replicación será lineal o “en máquina de estampado” (*stamping-machine*; Sanjuán and Domingo-Calap, 2016). Por tanto, es importante considerar la posibilidad de que la replicación lineal perturbe la no linealidad de la replicación cooperativa.

En general, los virus de ADN de doble cadena, al seguir una replicación semiconservativa, se ajustan al modelo de replicación geométrica. Sin embargo, los virus de ARN suelen emplear estrategias intermedias entre ambos modos de replicación que favorecen la producción de hebras genómicas. Para ello, pueden emplear al menos dos tipos de mecanismos generales: o bien la polimerasa viral es más afín a copiar hebras antigenómicas, o bien el virus regula qué hebra se emplea como molde de

copiado a lo largo del ciclo. VSV representa un ejemplo típico del primer caso, pues la polimerasa viral produce alrededor de 10 hebras genómicas por cada antígenoma (Li and Pattnaik, 1997). Aunque este mecanismo llevado al extremo podría compararse con la replicación lineal, en realidad sólo disminuye la velocidad de la replicación de las hebras genómicas en favor de otros posibles beneficios como, por ejemplo, no derrochar recursos en producir una cantidad innecesaria de antígenomas. Por tanto, lejos de limitar la cooperatividad cabe esperar que la favorezca, pues mientras que la velocidad de copiado (α) de ambas hebras debe ser la misma (o muy similar), la formación de complejos replicativos (γ) debe ser más lenta para las hebras genómicas, lo que ralentizaría la fase temprana de la infección e incrementaría la intensidad de la cooperación. Por otro lado, los efectos sobre la cooperatividad de aquellos virus que regulan su modo de replicación a lo largo del ciclo es más difícil de prever.

Consideremos dos casos de regulación temprana, uno en el que la replicación es al menos parcialmente geométrica al comienzo de la infección y pasa a ser lineal la mayor parte del ciclo, y otro donde el comienzo es lineal desde la hebra genómica y pasa a ser lineal desde la hebra antígenómica. El primer caso se ha estudiado en el virus del rizado del nabo (TCV), que compartimenta parte de los genomas iniciales en complejos replicativos mitocondriales que únicamente pueden establecerse de forma temprana, cuando los niveles de proteína p28 son bajos (Zhang et al., 2018). El segundo caso puede observarse, por ejemplo, en los virus de la familia *Togaviridae*, como los alfavirus Sindbis, Chikungunya, y Semliki Forest, en los cuales, el procesamiento de la poliproteína P1234 determina la hebra empleada como molde de replicación. Así, al comienzo del ciclo, la proteína se autoprocresa a su

DISCUSIÓN

forma P123 + nsP4, que sólo puede producir antigenomas, pero con el transcurso de la infección predomina su forma completamente procesada, que sólo emplea antigenomas como molde (Rupp et al., 2015; Strauss and Strauss, 1994).

En el caso de TCV, el virus debería poder beneficiarse de las fases más tempranas de la infección, cuando la replicación lineal aún no se ha establecido. En cambio, en el caso de los alfavirus es probable que un comienzo de la infección estrictamente lineal repercuta negativamente sobre la cooperatividad de la replicación. No obstante, es importante notar que incluso si el número de hebras molde no crece durante una parte del ciclo infectivo, la infección debería seguir respondiendo de forma sinérgica a un mayor inóculo viral, pues las relaciones entre genomas y recursos virales siguen siendo equivalentes a las descritas en nuestros modelos. Por tanto, cabe esperar que la coinfección produzca un adelanto desproporcionado del ciclo infectivo con efecto modesto. No obstante, otros factores podrían amplificar notoriamente estos beneficios, por ejemplo, la labilidad de los genomas iniciales, que con este sistema de replicación corren mayor riesgo de perderse o sufrir daños antes de poder producirse desde los antigenomas. Sin embargo, en ambos casos desconocemos el efecto de aumentar la cMOI al inicio del ciclo sobre la regulación de la replicación, que podría limitar el número de genomas que se establecen como molde y ralentizar con ello todo el ciclo infectivo.

Por otro lado, los retrovirus representan un caso de replicación *a priori* puramente lineal, pues toda la producción de genomas de ARN procede la expresión de los genomas fundadores que fueron inicialmente retrotranscritos a ADN e integrados en el genoma celular. Se ha observado que las sinapsis

virológicas de HIV-1 promueven un mayor número de eventos de integración (Russell et al., 2013). En este caso es probable que un mayor número de genomas virales integrados (provirus) cause una respuesta cooperativa débil en la replicación del virus, y es difícil prever un factor o mecanismo que la amplifique.

De acuerdo con esto, la coinfección resulta beneficiosa en el modelo de HIV-1 que hemos implementado (**Figs. 1.12 y 1.13**), pero el avance temporal es modesto y podría estar parte del beneficio se debe a que el ciclo no está limitado por los recursos celulares y la productividad global es proporcional al número de provirus (Shcherbatova et al., 2020). Experimentalmente, se ha observado que la transmisión colectiva de HIV-1 entre células adelanta el comienzo de la expresión génica viral (Boullé et al., 2016). Sin embargo, tal adelanto se ajusta mejor a un modelo no cooperativo en el que el comienzo de la expresión génica viral lo establece el provirus que primero se expresa por azar (Boullé et al., 2016). Esto sugiere que los efectos de la replicación cooperativa de HIV-1 (si los hay) podrían diluirse con la estocasticidad en la expresión génica viral, en la que pueden influir factores como la tasa de transcripción del sitio de integración del provirus (Jordan et al., 2001; Skupsky et al., 2010), los cuales, además, no deberían conferir un beneficio per cápita.

La replicación cooperativa y la dinámica viral intracelular

Nuestros modelos y simulaciones sugieren que la replicación cooperativa puede tener importantes consecuencias para la dinámica viral intracelular. En 1940, Delbrück estudió matemáticamente el efecto de las fluctuaciones estocásticas en las reacciones autocatalíticas iniciadas por N_0

DISCUSIÓN

moléculas basándose en su formulación más simple, que es la descrita por la ecuación del crecimiento exponencial (Delbrück, 1940). Así pues, determinó que cuando $N_0 = 1$, el número de moléculas esperado a un tiempo dado seguía una distribución exponencial y, por tanto, con coeficiente de variación (CV) unitario (ya que su media y desviación típica son equivalentes). Por otra parte, si $N_0 > 1$, se obtenía una distribución normal con $CV = 1/\sqrt{N_0}$. También determinó que las fluctuaciones afectaban de la misma manera a la distribución del tiempo empleado en alcanzar cierto número de moléculas. Sin embargo, el carácter no lineal de la replicación cooperativa reduce el tiempo de duplicación de los genomas virales con el transcurso del ciclo infectivo (es decir, aumenta la tasa de crecimiento per cápita), siempre que resten suficientes recursos celulares por consumir. Por tanto, el crecimiento viral temprano es hiperexponencial, lo que produce el adelantamiento desproporcionado del ciclo infectivo al coinfectar y, además, implica que la distribución del número de componentes virales tenga un $CV > 1$ durante las etapas iniciales de la infección. Obsérvese, como reflejo de ello, la enorme variabilidad en las trayectorias de nuestras simulaciones (**Fig. 1.7A**), así como el amplio rango de valores comprendidos entre los percentiles del 10% y 90% observados a tiempos tempranos tanto en nuestras simulaciones sencillas (**Figuras 1.7B-C**) como en las simulaciones del ciclo de IVA (**Figs. 1.12 y 1.13**).

En relación con lo anterior, distintos estudios han mostrado experimentalmente que los niveles de replicación, expresión génica y el rendimiento viral pueden fluctuar en varios órdenes de magnitud entre células infectadas (Combe et al., 2015; Guo et al., 2017; Heldt et al., 2015; Schulte and Andino, 2014; Timm and Yin, 2012; Xin et al., 2018; Zhu et al., 2009).

Teniendo en cuenta su estudio de los sistemas autocatalíticos, Delbrück especuló que toda esta dispersión en las variables de la infección podría originarse en eventos estocásticos tempranos (Delbrück, 1945). Además de este factor, que es intrínseco a la replicación, otros trabajos más actuales han considerado la acción de factores extrínsecos, que representan la heterogeneidad en la composición genética y el estado del hospedador o de los virus (Heldt et al., 2015), los cuales parecen depender ampliamente del virus ensayado. Por ejemplo, factores como el tamaño de la célula o la fase del ciclo celular al comienzo de la infección resultan críticos para explicar la variabilidad observada entre las infecciones del virus de la fiebre aftosa (FMDV; Xin et al. 2018), moderadamente relevantes para las de VSV (Timm and Yin, 2012; Zhu et al., 2009), e irrelevantes para las de poliovirus (Guo et al., 2017; Schulte and Andino, 2014) o IVA (Heldt et al., 2015). No obstante, algunas de las propiedades de la replicación cooperativa que se manifiestan en nuestros modelos sugieren que factores intrínsecos y extrínsecos no deberían considerarse independientes. Por otro lado, el estudio de la dinámica intracelular no debería fundamentarse únicamente en mediciones tomadas a final del ciclo infectivo, que son las típicamente reportadas en la mayoría de las publicaciones.

En primer lugar, en nuestros modelos, la magnitud de las fluctuaciones estocásticas depende de la intensidad de la cooperatividad en la replicación, que será mayor cuanto más aumente la tasa de crecimiento per cápita en función de la densidad de moléculas virales presentes. Esto se refleja al comparar la dinámica de las coinfecciones con la de las monoinfecciones. Al combinar distintos valores de los parámetros de nuestro modelo sencillo observamos que la intensidad de la cooperación varía ampliamente (**Fig. 1.6**),

DISCUSIÓN

por lo tanto, la heterogeneidad en las características del hospedador y del virus (factores extrínsecos) afectan a la magnitud de las fluctuaciones estocásticas (factor intrínseco). Cabe destacar que esto no ocurre si asumimos que el inicio del ciclo infeccioso sigue una dinámica exponencial, pues la tasa de crecimiento per cápita es constante para cualquier conjunto de parámetros, y la dispersión debida a las fluctuaciones sería la descrita por Delbrück. Obsérvese como distintos conjuntos de parámetros modifican la intensidad de la replicación cooperativa y generan dispersión en la dinámica viral en nuestros modelos y simulaciones sencillas (**Figs. 1.3 y 1.7D**). Sin embargo, esta dispersión es mínima en nuestro modelo de replicación no cooperativa (**Fig. 1.5E**), y surge a causa de que la replicación al inicio del ciclo no es completamente exponencial al existir una limitación por recursos celulares (crecimiento logístico) que se vuelve progresivamente más intensa.

En segundo lugar, como esta limitación por los recursos celulares impide que el crecimiento viral siga una dinámica exponencial o cooperativa de forma continua, anula las predicciones sobre el efecto de las fluctuaciones estocásticas al final del ciclo infeccioso. En nuestros modelos, la estocasticidad inicial (o la cMOI) apenas altera la producción total de progenie o genomas virales si consideramos infecciones productivas. Así pues, las trayectorias de nuestras simulaciones muestran una gran dispersión a tiempos intermedios, que desaparece mayormente al final del ciclo infeccioso (**Fig. 1.7A**). De acuerdo con estos resultados, se ha observado que el rendimiento viral de VSV (Timm and Yin, 2012; Zhu et al., 2009) y de poliovirus (Schulte and Andino, 2014) es independiente de la cMOI, y se ha especulado que depende fundamentalmente de la disponibilidad de recursos celulares (Schulte and Andino, 2014; Timm and Yin, 2012). Sin embargo, sí se ha determinado que

la cMOI tiene un impacto profundo en otras variables del ciclo infectivo de poliovirus, como el tiempo de inicio de la replicación o la duración media del ciclo infectivo (Guo et al., 2017). Además, en este estudio, la distribución de estas dos variables muestra una notable reducción de sus valores medios al aumentar la cMOI (Guo et al., 2017), de acuerdo con nuestros modelos y observaciones experimentales. Por otro lado, se ha determinado que el segmento genómico menos abundante determina mayormente el rendimiento viral de IVA (Heldt et al., 2015). Esto sugiere que, como en los virus segmentados o multipartidos los distintos segmentos genómicos compiten por unos recursos comunes, las fluctuaciones iniciales en los niveles de abundancia de cada segmento pueden propagarse a lo largo de la infección y afectar a la productividad final.

La transmisión colectiva y los eventos de colonización

A pesar de que la coinfección rara vez es considerada en el estudio de la dinámica viral, debe ser un fenómeno frecuente en las poblaciones virales. Por un lado, los virus pueden alcanzar tamaños poblacionales enormes en cada hospedador. Por ejemplo, se ha estimado que cada individuo infectado por HIV-1 contiene unas 10^{10} partículas virales (Salemi, 2013). Por otro lado, la distribución de estos viriones no es homogénea, sino que se compartimenta en distintos órganos y tejidos donde los virus se propagan en focos de infección. El crecimiento en focos causa un incremento local de la densidad viral, por lo que la infección colectiva es la norma (Gallagher et al., 2018; Gutiérrez et al., 2015; Jacobs et al., 2019). Aunque en un contexto de elevada densidad de virus los costes y al menos una parte de los beneficios de la coinfección podrían perder sentido ante la escasez de células susceptibles, las poblaciones virales experimentan grandes fluctuaciones demográficas durante su

DISCUSIÓN

diseminación a distintos órganos y tejidos, y especialmente en su transmisión entre hospedadores, donde la suerte de unas pocas partículas virales fundadoras definirá el establecimiento o la extinción de la población viral (Gutiérrez et al., 2012; McCrone and Lauring, 2018; Zwart and Elena, 2015a). Por tanto, es en estos eventos de colonización donde las unidades infecciosas colectivas (CIUs) podrían resultar cruciales para los virus al proporcionar los beneficios de una mayor cMOI de partida. Sin embargo, para que ello ocurra, éstas deberán contribuir a la eficacia biológica de forma netamente beneficiosa, compensando todos sus posibles costes.

En nuestros ensayos hemos empleado agregados virales de VSV inducidos con saliva como modelo de CIU (Cuevas et al., 2017), y hemos estudiado los efectos de la agregación en la producción temprana de progenie viral (a 4 y 6 hpi), en el establecimiento y la expansión de los focos de infección, en el tiempo de invasión de los cultivos infectados, y en la eficacia biológica en competencia, todo ello utilizando cultivos BHK-21 y MEF para observar el papel del hospedador (muy permisivo frente a poco permisivo, respectivamente). Dado que VSV no agrega en el medio de cultivo, los efectos de los agregados se limitan al evento de infección inicial, y se comparan respecto a un mismo inóculo no sometido a agregación con saliva. Además, hemos extendido nuestros análisis a otras seis líneas celulares (Vero, A549, MRC5, CT26, 4T1 y Neuro2a) para relacionar las consecuencias de la agregación sobre la eficacia biológica y la producción temprana de progenie viral con los distintos valores de permisividad y capacidad de respuesta inmunitaria de cada cultivo. Para definir estas variables explicativas hemos estimado, respectivamente, el porcentaje de focos de infección por partícula viral (física, no infecciosa) y la razón de títulos finales (24 hpi) alcanzados por

VSV WT frente al mutante VSV $\Delta 51$, que no bloquea la respuesta antiviral (Stojdl et al., 2003; **Tabla 2.1**).

Las conclusiones que se derivan de estos experimentos se ajustan a algunas de las predicciones teóricas de nuestros modelos y son congruentes con los efectos observados en las coinfecciones producidas por viriones independientes de VSV en cultivos de HeLa H1, MEF y BHK-21 (**Figs. 1.14 y 2.1**). Primero, los agregados virales tienden a acelerar la liberación temprana de progenie viral (**Fig. 2.2**; Tabla 2.1), lo cual acelera la invasión del cultivo y puede conferirles una ventaja competitiva frente al inóculo monodisperso (**Figs. 2.3, 2.5 y 2.6**). Segundo, el efecto positivo de la agregación depende ampliamente de las características del hospedador, y correlacionan inversamente con la permisividad de las células a la infección (**Fig. 2.7**) y directamente con su capacidad para establecer una respuesta antiviral (**Fig. 2.8A**). Tercero, de acuerdo con las simulaciones estocásticas, la infección colectiva mediada por agregados puede incrementar sustancialmente la probabilidad de iniciar la infección con éxito y puede llegar a compensar el coste dispersivo de la agregación, como hemos visto que ocurre en MEF (**Figs. 2.4 y 2.5**). Adicionalmente, hemos determinado en cultivos MEF que los agregados no contribuyen a un mayor bloqueo de la respuesta antiviral mediada por interferón β , pero sí permiten a los virus adelantarse a la misma por un mayor número de ciclos (**Fig. 2.8B**). También hemos observado que la carga mutacional favorece la interferencia viral más que la complementación entre mutantes deletéreos (**Fig. 2.9**) y que los efectos de la agregación en saliva son, al menos en parte, independientes de posibles componentes provirales presentes en ésta (**Fig. 2.10 y Tabla 2.2**).

DISCUSIÓN

En su conjunto, nuestros resultados sugieren que la selección natural debería favorecer la agregación de VSV en saliva, pues tiende a proporcionar beneficios que compensan sus distintos posibles costes. Además, los efectos positivos de la agregación fueron mucho más marcados en cultivos MEF y MRC5, que corresponden a las dos únicas líneas de crecimiento no tumoral y que no albergan múltiples defectos génicos, por lo que deberían representar las condiciones celulares *in vivo* mejor que el resto de cultivos tumorales. Cabe recordar que la mucosa oral del ganado es el principal centro de replicación y liberación de VSV al exterior, donde previamente se mezcla con abundante saliva a una temperatura adecuada para agregar (Letchworth et al., 1999; Rozo-Lopez et al., 2018). Por ello, la agregación en saliva no es únicamente un excelente método para conseguir suspensiones de VSV altamente agregadas en el laboratorio, sino que contribuye a la transmisión natural del virus por contacto directo entre animales y con fómites. Además, los artrópodos que actúan como vectores mecánicos o biológicos también pueden adquirir el virus o infectarse al entrar en contacto con zonas contaminadas con saliva (Letchworth et al., 1999; Rozo-Lopez et al., 2018; véase Introducción).

El efecto netamente positivo de la agregación de VSV podría reducir el impacto negativo de los cuellos de botella que operan en la transmisión entre hospedadores (Gutiérrez et al., 2012; McCrone and Lauring, 2018; Zwart and Elena, 2015a). Se ha estimado que es habitual que menos de una decena de virus comiencen la infección en el nuevo hospedador (Zwart and Elena, 2015a), lo que puede reducir en buena medida la eficacia biológica y la capacidad adaptativa viral. Además del evidente efecto demográfico, los cuellos de botella implican una reducción severa en la diversidad genética de

la población fundadora, cuya composición puede diferir radicalmente de la población de origen (efecto fundador). Además, en estas condiciones la deriva genética se impone sobre la selección natural y gobierna la evolución de los genotipos virales, permitiendo que puedan fijarse variantes ligeramente deletéreas. En consecuencia, la eficacia biológica de la población fundadora tiende a reducirse, y la escasez de diversidad dificulta su adaptación al nuevo ambiente. Posteriormente, la expansión de la población viral permite recuperar al menos una parte de su variabilidad gracias a las elevadas tasas de mutación de los virus, y la mutación reversa y compensatoria o la recombinación contribuyen a purgar los cambios perjudiciales. No obstante, en condiciones adversas, con expansiones breves seguidas de cuellos de botella frecuentes, la deriva favorece la fijación recurrente de mutaciones deletéreas en un proceso conocido como trinquete de Müller (Chao, 1990; Duarte et al., 1992; Muller, 1964; Novella and Ebandick-Corpus, 2004; Yuste et al., 1999), que reduce progresivamente la eficacia biológica e incrementa la probabilidad de extinción poblacional en los cuellos de botella subsiguientes (Lynch and Gabriel, 1990).

Dejando a un lado los posibles beneficios o costes vehiculares que los agregados de VSV podrían experimentar en sus rutas de transmisión natural, cabría esperar que redujesen la magnitud de los cuellos de botella mediante al menos tres mecanismos. En primer lugar, como la infección colectiva incrementa sinérgicamente la probabilidad de infectar con éxito en un ambiente adverso, los agregados deberían aumentar el número de partículas virales que contribuyen a la nueva población viral, incluso si el número de focos fundadores es menor al generado por una misma dosis monodispersa. En segundo lugar, al acelerar la invasión del tejido, la respuesta antiviral y

DISCUSIÓN

otros sistemas de defensa del hospedador tendrán menos oportunidades de bloquear el crecimiento de los focos fundadores de forma temprana (como ocurre en células MEF estimuladas con citoquinas). En consecuencia, un mayor número de variantes virales tendrán la posibilidad de diseminar sistémicamente dentro del hospedador y formar parte de la población viral transmisible. En tercer lugar, de acuerdo con nuestras imágenes de microscopía de fluorescencia a tiempo real, las variantes virales cotransmitidas en agregados virales no segregan inmediatamente después del primer ciclo de infección, a pesar de que en VSV puede operar la exclusión de la superinfección (Simon et al., 1990; Whitaker-Dowling et al., 1983), lo que debería favorecer el mantenimiento de la diversidad genética inicial. Todo ello contribuye a incrementar el tamaño poblacional (efectivo), reducir el impacto de la deriva genética en las trayectorias evolutivas y favorecer la invasión y adaptación del virus al hospedador. No obstante, no cabe descartar posibles efectos negativos de iniciar la infección con agregados, como por ejemplo promover la interferencia si la carga mutacional de las poblaciones es muy elevada.

En la naturaleza, los virus que requieren la invasión de hospedadores muy distintos para completar sus ciclos biológicos son los que típicamente padecen más intensamente los efectos negativos de los cuellos de botella. Por ejemplo, la capacidad adaptativa de los arbovirus suele estar constreñida por los efectos intensos de la deriva genética durante su diseminación en el insecto vector y la posterior selección purificadora que experimentan al alcanzar su hospedador vertebrado (Coffey et al., 2013; Forrester et al., 2014; Geoghegan and Holmes, 2018; Grubaugh et al., 2016, 2017; Lequime et al., 2016; Weaver et al., 2021). En el caso de VSV, aunque no requiere la infección de vectores

artrópodos para su transmisión, la circulación del virus involucra un gran número de especies animales muy distintas, que abarcan tanto insectos como mamíferos y aves (Letchworth et al., 1999).

Nuestro estudio es el primero en analizar los efectos de la transmisión colectiva sobre la eficacia biológica viral en múltiples hospedadores con diferente permisividad y capacidad inmunitaria. En conjunto, nuestras conclusiones refuerzan las de otros estudios que han sugerido que la transmisión colectiva se beneficia del efecto masa que causa coinfectar (véase Introducción), especialmente aquellos que demuestran que una mayor cMOI contribuye a superar barreras tempranas a nivel celular (Agosto et al., 2015; Borges et al., 2018; Landsberger et al., 2018; Richardson et al., 2008; Sigal et al., 2011) e incrementa la infectividad (Heldt et al., 2015; Luque et al., 2009; Stiefel et al., 2012). Un estudio reciente ha investigado los efectos de la cMOI en la replicación de distintos subtipos aviáres de IVA en diferentes células de mamíferos y aves (Phipps et al., 2020). Así pues, los autores han concluido que los influenza virus tienden a depender moderadamente de la coinfección para replicar, pero tal dependencia aumenta drásticamente cuando los virus aviáres infectan células de mamífero, sugiriendo que la coinfección podría contribuir a cruzar la barrera de especie y, por tanto, a la emergencia viral.

El origen de los efectos beneficiosos de la agregación

Los efectos generalmente positivos que hemos observado al agregar VSV en saliva podrían depender de factores distintos a la replicación cooperativa. En general, la agregación puede conllevar beneficios o costes vehiculares, como favorecer o dificultar la adsorción y la endocitosis de los virus en las células. Por otro lado, los efectos basados en la diversidad genética

DISCUSIÓN

cotransmitida también pueden ser positivos (cooperación entre variantes virales, complementación de mutantes deletéreos) o negativos (interferencia).

Asumiendo que la entrada de múltiples viriones en una célula no afecta en absoluto a la dinámica de la infección, la complementación genética y los beneficios vehiculares necesitarían incrementar el número total de focos de infección para generar un beneficio neto. No obstante, nuestros ensayos indican que agregar disminuye alrededor de 3,5 veces el número total de focos de infección en BHK-21 y que apenas llega a compensar el coste dispersivo en MEF (**Fig. 2.5A**). Otra posibilidad es que los agregados aceleren la entrada de los viriones. Sin embargo, el tiempo de incubación de VSV en cultivos es de 45 minutos, por lo que el margen de beneficio en la entrada por sí solo es demasiado corto para explicar, por ejemplo, el adelanto de aproximadamente 2,5 horas en el tiempo de invasión media del cultivo observado en MEF (**Fig. 2.2B**). Aunque esta ventaja temporal podría ser consecuencia de algún componente presente en los agregados que favorezca la replicación viral (quizá actuando sobre el metabolismo celular), los resultados obtenidos con viriones individuales en HeLa H1, BHK-21 y MEF (**Figs. 1.14 y 2.1**) y con agregados no inducidos con saliva (**Fig. 2.10 y Tabla 2.2**) sugieren fuertemente que el efecto positivo de agregar con saliva se origina principalmente en las consecuencias que tiene incrementar la multiplicidad de infección celular sobre la dinámica del ciclo infectivo.

Sin embargo, es más complicado determinar en qué medida nuestras observaciones dependen de que la replicación sea cooperativa. Nuestros modelos matemáticos muestran que distribuir una misma cantidad de viriones en un menor número de células sólo puede incrementar la liberación temprana de progenie viral per cápita si la replicación es cooperativa. No obstante, los

beneficios vehiculares y la complementación de defectos génicos o estructurales podrían promover que un mayor número de los viriones inoculados contribuyan al inicio de la infección. En tal caso, tal vez la agregación produjera efectos positivos como los observados, incluso si asumimos que los viriones replican independientemente y que el número de focos de infección es inferior al de la condición monodispersa. Por tanto, cabe preguntarse cuál es el papel de estos factores en nuestros ensayos y hasta qué punto podemos sustentar nuestras conclusiones en la replicación cooperativa.

De acuerdo con nuestros análisis, es poco probable que la cooperación basada en diversidad contribuya positivamente a los beneficios de agregar observados en los experimentos. Según múltiples estudios, la distribución de los efectos de las nuevas mutaciones en la eficacia biológica viral tiende a estar constituida por cambios mayoritariamente neutrales o deletéreos a distintos niveles (Carrasco et al., 2007; Eyre-Walker and Keightley, 2007; Sanjuan et al., 2004), por lo que la interacción espontánea entre mutantes beneficiosos debe ser rara. La complementación, en cambio, parece plausible, y la aplicación de mutágenos para elevar la carga mutacional de nuestras poblaciones virales debería incrementar su frecuencia. Sin embargo, en nuestros ensayos, las poblaciones mutagenizadas replicaron notablemente peor tras ser agregadas (**Fig. 2.9**), mostrando que la interferencia prima sobre los efectos positivos de la complementación. Si asumimos que esta preponderancia de la interferencia se mantiene en las poblaciones no mutagenizadas, entonces la diversidad incorporada en los agregados de VSV debería resultar costosa en promedio, y no contribuiría a explicar los efectos positivos de agregar.

DISCUSIÓN

En el contexto de los virus con genomas segmentados o multipartidos, la complementación puede tomar mayor relevancia, pues estos virus generalmente lo que requieren complementar es la dosis génica (Brooke, 2017; Jacobs et al., 2019; Lucía-Sanz and Manrubia, 2017; Sanjuán, 2018; Sicard et al., 2019). Sin embargo, considerar que los genotipos virales salvajes son siempre dominantes frente a los mutantes deletéreos obvia los casos de dominancia intermedia o negativa que pueden causar distintos grados de interferencia (Whitaker-Dowling and Youngner, 1987). De hecho, la interferencia causada por la dominancia negativa se ha observado en distintas etapas del ciclo infectivo de múltiples virus. Por ejemplo, en la regulación de la expresión génica de herpesvirus (Weber et al., 1992), en la replicación de HCV (Graziani and Paonessa, 2004) y HIV-1 (Meredith et al., 2009), en el ensamblaje y la transcripción reversa del virus de la hepatitis B (Von Weizsäcker et al., 1999), y en la resistencia de los viriones y agregados de VSV a anticuerpos (Cuevas et al., 2017; Holland et al., 1989) y de las cápsides de poliovirus a antivirales (Tanner et al., 2014). Además, los genomas interferentes defectivos son potentes inhibidores de la replicación cuando son complementados por genomas funcionales (Chao and Elena, 2017; Marriott and Dimmock, 2010). Más aun, estos y otros posibles mutantes actúan como inmunoestimuladores (Manzoni and López, 2018; Rezelj et al., 2018), y podrían contribuir a explicar el impacto negativo intenso observado al inocular agregados de viriones mutagenizados en MEF (**Fig. 2.9**). De acuerdo con esto, los agregados no mutagenizados también promovieron una mayor expresión del gen *Mx2* del ratón a las 6 hpi en MEF, lo que podría responder a una mayor inmunoestimulación por la aceleración del ciclo infectivo, pero también a una mayor presencia de mutantes deletéreos inmunoestimulantes. Recientemente también se ha hallado que las infecciones colectivas de IVA en A549

promueven la expresión de genes corriente abajo del IFN como *ISG15* y *Mx1* humano (Martin et al., 2020).

Nuestros resultados no permitieron descartar por completo la posible presencia en los agregados de algún componente de la saliva que favoreciese la infección, ya sea incrementando la adsorción a las células, como por ejemplo se ha visto que ocurre en los agregados que forma HIV-1 en el semen (Münch et al., 2007), o afectando al metabolismo celular para acelerar la replicación viral, que sólo afectaría a las células infectadas por agregados. Curiosamente, se ha detectado que algunas proteínas de la saliva permanecen unidas a los agregados de VSV, entre las cuales destaca la cadena gamma del fibrinógeno (FGG), cuyos niveles en saliva parecen determinar la capacidad del virus para agregar (Anschau and Sanjuán, 2020). El fibrinógeno participa en múltiples procesos relacionados con la coagulación, la agregación de plaquetas y la cicatrización, y su cadena gamma se une a integrinas, receptores celulares y factores de crecimiento y de coagulación. No obstante, también está implicado en otros procesos patológicos como la proliferación y metástasis de algunos tumores (Farrell, 2004; Vilar et al., 2020). De hecho, se ha observado que algunos cultivos tumorales como A549 sobreexpresan FGG junto al factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2), cuya interacción promueve el crecimiento y la capacidad invasiva de las células (Sahni et al., 2007). Por tanto, la FGG parece una molécula candidata para promover la adsorción y la replicación de los viriones agregados, aunque es incierto que la cantidad de FGG contenida en los agregados sea suficiente para desencadenar este último efecto. En este sentido, es posible que algunas de nuestras líneas celulares (además de A549) sobreexpresen o presentan unos niveles basales de FGG muy superiores al aporte de los agregados.

DISCUSIÓN

Los efectos no inmediatos de la agregación

Tras haber analizado el impacto inmediato generalmente positivo de la agregación de VSV sobre la eficacia biológica del virus, nos propusimos estudiar si la agregación promovía la evolución de interacciones cooperativas entre variantes virales en coinfección (cooperación heterotípica) o, por el contrario, resultaban ser buenos vehículos para la propagación de variantes desertoras. Para ello realizamos un ensayo de evolución experimental en el que infectamos de forma seriada cultivos de BHK-21 a baja densidad viral (0,01 partículas infecciosas totales/célula) partiendo de una mezcla equilibrada de VSV-GFP y VSV-mCherry, que incubamos en saliva antes de cada pase en las líneas agregadas (líneas A) y mantuvimos monodispersa en las líneas control (líneas C; **Fig. 3.1**). Además del mencionado objetivo principal, también consideramos factible que el virus evolucionase en el transcurso del ensayo para optimizar su capacidad de agregación en saliva alcanzando así la fracción agregada de la población viral y/o el tamaño del agregado que confiriese una mayor ventaja adaptativa para el virus en BHK-21. Sin embargo, resultó muy sorprendente observar cómo, en sólo tres pases de evolución, los ensayos de citometría de flujo mostraban que incubar en saliva las poblaciones de las líneas A producía tasas de coinfección mixta (positividad para GFP y mCherry) inferiores en promedio a las observadas en las líneas C sin incubar (**Tabla 3.1** y **Fig. 3.2B**).

Parecía poco probable que las condiciones impuestas en nuestro ensayo de evolución produjeran una presión selectiva tan intensa como para causar el fenotipo observado en solo tres pases, más aún si tenemos en cuenta que nuestros ensayos previos indicaban que la agregación de VSV resultaba ligeramente beneficiosa en cultivos de BHK-21. De acuerdo con ello, los datos

de secuenciación masiva permitieron descartar la proliferación de variantes no agregantes en las líneas evolucionadas en agregación, ya que no se encontraron variantes virales a alta frecuencia ni tampoco a frecuencia baja que fuesen candidatas a causar una pérdida de agregación del virus (**Fig. 3.3A** y **Tabla 3.2**). Sin embargo, si se detectó una acumulación significativamente mayor de mutaciones no sinónimas en las líneas A que se localizaba únicamente en gen L (**Fig. 3.3B**). Como confirmamos posteriormente, este resultado sugería que la agregación estaba favoreciendo la invasión de las poblaciones virales por partículas interferentes defectivas (DIPs), pues las DIPs de VSV presentan deleciones que típicamente abarcan todos los genes del virus, aunque mantienen parte de la secuencia del gen L (Cureton et al., 2010), donde pueden acumular cambios no sinónimos al no codificar ningún producto génico funcional.

Mediante ensayos de reducción de título determinamos que las poblaciones evolucionadas de las líneas A causaban niveles de interferencia moderados en comparación con un control positivo de DIPs obtenido mediante tres infecciones seriadas a alta densidad viral (10 PFU/célula; **Fig. 3.4**). Con los ensayos de RT-qPCR cuantificamos que la presencia de genomas virales delecionados (DIPs) era entre 5 y 9 veces mayor que la de genomas completos en las líneas A, mientras que los genomas completos fueron mayoritarios en las líneas C (**Tabla 3.3**). Finalmente, observamos la presencia masiva de DIPs en nuestras líneas A evolucionadas empleando la microscopía electrónica de transmisión (**Fig. 3.5**), de acuerdo con la morfología típicamente acortada de estas partículas descrita en múltiples estudios previos (Cureton et al., 2010; Huang et al., 1966; Timm et al., 2014).

DISCUSIÓN

Las DIPs parecen ser las responsables directas de la disminución de la tasa de coinfección mixta observada durante los pases en agregación, pues fueron el único rasgo distintivo hallado en las líneas A evolucionadas y su eliminación mediante dos infecciones seriadas sin agregación y a muy baja densidad viral ($<0,001$ PFU/célula) permitieron recuperar completamente los niveles iniciales de coinfección mixta tras incubar en saliva. Dado que la participación de las DIPs en los agregados es una condición necesaria para su emergencia en nuestro régimen de evolución, es posible prever al menos dos posibles vías por las que la presencia de DIPs en nuestros ensayos pudo interferir con la detección de infecciones mixtas. Por un lado, las DIPs podrían favorecer la abortividad de las infecciones iniciadas por agregados virales, lo cual reduciría la contribución de éstos a la fluorescencia total respecto a los viriones que hubiesen permanecido monodispersos tras el tratamiento con saliva. Por otro lado, la región deletada en los genomas de las DIPs incluye el gen reportero GFP o mCherry, por lo que éstas no producen fluorescencia en las células que infectan. Por tanto, al ser muy mayoritarias en la población, es posible que la mayor parte de los agregados consistiesen únicamente de DIPs o de DIPs con una sola variante fluorescente, lo que produciría infecciones abortivas e infecciones positivas para un único marcador, respectivamente.

Un resultado interesante de nuestra evolución experimental es que la agregación promovió la acumulación rápida de DIPs manteniendo el título viral aproximadamente constante en torno a las 10^9 PFUs/ml (**Fig. 3.2B**). En cambio, en las infecciones seriadas a alta densidad viral (10 PFU/ml), que realizamos para obtener un control positivo de DIPs, el título viral al tercer pase fue del orden de las 10^5 PFUs/ml. Esto probablemente se debe a que las

infecciones iniciadas con agregados virales parten de una baja densidad viral, por lo que el virus necesita múltiples ciclos de infección para arrasarse el cultivo. La estructura espacial en focos de infección favorece que aquellas infecciones más productivas (ausencia o menor presencia de DIPs) sean las que se extiendan principalmente por el cultivo. Por tanto, es posible que la fracción del inóculo formada por viriones funcionales libres; es decir, aquellos que no hayan logrado agregarse durante la incubación en saliva, sean los principales contribuyentes al título final. No obstante, este crecimiento en focos no impide que las DIPs mantengan una frecuencia poblacional elevada en nuestros ensayos como consecuencia de agregar indiscriminadamente con los viriones funcionales producidos tras cada pase de evolución.

Por otra parte, aunque abortamos nuestro ensayo de evolución experimental prematuramente ante la posibilidad de que el virus hubiese perdido la capacidad de agregar, es posible prever qué podría haber ocurrido si hubiésemos continuado realizando pases durante más tiempo. Una posibilidad es la emergencia de mutantes resistentes a las DIPs. Este resultado ya ha sido observado previamente al realizar cientos de pases de evolución transfiriendo el sobrenadante de infección de VSV sin diluir en cultivos BHK-21 (DePolo et al., 1987). Estos mutantes acumularon distintos tipos de cambios en el gen de la nucleocápside y, sobre todo, en los extremos genómicos, que se encargan de regular la replicación y la encapsidación del virus. Sin embargo, aunque estas adaptaciones previenen la invasión por un cierto tipo de DIP, los mutantes resistentes también producen sus propias DIPs a las que son susceptibles, lo que genera una continua coevolución entre los virus funcionales y las DIPs, que nunca llegan a desaparecer de la población. Por tanto, en nuestro caso, resulta más simple que la selección acabe

DISCUSIÓN

favoreciendo variantes no agregantes como mecanismo para reducir la multiplicidad de infección celular, que es necesaria para la proliferación de las DIPs.

Consecuencias evolutivas de la transmisión colectiva

El conjunto de nuestros resultados sugiere que la agregación de VSV tiene dos tipos de consecuencias para la eficacia biológica viral. Por un lado, nuestros análisis sobre los efectos inmediatos de la agregación muestran que ésta puede conferirle a VSV una ventaja competitiva inmediata al incrementar la multiplicidad de infección celular (cMOI), que adelanta desproporcionadamente el ciclo infectivo provocando un efecto sinérgico en la liberación de progenie viral y en la capacidad del virus para superar las barreras y eventos estocásticos tempranos que limitan la infección. Por otro lado, al incrementar la cMOI también se reduce la acción de la selección purificadora en los cuellos de botella, por lo que la agregación sostenida promueve que variantes desertoras como las DIPs invadan la población viral y reduzcan la eficacia biológica de los virus que se transmiten agregados. Por lo tanto, de estos resultados se deduce que la agregación frecuente o continua de VSV durante la transmisión intercelular debería estar fuertemente desfavorecida por la selección natural. Además, esta conclusión podría no limitarse a VSV, ya que la emergencia de DIPs en regímenes de alta cMOI es un proceso observado en un gran número de virus (Huang and Baltimore, 1970; Manzoni and López, 2018; Marriott and Dimmock, 2010; Rezelj et al., 2018; Vignuzzi and López, 2019).

Al comienzo de la introducción de esta tesis explicamos que la evolución de la cooperación requiere de la existencia de factores como la

estructura espacial (viscosidad poblacional) u otros mecanismos que eviten la interacción indiscriminada de individuos cooperadores con desertores. En nuestros ensayos esto no ocurre, porque los agregados virales se forman por la asociación completamente aleatoria de viriones procedentes de distintas células, que forman una mezcla homogénea en el sobrenadante de infección. Ante este escenario, y de acuerdo con nuestros resultados, la teoría de la evolución social predice la invasión de la población por variantes desertoras. Sin embargo, VSV no agrega durante su propagación por el cultivo celular y es muy probable que la estructura espacial en focos de infección y el fenómeno de la exclusión de la superinfección (Simon et al., 1990; Whitaker-Dowling et al., 1983) hayan resultado críticos para mantener un título elevado de virus funcionales durante los tres pases de evolución, a pesar de la proliferación de las DIPs. En la naturaleza, estos mismos procesos y los cuellos de botella que operan durante la diseminación intrahospedador podrían mantener las DIPs bajo control, permitiendo a los virus beneficiarse de una transmisión colectiva episódica.

De acuerdo con esta hipótesis, los viriones de VSV podrían agregar al mezclarse en saliva en la cavidad oral e de los animales infectados, pero no en otros fluidos biológicos como el plasma sanguíneo, cuya capacidad agregante resulta modesta *in vitro* (Cuevas et al., 2017) y debería ser menor *in vivo* teniendo en cuenta que VSV produce viremias frecuentemente indetectables (Letchworth et al., 1999; Rozo-Lopez et al., 2018). Además de VSV, otros virus forman agregados en los fluidos biológicos y condiciones asociadas a sus principales rutas de transmisión. Este es el caso de los agregados que forma HIV-1 con las fibras amiloides del líquido seminal (Münch et al., 2007; Usmani et al., 2014). La asociación de virus con bacterias intestinales o

DISCUSIÓN

componentes de las mismas también se ha observado múltiples virus que se transmiten por la vía fecal-oral (Neu and Mainou, 2020) como, por ejemplo, poliovirus y otros picornavirus (Aguilera et al., 2019; Erickson et al., 2018), norovirus (Almand et al., 2017; Jones et al., 2014; Li et al., 2015), y reovirus (Berger et al., 2017). En todos estos casos, los virus podrían haberse adaptado a agregar únicamente en la transmisión entre hospedadores para beneficiarse de los efectos positivos de incrementar la cMOI en las primeras etapas de la colonización, evitando promover la invasión masiva de las DIPs.

Cabe resaltar que si la capacidad de interacción entre viriones se redujese desde la total libertad (población bien mezclada) hasta el entorno local de cada célula productora de progenie viral, la agregación debería volverse progresivamente más robusta a la invasión por DIPs y otras variantes desertoras (Segredo-Otero and Sanjuán, 2019). Este último caso se asemejaría a lo que ocurre durante la transmisión directa de viriones entre células y probablemente en el resto de unidades infecciosas colectivas (vesículas extracelulares, viriones poliploides y cuerpos de oclusión), en las cuales los viriones o genomas virales se asocian antes de liberarse de la célula. Este hecho genera una estructura poblacional a nivel celular que reduce la distancia genética entre los virus que se transmiten conjuntamente, permitiendo que opere la selección de parentesco (o multinivel) para favorecer la proliferación de las asociaciones cooperativas. Esta es, probablemente, la razón por la que estas CIUs pueden propagarse de forma continua sin que las DIPs u otros desertores reduzcan drásticamente la eficacia biológica de la población viral. De acuerdo con esto, se ha observado que la transmisión seriada de vesículas purificadas de CVB3 durante 20 pases de evolución en cultivos HeLa H1 no causa una emergencia masiva de DIPs (Bou et al., 2019).

Por otro lado, es necesario matizar que las DIPs no se ajustan a la dinámica que predice el dilema del prisionero, pues al ser parásitas obligadas de los virus funcionales no puede fijarse en la población viral y, por tanto, no conducen directamente a su extinción (aunque la favorecen). Esto es porque en el dilema del prisionero, la desertión es la única estrategia evolutivamente estable, ya que es la que reporta mayores beneficios tanto en un contexto de cooperadores (se obtiene un beneficio extra) como en uno de desertores (no se incurre en costes). Sin embargo, las DIPs son letales en un contexto de sólo DIPs (desertión) y, al ser ésta la peor opción, la matriz de pagos cambia a la de otro juego conocido como “el gallina” (*game of chicken*) o “montón de nieve” (*Snowdrift*). En este caso, la estrategia evolutivamente estable es mixta, pues ante una población de cooperadores es preferible desertar, mientras que en una de desertores es mejor cooperar. Por tanto, este juego predice que las DIPs deberían alcanzar un equilibrio estable con los genomas funcionales si la coinfección ocurre a una tasa constante (Chao and Elena, 2017; Doebeli and Hauert, 2005; Turner and Chao, 2003), aunque la dinámica intracelular podría generar fluctuaciones. Las DIPs no son los únicos desertores que se ajustan al juego del gallina, y la letalidad de los desertores en ausencia de cooperadores no es un requisito. De hecho, Turner y Chao demostraron que la interacción de dos mutantes no defectivos del fago $\phi 6$ de *Pseudomonas* se ajustaba a la matriz de pagos y predicciones de este juego (Turner and Chao, 2003).

A pesar de que la selección natural debería favorecer la proliferación de los focos de infección con menor presencia de DIPs, existe un cuerpo de evidencia cada vez mayor de que las DIPs están presentes en poblaciones virales naturales, que además parecen cumplir importantes funciones inmunoregulatoras y de inducción a la persistencia (Manzoni and López,

DISCUSIÓN

2018; Rezelj et al., 2018; Vignuzzi and López, 2019). Estos efectos pueden conducir, en algunos casos, a una menor sintomatología y a una mayor duración de la infección, y podrían incrementar la tasa de transmisión del virus, como parece ocurrir en poblaciones del virus del dengue (Ke et al., 2013). Sin embargo, por ahora se desconoce si la transmisión colectiva contribuye significativamente al mantenimiento de tales niveles de DIPs en la población viral, y tampoco parece claro que estos puedan considerarse una solución adaptativa para algunos virus, pues podrían simplemente haberse adaptado a convivir con las DIPs al no poder evitarlas por completo.

La evolución de cooperación basada en diversidad debería estar enormemente limitada en nuestros ensayos. Por un lado, la rápida emergencia de las DIPs interfiere específicamente con el desarrollo de los agregados e introduce una fuerte presión selectiva en su contra. Por otro lado, los niveles de DIPs en la población viral son tan elevados que impiden la agregación frecuente de distintas posibles variantes del virus, como se deduce de la disminución drástica en la cantidad de infecciones mixtas (GFP y mCherry) detectadas en nuestros ensayos de citometría de flujo.

Como hemos comentado, las CIUs que establecen su composición de variantes a nivel celular deberían ser más robustas a la invasión por DIPs u otros desertores (Segredo-Otero and Sanjuán, 2019), por lo que podrían permitir la evolución de la cooperación heterotípica. Sin embargo, es probable que la producción de mutantes interferentes resulte mucho más frecuente que la de variantes cooperativas, especialmente en poblaciones virales bien adaptadas a su ambiente. Ante esta situación, la mejor opción para el virus sería segregar las variantes virales en distintas unidades colectivas para obtener los beneficios de la replicación cooperativa y reducir el continuo lastre

causado por las variantes desertoras. Múltiples líneas de evidencia apuntan en esta dirección, señalando la compartimentación como un posible mecanismo fundamental para establecer una estructura espacial intracelular que limite la segregación de variantes virales al azar. Así pues, se ha determinado que las células coinfectadas con las variantes GFP y mCherry de CVB3 producen vesículas extracelulares con hasta varias decenas de partículas infecciosas; sin embargo, sólo un $13,0 \pm 0,5$ % de estas vesículas transmiten ambas variantes (Bou et al., 2019). Esto sugiere que los viriones que codispersan proceden de un único centro replicativo en el que se forman esas vesículas (Mutsafi and Altan-Bonnet, 2018). También se han observado tasas similares (6 – 14%) para la cotransmisión de variantes mediada por las sinapsis virológicas que induce HIV-1 (Law et al., 2016). Análogamente, en virus de plantas se han detectado fuertes cuellos de botella genéticos asociados a la transmisión célula a célula mediada por plasmodesmos (Miyashita et al., 2015). En estos casos se ha propuesto que podrían estar implicados sistemas reguladores de la replicación como el descubierto en TCV (que ya hemos mencionado previamente), por el cual una parte de los genomas fundadores se segregan de forma temprana en distintos centros replicativos asociados a membranas para actuar como moldes de replicación durante la infección (Zhang et al., 2018).

Si estos procesos que limitan la transmisión conjunta de distintas variantes virales son la norma entre las distintas estrategias de transmisión colectiva no está claro. Sin embargo, la compartimentación subcelular se encuentra muy extendida entre los virus (den Boon and Ahlquist, 2010; den Boon et al., 2010; Fernández de Castro et al., 2021; Schmid et al., 2014; Shulla and Randall, 2016) y múltiples estudios sugieren que, en ausencia de segregación, altas tasas de coinfección sostenida deberían resultar muy

DISCUSIÓN

perjudiciales para la eficacia biológica viral (Froissart et al., 2004; Sardanyés and Elena, 2010; Segredo-Otero and Sanjuán, 2019; Zhu et al., 2021). Esto se debe a que la continua complementación genética entre variantes deletéreas debería dificultar su purgado incluso en presencia de recombinación (Froissart et al., 2004), lo que puede disminuir la tasa de adaptación de los virus (Zhu et al., 2021) y conducir la población viral hacia la catástrofe del error (Froissart et al., 2004; Sardanyés and Elena, 2010; Segredo-Otero and Sanjuán, 2019), que es una situación en la que la secuencia maestra (no mutada) de la población viral se pierde entre una nube de mutantes.

Ante tal perspectiva, el escenario para la evolución de la cooperación basada en diversidad se muestra hostil. Sin embargo, múltiples estudios han sugerido que las interacciones cooperativas entre distintas variantes contribuyen a incrementar la eficacia biológica viral, especialmente en aquellos virus de ARN con mayores tasas de mutación (Andino and Domingo, 2015; Bordería et al., 2015; Ciota et al., 2012; Luring and Andino, 2010; Shirogane et al., 2019; Vignuzzi et al., 2006). A pesar de ello, frecuentemente se desconocen los mecanismos y el nivel al que ocurren tales interacciones, y no está claro que produzcan un efecto positivo sobre la eficacia biológica. De hecho, es frecuente que las presuntas interacciones virales se califiquen como cooperativas por el hecho de incrementar la patogénesis en el hospedador, lo cual puede ser perjudicial para el virus (Acevedo et al., 2019). Por ejemplo, se observó que la diversidad genética de poliovirus se vinculaba con su capacidad para alcanzar el sistema nervioso central; sin embargo, que un virus de transmisión fecal-oral alcance este tejido es poco indicativo de un aumento de eficacia biológica (Vignuzzi et al., 2006). También se ha observado en poblaciones naturales de baculovirus que los cuerpos de oclusión contienen

una frecuencia estable de variantes defectivas incapaces de transmitirse en ausencia del virus salvaje (López-Ferber et al., 2003; Simón et al., 2013). Se ha propuesto que tales variantes incrementan la virulencia y aceleran la transmisión, y que la interacción es mutualista porque el genotipo salvaje incurre en costes al sobreexpresar los factores necesarios para transmitirse. No obstante, este caso podría ajustarse al juego del gallina, donde los defectores actuarían como desertores por ser individualmente letales (no se transmiten), y la aparente sobreexpresión de dichos factores podría estar seleccionada evolutivamente por la presencia de estos mutantes.

Por tanto, aunque se han descrito ciertas interacciones aparentemente beneficiosas entre variantes virales en coinfección (Shirogane et al., 2012; Xue et al., 2016), por ahora es incierto que la cooperación heterotípica pueda evolucionar en poblaciones virales a través de las diferentes estrategias de transmisión colectiva o mediante otros mecanismos. En cualquier caso, parece claro que éste no debe ser un fenómeno frecuente, por lo que es mucho más probable que sean mecanismos cooperativos no basados en diversidad (como la replicación cooperativa) los que, junto a los beneficios vehiculares de algunos modos de transmisión colectiva, promuevan la dispersión conjunta de los virus.

Perspectivas futuras

Debido a las limitaciones dispersivas espaciales, la infección colectiva es un fenómeno frecuente (Gallagher et al., 2018; Gutiérrez et al., 2015; Jacobs et al., 2019) que puede tener un gran impacto en la eficacia biológica que se asocia a las distintas variantes virales (Zhu et al., 2021) y que produce

DISCUSIÓN

efectos no lineales tanto en la dimensión temporal de la infección como en su establecimiento,

Los modelos matemáticos desarrollados en esta tesis para el estudio de la infección colectiva, aunque recogen aspectos básicos y comunes a al menos la mayoría de virus, son muy simples y no permiten analizar las consecuencias de otros factores fundamentales que podrían incluirse en el futuro, como la respuesta antiviral o la estructura espacial, tanto intracelular (compartimentación) como extracelular (crecimiento focal).

La modelización de la dinámica viral intracelular se ha llevado a cabo en detalle en un número limitado de virus (Yin and Redovich, 2018). No obstante, estos modelos son de gran valor tanto a nivel básico, para comprender los procesos del ciclo infectivo viral, como aplicado, para encontrar entre los productos génicos virales aquellas dianas moleculares óptimas para desarrollar antivirales o para atenuar los virus que se emplean en vacunas. Sin embargo, a la luz de los efectos no lineales que hemos observado al incrementar la multiplicidad de infección celular en nuestros modelos y experimentos, debería evitarse linealizar en exceso estos modelos y se deberían considerar los efectos colectivos en su análisis, pues las dianas óptimas contra las que dirigir los fármacos podrían variar en función del número de genomas iniciales.

Además, nuestros modelos muestran que los procesos que ocurren al comienzo de la infección son excepcionalmente importantes, pero sus consecuencias no tienen por qué reflejarse en las etapas finales de la infección. Sin embargo, en los estudios actuales en células individuales existe una tendencia a medir variables de final de ciclo, como el rendimiento viral, y no

siempre se consideran los efectos de la infección colectiva. En futuros experimentos debería prestarse más atención a estos aspectos para mejorar la comprensión de la variabilidad de las infecciones entre células y contribuir a informar mejor los modelos matemáticos previamente mencionados, que ahora dependen de datos promedio obtenidos en cultivos celulares a una densidad viral concreta.

Por otro lado, aunque nuestros ensayos sobre los efectos inmediatos de la agregación de VSV en saliva podrían ampliarse en múltiples direcciones, un aspecto que requiere mayor atención es el de determinar si los agregados poseen beneficios o costes vehiculares, ya sean mediados o no por algún componente de la saliva. Además, para soportar mejor nuestras conclusiones sobre el posible papel de los agregados en la transmisión sería interesante extender nuestros ensayos *in vivo* (incluyendo insectos), especialmente para descartar que la agregación no suponga un lastre para alcanzar las células susceptibles, como parece ocurrir con los agregados de HIV-1 que se forman en el semen (Real et al., 2018).

Ensayar la agregación de otros virus en los fluidos biológicos y condiciones presentes en sus principales rutas de transmisión podría proporcionarnos nuevos modelos experimentales de agregados virales biológicamente relevantes con los que extender nuestros análisis. Además de VSV, una enorme cantidad de virus se encuentran comúnmente en la saliva (herpesvirus, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, rinovirus, IVA...) y algunos la emplean como principal medio de transmisión (Corstjens et al., 2016; Limeres Posse et al., 2017; Slots and Slots, 2011). También la saliva de los insectos vectores juega un papel fundamental en la transmisión de múltiples arbovirus causantes de importantes enfermedades humanas y

DISCUSIÓN

animales (Fong et al., 2018; Schneider and Higgs, 2008; Sun et al., 2020). De igual modo, nuestros ensayos podrían aplicarse a distintos tipos de CIUs que puedan ser aisladas en el laboratorio, lo que permitiría analizar la generalidad de nuestras conclusiones entre distintos virus y CIUs.

Si la agregación resulta frecuentemente implicada en la transmisión viral, conocer los componentes y mecanismos empleados para agregar podría inspirar nuevos fármacos que eviten, reviertan o promuevan la agregación con el fin de dificultar los contagios. Por otro lado, plantearía una acuciante necesidad de revisar la hipótesis de acción independiente, que afirma que los virus no interactúan entre sí para establecer la infección, de modo que cada partícula viral tiene una cierta probabilidad independiente de causar la infección o la muerte de su hospedador (Cornforth et al., 2015; Zwart and Elena, 2015a, 2015b; Zwart et al., 2009, 2011). Todos los resultados de esta tesis implican que esta afirmación no se sostiene a nivel celular. Sin embargo, es asumida por distintas organizaciones de salud pública para valorar los riesgos de contagio (Cornforth et al., 2015). El estudio de los comportamientos sociales en bacterias ha llevado a descartar esta hipótesis en muchos casos (Cornforth et al., 2015) y probablemente ocurra lo mismo en virus. Por el momento, los estudios escasean y los métodos típicamente empleados son poco robustos bajo factores como la variabilidad entre las células del hospedador (Zwart and Elena, 2015a, 2015b). De hecho, Zwart y Elena (2015b) desarrollaron un método más robusto y detectaron que la hipótesis no se cumplía en un sistema donde sí lo había hecho previamente, y la causa de tal desviación se halló en la coinfección.

Determinar si existe una base genética para las estrategias de transmisión colectiva es crítico si queremos estudiarlas desde un punto de

vista evolutivo. También sería relevante precisar si la asociación de partículas virales es un carácter cualitativo o cuantitativo (optimizable). La evolución experimental parece una aproximación adecuada para resolver estos problemas. En nuestro ensayo de evolución experimental podrían haber surgido variantes virales no agregantes de no haber cancelado el ensayo prematuramente, pues la acumulación de DIPs inducía una fuerte selección en contra de los agregados. Otros regímenes de evolución, por ejemplo, alternando la agregación con la monodispersión para evitar la acumulación de DIPs, podrían contribuir a determinar si los niveles de agregación pueden optimizarse para cierto cultivo celular.

En el caso de otras CIUs más robustas a la invasión por DIPs, la evolución experimental en condiciones que no permiten a las CIUs compensar sus costes dispersivos podría promover la pérdida u optimización de los niveles de asociación. De acuerdo con esto, la aplicación de distintos regímenes de evolución experimental a la transmisión en vesículas de CVB3 en HeLa H1 ha permitido identificar mutantes de las proteínas de la cápside VP1 (K257Q y K257M), VP3 (N63H) y VP4 (I24T) que afectan a la transmisión en vesículas. Todos estos mutantes redujeron significativamente el número promedio de viriones transmitidos en cada vesícula y, en el caso de N63H, también se redujo la producción total de vesículas extracelulares infecciosas (Bou and Sanjuán, 2021). Además, la evolución experimental con estas CIUs robustas también podría ayudarnos a resolver si la cooperación heterotípica puede evolucionar en algún contexto.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de esta tesis se resumen en los siguientes puntos:

- La replicación viral es inherentemente cooperativa debido a la realimentación positiva no lineal que se da entre los genomas virales y los productos génicos que codifican.
- A consecuencia de la replicación cooperativa, la infección colectiva produce un adelanto desproporcionado del ciclo infectivo que acelera la producción temprana de genomas virales per cápita. Además, aumenta sinérgicamente el éxito de la infección ante barreras tempranas y efectos estocásticos limitantes.
- Estos efectos pueden incrementar de forma neta la eficacia biológica de los virus que infectan conjuntamente, aunque ello depende de distintas características del virus, del hospedador y del medio que afectan a su intensidad y propagación a los ciclos de infección subsiguientes.
- Los efectos contrarios de la replicación cooperativa tales como la competencia por los recursos celulares implican que debe existir un número óptimo de genomas virales fundadores para el cual la coinfección puede resultar beneficiosa.
- Los efectos positivos de la infección colectiva se mantienen al inocular agregados de VSV inducidos con saliva en múltiples líneas celulares, los cuales aceleran la liberación de progenie viral y confieren una ventaja competitiva frente a un mismo número de viriones monodispersos en múltiples líneas celulares.
- La eficacia biológica de los agregados correlaciona inversamente con la permisividad celular a la infección y directamente con la competencia celular para establecer una respuesta inmunitaria innata contra virus.
- El efecto positivo de la agregación sobre la eficacia biológica viral fue mayor en líneas celulares no tumorales (MEF y MRC5), que reflejan mejor las condiciones naturales *in vivo*. Además, al menos en MEF, la agregación de VSV no redujo el número de focos de infección, indicando un aumento sinérgico del establecimiento de la infección en condiciones poco permisivas.
- La cuantificación de la expresión del gen *Mx2* del ratón en células MEF inoculadas con agregados mostró que éstos no contribuyen a un

CONCLUSIONES

bloqueo de la respuesta antiviral. No obstante, la agregación sí contribuyó a mejorar la invasión en cultivos MEF previamente estimulados con citoquinas.

- La complementación genética probablemente no contribuyó positivamente a nuestros resultados, ya que la agregación resultó deletérea al incrementar la carga mutacional de la población viral mediante mutagénesis química con 5-FU.
- La agregación sin saliva también produjo un efecto positivo sobre la eficacia de VSV en MEF, aunque fue menos intenso. Esto implica que los efectos observados dependen parcialmente de incrementar la cMOI, pero no es posible descartar que algún componente de la saliva proporcione otros beneficios de tipo vehicular.
- La agregación continua favorece la invasión de la población viral por partículas interferentes defectivas, que reducen la eficacia biológica de la población viral e introducen una fuerte presión selectiva contra la agregación.
- Este hecho es contrario a la evolución de la cooperación entre variantes virales distintas, aunque éstas quizá puedan evolucionar en otras CIUs más robustas a la invasión.
- Limitar la agregación a la transmisión entre hospedadores parece una estrategia óptima para aprovechar los beneficios inmediatos de agregar sin incurrir en los costes de hacerlo continuamente.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abia, L.M., Angulo, O., and López-Marcos, J.C. (2005). Age-structured population models and their numerical solution. In *Ecological Modelling*, (Elsevier), pp. 112–136.

Acevedo, M.A., Dillemuth, F.P., Flick, A.J., Faldyn, M.J., and Elder, B.D. (2019). Virulence-driven trade-offs in disease transmission: A meta-analysis*. *Evolution* (N. Y). *73*, 636–647.

Agosto, L.M., Uchil, P.D., and Mothes, W. (2015). HIV cell-to-cell transmission: Effects on pathogenesis and antiretroviral therapy. *Trends Microbiol.* *23*, 289–295.

Ågren, J.A., Davies, N.G., and Foster, K.R. (2019). Enforcement is central to the evolution of cooperation. *Nat. Ecol. Evol.* *3*, 1018–1029.

Aguilera, E.R., and Pfeiffer, J.K. (2019). Strength in numbers: Mechanisms of viral co-infection. *Virus Res.* *265*, 43–46.

Aguilera, E.R., Erickson, A.K., Jesudhasan, P.R., Robinson, C.M., and Pfeiffer, J.K. (2017). Plaques Formed by Mutagenized Viral Populations Have Elevated Coinfection Frequencies. *MBio* *8*.

Aguilera, E.R., Nguyen, Y., Sasaki, J., and Pfeiffer, J.K. (2019). Bacterial Stabilization of a Panel of Picornaviruses. *MSphere* *4*.

Ahmed, M., McKenzie, M.O., Puckett, S., Hojnacki, M., Poliquin, L., and Lyles, D.S. (2003). Ability of the Matrix Protein of Vesicular Stomatitis Virus To Suppress Beta Interferon Gene Expression Is Genetically Correlated with the Inhibition of Host RNA and Protein Synthesis. *J. Virol.* *77*, 4646–4657.

Albertini, A.A. V, Baquero, E., Ferlin, A., and Gaudin, Y. (2012). Molecular and cellular aspects of rhabdovirus entry. *Viruses* *4*, 117–139.

Allen, S.A., Carias, A.M., Anderson, M.R., Okocha, E.A., Benning, L., McRaven, M.D., Kelley, Z.L., Lurain, J., Veazey, R.S., and Hope, T.J. (2015). Characterization of the Influence of Semen-Derived Enhancer of Virus Infection on the Interaction of HIV-1 with Female Reproductive Tract Tissues. *J. Virol.* *89*, 5569–5580.

Almand, E.A., Moore, M.D., Outlaw, J., and Jaykus, L.-A. (2017). Human norovirus binding to select bacteria representative of the human gut microbiota. *PLoS One* *12*, e0173124.

Altan-Bonnet, N. (2016). Extracellular vesicles are the Trojan horses of viral

- infection. *Curr. Opin. Microbiol.* 32, 77–81.
- Andino, R., and Domingo, E. (2015). Viral quasispecies. *Virology* 479–480, 46–51.
- Anschau, V., and Sanjuán, R. (2020). Fibrinogen Gamma Chain Promotes Aggregation of Vesicular Stomatitis Virus in Saliva. *Viruses* 12, 282.
- Appel, N., Herian, U., and Bartenschlager, R. (2005). Efficient Rescue of Hepatitis C Virus RNA Replication by trans -Complementation with Nonstructural Protein 5A. *J. Virol.* 79, 896–909.
- Arantes, T.S., Rodrigues, R.A.L., Dos Santos Silva, L.K., Oliveira, G.P., de Souza, H.L., Khalil, J.Y.B., de Oliveira, D.B., Torres, A.A., da Silva, L.L., Colson, P., et al. (2016). The Large Marseillevirus Explores Different Entry Pathways by Forming Giant Infectious Vesicles. *J. Virol.* 90, 5246–5255.
- Aunins, T.R., Marsh, K.A., Subramanya, G., Uprichard, S.L., Perelson, A.S., and Chatterjee, A. (2018). Intracellular Hepatitis C Virus Modeling Predicts Infection Dynamics and Viral Protein Mechanisms. *J. Virol.* 92.
- Axelrod, R., and Hamilton, W.D. (1981). The evolution of cooperation. *Science* (80-.). 212, 1390–1396.
- Bald, J.G., and Briggs, G.E. (1937). Aggregation of virus particles [13]. *Nature* 140, 111.
- Ball, L.A., Pringle, C.R., Flanagan, B., Perepelitsa, V.P., and Wertz, G.W. (1999). Phenotypic Consequences of Rearranging the P, M, and G Genes of Vesicular Stomatitis Virus. *J. Virol.* 73, 4705–4712.
- Barr, J.N., and Wertz, G.W. (2001). Polymerase Slippage at Vesicular Stomatitis Virus Gene Junctions To Generate Poly(A) Is Regulated by the Upstream 3' -AUAC-5' Tetranucleotide: Implications for the Mechanism of Transcription Termination. *J. Virol.* 75, 6901–6913.
- Bellet, A.J., and Cooper, P.D. (1959). Some properties of the transmissible interfering component of vesicular. *J. Gen. Microbiol.* 21, 498–509.
- Bello-Morales, R., Ripa, I., and López-Guerrero, J.A. (2020). Extracellular vesicles in viral spread and antiviral response. *Viruses*.
- Beniac, D.R., Melito, P.L., Devarenes, S.L., Hiebert, S.L., Rabb, M.J., Lamboo, L.L., Jones, S.M., and Booth, T.F. (2012). The organisation of Ebola

BIBLIOGRAFÍA

virus reveals a capacity for extensive, modular polyploidy. *PLoS One* 7, e29608.

Berger, A.K., Yi, H., Kearns, D.B., and Mainou, B.A. (2017). Bacteria and bacterial envelope components enhance mammalian reovirus thermostability. *PLOS Pathog.* 13, e1006768.

Bergua, M., Kang, S.H., and Folimonova, S.Y. (2016). Understanding superinfection exclusion by complex populations of Citrus tristeza virus. *Virology*.

Bernard, C., Li, Y., Lopez, P., and Bapteste, E. (2021). Beyond arbitrium: identification of a second communication system in Bacillus phage phi3T that may regulate host defense mechanisms. *ISME J.* 15, 545–549.

Birchler, J.A., Auger, D.L., and Riddle, N.C. (2003). In Search of the Molecular Basis of Heterosis. *Plant Cell* 15, 2236–2239.

Bonning, B.C., and Hammock, B.D. (1996). Development of Recombinant Baculoviruses for Insect Control. *Annu. Rev. Entomol.* 41, 191–210.

den Boon, J.A., and Ahlquist, P. (2010). Organelle-Like Membrane Compartmentalization of Positive-Strand RNA Virus Replication Factories. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 241–256.

den Boon, J.A., Diaz, A., and Ahlquist, P. (2010). Cytoplasmic Viral Replication Complexes. *Cell Host Microbe* 8, 77–85.

Boots, M., and Meador, M. (2007). Local interactions select for lower pathogen infectivity. *Science* (80-.). 315, 1284–1286.

Bordería, A. V, Isakov, O., Moratorio, G., Henningsson, R., Agüera-González, S., Organtini, L., Gnädig, N.F., Blanc, H., Alcover, A., Hafenstein, S., et al. (2015). Group Selection and Contribution of Minority Variants during Virus Adaptation Determines Virus Fitness and Phenotype. *PLoS Pathog.* 11, e1004838.

Borges, A.L., Zhang, J.Y., Rollins, M.C.F., Osuna, B.A., Wiedenheft, B., and Bondy-Denomy, J. (2018). Bacteriophage Cooperation Suppresses CRISPR-Cas3 and Cas9 Immunity. *Cell* 174, 917-925.e10.

Bou, J.-V., and Sanjuán, R. (2021). Experimental Evolution Reveals a Genetic Basis for Membrane-Associated Virus Release. *Mol. Biol. Evol.* 38, 358–367.

- Bou, J.V., Geller, R., and Sanjuán, R. (2019). Membrane-Associated Enteroviruses Undergo Intercellular Transmission as Pools of Sibling Viral Genomes. *Cell Rep.* *29*, 714-723.e4.
- Boullé, M., Müller, T.G., Dähling, S., Ganga, Y., Jackson, L., Mahamed, D., Oom, L., Lustig, G., Neher, R.A., and Sigal, A. (2016). HIV Cell-to-Cell Spread Results in Earlier Onset of Viral Gene Expression by Multiple Infections per Cell. *PLOS Pathog.* *12*, e1005964.
- Bracq, L., Xie, M., Benichou, S., and Bouchet, J. (2018). Mechanisms for cell-to-cell transmission of HIV-1. *Front. Immunol.* *9*, 1.
- Bregegere, F. (1974). Bacteriophage P2- λ interference: Inhibition of protein synthesis involves transfer RNA inactivation. *J. Mol. Biol.* *90*, 459–467.
- Brooke, C.B. (2017). Population Diversity and Collective Interactions during Influenza Virus Infection. *J. Virol.* *91*.
- Canini, L., and Perelson, A.S. (2014). Viral kinetic modeling: State of the art. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* *41*, 431–443.
- Carneiro, F.A., Bianconi, M.L., Weissmüller, G., Stauffer, F., and Da Poian, A.T. (2002). Membrane Recognition by Vesicular Stomatitis Virus Involves Enthalpy-Driven Protein-Lipid Interactions. *J. Virol.* *76*, 3756–3764.
- Carrasco, P., de la Iglesia, F., and Elena, S.F. (2007). Distribution of Fitness and Virulence Effects Caused by Single-Nucleotide Substitutions in Tobacco Etch Virus. *J. Virol.* *81*, 12979–12984.
- Carrington, J.C., Kasschau, K.D., Mahajan, S.K., and Schaad, M.C. (1996). Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* *8*, 1669–1681.
- Chao, L. (1990). Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet. *Nature* *348*, 454–455.
- Chao, L., and Elena, S.F. (2017). Nonlinear trade-offs allow the cooperation game to evolve from Prisoner's Dilemma to Snowdrift. *Proceedings. Biol. Sci.* *284*.
- Chaurushiya, M.S., and Weitzman, M.D. (2009). Viral manipulation of DNA repair and cell cycle checkpoints. *DNA Repair (Amst.)* *8*, 1166–1176.
- Chen, Y.-H., Du, W., Hagemeyer, M.C., Takvorian, P.M., Pau, C., Cali, A.,

BIBLIOGRAFÍA

Brantner, C.A., Stempinski, E.S., Connelly, P.S., Ma, H.-C., et al. (2015). Phosphatidylserine Vesicles Enable Efficient En Bloc Transmission of Enteroviruses. *Cell* *160*, 619–630.

Cheng, C.C., Yang, C.F., Lo, Y.P., Chiang, Y.H., Sofiyatun, E., Wang, L.C., and Chen, W.J. (2020). Cell-to-Cell Spread of Dengue Viral RNA in Mosquito Cells. *Biomed Res. Int.* *2020*.

Cicin-Sain, L., Podlech, J., Messerle, M., Reddehase, M.J., and Koszinowski, U.H. (2005). Frequent coinfection of cells explains functional in vivo complementation between cytomegalovirus variants in the multiply infected host. *J. Virol.* *79*, 9492–9502.

Cifuentes-Muñoz, N., Dutch, R.E., and Cattaneo, R. (2018). Direct cell-to-cell transmission of respiratory viruses: The fast lanes. *PLOS Pathog.* *14*, e1007015.

Ciota, A.T., Ehrbar, D.J., Van Slyke, G.A., Willsey, G.G., and Kramer, L.D. (2012). Cooperative interactions in the West Nile virus mutant swarm. *BMC Evol. Biol.* *12*.

Coffey, L.L., Forrester, N., Tsetsarkin, K., Vasilakis, N., and Weaver, S.C. (2013). Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: Implications for the emergence of disease. *Future Microbiol.* *8*, 155–176.

Cohen, E.M., and Kobilier, O. (2016). Gene Expression Correlates with the Number of Herpes Viral Genomes Initiating Infection in Single Cells. *PLOS Pathog.* *12*, e1006082.

Collis, P.S., O'Donnell, B.J., Barton, D.J., Rogers, J.A., and Flanagan, J.B. (1992). Replication of poliovirus RNA and subgenomic RNA transcripts in transfected cells. *J. Virol.* *66*, 6480–6488.

Combe, M., Garijo, R., Geller, R., Cuevas, J.M., and Sanjuán, R. (2015). Single-Cell Analysis of RNA Virus Infection Identifies Multiple Genetically Diverse Viral Genomes within Single Infectious Units. *Cell Host Microbe* *18*, 424–432.

Cornforth, D.M., Matthews, A., Brown, S.P., and Raymond, B. (2015). Bacterial Cooperation Causes Systematic Errors in Pathogen Risk Assessment due to the Failure of the Independent Action Hypothesis. *PLOS Pathog.* *11*, e1004775.

Corstjens, P.L.A.M., Abrams, W.R., and Malamud, D. (2016). Saliva and viral

infections. *Periodontol.* 2000 *70*, 93–110.

Crespi, B.J. (2001). The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends Ecol. Evol.* *16*, 178–183.

Cuevas, J.M., Durán-Moreno, M., and Sanjuán, R. (2017). Multi-virion infectious units arise from free viral particles in an enveloped virus. *Nat. Microbiol.* *2*, 17078.

Cureton, D.K., Massol, R.H., Whelan, S.P.J., and Kirchhausen, T. (2010). The Length of Vesicular Stomatitis Virus Particles Dictates a Need for Actin Assembly during Clathrin-Dependent Endocytosis. *PLoS Pathog.* *6*, e1001127.

DaPalma, T., Doonan, B.P., Trager, N.M., and Kasman, L.M. (2010). A systematic approach to virus-virus interactions. *Virus Res.* *149*, 1–9.

Dedrick, R.M., Jacobs-Sera, D., Guerrero Bustamante, C.A., Garlena, R.A., Mavrich, T.N., Pope, W.H., Cervantes Reyes, J.C., Russell, D.A., Adair, T., Alvey, R., et al. (2017). Prophage-mediated defence against viral attack and viral counter-defence. *Nat. Microbiol.*

Delbrück, M. (1940). Statistical Fluctuations in Autocatalytic Reactions. *J. Chem. Phys.* *8*, 120–124.

Delbrück, M. (1945). Interference Between Bacterial Viruses. *J. Bacteriol.* *50*, 151–170.

DePolo, N.J., Giachetti, C., and Holland, J.J. (1987). Continuing coevolution of virus and defective interfering particles and of viral genome sequences during undiluted passages: virus mutants exhibiting nearly complete resistance to formerly dominant defective interfering particles. *J. Virol.* *61*, 454–464.

Dias, A., Bouvier, D., Crépin, T., McCarthy, A.A., Hart, D.J., Baudin, F., Cusack, S., and Ruigrok, R.W.H. (2009). The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* *458*, 914–918.

Díaz-Muñoz, S.L. (2017). Viral coinfection is shaped by host ecology and virus-virus interactions across diverse microbial taxa and environments. *Virus Evol.* *3*.

Díaz-Muñoz, S.L. (2019). Uncovering Virus-Virus Interactions by Unifying Approaches and Harnessing High-Throughput Tools. *MSystems* *4*.

BIBLIOGRAFÍA

Díaz-Muñoz, S.L., Sanjuán, R., and West, S. (2017). Sociovirology: Conflict, Cooperation, and Communication among Viruses. *Cell Host Microbe* 22, 437–441.

Doceul, V., Hollinshead, M., Van Der Linden, L., and Smith, G.L. (2010). Repulsion of superinfecting virions: A mechanism for rapid virus spread. *Science* (80-.).

Doceul, V., Hollinshead, M., Breiman, A., Laval, K., and Smith, G.L. (2012). Protein B5 is required on extracellular enveloped vaccinia virus for repulsion of superinfecting virions. *J. Gen. Virol.*

Dodding, M.P., and Way, M. (2009). Nck- and N-WASP-Dependent Actin-Based Motility Is Conserved in Divergent Vertebrate Poxviruses. *Cell Host Microbe* 6, 536–550.

Doebeli, M., and Hauert, C. (2005). Models of cooperation based on the Prisoner's Dilemma and the Snowdrift game. *Ecol. Lett.* 8, 748–766.

Dolgin, E. (2019). The secret social lives of viruses. *Nature* 570, 290–292.

Domingo-Calap, P., Segredo-Otero, E., Durán-Moreno, M., and Sanjuán, R. (2019). Social evolution of innate immunity evasion in a virus. *Nat. Microbiol.* 4, 1006–1013.

Doms, R.W., Blumenthal, R., and Moss, B. (1990). Fusion of intra- and extracellular forms of vaccinia virus with the cell membrane. *J. Virol.* 64, 4884–4892.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 6015–6019.

Erez, Z., Steinberger-Levy, I., Shamir, M., Doron, S., Stokar-Avihail, A., Peleg, Y., Melamed, S., Leavitt, A., Savidor, A., Albeck, S., et al. (2017). Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions. *Nature* 541, 488–493.

Erickson, A.K., Jesudhasan, P.R., Mayer, M.J., Narbad, A., Winter, S.E., and Pfeiffer, J.K. (2018). Bacteria Facilitate Enteric Virus Co-infection of Mammalian Cells and Promote Genetic Recombination. *Cell Host Microbe* 23, 77-88.e5.

Eyre-Walker, A., and Keightley, P.D. (2007). The distribution of fitness

effects of new mutations. *Nat. Rev. Genet.* 8, 610–618.

Fan, Y., Sanyal, S., and Bruzzone, R. (2018). Breaking Bad: How Viruses Subvert the Cell Cycle. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 396.

Farrell, D.H. (2004). Pathophysiologic roles of the fibrinogen gamma chain. *Curr. Opin. Hematol.* 11, 151–155.

Feng, P., Everly, D.N., and Read, G.S. (2001). mRNA Decay during Herpesvirus Infections: Interaction between a Putative Viral Nuclease and a Cellular Translation Factor. *J. Virol.* 75, 10272–10280.

Feng, Z., Hensley, L., McKnight, K.L., Hu, F., Madden, V., Ping, L., Jeong, S.H., Walker, C., Lanford, R.E., and Lemon, S.M. (2013). A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature* 496, 367–371.

Fernández de Castro, I., Tenorio, R., and Risco, C. (2021). Virus Factories. In *Encyclopedia of Virology*, (Elsevier), pp. 495–500.

Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S., and Rubinstein, M. (2013). LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 7306–7311.

Fong, S.-W., Kini, R.M., and Ng, L.F.P. (2018). Mosquito Saliva Reshapes Alphavirus Infection and Immunopathogenesis. *J. Virol.* 92.

Forrester, N.L., Coffey, L.L., and Weaver, S.C. (2014). Arboviral bottlenecks and challenges to maintaining diversity and fitness during mosquito transmission. *Viruses* 6, 3991–4004.

Frensing, T., Heldt, F.S., Pflugmacher, A., Behrendt, I., Jordan, I., Flockerzi, D., Genzel, Y., and Reichl, U. (2013). Continuous Influenza Virus Production in Cell Culture Shows a Periodic Accumulation of Defective Interfering Particles. *PLoS One* 8, e72288.

Froissart, R., Wilke, C.O., Montville, R., Remold, S.K., Chao, L., and Turner, P.E. (2004). Co-infection weakens selection against epistatic mutations in RNA viruses. *Genetics* 168, 9–19.

Fujimoto, R., Uezono, K., Ishikura, W., Osabe, K., Peacock, W.J., and Dennis, E.S. (2018). Recent research on the mechanism of heterosis is important for crop and vegetable breeding systems. *Breed. Sci.* 68, 145–158.

BIBLIOGRAFÍA

- Galasso, G.J. (1967). Quantitative studies on the quality, effects of aggregation and thermal inactivation of vesicular stomatitis virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 21, 437–446.
- Galasso, G.J., and Sharp, D.G. (1962). Virus particle aggregation and the plaque-forming unit. *J. Immunol.* 88, 339–347.
- Gallagher, M.E., Brooke, C.B., Ke, R., and Koelle, K. (2018). Causes and consequences of spatial within-host viral spread. *Viruses* 10.
- Gallego del Sol, F., Penadés, J.R., and Marina, A. (2019). Deciphering the Molecular Mechanism Underpinning Phage Arbitrium Communication Systems. *Mol. Cell* 74, 59-72.e3.
- García-Murria, M.J., Duart, G., Grau, B., Diaz-Beneitez, E., Rodríguez, D., Mingarro, I., and Martínez-Gil, L. (2020). Viral Bcl2s' transmembrane domain interact with host Bcl2 proteins to control cellular apoptosis. *Nat. Commun.* 11, 6056.
- García-Sastre, A. (2017). Ten Strategies of Interferon Evasion by Viruses. *Cell Host Microbe* 22, 176–184.
- Gardner, A. (2015). The genetical theory of multilevel selection. *J. Evol. Biol.* 28, 305–319.
- Gardner, A., West, S.A., and Wild, G. (2011). The genetical theory of kin selection. *J. Evol. Biol.* 24, 1020–1043.
- Gardner, A., Griffin, A.S., and West, S.A. (2016). Theory of Cooperation. In *ELS*, (Wiley), pp. 1–8.
- Gelderblom, H.C., Vatakis, D.N., Burke, S.A., Lawrie, S.D., Bristol, G.C., and Levy, D.N. (2008). Viral complementation allows HIV-1 replication without integration. *Retrovirology* 5, 60.
- Gentile, G.M., Wetzel, K.S., Dedrick, R.M., Montgomery, M.T., Garland, R.A., Jacobs-Sera, D., and Hatfull, G.F. (2019). More evidence of collusion: A new prophage-mediated viral defense system encoded by mycobacteriophage sbash. *MBio*.
- Geoghegan, J.L., and Holmes, E.C. (2018). The phylogenomics of evolving virus virulence. *Nat. Rev. Genet.* 19, 756–769.
- Gerba, C.P., and Betancourt, W.Q. (2017). Viral Aggregation: Impact on

- Virus Behavior in the Environment. *Environ. Sci. Technol.* *51*, 7318–7325.
- Gillespie, D.T. (1977). Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. In *Journal of Physical Chemistry*, p.
- Gillespie, D.T. (2007). Stochastic simulation of chemical kinetics. *Annu. Rev. Phys. Chem.* *58*, 35–55.
- Graziani, R., and Paonessa, G. (2004). Dominant negative effect of wild-type NS5A on NS5A-adapted subgenomic hepatitis C virus RNA replicon. *J. Gen. Virol.* *85*, 1867–1875.
- Grinde, B. (2013). Herpesviruses: latency and reactivation – viral strategies and host response. *J. Oral Microbiol.* *5*, 22766.
- Gross, C., and Thoma-Kress, A. (2016). Molecular Mechanisms of HTLV-1 Cell-to-Cell Transmission. *Viruses* *8*, 74.
- Grubaugh, N.D., Weger-Lucarelli, J., Murrieta, R.A., Fauver, J.R., Garcia-Luna, S.M., Prasad, A.N., Black, W.C., and Ebel, G.D. (2016). Genetic Drift during Systemic Arbovirus Infection of Mosquito Vectors Leads to Decreased Relative Fitness during Host Switching. *Cell Host Microbe* *19*, 481–492.
- Grubaugh, N.D., Fauver, J.R., Rückert, C., Weger-Lucarelli, J., Garcia-Luna, S., Murrieta, R.A., Gendernalik, A., Smith, D.R., Brackney, D.E., and Ebel, G.D. (2017). Mosquitoes Transmit Unique West Nile Virus Populations during Each Feeding Episode. *Cell Rep.* *19*, 709–718.
- Guo, F., Li, S., Caglar, M.U., Mao, Z., Liu, W., Woodman, A., Arnold, J.J., Wilke, C.O., Huang, T.J., and Cameron, C.E. (2017). Single-Cell Virology: On-Chip Investigation of Viral Infection Dynamics. *Cell Rep.* *21*, 1692–1704.
- Guo, Q., Zhang, S., Sun, R., Yao, X., Zhang, X.F., Tatineni, S., Meulia, T., and Qu, F. (2020). Superinfection exclusion by p28 of turnip crinkle virus is separable from its replication function. *Mol. Plant-Microbe Interact.*
- Gutiérrez, S., Michalakis, Y., and Blanc, S. (2012). Virus population bottlenecks during within-host progression and host-to-host transmission. *Curr. Opin. Virol.* *2*, 546–555.
- Gutiérrez, S., Piroilles, E., Yvon, M., Baecker, V., Michalakis, Y., and Blanc, S. (2015). The Multiplicity of Cellular Infection Changes Depending on the Route of Cell Infection in a Plant Virus. *J. Virol.* *89*, 9665–9675.

BIBLIOGRAFÍA

Hamilton, W.D. (1964a). The genetical evolution of social behaviour. I. *J. Theor. Biol.* 7, 1–16.

Hamilton, W.D. (1964b). The genetical evolution of social behaviour. II. *J. Theor. Biol.* 7, 17–52.

Hanson, R.P., Estupiñan, J., and Castañeda, J. (1968). Vesicular stomatitis in the Americas. *Bull. l'Office Int. Des Epizoot.* 70, 37–47.

Hay, S., and Kannourakis, G. (2002). A time to kill: Viral manipulation of the cell death program. *J. Gen. Virol.* 83, 1547–1564.

Heldt, F.S., Kupke, S.Y., Dorl, S., Reichl, U., Frensing, T., Raj, A., Oudenaarden, A. van, Delbruck, M., Zhu, Y., Yongky, A., et al. (2015). Single-cell analysis and stochastic modelling unveil large cell-to-cell variability in influenza A virus infection. *Nat. Commun.* 6, 8938.

Hernández-Alonso, P., Garijo, R., Cuevas, J.M., and Sanjuán, R. (2015). Experimental evolution of an RNA virus in cells with innate immunity defects. *Virus Evol.* 1.

Holland, J.J., de la Torre, J.C., Steinhauer, D.A., Clarke, D., Duarte, E., and Domingo, E. (1989). Virus mutation frequencies can be greatly underestimated by monoclonal antibody neutralization of virions. *J. Virol.* 63, 5030–5036.

Huang, A.S., and Baltimore, D. (1970). Defective Viral Particles and Viral Disease Processes. *Nature* 226, 325–327.

Huang, A.S., Greenawalt, J.W., and Wagner, R.R. (1966). Defective T particles of vesicular stomatitis virus. I. Preparation, morphology, and some biologic properties. *Virology* 30, 161–172.

Hwang, L.N., Englund, N., and Pattnaik, A.K. (1998). Polyadenylation of Vesicular Stomatitis Virus mRNA Dictates Efficient Transcription Termination at the Intercistronic Gene Junctions. *J. Virol.* 72, 1805–1813.

Iglesias-Sánchez, M.J., and López-Galíndez, C. (2005). Each genomic RNA in HIV-1 heterozygous virus generate new virions. *Virology* 333, 316–323.

Isakov, O., Bordería, A. V., Golan, D., Hamenahem, A., Celniker, G., Yoffe, L., Blanc, H., Vignuzzi, M., and Shomron, N. (2015). Deep sequencing analysis of viral infection and evolution allows rapid and detailed characterization of viral mutant spectrum. *Bioinformatics* 31, 2141–2150.

- Jacobs, N.T., Onuoha, N.O., Antia, A., Steel, J., Antia, R., and Lowen, A.C. (2019). Incomplete influenza A virus genomes occur frequently but are readily complemented during localized viral spread. *Nat. Commun.* *10*, 1–17.
- Johnson, D.C., Webb, M., Wisner, T.W., and Brunetti, C. (2001). Herpes Simplex Virus gE/gI Sorts Nascent Virions to Epithelial Cell Junctions, Promoting Virus Spread. *J. Virol.* *75*, 821–833.
- Jones, M.K., Watanabe, M., Zhu, S., Graves, C.L., Keyes, L.R., Grau, K.R., Gonzalez-Hernandez, M.B., Iovine, N.M., Wobus, C.E., Vinjé, J., et al. (2014). Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science* (80-.). *346*, 755–759.
- Jordan, A., Defechereux, P., and Verdin, E. (2001). The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *EMBO J.* *20*, 1726–1738.
- Kadiu, I., Narayanasamy, P., Dash, P.K., Zhang, W., and Gendelman, H.E. (2012). Biochemical and Biologic Characterization of Exosomes and Microvesicles as Facilitators of HIV-1 Infection in Macrophages. *J. Immunol.* *189*, 744–754.
- Kaeppler, S. (2012). Heterosis: Many Genes, Many Mechanisms—End the Search for an Undiscovered Unifying Theory. *ISRN Bot.* *2012*, 1–12.
- Kazakov, T., Yang, F., Ramanathan, H.N., Kohlway, A., Diamond, M.S., and Lindenbach, B.D. (2015). Hepatitis C Virus RNA Replication Depends on Specific Cis- and Trans-Acting Activities of Viral Nonstructural Proteins. *PLoS Pathog.* *11*.
- Ke, R., Aaskov, J., Holmes, E.C., and Lloyd-Smith, J.O. (2013). Phylodynamic Analysis of the Emergence and Epidemiological Impact of Transmissible Defective Dengue Viruses. *PLoS Pathog.* *9*, e1003193.
- Kerr, B., Neuhauser, C., Bohannan, B.J.M., and Dean, A.M. (2006). Local migration promotes competitive restraint in a host-pathogen “tragedy of the commons.” *Nature* *442*, 75–78.
- Kim, I.S., Jenni, S., Stanifer, M.L., Roth, E., Whelan, S.P.J., van Oijen, A.M., and Harrison, S.C. (2017). Mechanism of membrane fusion induced by vesicular stomatitis virus G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, E28–E36.
- Kirkwood, T.B.L., and Bangham, C.R.M. (1994). Cycles, chaos, and

BIBLIOGRAFÍA

evolution in virus cultures: A model of defective interfering particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 8685–8689.

Klasse, P.J. (2015). Molecular determinants of the ratio of inert to infectious virus particles. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, (Elsevier B.V.), pp. 285–326.

Knipe, D.M., and Howley, P.M. (2013). *Fields Virology* (Lippincott Williams & Wilkins).

Koonin, E. V., Makarova, K.S., Wolf, Y.I., and Krupovic, M. (2020). Evolutionary entanglement of mobile genetic elements and host defence systems: guns for hire. *Nat. Rev. Genet.* *21*, 119–131.

Kost, T.A., Condreay, J.P., and Jarvis, D.L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* *23*, 567–575.

Kumar, D., Kumar, R., Hyun, T.K., and Kim, J.Y. (2014). Cell-to-cell movement of viruses via plasmodesmata. *J. Plant Res.* *128*, 37–47.

van Kuppeveld, F.J.M., van den Hurk, P.J.J.C., Schrama, I.W.J., Galama, J.M.D., and Melchers, W.J.G. (2002). Trans-complementation of a genetic defect in the coxsackie B3 virus 2B protein. *J. Gen. Virol.* *83*, 341–350.

Labrie, S.J., Samson, J.E., and Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.*

Lago, M., Rodríguez, J.F., Bandén, I., and Dopazo, C.P. (2016). Aquabirnavirus polyploidy: A new strategy to modulate virulence? *J. Gen. Virol.* *97*, 1168–1177.

Landsberger, M., Gandon, S., Meaden, S., Rollie, C., Chevallereau, A., Chabas, H., Buckling, A., Westra, E.R., and van Houte, S. (2018). Anti-CRISPR Phages Cooperate to Overcome CRISPR-Cas Immunity. *Cell* *174*, 908-916.e12.

Lauring, A.S., and Andino, R. (2010). Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog.* *6*, 1–8.

Law, K.M., Komarova, N.L., Yewdall, A.W., Lee, R.K., Herrera, O.L., Wodarz, D., and Chen, B.K. (2016). In Vivo HIV-1 Cell-to-Cell Transmission Promotes Multicopy Micro-compartmentalized Infection. *Cell Rep.* *15*, 2771–2783.

- Lawrence, D.M.P., Patterson, C.E., Gales, T.L., D’Orazio, J.L., Vaughn, M.M., and Rall, G.F. (2000). Measles Virus Spread between Neurons Requires Cell Contact but Not CD46 Expression, Syncytium Formation, or Extracellular Virus Production. *J. Virol.* *74*, 1908–1918.
- Lawson, N.D., Stillman, E.A., Whitt, M.A., and Rose, J.K. (1995). Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 4477–4481.
- Leeks, A., Segredo-Otero, E.A., Sanjuán, R., and West, S.A. (2018). Beneficial coinfection can promote within-host viral diversity. *Virus Evol.* *4*, vey028.
- Leeks, A., Sanjuán, R., and West, S.A. (2019). The evolution of collective infectious units in viruses. *Virus Res.* *265*, 94–101.
- Leeks, A., West, S.A., and Ghoul, M. (2020). Cheating in the viral world.
- Lefrancois, L., and Lyles, D.S. (1982). The interaction of antibody with the major surface glycoprotein of vesicular stomatitis virus I. Analysis of neutralizing epitopes with monoclonal antibodies. *Virology* *121*, 157–167.
- Leggett, H.C., Brown, S.P., and Reece, S.E. (2014). War and peace: social interactions in infections. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *369*, 20130365.
- Lequime, S., Fontaine, A., Ar Gouilh, M., Moltini-Conclois, I., and Lambrechts, L. (2016). Genetic Drift, Purifying Selection and Vector Genotype Shape Dengue Virus Intra-host Genetic Diversity in Mosquitoes. *PLoS Genet.* *12*.
- Leroy, H., Han, M., Woottum, M., Bracq, L., Bouchet, J., Xie, M., and Benichou, S. (2020). Virus-mediated cell-cell fusion. *Int. J. Mol. Sci.* *21*, 1–28.
- Letchworth, G.J., Rodriguez, L.L., and Barrera, J.D.C. (1999). Vesicular stomatitis. *Vet. J.* *157*, 239–260.
- Li, T., and Pattnaik, A.K. (1997). Replication signals in the genome of vesicular stomatitis virus and its defective interfering particles: Identification of a sequence element that enhances DI RNA replication. *Virology* *232*, 248–259.
- Li, D., Breiman, A., le Pendu, J., and Uyttendaele, M. (2015). Binding to

BIBLIOGRAFÍA

histo-blood group antigen-expressing bacteria protects human norovirus from acute heat stress. *Front. Microbiol.* *6*, 659.

Lichty, B.D., Power, A.T., Stojdl, D.F., and Bell, J.C. (2004). Vesicular stomatitis virus: Re-inventing the bullet. *Trends Mol. Med.* *10*, 210–216.

Limeres Posse, J., Diz Dios, P., and Scully, C. (2017). Viral Diseases Transmissible by Kissing. In *Saliva Protection and Transmissible Diseases*, (Elsevier), pp. 53–92.

Lopatina, A., Tal, N., and Sorek, R. (2020). Abortive Infection: Bacterial Suicide as an Antiviral Immune Strategy. *Annu. Rev. Virol.* *7*, 371–384.

López-Ferber, M., Simón, O., Williams, T., and Caballero, P. (2003). Defective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* *270*, 2249–2255.

Lopez, J., and Webster, R.E. (1983). Morphogenesis of filamentous bacteriophage ϕ 1: orientation of extrusion and production of polyphage. *Virology* *127*, 177–193.

Lucía-Sanz, A., and Manrubia, S. (2017). Multipartite viruses: adaptive trick or evolutionary treat? *Npj Syst. Biol. Appl.* *3*, 1–11.

Luque, D., Rivas, G., Alfonso, C., Carrascosa, J.L., Rodríguez, J.F., and Castón, J.R. (2009). Infectious bursal disease virus is an icosahedral polyploid dsRNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 2148–2152.

Lyles, D.S. (2000). Cytopathogenesis and Inhibition of Host Gene Expression by RNA Viruses. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *64*, 709–724.

Lynch, M., and Gabriel, W. (1990). Mutation load and the survival of small populations. *Evolution (N. Y.)* *44*, 1725–1737.

Machon, C., Catez, F., Venezia, N.D., Vanhalle, F., Guyot, L., Vincent, A., Garcia, M., Roy, B., Diaz, J.J., and Guitton, J. (2021). Study of intracellular anabolism of 5-fluorouracil and incorporation in nucleic acids based on an LC-HRMS method. *J. Pharm. Anal.* *11*, 77–87.

Manzoni, T.B., and López, C.B. (2018). Defective (interfering) viral genomes re-explored: impact on antiviral immunity and virus persistence. *Future Virol.* *13*, 493–503.

Marriott, A.C., and Dimmock, N.J. (2010). Defective interfering viruses and

- their potential as antiviral agents. *Rev. Med. Virol.* *20*, 51–62.
- Martin, B.E., Harris, J.D., Sun, J., Koelle, K., and Brooke, C.B. (2020). Cellular co-infection can modulate the efficiency of influenza A virus production and shape the interferon response. *PLOS Pathog.* *16*, e1008974.
- Mascia, T., and Gallitelli, D. (2016). Synergies and antagonisms in virus interactions. *Plant Sci.* *252*, 176–192.
- Maynard Smith, J. (1974). The theory of games and the evolution of animal conflicts. *J. Theor. Biol.* *47*, 209–221.
- McCrone, J.T., and Luring, A.S. (2018). Genetic bottlenecks in intraspecies virus transmission. *Curr. Opin. Virol.* *28*, 20–25.
- Meier, E., Kunz, G., Haller, O., and Arnheiter, H. (1990). Activity of rat Mx proteins against a rhabdovirus. *J. Virol.* *64*, 6263–6269.
- Meredith, L.W., Sivakumaran, H., Major, L., Suhrbier, A., and Harrich, D. (2009). Potent Inhibition of HIV-1 Replication by a Tat Mutant. *PLoS One* *4*, e7769.
- Miyashita, S., Ishibashi, K., Kishino, H., and Ishikawa, M. (2015). Viruses Roll the Dice: The Stochastic Behavior of Viral Genome Molecules Accelerates Viral Adaptation at the Cell and Tissue Levels. *PLOS Biol.* *13*, e1002094.
- Montgomery, M.T., Guerrero Bustamante, C.A., Dedrick, R.M., Jacobs-Sera, D., and Hatfull, G.F. (2019). Yet more evidence of collusion: A new viral defense system encoded by gordonia phage carolann. *MBio*.
- Mothes, W., Sherer, N.M., Jin, J., and Zhong, P. (2010). Virus Cell-to-Cell Transmission. *J. Virol.* *84*, 8360–8368.
- Muller, H.J. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* *1*, 2–9.
- Münch, J., Rücker, E., Ständker, L., Adermann, K., Goffinet, C., Schindler, M., Wildum, S., Chinnadurai, R., Rajan, D., Specht, A., et al. (2007). Semen-Derived Amyloid Fibrils Drastically Enhance HIV Infection. *Cell* *131*, 1059–1071.
- Murooka, T.T., Deruaz, M., Marangoni, F., Vrbanac, V.D., Seung, E., Von Andrian, U.H., Tager, A.M., Luster, A.D., and Mempel, T.R. (2012). HIV-

BIBLIOGRAFÍA

infected T cells are migratory vehicles for viral dissemination. *Nature* 490, 283–289.

Murray, B.K., Biswal, N., Bookout, J.B., Lanford, R.E., Courtney, R.J., and Melnick, J.L. (1975). Cyclic appearance of defective interfering particles of herpes simplex virus and the concomitant accumulation of early polypeptide VP175. *Intervirology* 5, 173–184.

Mutsafi, Y., and Altan-Bonnet, N. (2018). Enterovirus transmission by secretory autophagy. *Viruses* 10.

Nagashima, S., Jirintai, S., Takahashi, M., Kobayashi, T., Tanggis, Nishizawa, T., Kouki, T., Yashiro, T., and Okamoto, H. (2014). Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *J. Gen. Virol.* 95, 2166–2175.

Nascimento, R., Costa, H., and Parkhouse, R.M.E. (2012). Virus manipulation of cell cycle. *Protoplasma* 249, 519–528.

Neu, U., and Mainou, B.A. (2020). Virus interactions with bacteria: Partners in the infectious dance. *PLOS Pathog.* 16, e1008234.

Novella, I.S., and Ebendick-Corpus, B.E. (2004). Molecular Basis of Fitness Loss and Fitness Recovery in Vesicular Stomatitis Virus. *J. Mol. Biol.* 342, 1423–1430.

Novella, I.S., Presloid, J.B., Zhou, T., Smith-Tsurkan, S.D., Ebendick-Corpus, B.E., Dutta, R.N., Lust, K.L., and Wilke, C.O. (2010). Genomic evolution of vesicular stomatitis virus strains with differences in adaptability. *J. Virol.* 84, 4960–4968.

Nowak, M.A. (2006). Five Rules for the Evolution of Cooperation. *Science* (80-). 314.

Ogino, T., and Banerjee, A.K. (2007). Unconventional Mechanism of mRNA Capping by the RNA-Dependent RNA Polymerase of Vesicular Stomatitis Virus. *Mol. Cell* 25, 85–97.

Oppenheim, A.B., Kobilier, O., Stavans, J., Court, D.L., and Adhya, S. (2005). Switches in bacteriophage lambda development. *Annu. Rev. Genet.* 39, 409–429.

Owen, S. V., Canals, R., Wenner, N., Hammarlöf, D.L., Kröger, C., and Hinton, J.C.D. (2020). A window into lysogeny: Revealing temperate phage

biology with transcriptomics. *Microb. Genomics*.

Pais-Correia, A.-M., Sachse, M., Guadagnini, S., Robbiati, V., Lasserre, R., Gessain, A., Gout, O., Alcover, A., and Thoulouze, M.-I. (2010). Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat. Med.* *16*, 83–89.

Palma, E.L., and Huang, A. (1974). Cyclic production of vesicular stomatitis virus caused by defective interfering particles. *J. Infect. Dis.* *129*, 402–410.

Palmero, I., and Serrano, M. (2001). Induction of senescence by oncogenic Ras. *Methods Enzymol.* *333*, 247–256.

Paludan, S.R., Pradeu, T., Masters, S.L., and Mogensen, T.H. (2021). Constitutive immune mechanisms: mediators of host defence and immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* *21*, 137–150.

Pearce, A.F., and Lyles, D.S. (2009). Vesicular Stomatitis Virus Induces Apoptosis Primarily through Bak Rather than Bax by Inactivating Mcl-1 and Bcl-X L. *J. Virol.* *83*, 9102–9112.

Perelson, A.S. (2002). Modelling viral and immune system dynamics. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 28–36.

Perelson, A.S., and Nelson, P.W. (1999). Mathematical analysis of HIV-1 dynamics in vivo. *SIAM Rev.* *41*, 3–44.

Phipps, K.L., Ganti, K., Jacobs, N.T., Lee, C.Y., Carnaccini, S., White, M.C., Manandhar, M., Pickett, B.E., Tan, G.S., Ferreri, L.M., et al. (2020). Collective interactions augment influenza A virus replication in a host-dependent manner. *Nat. Microbiol.* *5*, 1158–1169.

Qanungo, K.R., Shaji, D., Mathur, M., and Banerjee, A.K. (2004). Two RNA polymerase complexes from vesicular stomatitis virus-infected cells that carry out transcription and replication of genome RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 5952–5957.

Quan, B., Seo, H.S., Blobel, G., and Ren, Y. (2014). Vesiculoviral matrix (M) protein occupies nucleic acid binding site at nucleoporin pair (Rae1•Nup98). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 9127–9132.

Quer, J., Hershey, C.L., Domingo, E., Holland, J.J., and Novella, I.S. (2001). Contingent Neutrality in Competing Viral Populations. *J. Virol.* *75*, 7315–7320.

BIBLIOGRAFÍA

Quintela, B. de M., Conway, J.M., Hyman, J.M., Guedj, J., dos Santos, R.W., Lobosco, M., and Perelson, A.S. (2018). A New Age-Structured Multiscale Model of the Hepatitis C Virus Life-Cycle During Infection and Therapy With Direct-Acting Antiviral Agents. *Front. Microbiol.* 9, 601.

Rager, M., Vongpunsawad, S., Duprex, W.P., and Cattaneo, R. (2002). Polyploid measles virus with hexameric genome length. *EMBO J.* 21, 2364–2372.

Rajani, K.R., Pettit Kneller, E.L., McKenzie, M.O., Horita, D.A., Chou, J.W., and Lyles, D.S. (2012). Complexes of Vesicular Stomatitis Virus Matrix Protein with Host Rae1 and Nup98 Involved in Inhibition of Host Transcription. *PLoS Pathog.* 8.

Ramakrishnaiah, V., Thumann, C., Fofana, I., Habersetzer, F., Pan, Q., De Ruiter, P.E., Willemsen, R., Demmers, J.A.A., Raj, V.S., Jenster, G., et al. (2013). Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 13109–13113.

Real, F., Sennepin, A., Ganor, Y., Schmitt, A., and Bomsel, M. (2018). Live Imaging of HIV-1 Transfer across T Cell Virological Synapse to Epithelial Cells that Promotes Stromal Macrophage Infection. *Cell Rep.* 23, 1794–1805.

Redondo, N., Madan, V., Alvarez, E., and Carrasco, L. (2015). Impact of vesicular stomatitis virus M proteins on different cellular functions. *PLoS One* 10.

Rezelj, V. V., Levi, L.I., and Vignuzzi, M. (2018). The defective component of viral populations. *Curr. Opin. Virol.* 33, 74–80.

Richardson, M.W., Carroll, R.G., Stremlau, M., Korokhov, N., Humeau, L.M., Silvestri, G., Sodroski, J., and Riley, J.L. (2008). Mode of Transmission Affects the Sensitivity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 to Restriction by Rhesus TRIM5 α . *J. Virol.* 82, 11117–11128.

Rincheval, V., Lelek, M., Gault, E., Bouillier, C., Sitterlin, D., Blouquit-Laye, S., Galloux, M., Zimmer, C., Eleouet, J.F., and Rameix-Welti, M.A. (2017). Functional organization of cytoplasmic inclusion bodies in cells infected by respiratory syncytial virus. *Nat. Commun.* 8, 1–11.

Roberts, K.L., and Smith, G.L. (2008). Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends Microbiol.* 16, 472–479.

Rohrmann, G.F. (2014). Baculovirus nucleocapsid aggregation (MNPV vs

SNPV): an evolutionary strategy, or a product of replication conditions? *Virus Genes* 49, 351–357.

Rohrmann, G.F. (2019). *Baculovirus Molecular Biology* (National Center for Biotechnology Information (US)).

Rozo-Lopez, P., Drolet, B., and Londoño-Rentería, B. (2018). Vesicular Stomatitis Virus Transmission: A Comparison of Incriminated Vectors. *Insects* 9, 190.

Rupp, J.C., Sokoloski, K.J., Gebhart, N.N., and Hardy, R.W. (2015). Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *J. Gen. Virol.*

Russell, R.A., Martin, N., Mitar, I., Jones, E., and Sattentau, Q.J. (2013). Multiple proviral integration events after virological synapse-mediated HIV-1 spread. *Virology* 443, 143–149.

Sadler, A.J., and Williams, B.R.G. (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 559–568.

Sahni, A., Simpson-Haidaris, P.J., Sahni, S.K., Vaday, G.G., and Francis, C.W. (2007). Fibrinogen synthesized by cancer cells augments the proliferative effect of fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *J. Thromb. Haemost.* 6, 176–183.

Salemi, M. (2013). The intra-host evolutionary and population dynamics of human immunodeficiency virus type 1: A phylogenetic perspective. *Infect. Dis. Rep.* 5, 8–14.

Sanjuan, R., Moya, A., and Elena, S.F. (2004). The distribution of fitness effects caused by single-nucleotide substitutions in an RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 8396–8401.

Sanjuán, R. (2017). Collective Infectious Units in Viruses. *Trends Microbiol.*

Sanjuán, R. (2018). Collective properties of viral infectivity. *Curr. Opin. Virol.* 33, 1–6.

Sanjuán, R., and Domingo-Calap, P. (2016). Mechanisms of viral mutation. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 4433–4448.

Sanjuán, R., and Thoulouze, M.-I. (2019). Why viruses sometimes disperse in groups?†. *Virus Evol.* 5.

Sanjuán, R., Moya, A., and Elena, S.F. (2004a). The contribution of epistasis

BIBLIOGRAFÍA

to the architecture of fitness in an RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 15376–15379.

Sanjuán, R., Moya, A., and Elena, S.F. (2004b). The distribution of fitness effects caused by single-nucleotide substitutions in an RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 8396–8401.

Sanjuán, R., Cuevas, J.M., Furió, V., Holmes, E.C., and Moya, A. (2007). Selection for Robustness in Mutagenized RNA Viruses. *PLoS Genet.* *3*, e93.

Santiana, M., Ghosh, S., Ho, B.A., Rajasekaran, V., Du, W.-L., Mutsafi, Y., De Jesús-Díaz, D.A., Sosnovtsev, S. V., Levenson, E.A., Parra, G.I., et al. (2018). Vesicle-Cloaked Virus Clusters Are Optimal Units for Inter-organismal Viral Transmission. *Cell Host Microbe* *24*, 208–220.e8.

Sardanyés, J., and Elena, S.F. (2010). Error threshold in RNA quasispecies models with complementation. *J. Theor. Biol.* *265*, 278–286.

Sattentau, Q. (2008). Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* *6*, 815–826.

Sattentau, Q.J. (2011). The direct passage of animal viruses between cells. *Curr. Opin. Virol.* *1*, 396–402.

Schmid, M., Speiseder, T., Dobner, T., and Gonzalez, R.A. (2014). DNA Virus Replication Compartments. *J. Virol.* *88*, 1404–1420.

Schmieder, R., and Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* *27*, 863–864.

Schneider, B.S., and Higgs, S. (2008). The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* *102*, 400–408.

Schulte, M.B., and Andino, R. (2014). Single-Cell Analysis Uncovers Extensive Biological Noise in Poliovirus Replication. *J. Virol.* *88*, 6205–6212.

Segredo-Otero, E., and Sanjuán, R. (2019). The effect of genetic complementation on the fitness and diversity of viruses spreading as collective infectious units. *Virus Res.* *267*, 41–48.

Segredo-Otero, E., and Sanjuán, R. (2020). The role of spatial structure in the evolution of viral innate immunity evasion: A diffusion-reaction cellular automaton model. *PLoS Comput. Biol.* *16*.

Shcherbatova, O., Grebennikov, D., Sazonov, I., Meyerhans, A., and Bocharov, G. (2020). Modeling of the hiv-1 life cycle in productively infected cells to predict novel therapeutic targets. *Pathogens* 9.

Shirogane, Y., Watanabe, S., and Yanagi, Y. (2012). Cooperation between different RNA virus genomes produces a new phenotype. *Nat. Commun.* 3, 1235.

Shirogane, Y., Watanabe, S., and Yanagi, Y. (2019). Cooperation between different variants: A unique potential for virus evolution. *Virus Res.* 264, 68–73.

Shulla, A., and Randall, G. (2016). (+) RNA virus replication compartments: A safe home for (most) viral replication. *Curr. Opin. Microbiol.* 32, 82–88.

Sicard, A., Pirolles, E., Gallet, R., Vernerey, M.S., Yvon, M., Urbino, C., Peterschmitt, M., Gutierrez, S., Michalakis, Y., and Blanc, S. (2019). A multicellular way of life for a multipartite virus. *Elife* 8.

Sigal, A., Kim, J.T., Balazs, A.B., Dekel, E., Mayo, A., Milo, R., and Baltimore, D. (2011). Cell-to-cell spread of HIV permits ongoing replication despite antiretroviral therapy. *Nature* 477, 95–99.

Siliciano, R.F., and Greene, W.C. (2011). HIV latency. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1.

Simon, K.O., Cardamone, J.J., Whitaker-Dowling, P.A., Youngner, J.S., and Widnell, C.C. (1990). Cellular mechanisms in the superinfection exclusion of vesicular stomatitis virus. *Virology*.

Simón, O., Williams, T., Cerutti, M., Caballero, P., and López-Ferber, M. (2013). Expression of a Peroral Infection Factor Determines Pathogenicity and Population Structure in an Insect Virus. *PLoS One* 8, e78834.

Skupsky, R., Burnett, J.C., Foley, J.E., Schaffer, D. V., and Arkin, A.P. (2010). HIV Promoter Integration Site Primarily Modulates Transcriptional Burst Size Rather Than Frequency. *PLoS Comput. Biol.* 6, e1000952.

Slack, J., and Arif, B.M. (2007). The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function. *Adv. Virus Res.* 69, 99–165.

Slots, J., and Slots, H. (2011). Bacterial and viral pathogens in saliva: Disease relationship and infectious risk. *Periodontol.* 2000 55, 48–69.

BIBLIOGRAFÍA

Smith, J.M., and Price, G.R. (1973). The logic of animal conflict. *Nature* 246, 15–18.

Smith, G.L., Murphy, B.J., and Law, M. (2003). Vaccinia Virus Motility. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 323–342.

Stiefel, P., Schmidt, F.I., Dörig, P., Behr, P., Zambelli, T., Vorholt, J.A., and Mercer, J. (2012). Cooperative Vaccinia Infection Demonstrated at the Single-Cell Level Using FluidFM. *Nano Lett.* 12, 4219–4227.

Stojdl, D.F., Lichty, B.D., TenOever, B.R., Paterson, J.M., Power, A.T., Knowles, S., Marius, R., Reynard, J., Poliquin, L., Atkins, H., et al. (2003). VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* 4, 263–275.

Stokar-Avihail, A., Tal, N., Erez, Z., Lopatina, A., and Sorek, R. (2019). Widespread Utilization of Peptide Communication in Phages Infecting Soil and Pathogenic Bacteria. *Cell Host Microbe* 25, 746-755.e5.

Strassmann, J.E., Gilbert, O.M., and Queller, D.C. (2011). Kin Discrimination and Cooperation in Microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 349–367.

Strauss, J.H., and Strauss, E.G. (1994). The alphaviruses: Gene expression, replication, and evolution. *Microbiol. Rev.*

Sun, P., Nie, K., Zhu, Y., Liu, Y., Wu, P., Liu, Z., Du, S., Fan, H., Chen, C.H., Zhang, R., et al. (2020). A mosquito salivary protein promotes flavivirus transmission by activation of autophagy. *Nat. Commun.* 11, 1–15.

Susskind, M.M., and Botstein, D. (1980). Superinfection exclusion by λ prophage in lysogens of *Salmonella typhimurium*. *Virology*.

Symeonides, M., Murooka, T., Bellfy, L., Roy, N., Mempel, T., and Thali, M. (2015). HIV-1-Induced Small T Cell Syncytia Can Transfer Virus Particles to Target Cells through Transient Contacts. *Viruses* 7, 6590–6603.

Szathmáry, E., and Smith, J.M. (1995). The major evolutionary transitions. *Nature* 374, 227–232.

Szathmáry, E. (1993). Co-operation and defection: Playing the field in virus dynamics. *J. Theor. Biol.* 165, 341–356.

Tanner, E.J., Liu, H., Oberste, M.S., Pallansch, M., Collett, M.S., and Kirkegaard, K. (2014). Dominant drug targets suppress the emergence of

antiviral resistance. *Elife* 3.

Teterina, N.L., Zhou, W.D., Cho, M.W., and Ehrenfeld, E. (1995). Inefficient complementation activity of poliovirus 2C and 3D proteins for rescue of lethal mutations. *J. Virol.* 69, 4245–4254.

Thomas, D., Newcomb, W.W., Brown, J.C., Wall, J.S., Hainfeld, J.F., Trus, B.L., and Steven, A.C. (1985). Mass and molecular composition of vesicular stomatitis virus: a scanning transmission electron microscopy analysis. *J. Virol.* 54, 598–607.

Thompson, K., Yin, J., Henle, W., Henle, G., Magnus, P. von, Huang, A., Baltimore, D., Lazzarini, R., Keene, J., Schubert, M., et al. (2010). Population dynamics of an RNA virus and its defective interfering particles in passage cultures. *Virol. J.* 7, 257.

Thompson, K.A.S., Rempala, G.A., and Yin, J. (2009). Multiple-hit inhibition of infection by defective interfering particles. *J. Gen. Virol.* 90, 888–899.

Timm, A., and Yin, J. (2012). Kinetics of virus production from single cells. *Virology* 424, 11–17.

Timm, C., Akpınar, F., and Yin, J. (2014). Quantitative characterization of defective virus emergence by deep sequencing. *J. Virol.* 88, 2623–2632.

Töpfer, A., Zagordi, O., Prabhakaran, S., Roth, V., Halperin, E., and Beerenwinkel, N. (2013). Probabilistic inference of viral quasispecies subject to recombination. *J. Comput. Biol.* 20, 113–123.

Trivers, R.L. (1971). The Evolution of Reciprocal Altruism. *Q. Rev. Biol.*

Turner, P.E., and Chao, L. (1999). Prisoner's dilemma in an RNA virus. *Nature* 398, 441–443.

Turner, P.E., and Chao, L. (2003). Escape from prisoner's dilemma in RNA phage ϕ 6. *Am. Nat.* 161, 497–505.

Ugolini, G. (2011). Rabies Virus as a Transneuronal Tracer of Neuronal Connections (*Adv Virus Res*).

Usmani, S.M., Zirafi, O., Müller, J.A., Sandi-Monroy, N.L., Yadav, J.K., Meier, C., Weil, T., Roan, N.R., Greene, W.C., Walther, P., et al. (2014). Direct visualization of HIV-enhancing endogenous amyloid fibrils in human semen. *Nat. Commun.* 5, 3508.

BIBLIOGRAFÍA

Vandepol, S.B., Lefrancois, L., and Holland, J.J. (1986). Sequences of the major antibody binding epitopes of the Indiana serotype of vesicular stomatitis virus. *Virology* 148, 312–325.

Vignuzzi, M., and López, C.B. (2019). Defective viral genomes are key drivers of the virus-host interaction. *Nat. Microbiol.* 4, 1075–1087.

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

Vilar, R., Fish, R.J., Casini, A., and Neerman-Arbez, M. (2020). Fibrin(ogen) in human disease: Both friend and foe. *Haematologica* 105, 284–296.

Voigt, E.A., Swick, A., and Yin, J. (2016). Rapid induction and persistence of paracrine-induced cellular antiviral states arrest viral infection spread in A549 cells. *Virology* 496, 59–66.

Wallis, C., and Melnick, J.L. (1967). Virus aggregation as the cause of the non-neutralizable persistent fraction. *J. Virol.* 1, 478–488.

Weaver, S.C., Forrester, N.L., Liu, J., and Vasilakis, N. (2021). Population bottlenecks and founder effects: implications for mosquito-borne arboviral emergence. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 184–195.

Weber, P.C., Kenny, J.J., and Wigdahl, B. (1992). Antiviral properties of a dominant negative mutant of the herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0. *J. Gen. Virol.* 73, 2955–2961.

Von Weizsäcker, F., Köck, J., Wieland, S., Offensperger, W.B., and Blum, H.E. (1999). Dominant negative mutants of the duck hepatitis B virus core protein interfere with RNA pregenome packaging and viral DNA synthesis. *Hepatology* 30, 308–315.

West, S.A., and Gardner, A. (2010). Altruism, spite, and greenbeards. *Science* (80-.). 327, 1341–1344.

West, S.A., Griffin, A.S., Gardner, A., and Diggle, S.P. (2006). Social evolution theory for microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 597–607.

West, S.A., Griffin, A.S., and Gardner, A. (2007a). Evolutionary Explanations for Cooperation. *Curr. Biol.* 17, R661–R672.

West, S.A., Griffin, A.S., and Gardner, A. (2007b). Social semantics:

Altruism, cooperation, mutualism, strong reciprocity and group selection. *J. Evol. Biol.* *20*, 415–432.

West, S.A., Diggle, S.P., Buckling, A., Gardner, A., and Griffin, A.S. (2007c). The Social Lives of Microbes. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* *38*, 53–77.

Whelan, S.P.J. (2008). Vesicular Stomatitis Virus. In *Encyclopedia of Virology*, (Elsevier Ltd), pp. 291–299.

Whitaker-Dowling, P., and Youngner, J.S. (1987). Viral interference-dominance of mutant viruses over wild-type virus in mixed infections. *Microbiol. Rev.* *51*, 179–191.

Whitaker-Dowling, P., Youngner, J.S., Widnell, C.C., and Wilcox, D.K. (1983). Superinfection exclusion by vesicular stomatitis virus. *Virology* *131*, 137–143.

White, J., Matlin, K., and Helenius, A. (1981). Cell fusion by Semliki Forest, influenza, and vesicular stomatitis viruses. *J. Cell Biol.* *89*, 674–679.

Wilson, D.S. (1975). A theory of group selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *72*, 143–146.

Xiao, F., Fofana, I., Heydmann, L., Barth, H., Soulier, E., Habersetzer, F., Doffoël, M., Bukh, J., Patel, A.H., Zeisel, M.B., et al. (2014). Hepatitis C Virus Cell-Cell Transmission and Resistance to Direct-Acting Antiviral Agents. *PLoS Pathog.* *10*, e1004128.

Xin, X., Wang, H., Han, L., Wang, M., Fang, H., Hao, Y., Li, J., Zhang, H., Zheng, C., and Shen, C. (2018). Single-Cell Analysis of the Impact of Host Cell Heterogeneity on Infection with Foot-and-Mouth Disease Virus. *J. Virol.* *92*.

Xue, K.S., Hooper, K.A., Ollodart, A.R., Dingens, A.S., and Bloom, J.D. (2016). Cooperation between distinct viral variants promotes growth of h3n2 influenza in cell culture. *Elife* *5*.

Yang, Y., Lyu, T., Zhou, R., He, X., Ye, K., Xie, Q., Zhu, L., Chen, T., Shen, C., Wu, Q., et al. (2019). The antiviral and antitumor effects of defective interfering particles/genomes and their mechanisms. *Front. Microbiol.* *10*.

Yin, J., and Redovich, J. (2018). Kinetic Modeling of Virus Growth in Cells. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *82*.

BIBLIOGRAFÍA

Yuste, E., Sánchez-Palomino, S., Casado, C., Domingo, E., and López-Galíndez, C. (1999). Drastic Fitness Loss in Human Immunodeficiency Virus Type 1 upon Serial Bottleneck Events. *J. Virol.* *73*, 2745–2751.

Zaichick, S., Bohannon, K., and Smith, G. (2011). Alphaherpesviruses and the Cytoskeleton in Neuronal Infections. *Viruses* *3*, 941–981.

Zakeri, Z., McLean, J., Ruck, A., Shirazian, A., and Pooyaei-Mehr, F. (2008). Viral Manipulation of Cell Death. *Curr. Pharm. Des.* *14*, 198–220.

Zhang, X.F., Zhang, S., Guo, Q., Sun, R., Wei, T., and Qu, F. (2018). A new mechanistic model for viral cross protection and superinfection exclusion. *Front. Plant Sci.*

Zhong, P., Agosto, L.M., Munro, J.B., and Mothes, W. (2013). Cell-to-cell transmission of viruses. *Curr. Opin. Virol.* *3*, 44–50.

Zhu, H., Allman, B.E., and Koelle, K. (2021). Fitness estimation for viral variants in the context of cellular coinfection. *Viruses* *13*.

Zhu, Y., Yongky, A., and Yin, J. (2009). Growth of an RNA virus in single cells reveals a broad fitness distribution. *Virology* *385*, 39–46.

Zwart, M.P., and Elena, S.F. (2015a). Matters of Size: Genetic Bottlenecks in Virus Infection and Their Potential Impact on Evolution. *Annu. Rev. Virol.* *2*, 161–179.

Zwart, M.P., and Elena, S.F. (2015b). Testing the independent action hypothesis of plant pathogen mode of action: A simple and powerful new approach. *Phytopathology* *105*, 18–25.

Zwart, M.P., Hemerik, L., Cory, J.S., De Visser, J.A.G.M., Bianchi, F.J.J.A., Van Oers, M.M., Vlak, J.M., Hoekstra, R.F., and Van Der Werf, W. (2009). An experimental test of the independent action hypothesis in virus-insect pathosystems. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* *276*, 2233–2242.

Zwart, M.P., Daròs, J.A., and Elena, S.F. (2011). One is enough: In vivo effective population size is dose-dependent for a plant RNA virus. *PLoS Pathog.* *7*.

ANEXO

ANEXO

Abundancia de las variantes genéticas con frecuencia > 0,1% en al menos una de las poblaciones virales evolucionadas

La tabla es demasiado extensa para incluirla entre las páginas de esta tesis. Para acceder a ella utilice la dirección:

https://journals.asm.org/doi/suppl/10.1128/mBio.02156-19/suppl_file/mbio.02156-19-sd001.csv