



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

(Ò≈) Facultat de
Ciències Biològiques

Instituto de biología integrativa de sistemas I2Sysbio

Programa de Doctorado en Biodiversidad y Biología Evolutiva

**TRANSMISIÓN COLECTIVA DE
ENTEROVIRUS ASOCIADA A MEMBRANAS:
BASES GENÉTICAS E IMPLICACIONES
EVOLUTIVAS**

Tesis Doctoral

Juan Vicente Bou Prados

Director: Rafael Sanjuán Verdeguer

Enero 2021



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA INTEGRATIVA DE SISTEMAS
I2SysBio**

**TRANSMISIÓN COLECTIVA DE ENTEROVIRUS
ASOCIADA A MEMBRANAS: BASES
GENÉTICAS E IMPLICACIONES EVOLUTIVAS**

JUAN VICENTE BOU PRADOS

Enero 2021

Programa de Doctorado en Biodiversidad y Biología Evolutiva

Director: **Rafael Sanjuán Verdeguer**

**A todos los que creyeron
en mí desde el principio**

ÍNDICE

PRÓLOGO	7
INTRODUCCIÓN.....	13
1. Importancia social de los virus	15
2. Infección y transmisión viral	17
3. Unidades de infección colectiva	21
3.1 Tipos de unidades de infección colectiva	21
3.2 Pros y contras de la transmisión colectiva	25
3.3 Vesículas extracelulares como unidad de infección colectiva... 31	
4. Modelo de estudio: Coxsackievirus b3.....	35
4.1 Relevancia y características generales del virus.....	35
4.2 Estructura del genoma y del virión	36
4.3 Ciclo de infección.....	39
OBJETIVOS	43
METODOLOGÍA	47
1. Líneas celulares y cultivo celular.....	49
2. Virus y stock viral	49
3. Construcción de virus codificantes de proteínas fluorescentes	50
4. Titulación por ensayo en placa.....	50
5. Dilución límite de unidades infecciosas	51
6. Recolección de virus asociados a membranas (VAM) por centrifugación	51
7. Purificación de VAMs ricos en fosfatidilserina	52
8. Rotura de membranas con detergente	53
9. Microscopía electrónica de transmisión	53
10. SDS-PAGE y Western blot.....	54
11. Evolución experimental	55
12. Medida del tamaño de calva mediante análisis de imagen	55
13. Extracción de ARN, RT-PCR	56
14. Secuenciación masiva y análisis de datos de secuenciación masiva	57
15. Mutagénesis dirigida	58
16. Transcripción in vitro y transfección	60
17. Microscopía de fluorescencia automatizada	60
18. Ensayos de citotoxicidad.....	61
19. Citometría de flujo	61
20. Cuantificación y análisis estadístico.....	62

RESULTADOS.....	65
1. Mise en place: Obtención y análisis de grupos de viriones asociados a membrana con CVB3.....	67
1.1 Los grupos de VAMs pueden ser separados de los viriones libres mediante centrifugación	69
2. Base genética de la transmisión colectiva asociada a membranas.....	77
2.1 Evolución dirigida de la transmisión colectiva asociada a membranas de CVB3	79
2.2 Análisis genético de las líneas evolucionadas.....	83
2.3 Caracterización del mutante N63H: Efectos en la dispersión y eficacia del virus.....	92
3. Diversidad genética de la transmisión colectiva asociada a membranas.....	99
3.1 La distribución de la progenie viral en grupos de VAMs no es aleatoria	101
3.2 Las interacciones entre variantes distintas del virus mediadas por grupos de VAMs son efímeras en el tiempo.....	114
3.3 Transferir seriadamente la fracción P apenas tiene efecto en la diversidad genética poblacional.....	117
4. Costes y efectos de la transmisión colectiva asociada a membranas en la eficacia de CVB3	121
4.1 La infección con grupos de VAMs acelera las dinámicas intracelulares tempranas del ciclo de CVB3 y pierde menos infectividad en células poco permisivas que la infección con virus libres	123
4.2 El coste de dispersión asociado a la dispersión colectiva no se compensa a nivel de productividad, pero la infección colectiva adelanta la liberación de partículas infecciosas	128
4.3 La transmisión colectiva asociada a membranas disminuye la tasa de adsorción del virus a la célula	133

DISCUSIÓN	135
1. Obtención y purificación de grupos de viriones asociados a membranas.....	137
2. La transmisión colectiva asociada a membranas está codificada en el genoma de CVB3	138
3. Los grupos de VAMs transmiten virus emparentados	141
4. La transmisión colectiva asociada a membranas no es beneficiosa a nivel de productividad, pero acelera el ciclo de infección	145
5. Discusión general	148
6. Temas pendientes, perspectivas de futuro y posibles aplicaciones.....	151
CONCLUSIONES	155
BIBLIOGRAFÍA	161
INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA	179

PRÓLOGO

AGRADECIMIENTOS

Es difícil concebir que un proyecto como este pueda llevarse a cabo en solitario sin contar para nada con el apoyo, la colaboración y la compañía de diversas personas. Precisamente, el desarrollo de esta tesis no habría tenido lugar del modo en que lo ha hecho de no ser así, por lo que antes de comenzar me gustaría dedicar unas palabras a las personas que considero han influido de algún modo en este proceso.

Comencemos por el comienzo, valga la redundancia. Me gustaría mencionar a mi profesor de biología de bachillerato, Salva, quien sin duda tuvo un papel decisivo en mi formación académica y sin el cual podría haber acabado estudiando cualquier otra cosa. Si a día de hoy puedo enorgullecerme de ser biólogo es gracias a él. Pero la Biología es muy amplia y si yo acabé interesado por el ámbito evolutivo fue gracias a la labor, como docentes, de los profesores Fernando González y Rafael Sanjuán, quienes, a través de sus asignaturas de *Árbol de la vida* y *Procesos y Mecanismos Evolutivos*, hicieron que creciese en mi interior un profundo interés por la biología evolutiva. Tal es así, que acabé acudiendo al laboratorio de Rafael para realizar mis prácticas externas y mi trabajo de fin de grado, donde tuve la oportunidad de introducirme en las técnicas de cultivos celulares y biología molecular. No debió ser tan mala la experiencia, cuando acabé realizando también el trabajo de fin de máster y mi tesis doctoral en el mismo laboratorio (bueno, técnicamente cambiamos de laboratorio porque nos mudamos del Cavanilles al I2SysBio). Es por ello que “Rafa” se merece mi agradecimiento por múltiples razones,

PRÓLOGO

tanto a nivel de profesor como de director de mi tesis doctoral, por guiarme y darme consejos e ideas cuando no sabía cómo seguir avanzando y por tratarme con la cercanía debida de un buen mentor.

Para continuar, me gustaría también nombrar a Ron Geller y José M. Cuevas, quienes estuvieron ahí en las primeras etapas de mi actividad investigadora (y siguen estando) y me enseñaron las bases del trabajo en el laboratorio. De esa misma etapa me gustaría resaltar a Silvia, la técnico del laboratorio en ese momento, a quien di más faena de la que debiera debido a mi inexperiencia en aquel entonces y a pesar de ello siempre me trató con una sonrisa. Luego la sustituyó María Durán, quien también me transmitió una alegría tremenda y me ayudó a obtener las fotografías de microscopía electrónica mostradas en esta tesis.

Gracias también a Flo y Víctor, de VirBio, quienes me enseñaron a hacer Western Blots y me han acompañado en innumerables horas de trabajo en la sala BSL2 compartiendo su experiencia y su buen rollo conmigo. Mencionar también a Ahmed, María, Alejandra, Salomé, Layla por hacer que el ambiente en el laboratorio durante este tiempo haya sido tan agradable. A Carlos, Chantal y otros (ya mencionados y sin mencionar) que han participado en nuestras jornadas de deportes. Mención especial también para Pilar, quien ha compartido su amistad conmigo, sus conocimientos de restaurantes de comida japonesa en Valencia, así como me brindó la oportunidad de escribir un capítulo de libro juntos. También a Henrietta Lacks (1920-1951), sin sus células esta tesis no habría sido posible...

PRÓLOGO

Pero hay quienes merecen una mención más que especial, extraordinaria. Lo que pueda escribir de vosotros difícilmente será suficiente, pero aquí un pequeño intento. Jenny, gracias por todo el tiempo que pasamos juntos, por tus lágrimas y sonrisas, incluso por las que fueron a costa de mis “nervios”, gracias por todo el cariño que me diste y que sepas que te perdono por convertirme en fumador pasivo durante un tiempo XD. Ernesto, mi compañero friki del lab, gracias por todos esos ratos en las quedadas, por todas esas partidas de videojuegos y juegos de mesa, por los ratos en San Francisco, por esas sorpresas y regalos, por los numerosos gestos de amistad que han definido y definen nuestra relación, por... en fin, gracias. Iván, qué decir... Has estado ahí desde el herbario de botánica en segundo de carrera, no antes porque cuando en primero coincidimos en el tren y en el metro cada uno tiró por su lado XD. Hemos compartido carrera, prácticas externas, TFG, TFM, doctorado, piso... Hemos compartido tanto que hasta hubo quienes pensaron que éramos algo más XD. No es que mi tesis no sería lo que es si no hubieras estado ahí, es que yo no sería el que soy si no hubiera sido así. Pero hay quien incluso en los momentos de mayor oscuridad, siempre estuvo ahí para ayudarme a ver la luz; quien cuando sólo tenía ganas de tirar la toalla, me ayudó a dar el siguiente paso; quien convirtió mis lágrimas de frustración y angustia, en otras de alegría y felicidad. A ella y sobre todo a ella, gracias. Cualquier cosa que pueda decir de ti, no te hará suficiente justicia.

PRÓLOGO

Artículos científicos elaborados a partir de los datos y resultados obtenidos en la presente tesis:

- **Bou, J.-V.**, Geller, R., y Sanjuán, R. (2019). Membrane-Associated Enteroviruses Undergo Intercellular Transmission as Pools of Sibling Viral Genomes. *Cell Reports*. 29, 714-723.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.014>
- **Bou, J.-V.** y Sanjuán, R. (2020). Experimental Evolution Reveals a Genetic Basis for Membrane-Associated Virus Release. *Molecular Biology and Evolution*. msaa208, <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa208>
- **Bou, J.-V.**, Andreu-Moreno, I., y Sanjuán, R. (2020). Membrane-Associated Virus Infection shows a Head-Start effect. Manuscrito en proceso.

INTRODUCCIÓN

1. Importancia social de los virus

Los virus son responsables de numerosas enfermedades, muchas de ellas crónicas, como las hepatitis B y C, así como del síndrome de inmunodeficiencia adquirido. Se estima que el 20% de los cánceres son causados por infecciones virales, por lo que vacunas eficientes contra estos virus son potenciales vacunas “anticáncer” como es el caso de la vacuna contra el virus del papiloma humano (Imperiale and Casadevall, 2015). Además, gracias a su gran capacidad adaptativa y a su facilidad de transmisión, tienen cierta facilidad para saltar de una especie a otra, por lo que muchos virus que infectan animales son potenciales zoonosis (infecciones que se transmiten de animales a humanos), lo que explica en gran medida por qué los virus son los responsables de los últimos brotes (pan/epi)démicos más importantes:

La pandemia de la mal llamada gripe española de 1918, causada por el **virus influenza H1N1**, es el mejor caso para representar el potencial pandémico de los virus. Este virus se cobró la vida de más de 50 millones de personas en todo el mundo. En 2009, causó un nuevo brote pandémico que, según los Centros para el Control y Prevención de enfermedades (CDC), se cobró la vida de entre 150 y 570 mil personas.

El **Dengue** es otro virus considerado como potencialmente pandémico que se encuentra presente principalmente en el continente americano, pero también en el este de Asia. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el total de infecciones

INTRODUCCIÓN

anuales en el mundo por Dengue oscila entre 50 y 100 millones cobrándose la vida de unas 20.000 personas cada año.

En 2014 el virus del ébola causó un brote epidémico en África occidental que llegó hasta EEUU, Italia y España. Según la OMS, este brote afectó a 28.652 personas de las cuales 11.325 murieron, lo que supone una tasa de mortalidad de casi el 40%.

Los coronavirus han causado varios brotes epidémicos en los últimos años: El virus del síndrome respiratorio agudo severo en 2002-2003 (SARS-CoV) afectó, según la OMS, a 8.096 personas con casi un 10% de letalidad. Unos años más tarde, apareció otro coronavirus similar en Oriente Medio (virus del síndrome respiratorio de Oriente Medio, MERS-CoV) cuya tasa de mortalidad era del 34%, causando la muerte de 866 personas, la gran mayoría en Oriente Medio. Pero sin duda alguna, el coronavirus más importante es el causante de la pandemia actual por COVID-19, el SARS-CoV-2. Hasta la fecha de depósito de esta tesis se han detectado más de 83 millones de casos repartidos en más de 150 países de todo el mundo y con 1,8 millones de muertes asociadas, lo que supone una tasa de mortalidad del 2,2%.

Se estima que existen más de 300.000 virus que infectan a mamíferos que tienen el potencial de volverse nuevas zoonosis (Imperiale and Casadevall, 2015). Por este motivo, mejorar nuestra comprensión de la virología, no sólo es fundamental para poder

desarrollar nuevos tratamientos, sino también para mejorar y acelerar nuestra respuesta ante nuevos brotes epidémicos causados por virus.

2. Infección y transmisión viral

Al contrario de lo que pueda parecer, el proceso de infección de una célula por parte de un virus no siempre resulta exitoso. En primer lugar, porque no todas las partículas virales o viriones son infecciosos. Los viriones están formados por una serie de proteínas estructurales que forman la partícula en sí misma, dentro de la cual se encuentra protegido el genoma del virus. Estas proteínas se encargan, a su vez, de interactuar con el receptor en la célula diana -como una llave (proteína del virus) y una cerradura (receptor celular)- para dar lugar al inicio de la infección. Cualquier defecto estructural puede suponer la exposición del genoma a la acción de determinadas nucleasas u otros factores externos que puedan dañarlo, así como también dificultar o impedir que el virus reconozca la molécula que utiliza como receptor, lo que daría lugar a una partícula no infectiva. En el caso de los virus envueltos, por ejemplo, la vida media de las glicoproteínas (sus proteínas estructurales) determina la viabilidad de la partícula y, por tanto, el tiempo que tiene el virus para encontrar una nueva célula susceptible e infectarla (Agrawal *et al.*, 2011; Layne *et al.*, 1992; Murray *et al.*, 2011). Además, aunque las proteínas estructurales se encuentren en perfectas condiciones, el genoma del virus debe codificar una versión funcional de todas sus proteínas para que el ciclo de infección se lleve a cabo. Cualquier defecto genético; como grandes deleciones, codones de parada prematuros, u otras anomalías genéticas que puedan alterar la funcionalidad de

INTRODUCCIÓN

cualquiera de sus proteínas, pueden causar lo que se conoce como infecciones abortivas (Klasse, 2015). Es decir, el virus llega a infectar a la célula, pero no logra completar su ciclo infeccioso y producir progenie. En segundo lugar, la infección de una célula por un virión sin defectos estructurales ni genéticos tampoco garantiza el éxito del proceso infeccioso. Existen una serie de factores estocásticos que pueden afectar a este proceso. Por ejemplo, en el caso de los virus que entran en la célula por endocitosis, éstos deben salir del endosoma antes de que se fusione con el lisosoma o serán degradados (Fredericksen *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2005). Una vez la partícula viral llega al citoplasma, debe desencapsidarse y liberar el genoma, de lo contrario deberá enfrentarse al proteasoma (Schwartz *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2005). Si cualquiera de estos pasos falla o lleva más tiempo del que es debido tendrá lugar una infección abortiva (Klasse, 2015).

Cuando un virus por fin consigue iniciar el proceso de infección de una célula, el sistema inmunitario innato de la célula, a través de un tipo de citoquinas conocidas como interferón, puede desencadenar una serie de respuestas que, si bien no pueden salvar a la célula ya infectada, puede reducir la síntesis proteica en esta célula, lo que disminuirá la producción de progenie del virus, avisar a las células vecinas de la presencia de una infección y llamar a macrófagos y células NK que se encargarán de matar a la célula infectada y a los virus que lleva dentro (Fensterl and Sen, 2009).

INTRODUCCIÓN

Además de tener que superar el proceso de infección con éxito, las poblaciones virales también deben enfrentarse a repetidos y severos cuellos de botella durante la transmisión a una nueva célula, un nuevo tejido o un nuevo hospedador. En el ámbito de la virología, podemos entender por cuello de botella una reducción transitoria del número de genomas virales en la población. Es decir, que de los miles de millones de viriones infecciosos que se pueden llegar a producir en un hospedador donante, sólo unos pocos conseguirán llegar a otro hospedador y, como hemos visto antes, no todos ellos lograrán llevar a cabo una infección exitosa. Una reducción del tamaño poblacional de este tipo genera un efecto estocástico en el número de genotipos y, por tanto, en la diversidad poblacional que pasa a la siguiente generación. Las poblaciones virales se enfrentan a cuellos de botella en diferentes situaciones:

1. En la transmisión de un hospedador a otro el virus se verá sometido a numerosos factores ambientales: radiación, condiciones de temperatura y humedad, etc. Que pueden acelerar las tasas de degradación del virus.
2. Una vez dentro del hospedador, el virus deberá enfrentarse a los diversos sistemas de defensa del hospedador (como la inmunidad innata), disponibilidad limitada de células susceptibles o de los receptores en dichas células (Ramratnam *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2008).

Aunque son complicadas de llevar a cabo, existen estimaciones de cuellos de botella en poblaciones virales. Por ejemplo, en el virus de

INTRODUCCIÓN

la patata Y, que se transmite a través de áfidos, se ha estimado que cada áfido puede transmitir eficazmente a una nueva planta de la patata entre 0,5 y 3,2 genomas virales (Betancourt *et al.*, 2008; Moury *et al.*, 2007). En el caso del virus del mosaico del tabaco, se ha estimado que se transmiten entre 1 y 4 genomas virales de un hospedador a otro (Sacristan *et al.*, 2011). En HIV, dependiendo del método de transmisión, desde un 40-70% en transmisiones por jeringa hasta un 70-90% en transmisiones sexuales o entre madre-hijo, implican la invasión de un nuevo organismo por un único genotipo (Monaco *et al.*, 2017).

Otro factor que puede afectar a los cuellos de botella es la estructura poblacional en el hospedador. Debido a que los virus replican en grandes cantidades, pueden aparecer numerosos mutantes aumentando la diversidad poblacional del virus. Esta diversidad es a menudo vertida en el sistema vascular del hospedador de modo que se pueden desarrollar nuevas subpoblaciones en otros órganos del hospedador, lo que se conoce como compartimentación de órganos (Cabot *et al.*, 2000; Jridi *et al.*, 2006; Pybus and Rambaut, 2009). Esto tiene un importante efecto durante la transmisión entre hospedadores, pues si el virus se transmite, por ejemplo, por vía respiratoria, las subpoblaciones que se hayan podido formar en otros órganos, como el riñón o el hígado, rara vez se transmitirán a un nuevo hospedador. Por tanto, sólo la población transmisible -en este ejemplo, la que se haya formado en las vías respiratorias- tendrá opciones de alcanzar nuevos hospedadores.

INTRODUCCIÓN

Bajo el paradigma clásico de la virología, cada unidad infecciosa representa una única partícula viral o virión. Sin embargo, en los últimos años se han descrito múltiples formas por las cuales los virus pueden viajar en grupo de una célula a otra o de un hospedador a otro (Sanjuán, 2017, 2018; Sanjuán and Thoulouze, 2019). A este tipo de estructuras las hemos decidido llamar unidades de infección colectiva o CIU (del inglés *collective infectious unit*). Esto sugiere un cambio del paradigma antes mencionado, pues una unidad infecciosa puede representar, también, un conjunto de viriones infectando a una misma célula por medio de una CIU.

3. Unidades de infección colectiva

3.1 Tipos de unidades de infección colectiva

Existen diversos tipos de estructuras que median la transmisión colectiva de partículas virales infecciosas a la célula diana (**figura 1**).

INTRODUCCIÓN

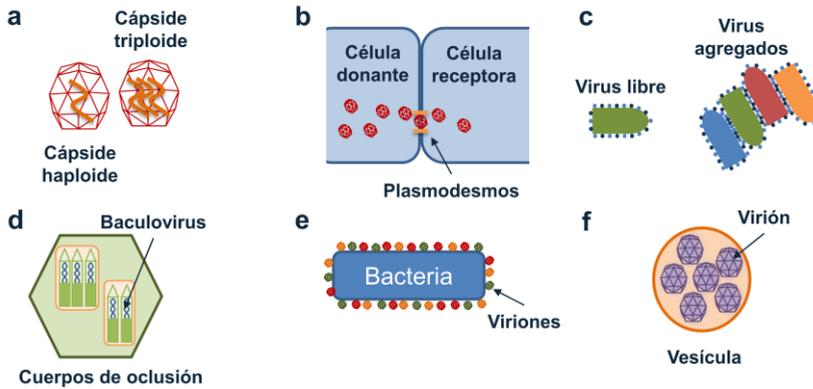


Figura 1: Tipos de unidades de infección colectiva. (a) Cápsides poliploides, cápsides que pueden contener en su interior múltiples copias del genoma viral. (b) Transmisión célula a célula de virus de plantas por medio de plasmodesmos. (c) Agregación de viriones por medio de contactos entre las moléculas que hay en la superficie de las partículas virales. (d) Cuerpos de oclusión de baculovirus incluyen grupos de partículas virales en matrices de polihedrina cristalizada que son necesarias para la transmisión entre hospedadores. (e) Asociación de viriones a superficies bacterianas de la microbiota intestinal. (f) Vesículas extracelulares que contienen en su interior múltiples partículas virales. Adaptado de Sanjuán 2017.

Cápsides poliploides. La poliploidía representa la forma más sencilla de mediar la transmisión de múltiples genomas a una misma célula (**figura 1a**). No requiere la agrupación de partículas virales y se ha descrito varias especies virales (Beniac *et al.*, 2012; Iglesias-Sánchez and López-Galíndez, 2005; Lopez and Webster, 1983; Rager *et al.*, 2002). Consiste en la incorporación de numerosos genomas dentro de una misma partícula viral. Esto es particularmente útil en el caso de virus con genomas segmentados que carecen de mecanismos que aseguren la inclusión de al menos una copia de cada segmento de su genoma (Bandín *et al.*, 2016; Luque *et al.*,

INTRODUCCIÓN

2009). Por ejemplo, en el caso de BDV (del inglés *Borna Disease Virus*) su genoma tiene dos segmentos. Si cada partícula viral contiene 2 segmentos y estos son introducidos indiscriminadamente, sólo el 50% de las partículas virales contendrán una copia de cada segmento y, por tanto, serán infecciosas. Sin embargo, si se introducen 4 genomas el porcentaje de partículas virales con al menos una copia de cada genoma aumenta hasta el 87,5% (Sanjuán, 2018).

Transmisión célula a célula. Otra forma de transmitir múltiples genomas de una célula a otra sin necesidad de agrupar partículas virales, es el caso de la transmisión célula a célula (**figura 1b**). Los virus pueden utilizar conexiones intercelulares entre células adyacentes para transferir genomas de una célula a otra como un medio de dispersión intrahospedador. Estas conexiones pueden ser preexistentes, por ejemplo, plasmodesmos en el caso de virus de plantas (Kumar *et al.*, 2015) o sinapsis nerviosas en el caso del virus del sarampión y del herpes (Lawrence *et al.*, 2000; Zaichick *et al.*, 2011); o pueden ser inducidas por el propio virus, lo que se conoce como sinapsis virológicas. Las glicoproteínas de VIH-1 localizadas en la superficie celular pueden inducir la formación de filopodios que sirven para la transmisión célula a célula (Sherer *et al.*, 2007). Otro ejemplo es el del virus HTLV-1 que puede inducir la formación de una matriz extracelular que es colonizada por un gran número de partículas virales, algo así como un “biofilm viral” que protege a las partículas virales de su entorno durante el transporte entre células (Gross and Thoma-Kress, 2016; Pais-Correia *et al.*, 2010). Otra

INTRODUCCIÓN

opción es transmitir directamente células infectadas de un hospedador a otro, como sucede en el caso de virus que infectan células sanguíneas, por ejemplo, en el caso de VIH-1 (Murooka *et al.*, 2012).

Agregación de viriones. Los viriones, en las condiciones oportunas, pueden unirse unos con otros formando cúmulos o agregados de partículas virales (**figura 1c**). Esto se ha observado, por ejemplo, en el virus de la estomatitis vesicular (Cuevas *et al.*, 2017; Galasso), el virus de la polio y de la gripe (Floyd, 1979; Wallis and Melnick, 1967), el virus de la inmunodeficiencia humana (Münch *et al.*, 2007) e incluso en algunos bacteriófagos (Drab, 2018; Gerba and Betancourt, 2017).

Cuerpos de oclusión. En el caso de baculovirus, un tipo de virus de insectos, la transmisión intrahospedador ocurre mediante viriones envueltos. Sin embargo, durante la transmisión entre hospedadores estos virus utilizan matrices de polihedrina cristalizada que se conocen como como cuerpos de oclusión (Slack and Arif, 2006) (**figura 1d**). Éstos son degradados en el intestino de los insectos liberando viriones derivados de cuerpos de oclusión que a su vez pueden estar formados por varias cápsides virales agregadas.

Asociación de viriones en superficies celulares. Otro modo de transmisión grupal se presenta en ciertos enterovirus como el virus de la polio pueden dispersarse en grupo asociados a la superficie celular de bacterias intestinales (Erickson *et al.*, 2018) (**figura 1e**). Otro ejemplo, es el de las células dentríticas. Éstas pueden actuar como medio de transmisión de VIH-1, captan en su superficie múltiples

partículas virales y las entregan a los linfocitos CD4+ durante la presentación de antígeno, favoreciendo así su infección (McDonald, 2010).

Vesículas extracelulares. Las vesículas extracelulares son estructuras membranosas fabricadas por las células hospedadoras principalmente con propósitos de mediar la comunicación intercelular (Tkach and Théry, 2016) (**figura 1f**). Sin embargo, los virus pueden explotar la producción de vesículas extracelulares y utilizarlas como medio de transporte (Altan-Bonnet *et al.*, 2019). Este tipo de unidad de infección colectiva se explicará con más detalle más adelante.

Es importante resaltar que en el caso de 4 de estas formas de transmisión colectiva descritas (cápsides poliploides, transmisión célula a célula, cuerpos de oclusión y vesículas extracelulares) los genomas virales que se transmiten conjuntamente han sido sintetizados en la misma célula productora y, por tanto, probablemente estarán altamente emparentados. En cambio, en el caso de la agregación de viriones y la asociación de viriones a superficies bacterianas, la agrupación de los viriones ocurre en el medio extracelular, por lo que pueden asociarse partículas virales que proceden de células distintas. Cabría esperar, pues, una mayor diversidad genética en este tipo de CIUs.

3.2 Pros y contras de la transmisión colectiva

Dada la diversidad de estructuras que permiten la transmisión colectiva de virus (**figura 1**) y su ubicuidad en la virosfera, cabría esperar que este tipo de estructuras represente una importante ventaja evolutiva respecto a la visión clásica de monodispersión. La

INTRODUCCIÓN

principal característica que tienen en común todos estos tipos de estructuras es un consecuente aumento a nivel celular de la multiplicidad de infección (MOI, del inglés *cellular multiplicity of infection*). Nótese que el concepto clásico de MOI representa la relación a nivel poblacional entre virus y células, nosotros en este caso omitimos las células no infectadas y nos centramos sólo en las infectadas, confiriendo el valor a la cantidad promedio de genomas virales que inician la infección. En condiciones de monodispersión, esto sólo es posible cuando la densidad de la población viral es alta. Sin embargo, si los virus pueden transmitirse colectivamente de una célula a otra, pueden mantener condiciones de alta MOI a nivel celular incluso si la densidad poblacional del virus es baja (por ejemplo, tras un cuello de botella durante la transmisión entre un hospedador y otro) (Sanjuán, 2017). Se ha sugerido que este aumento de la MOI a nivel celular puede tener importantes implicaciones en la eficacia de la población viral (Altan-Bonnet *et al.*, 2019; Díaz-Muñoz *et al.*, 2017; Sanjuán, 2017, 2018; Sanjuán and Thoulouze, 2019).

Por una parte, la agrupación de partículas virales en CIUs genera un coste para el virus a nivel de dispersión. Esto es, si una CIU contiene en su interior k partículas infecciosas, esta CIU infectará una única célula cuya infección será iniciada, en principio, por k genomas virales. Sin embargo, en monodispersión, el virus podría infectar k células (**figura 2**).

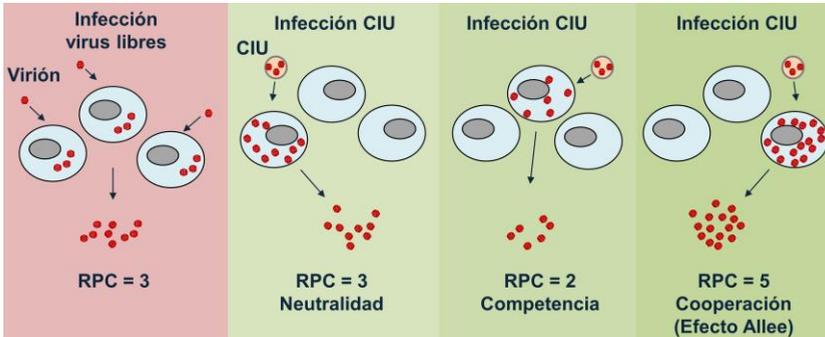


Figura 2. Coste de la dispersión grupal y posibles consecuencias a nivel de productividad. Cuando diversos viriones se agrupan en una unidad de infección colectiva o CIU, pagan un coste de dispersión ya que son capaces de infectar un menor número de células. En términos de productividad, este coste sólo puede ser compensado si los virus colaboran en la célula infectada y aumentan su rendimiento *per capita* (RPC), lo que se conoce como efecto Allee.

En términos de productividad, este coste sólo puede ser compensado si existe una correlación positiva entre el tamaño del grupo fundador (cuántos genomas infecciosos inician la infección de la célula) y la productividad (cuántas partículas infecciosas es capaz de producir esa célula), lo que en términos de ecología se conoce como efecto Allee (Stephens *et al.*, 1999). Si la célula infectada por una CIU que contiene k partículas infecciosas produce una cantidad de progenie $>k$ veces superior que en monoinfección, el coste es compensado y se obtiene un beneficio neto, por lo que la infección por CIUs es beneficiosa en términos de productividad. Como hemos mencionado anteriormente, los viriones libres a menudo fallan en el proceso de infección. Esto puede ser debido a: defectos genéticos o estructurales del virión; factores estocásticos asociados a las etapas

INTRODUCCIÓN

iniciales de la infección; o a factores del hospedador que determinan la permisividad celular (Klasse, 2015). Sin embargo, iniciar la infección con un mayor número de genomas virales puede producir un **efecto masa** que incrementa la probabilidad de infección. En el virus Vaccinia, se realizó un estudio en el que por técnicas de microfluidos los investigadores controlaban el número de genomas que introducían en cada célula y observaron que existe un aumento desproporcionado de la probabilidad de infección al aumentar el número de genomas que entran en la célula (Stiefel *et al.*, 2012). También se ha demostrado en distintas especies virales que aumentar la MOI puede acelerar el ciclo de infección del virus y ayudarlo a superar las barreras antivirales de la célula, así como favorecer la replicación viral en condiciones adversas (Andreu-Moreno and Sanjuán, 2018; Arantes *et al.*, 2016; Borges *et al.*, 2018; Boullé *et al.*, 2016; Santiana *et al.*, 2018; Sigal *et al.*, 2011; Zhong *et al.*, 2013).

Por otra parte, la coinfección sostenida por medio de transmisión colectiva puede favorecer eventos de **cooperación basada en la diversidad genética**. Es decir, eventos de cooperación entre variantes genéticas diferentes del mismo virus o, incluso, cooperación entre especies virales distintas. La cooperación entre variantes distintas puede beneficiar al virus de dos formas distintas: primero, los efectos deletéreos de una mutación en una proteína que actúe en trans -una proteína que puede ser aprovechada por diversos virus en condiciones de coinfección- pueden ser compensados por complementación genética en situaciones de coinfección junto a una

INTRODUCCIÓN

variante que produce una versión funcional de esa proteína (**figura 3a**) (Andino and Domingo, 2015). Segundo, en el caso de mutaciones beneficiosas que muestran efectos de epistasia negativa, es decir, que existe una interacción negativa entre las dos mutaciones cuando se encuentran presentes en el mismo genoma. La coinfección sostenida de variantes distintas podría favorecer una división de tareas en la que cada variante se especializa en mejorar una de sus funciones resultando en un aumento de la eficacia media poblacional (**figura 3b**) (Bordería *et al.*, 2015; Vignuzzi *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2016). Sin embargo, de las interacciones entre variantes distintas también pueden emerger variantes egoístas que maximicen su propia eficacia a costa de la eficacia de otras variantes (Turner and Chao, 1999). El caso más extremo sería el de las variantes interferentes defectivas o DIPs (del inglés *defective interfering particles*) que portan enormes deleciones por lo que se replican mucho más rápido que las variantes normales y pueden interferir en su funcionamiento (Marriott and Dimmock, 2010).

INTRODUCCIÓN

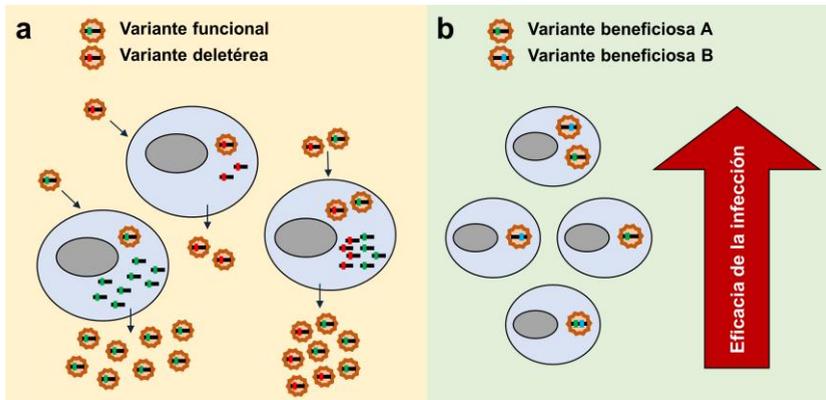


Figura 3. Cooperación basada en diversidad. **a.** Complementación genética, en este ejemplo se muestra cómo el efecto de una mutación deletérea puede ser compensado en coinfección con la variante funcional. Esto es posible cuando la proteína afectada por la mutación funciona en trans, es decir, que unos virus pueden utilizar las proteínas sintetizadas por otros virus en la misma célula. **b.** División de tareas, cada variante se especializa en una función y, en coinfección, la cooperación entre ellas aumenta la eficacia global. Esto es especialmente importante cuando dos mutaciones beneficiosas presentan algún tipo de interacción negativa al presentarse conjuntamente en el mismo genoma (epistasia negativa).

En suma, la transmisión grupal puede resultar ser una estrategia evolutivamente estable si:

1. La cooperación ocurre de forma preferencial entre variantes emparentadas. Por ejemplo, si la agrupación en una misma CIU no es indiscriminada, variantes genéticamente relacionadas pueden transmitirse de forma conjunta y beneficiarse de los beneficios obtenidos por el efecto masa y/o efecto Allee. Esto es especialmente probable en el caso de vesículas extracelulares, transmisión célula a célula, cápsides poliploides y cuerpos de oclusión, ya que las variantes que participan en este tipo de

transmisión colectiva proceden de la misma célula y, por tanto, están relacionadas genéticamente. Por ejemplo, en el virus de la inmunodeficiencia humana se ha mostrado que la transmisión célula a célula mediada por sinapsis virológicas no cotransmite eficazmente variantes distintas del virus (Law *et al.*, 2016).

2. La cotransmisión de variantes distintas se da de forma episódica. Por ejemplo, si sólo tiene lugar durante la transmisión hospedador-hospedador o la invasión de un nuevo tejido. De este modo las CIUs podrían aumentar la infectividad al reducir el efecto de los cuellos de botella, fomentar fenómenos de complementación genética y evitar efectos de epistasis negativas (Sanjuán, 2017, 2018).

3.3 Vesículas extracelulares como unidad de infección colectiva

En organismos multicelulares, las células distantes necesitan comunicarse de algún modo entre sí. Para ello, envían una serie de señales (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos...) a través de estructuras membranosas que se conocen como vesículas extracelulares. Según su tamaño y biogénesis, se puede diferenciar entre: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos (Akers *et al.*, 2013; Raposo and Stoorvogel, 2013; Tkach and Théry, 2016).

Los **exosomas** son vesículas de entre 30 y 100 nm de diámetro. Se originan en endosomas, unos subcompartimentos que organizan la degradación, reciclado o exocitosis de ciertas biomoléculas. Al fusionarse con la membrana plasmática los exosomas son liberados al medio extracelular.

INTRODUCCIÓN

Las **microvesículas** son más grandes que los exosomas, pueden llegar hasta 2 μm de diámetro. Se forman directamente por gemación en la propia membrana plasmática.

Los **cuerpos apoptóticos** son el tipo de vesícula extracelular más grande, entre 500 nm y 4 μm y como su propio nombre sugiere, se forman durante el proceso de apoptosis.

Los virus pueden explotar la producción de estas vesículas extracelulares para transmitirse en grupo de una célula a otra o de un hospedador a otro. Como veremos en el siguiente apartado, un proceso bien documentado que conduce a la formación de estas unidades infecciosas colectivas es la asociación de partículas virales a las membranas celulares. En concreto, en una especie de orgánulos, formados por membranas intracelulares procedentes del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi, donde tiene lugar la replicación y la morfogénesis del virus (Altan-Bonnet, 2017; Belov, 2016; Fernández de Castro *et al.*, 2016; Hsu *et al.*, 2010; Ravindran *et al.*, 2016; Romero-Brey and Bartenschlager, 2016; Shulla and Randall, 2016). Este tipo de transmisión colectiva es particularmente frecuente en el caso de virus no envueltos, para los cuales típicamente se ha considerado que no podían liberar su progenie hasta la lisis celular. La transmisión por medio de este tipo de unidades de infección colectiva puede dar como resultado la liberación no lítica de grupos de virus al medio extracelular (Bird *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015; Robinson *et al.*, 2014). El primer virus no envuelto que se descubrió que podía transmitirse por medio de exosomas fue el virus de la hepatitis A (Feng *et al.*, 2013) y más tarde

INTRODUCCIÓN

el virus de la hepatitis B (Nagashima *et al.*, 2014). Posteriormente se demostró que cultivos celulares infectados por enterovirus, como el virus de la polio, el virus Coxsackie B3 o el virus del resfriado común, liberan una mezcla de viriones libres y grupos de viriones asociados a membranas (VAMs). Estas dos subpoblaciones pueden ser separadas por centrifugación gracias a su diferencia en tamaño y peso (Chen *et al.*, 2015). Los enterovirus pueden transmitirse por medio de vesículas extracelulares de tipo autofagosoma, un tipo de microvesícula íntimamente ligado a la ruta de autofagia. Otros virus no envueltos, como cardiovirus, rotavirus y norovirus también pueden transmitirse en grupo asociados a membranas (van der Grein *et al.*, 2019; Santiana *et al.*, 2018). Sin embargo, este tipo de transmisión colectiva no es exclusiva de virus no envueltos, también se ha descrito en virus envueltos como VIH (Kadiu *et al.*, 2012), el virus SFTS (Silvas *et al.*, 2016). Incluso pueden transmitir genomas libres del virus de la hepatitis C (Ramakrishnaiah *et al.*, 2013). También se ha descrito que los marseillevirus, virus de DNA que infectan amebas, pueden transmitirse por medio de vesículas micrométricas (Arantes *et al.*, 2016).

La diversidad de virus capaces de transmitirse colectivamente asociados a membranas inspira un especial interés en el estudio de las particularidades de este tipo de CIU. Por ejemplo, se ha logrado aislar vesículas extracelulares de diversos tipos de muestras biológicas como sangre, orina y heces (He *et al.*, 2018; Kalra *et al.*, 2013; Santiana *et al.*, 2018), por lo que viajar en el interior de vesículas extracelulares puede ser un mecanismo de protección

INTRODUCCIÓN

contra condiciones ambientales, lo que puede jugar un papel clave durante la transmisión entre hospedadores. De hecho, en el estudio de Santiana y colaboradores los virus que obtienen de las heces que se encontraban en el interior de vesículas están en su forma madura e infecciosa, mientras que la mayoría de los que se encontraban libres estaban dañados y degradados, probablemente por acción de proteasas intestinales (Santiana *et al.*, 2018). La ruta de transmisión natural de norovirus y rotavirus es fecal-oral, en este mismo estudio demuestran que infectar ratones con estas vesículas es más beneficioso que infectarlos con la misma cantidad de partículas infecciosas pero en estado libre, por lo que es posible que resistan mejor a las condiciones del tracto digestivo, como el pH bajo del estómago (Santiana *et al.*, 2018). También se ha demostrado que los virus pueden esconderse de los anticuerpos neutralizantes en el interior de estas vesículas, lo que puede dar lugar a infecciones más persistentes (Feng *et al.*, 2013; van der Grein *et al.*, 2019; Mao *et al.*, 2016).

Como veremos en el siguiente apartado, la unión a lípidos es un aspecto esencial del ciclo infectivo del virus Coxsackie b3 (CVB3), tanto a nivel de la replicación como de la liberación de partículas infectivas. Además, Chen y colaboradores demostraron que este virus puede transmitirse por medio de vesículas extracelulares. Por todo ello, en esta tesis se utilizará el virus Coxsackie b3 como modelo de estudio de la transmisión colectiva asociada a estructuras membranosas, entre las que se encuentra la transmisión por medio de vesículas extracelulares. A partir de un cultivo celular infectado por

este virus podemos obtener grupos de viriones asociados a membrana (VAM). Debido a la diferencia de tamaño entre los VAMs – unos 400nm en promedio– y los viriones libres –unos 30nm de diámetro– es posible separar la población de CVB3 en VAMs y viriones libres aplicando una fuerza centrífuga que sedimente los VAMs, pero no los viriones libres (Chen *et al.*, 2015).

4. Modelo de estudio: Coxsackievirus b3

4.1 Relevancia y características generales del virus

En esta tesis se ha utilizado como modelo de estudio al virus Coxsackie b3 (CVB3). Este virus pertenece al grupo de los Enterovirus, un género que contiene la mayoría de patógenos humanos importantes de la familia Picornaviridae entre los cuales cabría destacar el virus de la polio, el virus del resfriado común y algunos enterovirus como EV-78. Dada su elevada similitud tanto a nivel molecular como estructural al virus de la polio, CVB3 ha sido ampliamente utilizado como modelo más seguro para estudiar y comprender mejor al virus de la polio. Tanto es así que muchos de los detalles que conocemos de la biología de CVB3 proceden de investigaciones relacionadas con el virus de la polio y viceversa (Dutkiewicz *et al.*, 2012). Su descubrimiento tuvo lugar a finales de los 40 durante un brote atípico de polio en 1947 en la localidad de Coxsackie (Nueva York). A partir de muestras de niños infectados durante este brote se pudo aislar un virus que era capaz de infectar ratones, concretamente tejido muscular estriado, mientras que el virus de la polio sólo infecta primates. A este virus se le llamó virus

INTRODUCCIÓN

Coxsackie A (Dalldorf and Sickles, 1948). Al año siguiente, se descubrió una segunda variedad inmunológica, el virus Coxsackie B, que no sólo infectaba músculo estriado, sino que también ocasionaba daños en cerebro, páncreas y corazón (Melnick *et al.*, 1949). Actualmente, aunque la mayoría de infecciones por este virus son asintomáticas en individuos adultos, su infección está asociada a miocarditis, pancreatitis y meningitis (Dutkiewicz *et al.*, 2012). El 30% de las miocarditis diagnosticadas se asocian a infecciones por CVB (Horwitz *et al.*, 2006). En niños puede ocasionar inflamaciones sistémicas que pueden causar paro cardíaco y muerte (Tracy and Gauntt, 2008). La infección persistente de células beta del islote pancreático puede, a su vez, derivar en diabetes de tipo I o insulino dependiente (Hober and Sauter, 2010). A pesar de que el virus Coxsackie b3 tiene una importante repercusión a nivel de salud pública, a día de hoy todavía carecemos de tratamientos o vacunas eficaces contra este u otros enterovirus humanos más allá del virus de la polio, por lo que comprender mejor su evolución y su biología no sólo es útil por su íntima similitud con el virus de la polio, sino que también es crucial para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas contra este y otros enterovirus.

4.2 Estructura del genoma y del virión

La partícula viral o virión de CVB3 es un icosaedro de unos 30nm de diámetro que carece de envoltura lipídica (Muckelbauer *et al.*, 1995) y que contiene en su interior el genoma del virus (**figura 4**). El genoma es una molécula de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva, lo

INTRODUCCIÓN

que significa que puede ser leído directamente por el ribosoma para sintetizar sus proteínas. Es un virus de ARN pequeño (pico-rna-virus).

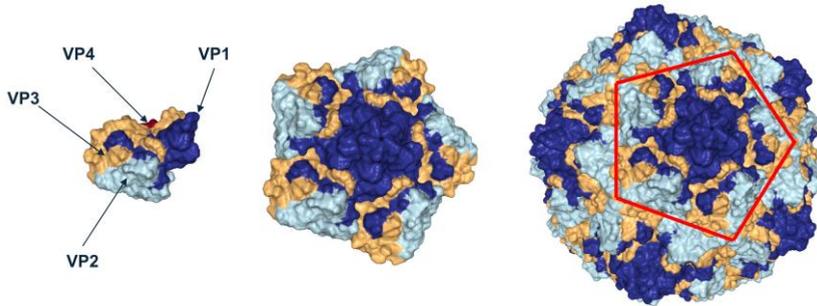


Figura 4. Estructura de la partícula viral del virus Coxsackie b3. Izquierda: Las cuatro proteínas estructurales del virus (VP1, VP2, VP3 y VP4) se unen para formar un protómero. Centro: la unión de 5 protómeros forma un pentámero. Derecha: 12 pentámeros se unen para formar la cápside viral. RCSB Protein DataBase <http://www.rcsb.org/3d-view/1COV/1>.

La longitud del genoma es de unos 7400 nucleótidos y contiene una única región codificante flanqueada por dos regiones no codificantes 5'UTR y 3'UTR (del inglés *untranslated region*) (Lindberg *et al.*, 1987) (**figura 5**).

INTRODUCCIÓN

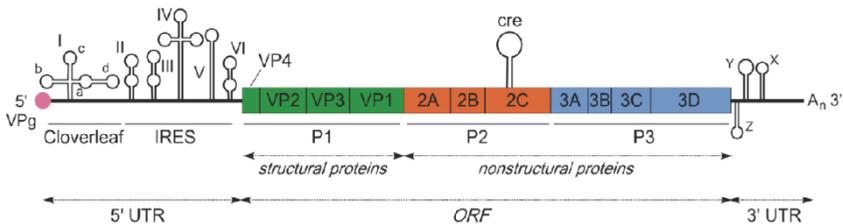


Figura 5: Organización del genoma del virus Coxsackie b3. El genoma de CVB3 contiene una única pauta de lectura abierta (ORF, del inglés *open reading frame*) que contiene las 11 proteínas del virus. En verde las proteínas estructurales. En naranja y azul, las proteínas no estructurales. La ORF se encuentra flanqueada por dos regiones no codificantes que contienen estructuras secundarias importantes en la traducción y replicación del virus. En 5'UTR se encuentra unida covalentemente la proteína VPg, la estructura en hoja de trébol y el IRES. En 3'UTR se encuentran los *stemloop* X, Y y Z. Extraído de Dutkiewicz y col. 2012.

La parte codificante contiene la información necesaria para la síntesis de una única poliproteína de unos 2200 aminoácidos que debe ser cortada por proteasas para dar lugar a las proteínas maduras del virus. Estas proteínas están agrupadas en 3 regiones determinadas por los cortes iniciales de las proteasas del virus: 2A corta entre P1 y P2 y 3C corta entre P2 y P3 (Kräusslich *et al.*, 1988). En P1 se encuentran las proteínas estructurales que forman la cápside: VP1, VP2, VP3 y VP4, mientras que en P2 y P3 codifican las proteínas no estructurales encargadas del ciclo replicativo: 2A, 2B, 2C, 3A, 3B (más conocida como VPg), 3C y 3D (Lin *et al.*, 2009). En las regiones no codificantes podemos observar estructuras secundarias de ARN muy conservadas. Las estructuras en *stemloop* de la región 3'UTR y la primera estructura en hoja de trébol de la región 5'UTR están directamente relacionadas con la replicación del virus (Banerjee *et al.*, 2001; Melchers *et al.*, 1997). Tras la hoja de

INTRODUCCIÓN

trébol se encuentra un conjunto de estructuras *stemloop* que forman el IRES (del inglés *internal-ribosome entry site*) un elemento muy conservado en enterovirus que les permite reclutar ribosomas e iniciar la traducción de forma independiente de cap (Bailey and Tappich, 2007; Pelletier and Sonenberg, 1988).

4.3 Ciclo de infección

El ciclo de infección de los enterovirus está muy conservado (**figura 6**), a excepción del paso inicial, debido a la gran variedad de receptores celulares que se han identificado (Baggen *et al.*, 2018).

INTRODUCCIÓN

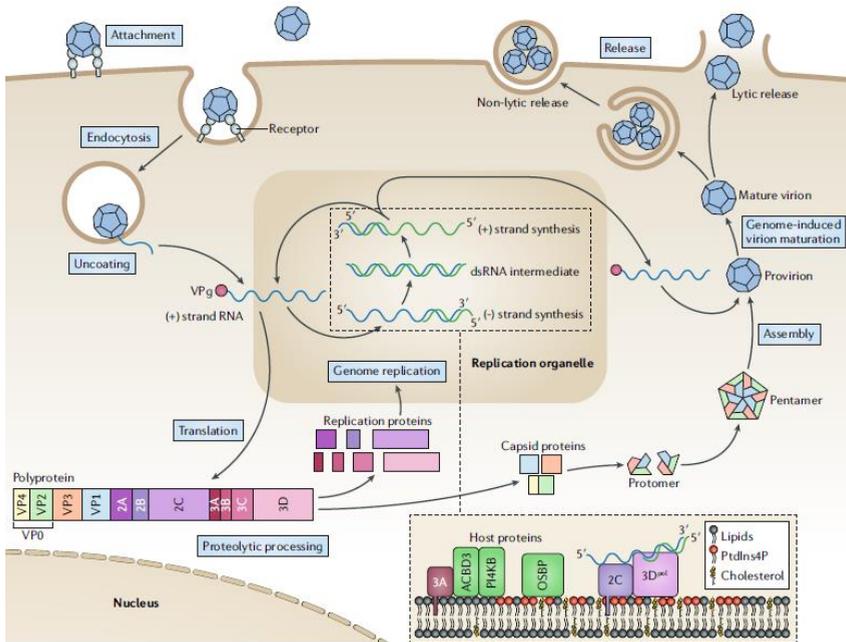


Figura 6. Esquema del ciclo infeccioso de un enterovirus. Tras la unión a su receptor principal se induce la entrada del virus por endocitosis. El virus libera su genoma al citoplasma por medio de la formación de un poro en la membrana del endosoma. La traducción del genoma genera una poliproteína que es cortada por las propias proteasas del virus dando lugar a las proteínas de la cápside y las proteínas involucradas en la replicación del virus. Las proteínas 3A y 2BC, así como otras proteínas celulares, inducen la formación de orgánulos de replicación a partir de membranas intracelulares. En estos orgánulos tiene lugar la replicación del virus por parte de la polimerasa del virus, 3D. La proteína VPg, unida covalentemente al extremo 5' del genoma, actúa como cebador de la replicación. Primero se sintetiza la hebra negativa que luego sirve como molde para la síntesis de hebras positivas. Los genomas positivos sintetizados, pueden ser utilizados de nuevo para más traducción y replicación o pueden ser empaquetados en nuevas cápsides víricas. Las proteínas de la cápside se organizan en protómeros y pentámeros y se ensamblan alrededor de un genoma positivo unido a VPg en su extremo 5' formando el provirión. El propio genoma induce la maduración de la partícula viral. Las partículas maduras pueden liberarse de forma no

INTRODUCCIÓN

lítica por medio de vesículas extracelulares o cuando tenga lugar la lisis celular. Extraído de Baggen y col. 2018.

En el caso de CVB3 el ciclo puede comenzar tras la interacción directa con su principal receptor, CAR (del inglés *Coxsackievirus and adenovirus receptor*) en células no polarizadas o, tras la interacción con CAR mediada por una interacción previa con DAF (del inglés *decay-accelerating factor*) que actúa como correceptor en células polarizadas (Bergelson *et al.*, 1994, 1997; Coyne and Bergelson, 2006; Patel *et al.*, 2009; Yoder *et al.*, 2012). La unión del virión con su receptor CAR desencadena un proceso de endocitosis mediada por receptor que permite la entrada del virus en la célula (Baggen *et al.*, 2018). Una vez dentro de la célula, una serie de cambios conformacionales permiten la liberación del genoma del virión y se induce la formación de un poro en el endosoma a través del cual el genoma del virus consigue llegar al citoplasma (Danthi *et al.*, 2003; Tosteson and Chow, 1997). Ya en el citoplasma, el IRES permite el reclutamiento de ribosomas y comienza la traducción de la poliproteína. Conforme se va generando la poliproteína, las proteasas del virus realizan los cortes oportunos para formar las proteínas maduras (Baggen *et al.*, 2018; Kräusslich *et al.*, 1988).

Tras la traducción comienza la replicación del genoma. El proceso de replicación del genoma viral ocurre en orgánulos de replicación, unas estructuras membranosas derivadas de membranas intracelulares del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi, cuya formación es inducida por las proteínas 3A y 2BC del virus (Altan-Bonnet, 2017; Belov, 2016; Fernández de Castro *et al.*, 2016; Hsu *et*

INTRODUCCIÓN

al., 2010; Ravindran *et al.*, 2016; Romero-Brey and Bartenschlager, 2016; Shulla and Randall, 2016; Suhy *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2008). Una vez formados los orgánulos de replicación, la proteína VPg actúa como cebador, y la polimerasa del virus, 3D, utiliza el genoma del virus como molde para la síntesis de la hebra negativa formando un heterodúplex de ARN (Sean and Semler, 2008). Luego, con ayuda de 3CD, 2C y ciertas proteínas celulares, la polimerasa accede al extremo 3' de la hebra negativa y comienza la síntesis de hebras positivas que pueden ser utilizadas para traducir más proteínas virales o se pueden ensamblar en nuevos viriones (Banerjee *et al.*, 2001; Ertel *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2009). Para el ensamblaje de nuevas partículas virales P1 debe ser procesada por 3CD lo que da lugar a un protómero formado por una copia de cada proteína estructural (Geller *et al.*, 2007), estos protómeros oligomerizan para formar pentámeros que envolverán el genoma viral formando la partícula viral (Basavappa *et al.*, 1994). Hasta hace poco tiempo, se consideraba que la liberación de nuevos viriones se producía durante la lisis celular. Sin embargo, el modelo actual sostiene que Coxsackie puede salir por una vía alternativa activando la ruta de la autofagia e induciendo la formación de autofagosomas que engloban grupos de viriones (Jackson *et al.*, 2005). Los autofagosomas se fusionan con lisosomas para degradar su contenido, sin embargo este proceso es inhibido por el virus y, en su lugar, se induce la fusión con la membrana plasmática, dando como resultado la liberación no lítica de grupos de viriones metidos dentro de vesículas extracelulares (Baggen *et al.*, 2018; Bird *et al.*, 2014; Robinson *et al.*, 2014).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Estudiar si existe una base genética que determine la transmisión colectiva de viriones asociados a membranas en CVB3.
2. Comprobar si las unidades de infección colectiva asociadas a membranas son un buen vehículo para promover la co-transmisión de diferentes variantes genéticas de CVB3.
3. Analizar los posibles beneficios y costes del aumento de la multiplicidad de infección producida por la transmisión colectiva asociada a membranas.

METODOLOGÍA

1. Líneas celulares y cultivo celular

A lo largo de esta tesis se han utilizado tres tipos celulares distintos: Células HeLa-H1 (células humanas de adenocarcinoma de cuello uterino, CRL-1958); células Vero (células epiteliales de riñón de mono verde, CCL-81); y células A549 (células humanas de adenocarcinoma de pulmón, CCL-185). Todas las líneas celulares utilizadas fueron obtenidas de la ATCC (del inglés *American Type Culture Collection*) y cultivadas en medio DMEM (del inglés *Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado con un 10% (v/v) de suero bovino fetal o FBS (del inglés *fetal bovine serum*), aminoácidos no esenciales, 10 unidades/mL de penicilina, 10µg/mL de estreptomina y 250 ng/mL de anfotericina B (de aquí en adelante medio de cultivo), bajo condiciones estándar de cultivo (37°C y 5% de CO₂). Posibles contaminaciones por micoplasma fueron descartadas mediante PCR.

2. Virus y stock viral

El clon infeccioso de CVB3 fue amablemente proporcionado por el Dr. Marco Vignuzzi (Instituto Pasteur de París, Francia). Los stocks virales fueron producidos infectando células HeLa-H1 a baja MOI (0,1 PFUs/célula) durante 24h bajo condiciones estándar de cultivo. Entonces, las células infectadas fueron sometidas a 3 ciclos de congelación-descongelación para romper completamente las células y liberar todas las partículas virales producidas. Los restos celulares fueron eliminados centrifugando el cultivo a 3.000 g durante 1 min y el sobrenadante de esta centrifugación fue alicuotado y almacenado a -80°C.

METODOLOGÍA

3. Construcción de virus codificantes de proteínas fluorescentes

Para la construcción de virus codificantes de proteínas fluorescentes construimos clones infecciosos de CVB3 con secuencias dianas de enzimas de restricción realizando sustituciones (sinónimas cuando éstas caían en una región codificante) por mutagénesis dirigida. Para la inserción del gen eGFP, construimos el clon infeccioso CVB3-*XhoI*-P1-*KpnI*. Para ello quitamos la diana *XhoI* presente en P1 e introducimos una diana *XhoI* en la posición 692 así como también una diana *KpnI* en la posición 3314. El plásmido resultante fue digerido con *KpnI* para linealizarlo e introducimos un fragmento sintético (IDT) que contenía la secuencia codificante de eGFP flanqueada por los aminoácidos que sirven como diana de corte de la proteasa 2A del virus utilizando la mezcla de ensamblaje de ADN NEBuilder HiFi (New England Biolabs). Para la inserción del gen mCherry, construimos el clon infeccioso CVB3-*MluI*-P2-*KpnI*. Para ello eliminamos la diana *MluI* presente en el plásmido fuera del genoma del virus e introducimos una diana *MluI* en la posición 3263 y una diana *KpnI* en la posición 5068. El plásmido resultante fue digerido con *KpnI* e introducimos un fragmento sintético que codifica el gen mCherry flanqueado por los aminoácidos que sirven como diana de corte de la proteasa 3C del virus utilizando el mismo procedimiento que con el constructo anterior.

4. Titulación por ensayo en placa

Los títulos virales se definen como número de partículas formadoras de calva o PFU (del inglés *plaque forming units*) por mililitro (PFUs/mL). Todos los títulos mostrados en esta tesis han sido

obtenidos mediante ensayo en placa. Para ello, se usaron células HeLa-H1 cultivadas en placas de 6 pocillos. Cada pocillo se inoculó con 200µL de virus y se incubó durante 45 min (o el tiempo necesario para medir la tasa de adsorción de las distintas subpoblaciones del virus) bajo condiciones estándar de cultivo. Tras el periodo de incubación se añadieron 2mL de medio de cultivo 2% FBS con agar noble al 0,8% (p/v). Las calvas se volvían visibles alrededor de las 44 o 48 h post inoculación (hpi), momento en el cual se fijaron las células a la placa con formaldehído 10% (v/v) durante 1 h y se retiró la capa de agar para teñir las células con cristal violeta al 2% (p/v) disuelto en formaldehído 10%.

5. Dilución límite de unidades infecciosas

La dilución límite se llevó a cabo repartiendo las unidades infectivas en placas de 96 pocillos con células HeLa-H1. Para asegurar que la mayoría de pocillos de cada placa recibiesen 0 o 1 PFU (nótese que 1 PFU puede ser una unidad colectiva o una partícula individual) se hicieron diluciones seriadas en placas de 96 pocillos y se analizaron los focos de aquellas placas que mostraron fluorescencia en menos de un tercio de los pocillos. La fluorescencia de los focos de infección fue analizada utilizando una herramienta de conteo manual (*multi-point*) de Fiji (ImageJ).

6. Recolección de virus asociados a membranas (VAM) por centrifugación

Para la obtención de VAMs infecciosos se infectaron células HeLa-H1 con el virus CVB3 en placas de 6 pocillos (con 200 µL de virus por

METODOLOGÍA

pocillo) o en placas p100 (con 1200 μ L de virus) a alta MOI (10 PFUs/célula) para maximizar la infección. Tras el periodo de incubación el inóculo fue retirado y se añadió medio de cultivo 2% FBS (1mL a cada pocillo de la placa de 6 pocillos o 6mL a la placa p100). En el momento de la recolección (8hpi o 12hpi según el experimento) el cultivo fue recolectado y centrifugado a 1.000 g durante 10 min a 4°C para retirar los restos celulares y/o las células no lisadas. El sobrenadante de esta centrifugación se recogió y fue centrifugado de nuevo a 4°C esta vez a 10.000 g durante 10 min (si el volumen de cultivo era de 1mL) o 30 min (si el volumen era de 6mL). El sobrenadante de esta centrifugación (S_1) fue almacenado a 4°C como fracción de virus libres hasta ser utilizado, mientras que el *pellet* fue resuspendido y centrifugado de nuevo dos veces más bajo las mismas condiciones. El tercer *pellet* (P_3) fue resuspendido y almacenado como fracción enriquecida en VAMs a 4°C hasta ser utilizado.

7. Purificación de VAMs ricos en fosfatidilserina

Se realizó el mismo procedimiento que en el apartado anterior. El segundo *pellet* del proceso de centrifugación (P_2) fue resuspendido en 80 μ L de tampón de unión proporcionado por el *kit* de microperlas conjugadas con anexina V (Milteny Biotec, CA). Luego se añadieron otros 20 μ L de microperlas y la mezcla se incubó a 4°C durante 15 min. Finalmente, las partículas ricas en fosfatidilserina fueron purificadas siguiendo las instrucciones del fabricante hasta obtener la fracción P_2^* que fue almacenada a 4°C como fracción enriquecida en VAMs ricas en fosfatidilserina hasta ser utilizado.

8. Rotura de membranas con detergente

La liberación de los viriones asociados a membranas se llevó a cabo con un detergente para romper sus membranas. Para ello, se incubaron fracciones P₃ o P₂* con tritón X-100 al 0,16% (v/v) a 4°C durante al menos 15 min.

9. Microscopía electrónica de transmisión

Se obtuvieron VAMs por centrifugación como se explica arriba. Las muestras fueron encajadas en un cono de agar 1% (p/v) y luego fijadas con paraformaldehído 2% (p/v) y glutaraldehído 2,5% (p/v) disueltos en tampón fosfato (PB, del inglés *phosphate buffer*) 0,1M durante más de 1h a temperatura ambiente de laboratorio. El fijador fue retirado y el cono se lavó con PB para eliminar los restos de solución fijadora. Las preparaciones fueron post-fijadas y contrastadas con una solución de osmio al 2% (p/v), deshidratadas en lavados de etanol de concentraciones crecientes y contrastadas durante la deshidratación con acetato de uranilo 2% (p/v) en etanol 70% (v/v). Finalmente, las muestras fueron embebidas en resina epoxi Durcupan y polimerizadas durante 72h a 70°C. Se obtuvieron cortes semifinos (1,5 µm) usando un ultramicrotomo Leica EM UC-6 y teñidos con azul de toluidina 1% (p/v) a 70°C para su visualización por microscopía óptica. Finalmente, se obtuvieron secciones ultrafinas (70-80 nm) que fueron contrastadas con solución de Reynolds para su visualización al microscopio electrónico de transmisión.

METODOLOGÍA

10. SDS-PAGE y Western blot

Se obtuvieron VAMs por centrifugación como se explica arriba. El tercer *pellet* fue resuspendido en tampón de lisis (Tris-pH 8,0, 50 mM, NaCl, 150 mM, EDTA 5mM, NP-40 0,5% [v/v]) con inhibidores de proteasas e incubado en hielo durante 30 min, agitando la mezcla en el vórtex cada 10 min. Entonces, las proteínas fueron desnaturalizadas a 95°C durante 10 min en tampón de muestra Laemmli (BioRad) con β -Mercaptoetanol al 2,5% (v/v). Las proteínas desnaturalizadas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) y transferidos en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20% [v/v]) a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m por transferencia semi-seca en un Novex Semi-Dry Blotter (Invitrogen). Las membranas se lavaron con PBS *tween* 20 0,1% (v/v, de aquí en adelante PBS-*tween*) y luego incubadas con tampón de bloqueo (5% [p/v] de leche en polvo sin grasa en PBS-*tween*) durante 30 min a temperatura ambiente de laboratorio. Tras el bloqueo, las membranas fueron incubadas *overnight* a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos en tampón de bloqueo: anti-LC3B (1:1000, de conejo, ThermoScientific) como marcador de autofagosomas, anti-GAPDH (1:3000, de conejo, Sigma-MERK) como control de contenido intracelular y anti-BSA (1:2500, de conejo, Sigma-MERK) como control negativo o de contenido extracelular. El exceso de anticuerpos primarios se retiró lavando las membranas 5 veces con PBS-*tween*. Entonces, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo

secundario conjugado con HRP y diluido en tampón de bloqueo (anticuerpo anti-conejo de cabra, Santa Cruz Biotechnology) durante 90 min a temperatura ambiente de laboratorio. Finalmente, se retiró el exceso de anticuerpo secundario como antes y se incubaron las membranas con el sustrato de la HRP Pierce ECL Plus Wester Blotting Substrate para detectar quimioluminiscencia en un analizador de imagen luminiscente ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Bio-Sciences AB).

11. Evolución experimental

Un cultivo de células HeLa-H1 fue infectado como arriba con el virus *stock* (virus fundador) para obtener las siguientes fracciones: fracción enriquecida en VAMs (P_3), viriones infecciosos libres (S_1) y viriones infecciosos liberados de VAMs mediante detergente (B_3). Con cada fracción se iniciaron dos líneas evolutivas paralelas a baja MOI (0,1 PFUs/célula) durante 20 transferencias. A las 20hpi para cada linaje se recuperó la fracción de interés y se transfirió de nuevo a otro cultivo celular a baja MOI. Cada fracción fue titulada por ensayo en placa tras cada transferencia para mantener la MOI constante.

12. Medida del tamaño de calva mediante análisis de imagen

El tamaño de la calva formada por las variantes silvestre (CVB3-WT) y mutante (CVB3-N63H), fue analizado mediante análisis de imagen con Fiji (ImageJ). Para ello se realizó un ensayo en placa con cada variante del virus y a las 44hpi las células fueron fijadas y teñidas. Las placas resultantes fueron fotografiadas con una lupa Leica MZ10 F.

METODOLOGÍA

13. Extracción de ARN, RT-PCR

100 µL del sobrenadante de cultivo de la transferencia 20 de cada linaje, así como también del virus fundador, fueron utilizados para realizar la extracción de ARN usando el Quick RNA viral kit (ZymoResearch) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Del ARN extraído de cada muestra se utilizaron 2 µL para realizar una transcripción inversa usando la transcriptasa reversa de alta fidelidad AccuScript (Agilent) con un olido-dT específico para CVB3 (5'TTTTTTTTTTTTTTCCGCAC). La amplificación del genoma completo del virus se llevó a cabo mediante tres reacciones de PCR usando las siguientes parejas de cebadores:

Cebador	Secuencia (5'→3')	Temperatura de hibridación	Tiempo de extensión
CV-1F	TTAAACAGCCTGTGGGTTGA	64°C	1'15"
CV-2143-R	GGCCGAACCACAGAACATAA		
CV-2045-F	TCGAGTGTTTTAGTCGGACG	63°C	1'40"
CV-4923-R	AGCCTTCCCACACACAAGAGG		
CV-4879-F	TCGAGTGTTTTAGTCGGACG	66°C	1'30"
CV-7399-R	AGCCTTCCCACACACAAGAGG		

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando la polimerasa de ADN de alta fidelidad Phusion (ThermoScientific) y 2,5 µL de la reacción de retrotranscripción en un volumen de reacción de 50 µL, con el siguiente ciclo termal:

Paso	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización	98°C	60"	
Desnaturalización	98°C	10"	
Hibridación	*	20"	x35
Extensión	72°C	*	
Extensión final	72°C	5'	

*Según pareja de cebadores utilizada

Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa y purificados con el DNA Clean & Concentrator kit (ZymoResearch).

14. Secuenciación masiva y análisis de datos de secuenciación masiva

Con el fin de que todo el genoma fuese secuenciado con aproximadamente la misma cobertura, se realizó una mezcla equimolar de los tres amplicones. Para ello, cada amplicón fue cuantificado por espectrometría en un NanoDrop One (ThermoScientific). Con cada mezcla equimolar de cada muestra se construyeron librerías *paired-end* y se secuenciaron en un secuenciador MiSeq de Illumina.

Los archivos de secuenciación masiva FastQ fueron analizados con el programa informático FastQC 0.11.7 para evaluar su calidad (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Según el reporte obtenido con el programa FastQC, se procedió a cortar los primeros 10 nucleótidos y los últimos 2 de cada lectura con el programa Cutadapt (<https://cutadapt.readthedocs.io>). Las lecturas recortadas fueron entonces depuradas con FASTQ Quality Filter

METODOLOGÍA

(http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) y Prinseq-lite 0.20.4 (Schmieder and Edwards, 2011) por calidad (Q30), longitud (200 nucleótidos) y otros artefactos de secuenciación (duplicaciones, indeterminaciones [Ns]). Como referencia para el mapeado se utilizó el genoma de CVB3 cepa Nancy (GenBank: JX312064) y la identificación de polimorfismos en la secuencia se llevó a cabo utilizando la *pipeline* ViVan 0.43 (Isakov *et al.*, 2015).

15. Mutagénesis dirigida

Las mutaciones no sinónimas observadas a una frecuencia elevada en los datos de secuenciación fueron introducidas por mutagénesis dirigida en el clon infeccioso de CVB3. Para ello se utilizaron parejas de cebadores autocomplementarios con la sustitución deseada localizada en el centro:

Cebador	Secuencia (5'→3')
CV_G749A_F	CAGCAAAATGGGAACTCAAGTATCAAC
CV_G749A_R	GTTGATACTTGAGTTCCTATTTTGCTG
CV_T796A_F	GAGACCAGGCTGAAAGCTAGCGGCAATTC
CV_T796A_R	GAATTGCCGCTAGCTTTCAGCCTGGTCTC
CV_T813C_F	GCGGCAATCCACCATTCACTACAC
CV_T813C_R	GTGTAGTGAATGGTGAATTGCCGC
CV_A1925C_F	GGAGAGAAGGTCCACTCTATGGAAG
CV_A1925C_R	CTTCCATAGAGTGGACCTTCTCTCC
CV_A3221C_F	CTGCCAATACGAGCAGGCAAAGAACG
CV_A3221C_R	CGTTCTTTGCCTGCTCGTATTGGCAG
CV_A3222T_F	GCCAATACGAGATGGCAAAGAACGTG
CV_A3222T_R	CACGTTCTTTGCCATCTCGTATTGGC

METODOLOGÍA

Para la mutagénesis dirigida se realizó una PCR lineal con la polimerasa de ADN de alta fidelidad Phusion (ThermoScientific) y utilizando 150ng del clon infeccioso de CVB3 como molde. El ciclo termal llevado a cabo fue el siguiente:

Paso	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización	98°C	60''	
Desnaturalización	98°C	60''	
Hibridación	65°C	60''	x25
Extensión	72°C	6'	
Extensión final	72°C	10'	

Tras la reacción de mutagénesis, se añadió *DpnI* (ThermoScientific) que gracias a su capacidad para digerir ADN metilado sólo digiere el ADN utilizado como molde y deja intacto el generado durante la reacción de PCR. La reacción de digestión se incubó durante 2 h a 37°C y se analizó el resultado mediante electroforesis en gel de agarosa. Aquellas muestras que continuaban mostrando banda tras la digestión, se ligaron con la ligasa de ADN del bacteriófago T4 (ThermoScientific) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN mutado y ligado se utilizó para transformar bacterias competentes NZY5 α (NZYtech) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para comprobar el fondo de posibles colonias transformadas con restos de ADN molde no digerido, se utilizó un control negativo de una reacción de mutagénesis a la que no se añadieron cebadores y se comparó el resultado de la transformación de bacterias competentes del control negativo con las muestras de

METODOLOGÍA

mutagénesis. Se recolectaron varias colonias que fueron testadas por PCR y las que dieron positivo se comprobó mediante secuenciación Sanger que contenían la sustitución deseada, tras lo cual se amplificó al menos un clon infeccioso de cada mutante mediante miniprep con el kit NZYMiniprep (nzytech).

16. Transcripción *in vitro* y transfección

Los clones infecciosos fueron linealizados con *SaI* (ThermoScientific). El ADN lineal se usó como molde para la síntesis de ARN mediante transcripción *in vitro* con el TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (ThermoScientific). El ARN sintetizado fue purificado por precipitación con LiCl, cuantificado por espectrometría en un NanoDrop One (ThermoScientific) y almacenado a -80°C hasta ser utilizado.

Para producir partículas virales, se transfectaron 400 μ L de células HeLa-H1 a una concentración de 10^6 células/mL por electroporación en un BIO-RAD GenePulser Xcell con la siguiente configuración: Voltaje a 240 V, Capacitancia a 950 μ F, Resistencia ∞ , Grosor de la cubeta 4 mm.

17. Microscopía de fluorescencia automatizada

La toma de imágenes de microscopía de fluorescencia se realizó en un IncuCyte S3 Live-Cell Analysis System (Essen BioScience) que reside dentro de un incubador de cultivos celulares. Las placas del experimento pueden ser incubadas dentro de este microscopio bajo condiciones estándar de cultivo, lo que permite poder tomar imágenes en cualquier momento y seguir el experimento en tiempo real. Con el

objetivo 4x se tomaron imágenes de: contraste de fases; canal de fluorescencia verde (con 300 ms de exposición); y canal de fluorescencia roja (con 400 ms de exposición). De cada canal se cogieron imágenes representativas de cada condición para definir una máscara de análisis de imagen. La señal de fluorescencia de fondo fue corregida usando el método *top-hat* y se aplicó un valor de umbral mínimo de intensidad de fluorescencia.

18. Ensayos de citotoxicidad

Células HeLa-H1 fueron infectadas a MOI alta (10 PFUs/célula) con las variantes CVB3-WT y CVB3-N63H para medir la citotoxicidad celular de cada variante a lo largo del ciclo infeccioso. Como control negativo se utilizaron células sin infectar. Tras el periodo de incubación con el virus, el inóculo fue retirado y se añadió medio de cultivo 2% FBS con IncuCyte® Cytotox Red (Essen Bioscience) a 250nM, un reactivo de fluorescencia para contar células muertas. Los datos de muerte celular a lo largo del ciclo de infección se obtuvieron mediante microscopía de fluorescencia automatizada.

19. Citometría de flujo

Para el análisis de citometría de flujo infectamos células HeLa-H1 con una mezcla 1:1 de CVB3-eGFP y CVB3-mCherry a alta MOI (10 PFUs/célula de cada virus) para maximizar la cantidad de células coinfectadas con ambas variantes y, por tanto, la producción de VAMs potencialmente polimórficos (es decir, que contienen distintas variantes del virus en cada unidad infectiva, en este caso, tanto la variante CVB3-eGFP como la variante CVB3-mCherr). Tras ello, se

METODOLOGÍA

infectaron células HeLa-H1 con estos VAMs a baja MOI (0,1 PFUs/célula). A las 7 hpi se retiró el medio extracelular, se lavó la monocapa con PBS, se recolectaron las células separándolas de la placa con tripsina-EDTA, se resuspendieron en medio completo 10% FBS para inhibir la reacción de tripsinización, se lavaron con PBS por centrifugación a 750 g durante 5 min y se resuspendieron en paraformaldehído al 4% (v/v) para fijarlas *overnight* a 4°C. Una vez fijadas fueron lavadas de nuevo con PBS por centrifugación en las mismas condiciones y se resuspendieron en 1 mL de PBS. Entonces, se analizaron 10^4 (células productoras) o 10^5 (células receptoras) eventos de cada muestra en un citómetro de flujo Becton Dickinson LSRFortessa equipado con láseres de 488 nm y 561 nm para la excitación de eGFP y mCherry, respectivamente. Como control negativo se utilizaron células no infectadas, como control positivo se utilizaron células infectadas sólo con una variante o con ambas (células productoras) para ajustar los cuadrantes de fluorescencia manualmente.

20. Cuantificación y análisis estadístico

Salvo en el caso de la evolución experimental, todos los experimentos llevados a cabo en esta tesis fueron realizados por triplicado. Los términos de error corresponden al error estándar de la media. Al disponer de sólo 3 réplicas los contrastes se realizaron en la mayoría de los casos utilizando los test de Welch y Games-Howell. A excepción de la comparación de los tamaños de calva, donde disponíamos de más de 20 datos para cada condición, lo que nos permitió confirmar normalidad y homocedasticidad antes de aplicar

una prueba *t* de Student. El modelo utilizado para estimar la proporción de la progenie viral que es transmitida por medio de VAMs (*f*) se explica en la **figura 15**. Los archivos crudos de citometría de flujo fueron analizados utilizando la función `read.FCS` implementada en R (<https://www.R-project.org>) para obtener los valores de intensidad de mCherry y eGFP. Los modelos matemáticos usados para inferir el número de partículas por unidad VAM (*n*), la probabilidad de que la unidad infectiva VAM se rompa durante la resuspensión del *pellet* (*b*) y la proporción de VAMs en la fracción P_3 (v_p) se explica en la **figura 16**. El modelo probabilístico usado para calcular la proporción de grupos polimórficos de VAMs (*m*) a partir de los recuentos de citometría de flujo se explican en la **figura 19**.

RESULTADOS

1. *Mise en place*: Obtención y análisis de grupos de viriones asociados a membrana con CVB3

1.1 Los grupos de VAMs pueden ser separados de los viriones libres mediante centrifugación

El primer paso de esta tesis consistió en la obtención de una muestra enriquecida en grupos de viriones asociados a membranas (VAM). Como se ha mencionado en la introducción, se ha descrito que CVB3 puede transmitirse por medio de vesículas extracelulares que tienen un diámetro promedio de unos 350 nm (Chen *et al.*, 2015). En cambio, el diámetro de los viriones de Coxsackievirus es de unos 30nm (Muckelbauer *et al.*, 1995), por lo que debería ser posible separar los viriones libres de los grupos de VAMs aplicando una fuerza de gravedad que sedimente los VAMs pero deje a los viriones libres en el sobrenadante. Basándonos en la metodología descrita por Chen *et al.* 2015, procedimos a infectar un cultivo de células HeLa-H1 con el virus a alta MOI (10 PFUs/mL) para maximizar la cantidad de células infectadas. Al final del ciclo, en torno a las 12 horas post inoculación (hpi), recogimos el medio de cultivo, retiramos los restos celulares con una centrifugación suave y finalmente aplicamos una centrifugación más fuerte (10.000 × g) para separar los grupos de VAMs de los viriones libres. Con el fin de tratar de reducir la presencia de viriones libres en la fracción VAM, resuspendimos el *pellet* y repetimos el proceso dos veces más (**figura 7a**). El primer sobrenadante lo guardamos como fracción de viriones libres (S₁) y el tercer *pellet* como fracción de VAM (P₃). Entonces, procedimos a titular ambas fracciones por ensayo en placa (**figura 7b**). S₁ contenía $(2,4 \pm 0,4) \times 10^8$ PFUs/mL, frente a $(5,0 \pm 0,4) \times 10^6$ PFUs/mL en P₃. Al pasar estas fracciones a través de filtros de 0,1 μm el título de P₃

RESULTADOS: Mise en place

disminuyó $15,8 \pm 1,0$ veces. En cambio, el título de S_1 disminuyó $1,3 \pm 0,1$ veces. Es decir, que apenas se vio afectado. Esto nos sugiere que este procedimiento nos sirve para separar viriones libres infecciosos de otras unidades infecciosas de mayor tamaño. Para confirmar si la infectividad observada en P_3 se debía a la presencia de unidades de infección colectiva (CIU) asociadas a membranas, como sería el caso de las vesículas extracelulares, aplicamos un tratamiento con detergente tritón X-100 para romper membranas lipídicas (P_{t3}). Esto causó un incremento del título en P_3 de $11,6 \pm 1,1$ veces. En cambio, este tratamiento sólo aumentó el título de la fracción S_1 1.3 ± 0.1 veces. Lo que sugiere que la infectividad observada en P_3 se debe a la presencia de CIU asociadas a membranas. Basándonos en estos datos, el $19,5\% \pm 1,1\%$ del total de viriones infecciosos producidos en el momento de la recolección se encontraban asociados a membranas, un valor que puede estar subestimado si tenemos en cuenta que:

1. A pesar de los 3 ciclos de centrifugación-resuspensión, en P_3 podrían seguir quedando viriones libres infecciosos, por tanto, si no todas las PFUs de P_3 son grupos de VAMs, el aumento de título observado al tratar con detergente podría suponer una subestimación de la proporción de progenie viral asociada a membranas.
2. El tratamiento con detergente podría no haber liberado todos los viriones infecciosos asociados a membranas, lo que de nuevo supondría una infraestimación de la cantidad promedio de viriones infecciosos por cada unidad de infección colectiva.

RESULTADOS: Mise en place

- En S_1 podría haber partículas infecciosas que provengan de VAMs que se han liberado por el estrés mecánico del proceso de centrifugación, por lo que la cantidad de viriones infecciosos libres podría estar sobreestimada.

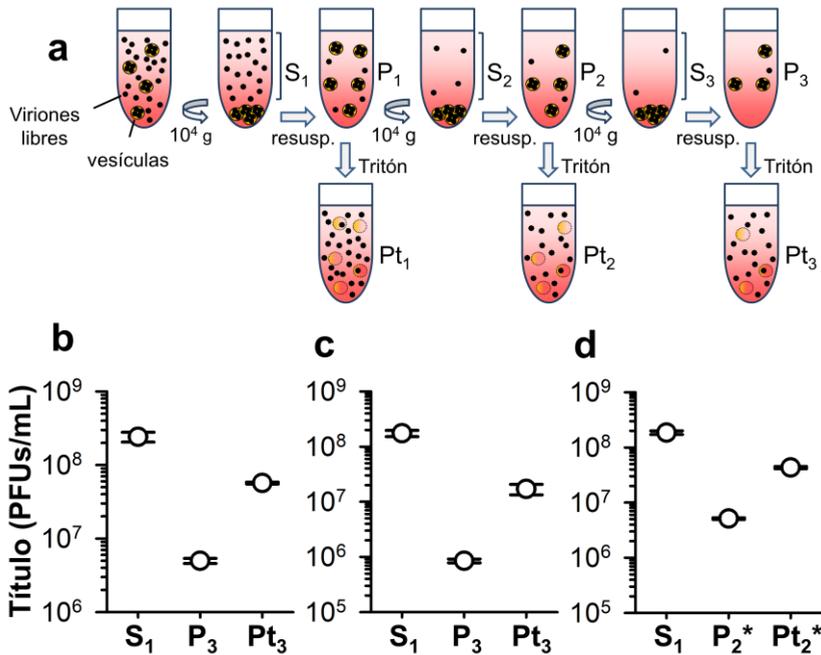


Figura 7. Separación de virus libres y grupos de VAMs. (a) Esquema del procedimiento para separar virus asociados a membrana de viriones libres por centrifugación. De este modo distinguimos entre sobrenadante o virus libres (S_{1-3}) y *pellet* o grupos de VAMs (P_{1-3}). La fracción P fue tratada con detergente tritón X-100 al 0.16% para romper las membranas y liberar el contenido viral asociado dando lugar a la fracción de *pellet* tratado o Pt (Pt_{1-3}). (b-d) Titulación de las fracciones indicadas por ensayo en placa obtenidas por: centrifugación post-lisis (b, 12hi), pre-lisis (c, 8hpi) y utilizando anexina V (d, 12hpi). Las barras de error indican el error estándar de la media ($n = 3$ réplicas).

RESULTADOS: Mise en place

Aunque este procedimiento nos permite obtener una muestra enriquecida en CIU asociadas a membranas, no podemos olvidar que simplemente selecciona unidades infecciosas que sedimentan a 10.000 por lo que aparte de vesículas extracelulares podría haber otras estructuras membranosas, como orgánulos de replicación liberados durante la lisis, que permitan la transmisión colectiva de viriones asociados a membranas. Sin embargo, sabemos que la secreción de vesículas extracelulares con viriones en su interior precede a la lisis (Bird *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015; Robinson *et al.*, 2014). Por tanto, aplicando el mismo procedimiento, pero en un momento anterior a la lisis celular podríamos hacernos una idea de la contribución de las vesículas extracelulares a la infectividad de P₃. Para ello, infectamos células del mismo modo, pero las recolectamos a 8 hpi y aplicamos el mismo procedimiento de centrifugación (**figura 7c**). En esta ocasión, la cantidad de viriones libres resultó ser de $(1,9 \pm 0,1) \times 10^8$ PFUs/mL frente a $(5,1 \pm 0,2) \times 10^6$ PFUs/mL en P₃. El tratamiento con detergente mostró un aumento del título en P₃ de $7,9 \pm 0,1$ veces. Unos valores muy similares a los obtenidos a 12hpi por lo que nos sugieren una importante contribución de vesículas extracelulares a la infectividad del tercer *pellet*.

Otra forma de comprobar la presencia de vesículas extracelulares es comprobar si nuestros virus asociados a membrana son ricos en fosfatidilserina, tal y como se ha descrito (Chen *et al.*, 2015). Para ello, repetimos el mismo procedimiento de infección y recolección a 12 hpi pero utilizando el segundo *pellet* (P₂) para realizar una

RESULTADOS: Mise en place

purificación con perlas magnéticas conjugadas con anexina V, una proteína que se une específicamente a fosfatidilserina. Mediante este procedimiento logramos obtener grupos de VAMs ricos en fosfatidilserina (P_2^*). En concreto, el resultado fue de $(0,9 \pm 0,1) \times 10^6$ PFUs frente a $(1,8 \pm 0,2) \times 10^8$ PFUs en S_1 y un aumento de título tras el tratamiento con detergente de $20,6 \pm 5,3$ veces (**figura 7d**). De nuevo datos muy similares a los anteriores que nos sugieren que los VAMs obtenidos en P_3 son ricos en fosfatidilserina. Cabe resaltar que el aumento de título tras el tratamiento con detergente es considerablemente mayor, lo que puede deberse a dos razones no necesariamente excluyentes:

1. Con este procedimiento obtenemos una muestra final menos contaminada con viriones libres por lo que apreciamos mejor el aumento de título al romper las vesículas.
2. Las unidades de infección colectiva ricas en fosfatidilserina contienen en promedio más viriones infecciosos que otras CIU que podrían estar presentes en P_3 , como, por ejemplo, algún otro tipo de vesícula extracelular distinta a los autofagosomas, exosomas u orgánulos de replicación.

Así que nuestro siguiente paso fue realizar un análisis *western blot* de P_3 para evaluar la presencia de LC3 (**figura 8**), un marcador típico de la ruta autofágica y, por tanto, de autofagosomas (Kabeya *et al.*, 2000; Klionsky *et al.*, 2012). Este análisis nos mostró que las CIUs obtenidas por centrifugación son positivas tanto para LC3 como para su forma inmadura (pro-LC3). Por tanto, en P_3 , en efecto, aislamos vesículas de tipo autofagosoma.

RESULTADOS: Mise en place

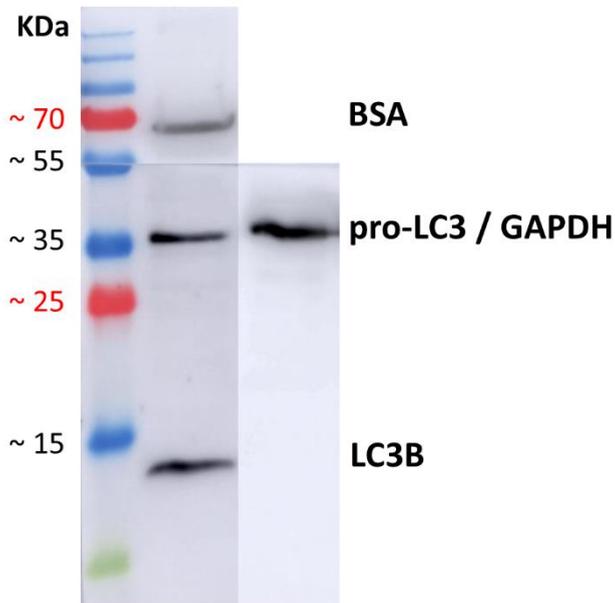


Figura 8. Western blot de la fracción P₃. Mediante este procedimiento se analizó la presencia/ausencia de las proteínas: LC3B, un marcador típico de autofagosomas; GAPDH, un control positivo para contenido citoplasmático; BSA, un control positivo para contenido extracelular. Se detectó la presencia de todas las proteínas ensayadas y, además, la forma no procesada de LC3B, pro-LC3. BSA no debería estar presente dentro de las vesículas ni de otras estructuras derivadas del citoplasma. En ensayos control con células no infectadas lisadas con ddH₂O que fueron sometidas al mismo procedimiento de extracción de proteínas no se observó presencia de BSA (no mostrado). Para ayudar a la visualización y, dado que pro-LC3 y GAPDH tienen un tamaño similar, las regiones de interés de la membrana fueron cortadas antes de la incubación con el anticuerpo primario.

Sin embargo, dada la presencia de pro-LC3, no podemos descartar fehacientemente la presencia de otras estructuras

RESULTADOS: Mise en place

membranosas que puedan justificar la presencia de esta forma inmadura de LC3 en P₃. Por este motivo, de ahora en adelante nos referiremos a este tipo de CIU como grupos de viriones asociados a membranas o VAM.

Finalmente, procedimos a observar directamente la fracción P₃ por medio de microscopía electrónica de transmisión (**figura 9**). Esto nos confirmó la presencia de estructuras membranosas similares a vesículas con un rango de tamaño variable (desde 100 nm hasta 1 μ m de diámetro) y que contenían en su interior múltiples partículas virales. El tamaño de la partícula viral de CVB3 es de unos 30 nm de diámetro, por lo que estas estructuras vesiculares pueden, potencialmente, contener cientos de partículas infecciosas.

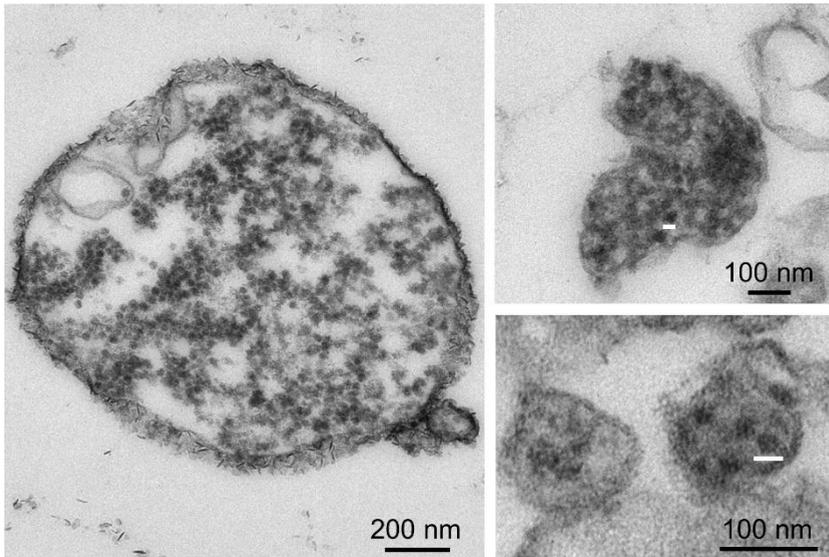


Figura 9. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la fracción P₃. La barra blanca pequeña corresponde a 30nm, el diámetro de las partículas virales de CVB3.

2. Base genética de la transmisión colectiva asociada a membranas

2.1 Evolución dirigida de la transmisión colectiva asociada a membranas de CVB3

A pesar de que la transmisión colectiva asociada a vesículas extracelulares es bastante ubicua, la base genética subyacente sigue sin ser conocida. Si este tipo de propagación está bajo el control genético del virus, el rasgo debería ser optimizable mediante selección natural. Con el fin de promover la evolución de variantes del virus con diferentes capacidades para propagarse colectivamente asociados a membranas, separamos la población viral en: viriones libres (fracción S_1 , de aquí en adelante fracción S) y grupos de viriones asociados a membrana o VAMs (fracción P_3 , de aquí en adelante fracción P). Con cada fracción infectamos un cultivo a MOI baja (0,1 PFUs / célula), recogíamos el cultivo a las 20 hpi y seleccionamos de nuevo la fracción de interés según la línea evolutiva. De este modo realizamos 20 transferencias en serie a baja MOI de las fracciones S y P (líneas s y p , **figura 10**). Como régimen alternativo de selección, hicimos una línea adicional en la que obteníamos grupos de VAMs ricos en fosfatidilserina (fracción P^* , línea p^*). Por último, realizamos dos líneas evolutivas adicionales en las que tratábamos las fracciones P y P^* con detergente para liberar los viriones infecciosos asociados a las VAMs (líneas pt y pt^*). En total, el experimento de evolución dirigida consistía en 5 regímenes distintos de selección (líneas s , p , p^* , pt y pt^*), por lo que por razones pragmáticas sólo pudimos llevar a cabo dos réplicas experimentales de cada régimen. De este modo, realizamos una evolución experimental en la que generamos, por un lado, una presión selectiva

RESULTADOS: Base genética

en contra de la transmisión colectiva asociada a membranas, obligando al virus a transmitirse libremente (líneas *s*) y, por otro, distintas presiones selectivas en favor de la transmisión colectiva asociada a membranas (líneas *p*, *p**, *pt* y *pt**). Nótese que para hablar de las líneas evolucionadas utilizaremos letras minúsculas en cursiva para no confundirlas con las fracciones en las que podemos separar la población viral.

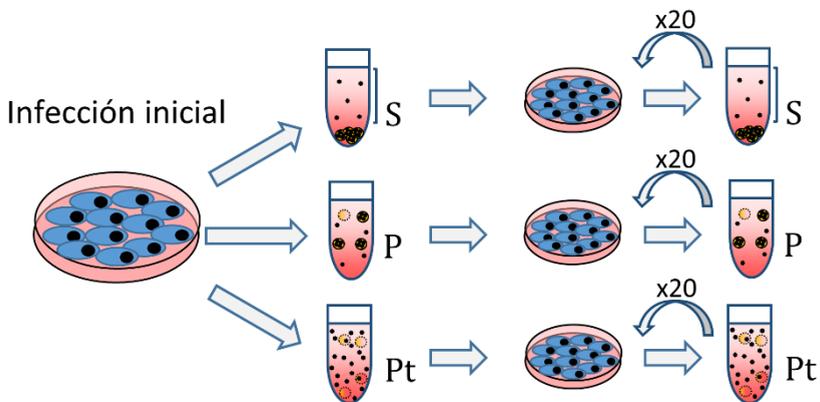


Figura 10. Diseño de la evolución experimental. A partir de un cultivo inicial infectado se obtuvieron las fracciones de viriones infecciosos libres (fracción S), grupos de VAMs (fracción P) y grupos de VAMs tratados con detergente (fracción Pt). Con cada fracción se realizaron 20 transferencias en serie a baja MOI (0,1 PFUs/célula). Se hicieron otras condiciones líneas extra en las que se obtuvieron grupos de VAMs ricos en fosfatidilserina (fracciones *P** y *Pt**, no mostradas). Se realizaron 2 réplicas experimentales de cada régimen de selección.

Para analizar la respuesta a las presiones selectivas tras 20 transferencias en las condiciones establecidas, aplicamos el protocolo de centrifugación a 12 hpi para separar S y P en cada línea evolucionada para cada línea evolucionada, así como también para el

RESULTADOS: Base genética

virus fundador y las titulamos. Lo primero que cabe destacar es que todas las líneas evolucionadas mostraron títulos, en general, más altos que el virus fundador, lo que sugiere una adaptación a las condiciones de cultivo celular. Sin embargo, la distribución de las unidades infecciosas entre las fracciones S y P varió de forma distinta según la línea. En el caso de las líneas pro-VAMs (líneas *p*, *p**, *pt* y *pt**) esta distribución se mantuvo similar a la del virus fundador (**figura 11a**). En cambio, en el caso de las líneas *s*, el virus respondió a la presión selectiva aumentando el título sólo en la fracción S, por lo que la relación P/S se redujo entre 14 y 22 veces con respecto a la del virus fundador ($0,430 \pm 0,063\%$ y $0,667 \pm 0,137\%$ para las líneas S, frente a $9,75 \pm 3,5\%$ para el virus fundador; test t de Welch de $\log(P/S)$ Fundador vs (*s1*|*s2*): $p < 0,001$; **figura 11a**).

RESULTADOS: Base genética

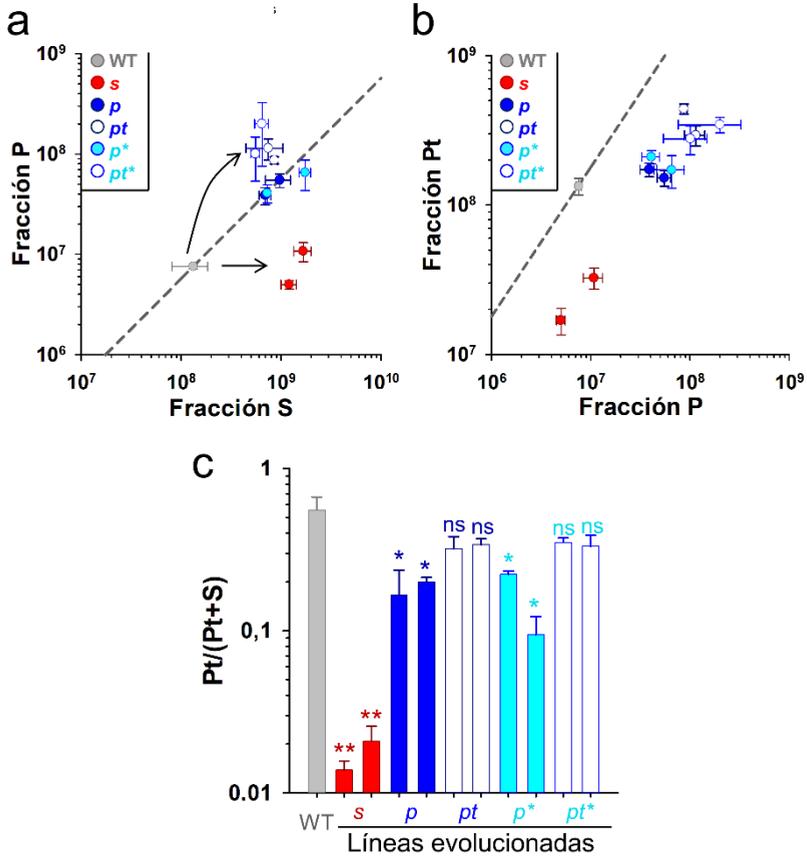


Figura 11. Análisis de las líneas evolucionadas. **a.** Título de las fracciones P y S para el virus fundador y para cada linaje evolucionado. La línea discontinua representa la ratio P/S del virus fundador. **b.** Título de las fracciones Pt y P para el virus fundador y para cada linaje evolucionado. La línea discontinua representa la ratio Pt/P del virus fundador. **c.** Proporción de progenie viral asociada a membranas calculada como Pt/(Pt+S). Las barras de error indican el error estándar de la media (n = 3 réplicas). ns: no significativo; * significatividad < 0,05; ** significatividad < 0,01. Test t de Welch.

RESULTADOS: Base genética

Por otra parte, también comprobamos si hubo algún cambio en relación a la cantidad promedio de viriones infecciosos por cada CIU. Para ello, sometimos a las fracciones P al tratamiento con detergente (fracción Pt) y comparamos la relación entre P y Pt (**figura 11b**). De este modo observamos que en todos los linajes evolucionados el aumento de título al tratar las unidades colectivas con detergente fue significativamente menor que en el caso del virus fundador (test t de Welch de $\log(Pt/P)$ líneas evolucionadas contra el virus fundador: $p < 0,05$; **figura 11b**). Por tanto, en el caso de *s1* y *s2* se redujo tanto el número de VAMs producidos como la cantidad de viriones infecciosos por VAM, lo que supone una caída en la proporción de progenie viral transmitida asociada a membranas ($Pt/[Pt+S]$) entre 26 y 40 veces ($0,014 \pm 0,002$ y $0,021 \pm 0,005$ para las líneas *s* y $0,555 \pm 0,113$ para el virus fundador). En cambio, en las líneas pro-VAMs este valor disminuyó entre 3 y 6 veces en las líneas *p* y *p**, pero apenas cambió en las líneas *pt* y *pt** (**figura 11c**).

2.2 Análisis genético de las líneas evolucionadas

Dado que logramos observar cambios fenotípicos en cuanto a la transmisión colectiva asociada a membranas, procedimos a secuenciar las distintas líneas evolucionadas, así como la variante fundadora del virus, con el fin de detectar posibles mutaciones que podrían ser responsables de los efectos observados en el apartado anterior. Para ello utilizamos sobrenadante crudo de la última transferencia de cada línea evolutiva y una alícuota del virus fundador para la extracción de genomas virales, los cuales amplificamos por

RESULTADOS: Base genética

RT-PCR y secuenciamos mediante tecnología de secuenciación Illumina. El análisis de los datos de secuenciación mostró la presencia de diversas mutaciones no sinónimas a una frecuencia considerable en diferentes líneas evolutivas (**tabla 1**).

La sustitución aminoacídica N63H en la proteína VP3 alcanzó frecuencias > 95% en ambas líneas *s*, mientras que ésta se encontraba a una frecuencia <2% en todas las otras líneas, así como en el fundador. El cambio N18K en la proteína VP4 también se encontró selectivamente en las líneas *S*, aunque a frecuencias más bajas. Por contra, el residuo K257 en la proteína VP1 fue sustituido por Q o M en > 99,0% de las secuencias de las líneas *p* y *p**, mientras que > 99% de las secuencias de las líneas *s* y del virus fundador mantenían el aminoácido silvestre. En las líneas *pt* y *p**, la variante 257M también alcanzó frecuencias elevadas, pero la variante 257Q no apareció. Así pues, la variante 257M se encontraba favorecida sobre la variante 257Q en las líneas *bp* y *bp**, mientras que estaban a una frecuencia similar en las líneas *p* y *p**. Es posible que la variante M sea más eficaz que la variante Q pero que conlleve algún coste de eficacia relacionado con la transmisión entre una transferencia y la siguiente. Como hemos mostrado, esto podría deberse al hecho de que los VAMs tienen una eficiencia de adsorción menor que los viriones libres. Al degradar las membranas antes de realizar la transferencia, podríamos estar aliviando este coste y favorecer la variante 257M sobre la 257Q.

RESULTADOS: Base genética

Por último, el cambio I24T en la proteína VP4 se encontró en todas las líneas pro-VAMs (líneas p , p^* , pt y pt^*) a frecuencias variables, pero estuvo ausente en gran medida de las líneas s y en el fundador.

RESULTADOS: Base genética

Tabla 1. Análisis de secuencias¹

Mutación	Proteína	Cambio de aminoácido	s1	s2	p1	p2	pt1	pt2	p*1	p*2	pt*1	pt*2
G749A	VP4	A3T	54,4									
U796A		N18K	<u>8,9</u>	<u>63,8</u>								
U808A		N22K								6,7		
U813C		I24T			<u>77,6</u>	<u>57,1</u>	<u>64,5</u>	<u>44,7</u>	<u>27,4</u>	<u>33,3</u>	<u>55,7</u>	<u>46,6</u>
U992A	VP2	S15T	5,6	10,7								
G1577A		V210I	8,1									
G1622A		V225I	5,7	20,0								
G1842U	VP3	R35M				5,9						
A1925C		N63H	<u>98,9</u>	<u>97,7</u>								
U2175C		V146A				6,1			16,0			
A2690G	VP1	K80E			10,8					18,7		
U2696A		S82T	20,0									
G2900A		V150I	19,9	30,1			12,9					
A3005G		I185V				8,8			28,7			
A3140G		K230E								24,6		
A3221C		K257Q ²			<u>80,6</u>	<u>72,8</u>			<u>42,5</u>	<u>49,8</u>		
A3222U		K257M ²			<u>18,9</u>	<u>26,5</u>	<u>84,5</u>	<u>96,7</u>	<u>56,9</u>	<u>49,4</u>	<u>99,3</u>	<u>98,2</u>
A3231G		N260S								6,0		

RESULTADOS: Base genética

Tabla 1. Análisis de secuencias (continuación)¹

Mutación	Proteína	Cambio de aminoácido	<i>s1</i>	<i>s2</i>	<i>p1</i>	<i>p2</i>	<i>pt1</i>	<i>pt2</i>	<i>p*1</i>	<i>p*2</i>	<i>pt*1</i>	<i>pt*2</i>
U3302C	2A	F3L						7,2				
U3303C		F3S	57,6									
C3519U		S75L		28,8								
G3810A	2B	C22Y		17,0			6,5					
A3822G		N26S			5,4							
A5093G	3A	I22V			7,9							5,3
C5198U		H57Y	20,4									
G5205C		S59T					7,9					
G5312A	3B	V6M					7,6					
U5952A	3D	F14Y		18,7								
U6405C		I165T							11,3			9,9
A6905C		I332L								19,6		
A7019G		T370A		6,5								

¹Aquí se muestran las frecuencias poblacionales de las mutaciones no sinónimas presentes en al menos una línea a una frecuencia > 5%. La lista de todas las mutaciones se muestra en la **tabla s1 del anexo 1**. Las mutaciones que se encontraban en las dos líneas de la misma condición a una frecuencia > 5% y que en al menos una de ellas se encontraba a una frecuencia > 50% se muestran en negrita y subrayadas. Éstas fueron seleccionadas para el análisis por mutagénesis dirigida.

²Las secuencias contenían las mutaciones A3221C o A3222U, pero nunca las dos. La frecuencia combinada de estas mutaciones era superior al 99% en todas las líneas pro-VAMs.

RESULTADOS: Base genética

Seleccionamos las cinco sustituciones anteriores (N63H, K257Q, K257M, N18K e I24T) para el análisis por mutagénesis dirigida a partir de un clon infeccioso de CVB3 idéntico al fundador o WT (del inglés *wild-type*) que utilizamos para introducir cada una de estas sustituciones individualmente. Una vez construidos los mutantes analizamos la estructura poblacional de cada mutante obteniendo las fracciones S y P tal y como se hizo con las líneas evolucionadas (**figura 12a**). Ninguna de las mutaciones que surgieron en las líneas pro-VAMs (I24T, K257M, K257Q) así como la que estaba presente en las líneas s a baja frecuencia (N18K) tuvo efecto significativo alguno en la ratio P/S (test t de Welch de $\log(P/S)$: Fundador vs (I24T | K257M | K257Q | N18K): $p > 0,05$). En cambio, la mutación N63H produjo una caída de más de 40 veces en la ratio P/S ($0,139 \pm 0,027\%$ versus $6,22 \pm 1,37\%$ para el WT, test t de Welch de $\log(P/S)$: $p = 0,002$), aumentando la cantidad de viriones infecciosos libres 16 veces (test t de Welch de $\log(S)$: $p < 0,001$) y reduciendo el título P en 2,8 veces (test t de Welch de $\log(P)$: $p = 0,033$). Estos datos nos sugieren que la mutación N63H disminuye la ratio P/S, tanto aumentando la producción de viriones libres como disminuyendo la cantidad de grupos de VAMs.

RESULTADOS: Base genética

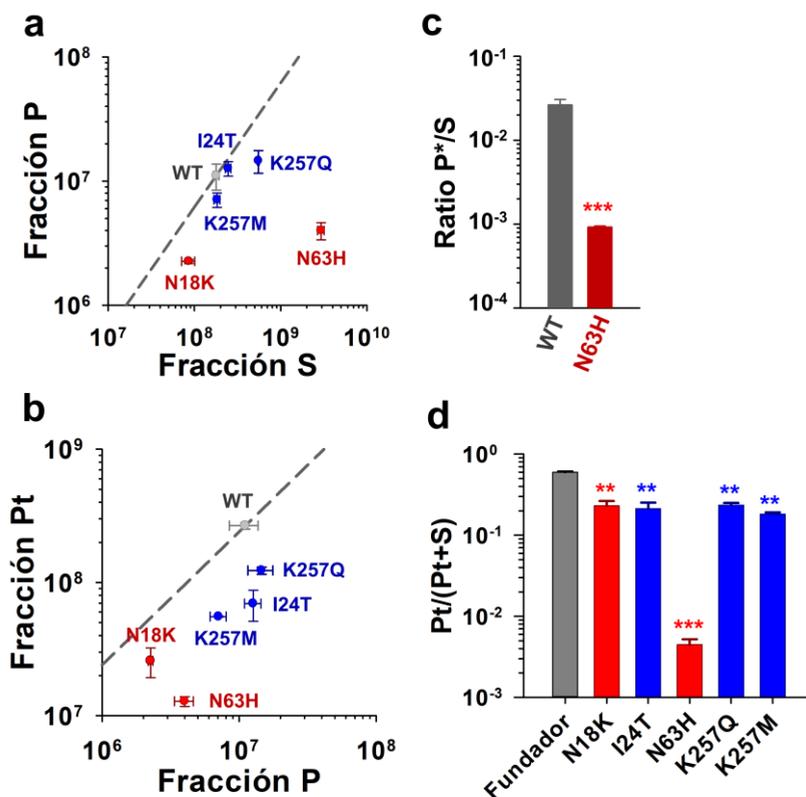


Figura 12. Análisis de los mutantes seleccionados. **a.** Título de las fracciones P y S para el virus WT y para cada mutante. La línea discontinua representa la ratio P/S del virus WT. **b.** Ratio del título de VAMs enriquecidos en fosfatidilserina (P*) y el título S para el virus WT y el mutante N63H. **c.** Título de las fracciones Pt y P para el virus WT y para cada mutante. La línea discontinua representa la ratio Pt/P del virus WT. **d.** Proporción de progenie viral asociada a membranas calculada como Pt/(Pt+S). Las barras de error indican el error estándar de la media (n = 3 réplicas. ** nivel de significatividad < 0,01. *** nivel de significatividad < 0,001. Test t de Welch.

RESULTADOS: Base genética

Para corroborar la diferencia observada entre el mutante N63H y el WT, repetimos el análisis, pero purificando grupos de VAMs ricos en fosfatidilserina (usando perlas magnéticas conjugadas con anexina V, fracción P*). De este modo confirmamos que la relación de título P*/S es menor para el N63H que para el virus fundador (casi 30 veces en este caso; $0,092 \pm 0,003\%$ versus $2,63 \pm 0,43\%$; test t de Welch de $\text{Log}(P^*/S)$: $p = 0,002$; **figura 12b**). El título de VAMs ricos en fosfatidilserina del mutante N63H fue $(1,74 \pm 0,17) \times 10^6$ PFUs/mL, versus $(2,1 \pm 0,3) \times 10^7$ PFUs/mL en el caso del virus WT, lo que representa una reducción de 12 veces en el número de VAMs ricos en fosfatidilserina (test t de Welch de $\text{Log}(P^*)$: $p < 0,001$), lo que nos sugiere de nuevo que la mutación N63H reduce la transmisión por medio de VAMs.

Por último, tal y como se hizo con los datos de las líneas evolucionadas, tratamos con detergente las fracciones P de los mutantes y del WT y comparamos la relación entre Pt y P para estimar y comparar la cantidad promedio de viriones infecciosos transmitidos en cada grupo de VAMs. Salvo en el mutante N18K, en todos los mutantes el tratamiento con detergente causó un aumento de título significativamente menor al observado en el virus fundador. Un efecto que fue moderado en el caso de los mutantes I24T, K257M y K257Q (test t de Welch de $\text{Log}(Pt/P)$: $p < 0,05$) y más fuerte para N63H ($3,34 \pm 0,52$ versus $26,6 \pm 5,7$ para el virus fundador; $P = 0,002$; **figura 12c**). Esto sugiere que, para el mutante N63H, se redujo tanto el título de grupos de VAMs como la cantidad promedio de viriones infecciosos en cada uno de ellos. En total, el cambio en la

RESULTADOS: Base genética

proporción de progenie viral asociada a membranas ($Pt/[Pt+S]$) fue más de 100 veces más bajo para el mutante N63H ($0,004 \pm 0,001$) que para el virus silvestre ($0,599 \pm 0,011$; $P < 0,001$, **figura 12d**). En cambio, para los mutantes I24T, K257M y K257Q, parece que se produjo un número similar de grupos de VAMs, pero que éstas contenían una menor cantidad de viriones infecciosos. En cambio, para los mutantes I24T, K257M y K257Q, parece que se produjo un número similar de VAMs infecciosos, pero que éstas contenían una menor cantidad de viriones infecciosos. En cuanto al mutante N18K, presente a baja frecuencia en las líneas S, no se observó ningún cambio significativo en comparación con el WT.

Dado que las mutaciones K257M y/o K257Q en VP1, en su conjunto, estaban a una frecuencia superior al 99% en todas las condiciones pro-VAMs, aquellas secuencias con la mutación I24T de VP4 debían contener también, necesariamente, la mutación K257M o K257Q en el mismo genoma viral. Por este motivo construimos los mutantes dobles I24T + K257Q (MD1) e I24T + K257M (MD2), y determinamos los títulos de las fracciones S, P y Pt. Por un lado, MD1 redujo la relación P/S de manera similar a K257Q ($1,91 \pm 0,15\%$; test t de Welch de $\text{Log}(P/S)$: $p = 0,028$), mientras que MD2 tuvo poco o ningún efecto sobre la relación P/S ($6,23 \pm 0,20\%$; test t de Welch de $\text{Log}(P/S)$: $p > 0,05$). Por otro lado, la cantidad de viriones infecciosos por VAM es menor en ambos mutantes (test t de Welch de $\text{Log}(Pt/P)$: $p < 0,05$). En general, los dos mutantes dobles mostraron propiedades similares a los mutantes simples, por lo que no tenemos evidencia alguna que sugiera posibles interacciones entre los

RESULTADOS: Base genética

residuos 256 de VP1 y 24 de VP4 en relación a la transmisión colectiva asociada a membranas.

2.3 Caracterización del mutante N63H: Efectos en la dispersión y eficacia del virus

Los resultados del análisis genético mostraron que el mutante N63H de VP3 es el que cambió más su comportamiento en relación a la transmisión colectiva asociada a membranas. Así pues, procedimos a caracterizar detenidamente al mutante N63H. Para ello, realizamos curvas de crecimiento de un solo ciclo a alta MOI para el virus WT y el mutante N63H (10 PFUs / célula, inóculo fracción S). Inicialmente, el mutante N63H y el WT crecieron de manera similar, pero, durante las últimas etapas del ciclo infeccioso, N63H liberó más unidades infecciosas que el tipo salvaje (**figura 13a**). Por tanto, la mutación N63H mejoró la eficacia biológica del virus en cultivo favoreciendo una mayor producción de unidades infecciosas por célula, pero sin alterar la duración del ciclo infeccioso. También analizamos la citotoxicidad de cada variante usando un marcador fluorescente para la pérdida de integridad de la membrana. En cultivos inoculados a la misma MOI, descubrimos que la dinámica de la muerte celular era muy similar para el WT y N63H (**figura 13b**).

RESULTADOS: Base genética

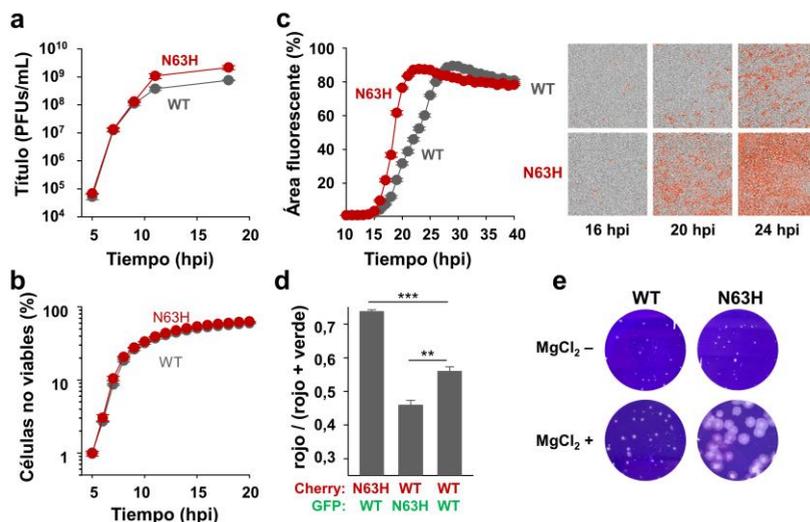


Figura 13. Caracterización del mutante N63H. **a.** Curvas de crecimiento de un solo ciclo a alta MOI (10 PFUs/célula) para el virus WT y el mutante N63H. **b.** Curva de citotoxicidad a alta MOI de la fracción S. **c.** Análisis de la capacidad de dispersión mediante microscopía de fluorescencia automatizada utilizando variantes fluorescentes del virus WT y del mutante N63H. Izquierda, curva de crecimiento del área fluorescente; derecha, imágenes representativas obtenidas con el objetivo 4X de los canales de contraste de fases y fluorescencia roja. **d.** Ensayos de competencia entre el virus WT y el mutante N63H utilizando mCherry y eGFP como genes reporteros (ratio 1:1, MOI = 0,001 PFUs/célula). Se muestra la proporción de células rojo-fluorescentes a 20 hpi. **e.** Calvas obtenidas por ensayo en placa en presencia y ausencia de MgCl₂. Las barras de error indican el error estándar de la media. Nivel de significatividad del test de Welch: ns > 0,05; * < 0,05; *** < 0,001. R² > 0,99 en el ajuste de los datos en **c** al modelo de crecimiento logístico.

Para una producción equivalente de progenie viral, el virus N63H debería generar más unidades infecciosas que el virus WT, ya que produce una menor cantidad de VAMs infecciosos. Por tanto, debería haber un rendimiento aparentemente favorable para el mutante, lo

RESULTADOS: Base genética

que concuerda con lo que observamos en las curvas de crecimiento anteriores. Para probar esto infectamos cultivos celulares con el virus WT o el mutante N63H a la misma MOI y recolectamos el medio de cultivo crudo (sobrenadante de la infección sin aplicar ningún procedimiento de separación de fracciones S y P) después de completar la infección, titulamos antes y después de tratar las muestras con Tritón X-100. Sin detergente, el título del mutante N63H fue más de 4 veces superior al del WT ($1,65 \pm 0,06$) $\times 10^9$ PFUs/mL versus ($3,82 \pm 0,20$) $\times 10^8$ PFUs/mL: test t de Welch en escala logarítmica: $p < 0,001$). En cambio, tras el tratamiento con detergente el título del virus WT aumentó $3,19 \pm 0,07$ veces (test t de Welch en escala logarítmica: $p < 0,001$), mientras que el del mutante no (test t de Welch en escala logarítmica: $p = 0,17$), por lo que tras el tratamiento con detergente el título del mutante N63H sólo era $1,50 \pm 0,13$ veces superior al del WT. Esto confirma que la ventaja evolutiva de la sustitución N63H reside, en su mayoría, en un mayor rendimiento de unidades infecciosas por célula, el cual viene determinado por el mayor número de progenie viral liberada como viriones libres en lugar de en grupos de VAMs.

Al producir menos VAMs infecciosos y, por tanto, más unidades infecciosas por célula, el mutante N63H no asume un coste tan elevado a nivel de dispersión como el virus WT (**figura 2**), por lo que debería extenderse con mayor rapidez. Para comparar la capacidad de dispersión del virus WT y el mutante N63H, introdujimos el gen reportero mCherry en el genoma del virus fundador y del mutante N63H, inoculamos cultivos a baja MOI (0,01 PFUs / célula con la

RESULTADOS: Base genética

fracción S en ambos casos), y seguimos el progreso de la infección viral mediante microscopía de fluorescencia automatizada (**figura 13c**). Como se observa en la figura, los datos de confluencia mCherry, o lo que es lo mismo, el porcentaje del área del cultivo que muestra fluorescencia en un tiempo dado, adoptan una forma sigmoidal por lo que podemos ajustarlos a una curva de crecimiento logístico:

$$C(t) = \frac{K}{1+e^{c-rt}}$$

Donde C es la confluencia mCherry en un momento dado; K es el valor máximo de confluencia a la cual el modelo alcanza su *plateau*; c es una constante de las condiciones iniciales; r es la tasa de dispersión; y t es el tiempo de infección. De este modo, podemos calcular el tiempo que le cuesta al virus alcanzar la mitad de su K ($T_{1/2}$) como c/r . Tal y como se esperaba, el mutante N63H se extiende más rápido ya que alcanza su valor $K/2$ más de 3 h antes que el virus WT ($18,00 \pm 0,13$ hpi para el mutante versus $21,42 \pm 0,30$ hpi para el WT: test t de Welch de $T_{1/2}$: $p = 0,003$).

En base a esto, pensamos que el mutante N63H debería superar al virus WT en un ensayo de competencia. Para comprobar esto, usamos virus WT y N63H codificantes de genes reporteros mCherry y eGFP. Infectamos el cultivo con una mezcla 1:1 de N63H-mCherry y WT-eGFP a la misma MOI que antes. Al hacer esto, la proporción de células positivas para mCherry aumentó al $73,7 \pm 0,6\%$ a 20 hpi, mientras que en ensayos de control usados con WT-mCherry y WT-

RESULTADOS: Base genética

eGFP, esta proporción era del $55,9\% \pm 1,4\%$ (test t de Welch: $P < 0,001$; fig 4d). En contraste, cuando realizamos el mismo ensayo con una mezcla 1:1 de N63H-eGFP y WT-mCherry, la proporción de células positivas para mCherry bajó al $45,9\% \pm 1,5\%$ a las 20 hpi. Por tanto, como esperábamos, el mutante N63H resultó ser más eficaz que el WT en ensayos de competencia directa (**figura 13d**).

La difusión más eficiente del virus N63H también se demostró midiendo los tamaños de las calvas por ensayo en placa. El tamaño promedio de la calva del mutante N63H a 44 hpi fue aproximadamente dos veces mayor ($0,0070 \pm 0,0007 \text{ mm}^2$) que el del tipo salvaje ($0,0032 \pm 0,0003 \text{ mm}^2$; test t con $n = 46$ para el WT y 61 para N63H: $p < 0,001$). Esta diferencia fue mucho mayor (20 veces mayor) cuando agregamos MgCl_2 al medio con agar ($0,136 \pm 0,010 \text{ mm}^2$ versus $0,0045 \pm 0,0004 \text{ mm}^2$; test t con $n = 32$ para el WT y 29 para N63H: $p < 0,001$; **figura 13e**). Un estudio previo mostró que la unión a los glicanos sulfatados dificulta la difusión de los viriones de CVB3 en agar, y que la sustitución N63Y en la proteína VP3 reduce la afinidad del virión por los glicanos sulfatados, lo que aumenta el tamaño de la placa (31). Por lo tanto, es posible que N63H también reduzca la afinidad del virión por los glicanos sulfatados, pero que este efecto sea dependiente de MgCl_2 . Alternativamente, tanto los viriones del virus fundador como los del mutante N63H podrían mostrar una afinidad reducida por los glicanos sulfatados en presencia de MgCl_2 , pero los viriones de N63H se difundirían de manera más eficiente porque la mutación de N63H aumenta el número de viriones libres liberados por célula.

RESULTADOS: Base genética

Para que la pérdida de la transmisión colectiva asociada a membranas aumente considerablemente la propagación, una porción suficientemente grande de la progenie del virus WT debería estar formada por grupos de VAMs. Para cuantificar esto, supongamos que el título total en el sobrenadante sin tratar con detergente es $T = S + P$, donde S es el número de viriones infecciosos libres y P el número de grupos de VAMs. El título total después del tratamiento con detergente debería ser $T' = S + nP$, donde n es el número promedio de viriones infecciosos liberados por VAM. La proporción de viriones infecciosos que se encuentran asociados a membranas respecto a la cantidad total de viriones infecciosos producidos debería ser $f = nP / (S + nP)$, que puede calcularse también como $f = n / (n-1) (1-T/T')$. Suponiendo que la fracción P no contiene viriones libres, el aumento de título producido por el tratamiento con detergente de esta fracción (Pt/P) debería ser igual a n . En el caso del WT observamos una $n = 26,6$ y $T'/T = 3,19$, por lo que el 71% de la progenie producida es transmitida colectivamente asociada a membranas (**figura 14**). Aumentar más la n no supondría cambios significativos pues en el límite ($n \rightarrow \infty$) $f = 1 - T/T' = 0,69$.

RESULTADOS: Base genética

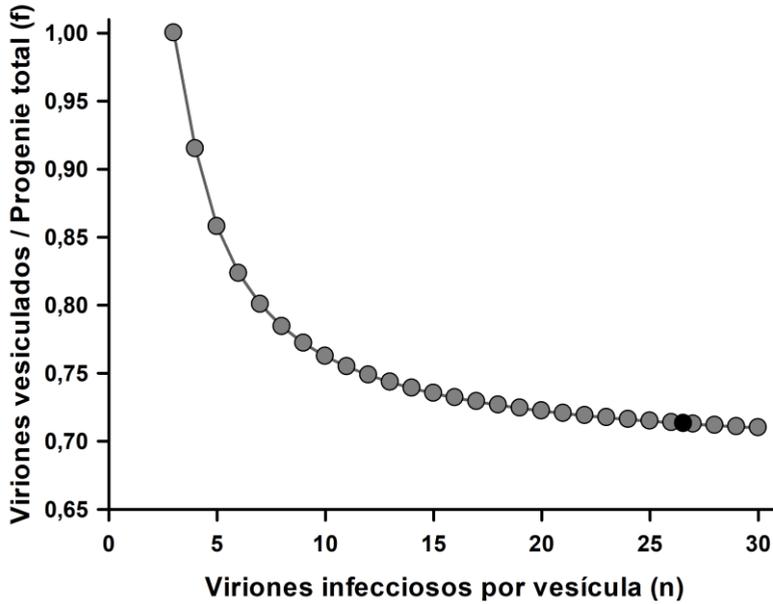


Figura 14. Modelo de estima de la proporción de progenie transmitida mediante VAMs (f). $f = n / (n-1) (1 - T/T)$, donde T/T es el efecto del tratamiento con tritón en el sobrenadante de infección crudo: 3,19 para el virus WT. El punto negro simboliza el valor de f para la n observada.

3. Diversidad genética de la transmisión colectiva asociada a membranas

3.1 La distribución de la progenie viral en grupos de VAMs no es aleatoria

Una de las posibles ventajas evolutivas que se ha sugerido para las unidades de infección colectiva o CIUs, es la posibilidad de favorecer interacciones entre variantes genéticas distintas del virus, lo que posibilitaría eventos de **cooperación basada en diversidad**, ya sea por complementación genética, evitando fenómenos de epistasia negativa, etc. No obstante, existe una condición sin la cual la transmisión colectiva no podría favorecer este tipo de cooperación y es que estas CIUs deben ser vehículos eficientes para la cotransmisión de distintas variantes del virus. Para comprobar si la transmisión colectiva asociada a membranas cumple esta condición, estudiamos la diversidad genética de los grupos de VAMs, para lo cual utilizamos dos variantes de CVB3 marcadas con genes reporteros fluorescentes: CVB3-eGFP y CVB3-mCherry.

Si la distribución de la progenie viral en grupos de VAMs fuese aleatoria, éstos serían muestras más o menos representativas de la diversidad viral presente en las células productoras. Por tanto, a partir de células coinfectadas con CVB3-eGFP y CVB3-mCherry, deberíamos ser capaces de obtener grupos polimórficos de VAMs. Es decir, grupos que cotransmiten conjuntamente diferentes variantes virales, en nuestro caso, CVB3-eGFP y CVB3-mCherry. Así pues, comenzamos infectando células con una mezcla 1:1 de cada variante fluorescente a MOI alta (10 PFUs/célula de cada variante) con el fin de maximizar la proporción de células productoras de unidades de infección colectiva asociadas a membrana que estén coinfectadas

RESULTADOS: Diversidad genética

con ambas variantes. Mediante citometría de flujo confirmamos que en estas condiciones el 99,1% de las células mostraban fluorescencia a 7 hpi, de las cuales el 95,1% eran positivas tanto para eGFP como para mCherry (**figura 15a**). A partir de estas células coinfectadas obtuvimos la fracción P por centrifugación a las 12 hpi y la usamos para infectar células a baja MOI (0,1 PFUs/célula) para asegurarnos de que la mayoría de las células recibía sólo 1 PFU. Esto nos permite estudiar la frecuencia de cotransmisión de variantes distintas del virus a través del fenotipo fluorescente de las células infectadas con esta fracción. Consistente con la MOI a la que infectamos las células receptoras, el $10,02 \pm 0,10\%$ de las células receptoras mostraban fluorescencia a 7hpi. Entre las células fluorescentes, el $43,29 \pm 0,08\%$ sólo mostraban fluorescencia verde, el $44,49 \pm 0,42\%$ sólo mostraban fluorescencia roja y el $12,22 \pm 0,41\%$ mostraban doble fluorescencia (la **figura 15b** muestra una réplica representativa del experimento; **tabla 2**). Con estos datos podemos estimar la frecuencia esperada de células coinfectadas en ausencia de un mecanismo de transmisión colectiva, es decir, que fueran infectadas por viriones infecciosos libres de forma independiente:

Células infectadas \times (células eGFP-fluorescentes + células doble-fluorescentes) \times (células mCherry-fluorescentes + células doble-fluorescentes) = Porcentaje de células doble-fluorescentes esperado por azar.

Este cálculo nos sugirió un $3,16 \pm 0,06\%$ de coinfección esperada con los recuentos observados en ausencia de transmisión colectiva, un valor $3,87 \pm 0,05$ veces inferior al observado (test t de Welch: $p =$

RESULTADOS: Diversidad genética

0,002). Por tanto, la fracción P contiene grupos polimórficos de VAMs que permiten la coinfección por más de una variante viral.

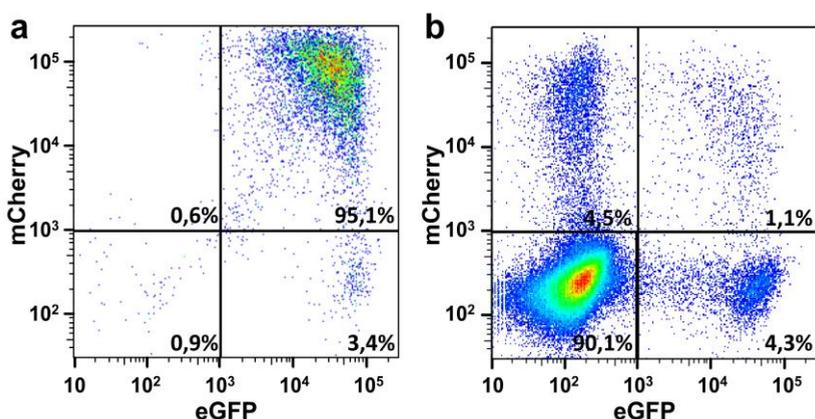


Figura 15. Citometría de flujo de células productoras y receptoras de VAMs. (a) Análisis de citometría de flujo de células productoras infectadas a MOI alta (10 PFUs/célula de cada variante) con una mezcla 1:1 de CVB3-eGFP y CVB3-mCherry. (b) Análisis de citometría de flujo de células inoculadas a baja MOI (0,1 PFUs/mL) con la fracción VAM recolectada a partir de células productoras a 12 hpi. El gráfico muestra los datos relativos a la réplica 1. Los datos de las 3 réplicas se encuentran en la **tabla 2**.

Tabla 2. Recuentos de citometría de flujo de células HeLa-H1 inoculadas con VAMs recolectados a 12hpi a partir de células coinfectadas con CVB3-eGFP y CVB3-mCherry.

	Doble (-)	eGFP (+)	mCherry (+)	Doble (+)
Ensayo 1	89.358 (90,1%)	4.217 (4,3%)	4.414 (4,5%)	1.138 (1,1%)
Ensayo 2	88.945 (89,7%)	4.397 (4,4%)	4.444 (4,5%)	1.322 (1,3%)
Ensayo 3	89.419 (90,0%)	4.301 (4,3%)	4.414 (4,4%)	1.188 (1,2%)

RESULTADOS: Diversidad genética

Sin embargo, ese $12,22 \pm 0,41\%$ de VAMs polimórficos es un valor muy bajo comparado con lo que cabría esperar por azar teniendo en cuenta el número promedio de viriones infectivos que forman cada una de estas CIU. En promedio, cada unidad colectiva de VAM contiene $11,6 \pm 1,1$ viriones infectivos según los datos obtenidos en el primer capítulo. Puesto que la gran mayoría de las células productoras de grupos de VAMs estaba coinfectada por ambas variantes del virus, cabría esperar que el porcentaje de VAMs polimórficos fuese mucho mayor que lo observado.

Una posible explicación para esta escasa co-transmisión de variantes sería una desviación en la proporción de alguna de las variantes fluorescentes del virus en la progenie viral de las células productoras. Esto podría causar que en células donde se replica preferencialmente una variante se produzcan grupos de VAMs que contienen sólo esa variante en su interior pudiendo llegar a causar una baja frecuencia de cotransmisión como la que observamos. A partir de los recuentos de citometría de las células receptoras podemos observar que las proporciones a nivel poblacional de cada variante son muy similares: $49,40\% \pm 0,22\%$ para CVB3-eGFP vs $50,60\% \pm 0,22\%$ para CVB3-mCherry. Sin embargo, aun así, cabe la posibilidad de que dicha proporción pudiera sufrir grandes fluctuaciones entre células individuales. Para medir esta variabilidad, usamos la intensidad de eGFP y de mCherry en cada célula productora analizada mediante citometría de flujo. Para correlacionar mejor la intensidad de fluorescencia con la abundancia de virus, re-escalamos la señal de fluorescencia para que la intensidad de señal

RESULTADOS: Diversidad genética

promedio coincidiese con los porcentajes de células positivas para eGFP y mCherry. Esto nos permitió determinar la distribución de la proporción estimada de la variante eGFP respecto al total de virus (eGFP + mCherry) en la progenie liberada por cada célula productora, que llamamos g (**figura 16a**). Si las dos variantes se mezclasen libremente, la probabilidad de que un grupo de VAM contuviese ambas variantes debería ser $p(n) = 1 - g^n - (1 - g)^n$, donde n es el número de viriones infecciosos por VAM. Para cada valor de n calculamos la distribución de $p(n)$ basada en la distribución de g . Esto mostró que, para $n = 12$, los porcentajes observados de células con doble fluorescencia ($12,22 \pm 0,41\%$) se desvían fuertemente de un modelo en el que dos variantes se mezclan libremente (**figura 16b**). Incluso asumiendo $n = 2$ el porcentaje de grupos polimórficos de VAMs seguiría desviándose fuertemente de lo esperado. Por tanto, fluctuaciones en la proporción de cada variante entre células productoras no explican la baja frecuencia de cotransmisión que hemos observado mediante citometría de flujo.

RESULTADOS: Diversidad genética

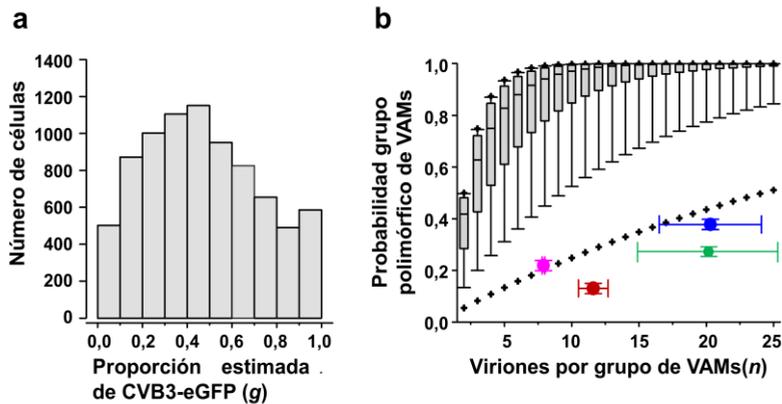


Figura 16. La frecuencia de cotransmisión de variantes distintas de CVB3 por medio de grupos de VAMs es más baja de lo esperado. (a) Distribución de la proporción estimada de CVB3-eGFP en las células productoras (g). Los valores de intensidad de fluorescencia verde de las células analizadas en la **figura 15** fueron escalados para cuadrar la proporción de células infectadas con cada variante ($49,40\% \pm 0,22\%$ para CVB3-eGFP vs $50,60\% \pm 0,22\%$ para CVB3-mCherry; **tabla 2**). Los coeficientes de variación de intensidad de fluorescencia roja e intensidad reescalada de fluorescencia verde eran similares ($0,72$ y $0,68$, respectivamente). (b) Diagrama de cajas de la probabilidad de que grupos de VAMs que contienen n viriones infecciosos sean polimórficos (que contengan ambas variantes) asumiendo que la progenie viral se distribuye indiscriminadamente en estas unidades de infección colectiva. Esta probabilidad se calculó como $p(n) = 1 - g^n - (1 - g)^n$. Los límites superiores e inferiores de las cajas indican los percentiles 75 y 25. La línea dentro de la caja indica la mediana. Los bigotes muestran los percentiles 90 y 10, y las cruces los percentiles 95 y 5. Se han superpuesto los valores de n y la proporción de cotransmisión con su media y error estándar (barras de error) para diferentes casos: datos de citometría de flujo con la fracción P obtenida por centrifugación a 12 hpi (rojo), corregidos por posibles contaminaciones de la fracción P con viriones libres (azul), fracción P obtenida a 8 hpi (rosa) y fracción P* (grupos de VAMs ricos en fosfatidilserina, verde).

Otra posible explicación para la baja frecuencia de cotransmisión observada es que la fracción P contenga, pese a los lavados

RESULTADOS: Diversidad genética

reiterados, cierta contaminación con viriones libres infecciosos que podrían causar un descenso en la frecuencia de cotransmisión. Para explorar esta posibilidad realizamos un análisis exhaustivo del procedimiento que utilizamos para enriquecer la muestra en grupos de VAMs. Para ello, titulamos cada fracción de cada ciclo de centrifugación del proceso (**figura 7**). Cabría esperar que el título en el sobrenadante a lo largo de las sucesivas centrifugaciones cayese con una pendiente más o menos constante que dependería de la eficiencia de los lavados realizados. Sin embargo, lo que observamos es que el título cae $41,2 \pm 8,6$ veces de S_1 a S_2 , pero en las siguientes rondas se mantiene estable (**figura 17**). Esto nos sugiere que nuestro procedimiento separa eficientemente viriones libres de otras unidades infecciosas más grandes, grupos de VAMs. Sin embargo, en cada ciclo de centrifugación aparecen nuevos viriones infecciosos libres que se quedan en el sobrenadante impidiendo que el título siga disminuyendo con cada ciclo. Estos viriones proceden, probablemente, de grupos de VAMs que se han roto por el estrés mecánico que supone el proceso de centrifugación y resuspensión. Si las membranas se rompiesen durante la centrifugación, pero no durante la resuspensión, la fracción P no contendría viriones libres y no afectaría a nuestros resultados. Por tanto, asumiremos que los grupos de VAMs se rompen durante la resuspensión y con esa premisa y los títulos obtenidos en cada fracción de cada ciclo de centrifugación-resuspensión construimos un modelo matemático como una función del número promedio de viriones infecciosos por cada grupo de VAM (n) y la probabilidad de rotura espontánea

RESULTADOS: Diversidad genética

durante el procesado (b) para poder calcular la proporción de grupos de VAMs en nuestra fracción P (v_p , **figura 17**). Ajustando el modelo por mínimos cuadrados a los títulos obtenidos, nuestro modelo se ajustó para valores de: $n = 20,3 \pm 3,8$ y $b = 0,117 \pm 0,008$. Esto nos permitió estimar la proporción de VAMs en nuestra fracción P; $v_p = (1-b)/(1-b + nb) = 0,284 \pm 0,043$.

Conociendo el valor de v_p podemos, además, estimar la proporción de grupos polimórficos de VAMs (m). Para ello tendremos en cuenta que, a la MOI con la que infectamos células con la fracción VAM, la gran mayoría de células infectadas recibirían 1 o, a lo sumo, 2 PFUs. Por tanto, podemos establecer todas las posibilidades que generarían infecciones fluorescentes en un color u otro o en ambos en función de si la célula recibió una o dos PFUs (**figura 18**). Este modelo alcanza un ajuste óptimo cuando $m = 0,378 \pm 0,016$. Por tanto, al considerar posibles contaminaciones con viriones libres la estimación de grupos polimórficos de VAMs aumentó hasta un 37,8% $\pm 1,6\%$. Teniendo en cuenta que el modelo estimó que la cantidad promedio de viriones infecciosos por cada grupo de VAM es de $20,3 \pm 3,8$, el valor observado de cotransmisión sigue estando claramente por debajo de lo esperado bajo la hipótesis de mezcla aleatoria (**figura 16b**).

RESULTADOS: Diversidad genética

$$Q_0 = e^{-D}$$

No fluorescencia

$$Q_1 = De^{-D}$$

				
$(1 - v_p)g$	$(1 - v_p)(1 - g)$	$v_p g(1 - m)$	$v_p(1 - g)(1 - m)$	$v_p m$
$(1 - v_p)$		$v_p(1 - m)$		
				v_p

$$Q_2 = \frac{1}{2} D^2 e^{-D}$$

					
	$(1 - v_p)^2 g^2$	$(1 - v_p)^2 g(1 - g)$	$v_p g^2 (1 - m)(1 - v_p)$	$v_p(1 - g)(1 - m)(1 - v_p)g$	$v_p m(1 - v_p)g$
	$(1 - v_p)^2 g(1 - g)$	$(1 - v_p)^2 (1 - g)^2$	$v_p g(1 - m)(1 - v_p)(1 - g)$	$v_p(1 - m)(1 - v_p)(1 - g)^2$	$v_p m(1 - v_p)(1 - g)$
	$(1 - v_p)g^2 v_p(1 - m)$	$(1 - v_p)(1 - g)v_p g(1 - m)$	$v_p^2 g^2 (1 - m)^2$	$v_p^2 (1 - m)^2 g(1 - g)$	$v_p^2 gm(1 - m)$
	$(1 - v_p)g v_p(1 - g)(1 - m)$	$(1 - v_p)(1 - g)v_p(1 - m)$	$v_p^2 (1 - m)^2 g(1 - g)$	$v_p^2 (1 - m)^2 (1 - m)^2$	$v_p^2 (1 - g)m(1 - m)$
	$(1 - v_p)g v_p m$	$(1 - v_p)(1 - g)v_p m$	$v_p^2 gm(1 - m)$	$v_p^2 (1 - g)m(1 - m)$	$v_p^2 m^2$

Figura 18. Estimación de la proporción de grupos polimórficos de VAMs en presencia de contaminación con viriones infecciosos libres. La proporción de células que recibieron cero (Q_0), una (Q_1) o dos (Q_2) PFUs se asumió que seguía una distribución de Poisson. Células que recibiesen más de 2 PFUs fueron descartadas del análisis. La proporción de células no fluorescentes nos permite estimar la MOI (D) exacta a la que las células fueron infectadas ya que $Q_0 = e^{-D}$. Conociendo D inferimos Q_1 y Q_2 . La probabilidad de recibir un virión infeccioso libre CVB3-eGFP, un virión infeccioso libre CVB3-mCherry, una unidad colectiva CVB3-eGFP, una unidad colectiva CVB3-mCherry o una unidad colectiva polimórfica (que contiene las dos variantes) se muestra en la primera tabla. Los colores de la celda indican el fenotipo de la célula infectada (verde: positiva para eGFP; rojo: positiva para mCherry; naranja: positiva para ambas). Para las células que recibieron 2 PFUs, se calculó la probabilidad de cada una de las diferentes combinaciones según el producto de la probabilidad de cada una de las partes implicadas, segunda tabla. Estas probabilidades dependen de: la proporción de CVB3-eGFP respecto al total de virus (g), la proporción de VAMs (v_p), y la proporción de VAMs polimórficos (m). El parámetro g fue directamente estimado como la ratio de verde (células positivas para eGFP +

RESULTADOS: Diversidad genética

células doble positivas) respecto al total de células fluorescentes, $g = 0,464$. El parámetro v_p fue determinado como se detalla en la figura 17, $v_p = 0,284$. El parámetro m se calculó numéricamente a partir de los valores indicados de g y v_p y las proporciones observadas de células positivas para eGFP, células positivas para mCherry y células doble positivas.

Tal y como se ha comentado arriba, la fracción P obtenida por centrifugación a 12 hpi podría contener otras CIUs además de vesículas extracelulares como, por ejemplo, orgánulos de replicación derivados del retículo endoplasmático y liberados durante la lisis. Por tanto, ya que cada variante se replicaría en su propio orgánulo de replicación, sería de esperar que estos orgánulos de replicación sólo contuviesen una de las variantes. Por tanto, si parte de la infectividad de la fracción P obtenida post-lisis se debe a la presencia de este tipo de estructuras, esto podría causar un descenso en la frecuencia de cotransmisión. Para descartar esta posibilidad repetimos los análisis de citometría de flujo utilizando una fracción P obtenida antes de la lisis celular, 8hpi. La inoculación de células productoras a alta MOI (10 PFUs/célula de cada variante) mostró que el 99,7% de las células productoras eran fluorescentes a 7hpi, de las cuales el 95,0% fueron positivas tanto para eGFP como para mCherry. La inoculación de células con grupos de VAMs obtenidos a 8hpi a baja MOI (0,1 PFUs/célula) mostró un $9,47\% \pm 0,24\%$ de células fluorescentes, de las cuales el $40,95\% \pm 1,99\%$ eran positivas para eGFP, el $37,16\% \pm 1,15\%$ eran positivas para mCherry, y el $21,89\% \pm 1,67\%$ fueron doble positivas (**tabla 3**). Aunque la frecuencia de cotransmisión es $6,23 \pm 0,35$ veces superior a la esperada en ausencia de transmisión colectiva (t-test, $p < 0,001$) y casi el doble la obtenida en el ensayo

RESULTADOS: Diversidad genética

post-lisis ($12,22 \pm 0,41\%$), la cotransmisión sigue ocurriendo a una frecuencia menor de lo esperado si las dos variantes se distribuyesen libremente en grupos de VAMs (**figura 17b**).

Tabla 3. Recuentos de citometría de flujo de células HeLa-H1 inoculadas con la fracción P obtenida a 8hpi a partir de células coinfectadas con CVB3-eGFP y CVB3-mCherry.

	Doble (-)	eGFP (+)	mCherry (+)	Doble (+)
Ensayo 1	90.950 (91,0%)	3.574 (3,6%)	3.567 (3,6%)	1.909 (1,9%)
Ensayo 2	90.518 (90,5%)	3.648 (3,6%)	3.455 (3,5%)	2.379 (2,4%)
Ensayo 3	90.131 (90,1%)	4.430 (4,4%)	3.516 (3,5%)	1.923 (1,9%)

Por último, repetimos los análisis una última vez utilizando la fracción P* (grupos de VAM ricos en fosfatidilserina) a 12 hpi. Este procedimiento debería proporcionarnos una población de grupos de VAMs mejor purificada y con una menor contaminación de viriones libres. Usamos P* para infectar a baja MOI las células receptoras ($0,1$ PFUs/célula) y analizamos el resultado a 7hpi. Los resultados de citometría de flujo nos mostraron que el $14,91\% \pm 1,01\%$ de las células mostraban fluorescencia, lo que supone que la MOI a la que realmente infectamos las células fue ligeramente mayor a la deseada ($0,16 \pm 0,01$ PFUs/célula). De las células infectadas el $55,1\% \pm 0,2\%$ eran positivas para EGFP, el $17,7\% \pm 0,3\%$ eran positivas para mCherry y el $27,2\% \pm 0,3\%$ mostraban doble fluorescencia (**tabla 4**). En este caso, la frecuencia de cotransmisión resultó $4,97 \pm 0,30$ veces superior a la esperada en ausencia de transmisión colectiva (t-

RESULTADOS: Diversidad genética

test, $p < 0,001$). No obstante, a pesar de que la proporción de cada virus estaba desequilibrada en este ensayo y que la MOI era un poco superior, la cotransmisión mediada por grupos de VAMs ricos en fosfatidilserina fue nuevamente inferior a la esperada si las dos variantes se mezclasen libremente (**figura 16b**).

Tabla 4. Recuentos de citometría de flujo de células HeLa-H1 inoculadas con la fracción P* obtenida a 12hpi a partir de células coinfectadas con CVB3-eGFP y CVB3-mCherry.

	Doble (-)	eGFP (+)	mCherry (+)	Doble (+)
Ensayo 1	87.414 (86,5%)	7.574 (7,5%)	2.375 (2,4%)	3.670 (3,6%)
Ensayo 2	84.248 (83,2%)	9.365 (9,2%)	2.970 (2,9%)	4.736 (4,7%)
Ensayo 3	86.828 (85,6%)	8.017 (7,9%)	2.672 (2,6%)	3.920 (3,9%)

Por tanto, nuestros datos, aunque demuestran que la transmisión colectiva asociada a membranas produce cierto aumento de la capacidad de cotransmisión de distintas variantes, no se sostienen bajo un modelo de distribución libre de la progenie viral en grupos de VAMs. Esto nos lleva a concluir que la introducción de viriones infecciosos dentro de VAMs no ocurre de forma azarosa, sino que, en su mayoría, la progenie viral que contiene una unidad colectiva dada procede del mismo orgánulo de replicación y, por tanto, del mismo genoma parental.

RESULTADOS: Diversidad genética

3.2 Las interacciones entre variantes distintas del virus mediadas por grupos de VAMs son efímeras en el tiempo

Una forma alternativa a la citometría de flujo de medir la frecuencia de cotransmisión es analizar el fenotipo de las células infectadas por la fracción P mediante microscopía de fluorescencia automatizada. Para ello, coinfectamos células con las dos variantes fluorescentes del virus tal y como se hizo para los experimentos de citometría y obtuvimos la fracción P por centrifugación a 12hpi. Entonces, realizamos una dilución límite de la fracción P para poder analizar independientemente cada foco de infección producido. Para ello, infectamos placas de 96 pocillos con distintas diluciones y seleccionamos las placas que mostraban fluorescencia en menos de un tercio de los pocillos de la placa de modo que la mayoría de los pocillos recibieron 0 o 1 PFU. A 30hpi analizamos los focos resultantes de esta dilución límite y encontramos que 58 de los 192 pocillos analizados mostraban fluorescencia. Once de esos 58 pocillos contenían 2 focos, mientras que el resto sólo 1. Por tanto, el total de focos analizados asciende a 69 (**figura 19**). De los 69 focos analizados, 29 eran positivos sólo para eGFP, 35 sólo para mCherry y 5 mostraban doble fluorescencia. Es decir, el 7,2% de los focos examinados mostraron evidencias de coinfección con las dos variantes fluorescentes del virus, un porcentaje incluso menor que los observados por citometría de flujo, sugiriendo de nuevo que los viriones que forman los grupos de VAMs proceden, en su mayoría, del mismo genoma parental.

RESULTADOS: Diversidad genética

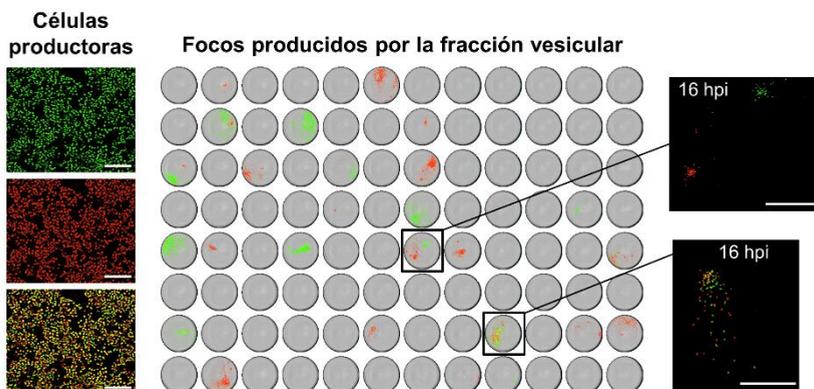


Figura 19. Análisis de cotransmisión de CVB3-eGFP y CVB3-mCherry por microscopía de fluorescencia automatizada. Izquierda: Células productoras infectadas a alta MOI (10 PFUs/célula de cada variante) con una mezcla 1:1 de CVB3-eGFP y CVB3-mCherry. La imagen representa el estado de las células a 7 hpi. Se muestran los canales de fluorescencia eGFP (arriba), mCherry (centro) y la mezcla de ambos (abajo). La saturación de la imagen se maximizó para mostrar la presencia o ausencia de cada variante independientemente del nivel de infección. Las barras de escala corresponden a 0,3mm. Derecha: Análisis de los focos producidos en células infectadas a una dilución límite con la fracción P obtenida por centrifugación a 12 hpi. Se muestra una placa de 96 pocillos analizada por microscopía de fluorescencia automatizada a 30 hpi. Se muestran también dos pocillos maximizados en un tiempo más temprano (16 hpi). Arriba: dos focos de infección independientes en el mismo pocillo. Abajo: un foco de infección en el que se puede apreciar la presencia de células infectadas por ambas variantes, resultado de haber sido iniciado por una unidad de infección colectiva polimórfica. Las barras de escala corresponden a 1mm.

Como los focos fueron analizados a 30hpi contenían múltiples células infectadas como consecuencia de varios ciclos de infección, esto no sólo nos permite estudiar la frecuencia de cotransmisión de distintas variantes por medio de VAMs, sino también la durabilidad de las interacciones entre variantes distintas a lo largo de diversos ciclos

RESULTADOS: Diversidad genética

de infección. En los 5 focos que mostraron doble fluorescencia analizamos 1.024 ± 365 células fluorescentes por cada foco, de las cuales sólo el $4,91\% \pm 0,96\%$ mostraban doble fluorescencia (**tabla 5**), sugiriendo que las interacciones entre variantes distintas de CVB3 mediadas por la cotransmisión por medio de grupos de VAMs son poco duraderas. Aprovechando el modelo del apartado anterior en el que estimábamos la proporción de grupos polimórficos de VAMs (m), cabe señalar que la probabilidad de que dos variantes distintas coinfecten la misma célula por medio de grupos polimórficos de VAMs después de k ciclos de infección debería ser m^k , lo que rápidamente tiende a 0 cuanto menor sea m . Dada la duración del ciclo de infección de CVB3, unas 12 h, las células fluorescentes analizadas a 30 hpi deben ser células infectadas entre el tercer y cuarto ciclo de infección, por lo que podemos estimar que m debe estar comprendida entre $0,22 \pm 0,02$ si todas las células fluorescentes fuesen del tercer ciclo de infección $\sqrt[p(\text{doble})]$ y $0,36 \pm 0,03$ si todas las células fluorescentes fuesen del cuarto ciclo de infección $\sqrt[3]{p(\text{doble})}$, **tabla 5**). Nótese que el grado de la raíz es $k-1$ ya que contamos los ciclos de infección desde el inicio del foco de infección, pero estamos calculando la proporción de VAMs polimórficos producidos por la primera célula fluorescente de dicho foco.

RESULTADOS: Diversidad genética

Tabla 5. Recuento de células fluorescentes en los 5 focos que muestran doble fluorescencia.

	eGFP	mCherry	Doble	Total	$\sqrt{p(\text{doble})}$	$\sqrt[3]{p(\text{doble})}$
Foco 1	228	227	35	490	0,27	0,41
Foco 2	626	340	65	1.031	0,25	0,40
Foco 3	136	21	6	163	0,19	0,33
Foco 4	1.035	80	21	1.136	0,14	0,26
Foco 5	1.323	847	128	2.298	0,24	0,38
Promedio	670 ± 228	303 ± 147	51 ± 21	1.024 ± 365	0,22 ± 0,02	0,36 ± 0,03

En su conjunto, los resultados de este apartado y el anterior nos permiten concluir que la transmisión colectiva asociada a membranas en el virus Coxsackie b3 no representa un método eficaz para el establecimiento de interacciones mantenidas en el tiempo entre variantes genéticas del virus distintas.

3.3 Transferir seriadamente la fracción P apenas tiene efecto en la diversidad genética poblacional

Dado que nuestros datos sugieren que los VAMs no representan un buen vehículo para la cotransmisión mantenida de distintas variantes del virus, cabría esperar que no tengan efecto alguno en la diversidad genética de la población viral ya que en nuestro modelo de estudio queda descartado que la transmisión colectiva favorezca fenómenos de cooperación basados en la diversidad genética como, por ejemplo, la complementación genética. Para comprobar esta hipótesis

RESULTADOS: Diversidad genética

aprovechamos los datos de secuenciación del capítulo anterior en el cual realizamos una evolución experimental a baja MOI (0,1 PFUs/célula) seleccionando repetidamente las fracciones S, P y Pt durante 20 transferencias. Los datos de secuenciación de los virus evolucionados muestran que la frecuencia de mutaciones aumentó en todos los linajes entre 7 y 10 veces respecto al virus fundador (**tabla 6**). Sin embargo, no se apreciaron diferencias entre los distintos linajes evolucionados.

Tabla 6. Análisis de la diversidad genética acumulada en los distintos linajes evolucionados (*s1*, *s2*, *p1*, *p2*, *pt1* y *pt2*).

Población viral	Bases leídas en total	Posiciones mutadas	Bases mutantes leídas en total	Frecuencia de mutaciones*
Fundador	$1,04 \times 10^8$	266	11.254	$1,08 \times 10^{-4}$
s1	$1,82 \times 10^8$	1.868	160.506	$8,81 \times 10^{-4}$
s2	$1,48 \times 10^8$	1.796	150.954	$10,20 \times 10^{-4}$
p1	$2,43 \times 10^8$	2.148	256.77	$10,60 \times 10^{-4}$
p2	$2,08 \times 10^8$	2.092	188.731	$9,08 \times 10^{-4}$
pt1	$1,21 \times 10^8$	2.073	89.318	$7,38 \times 10^{-4}$
pt2	$1,99 \times 10^8$	2.141	172.507	$8,66 \times 10^{-4}$

*Cociente entre bases mutantes leídas en total y bases leídas en total.

También analizamos la distribución de la diversidad a lo largo del genoma y, más allá de las mutaciones a alta frecuencia analizadas en el capítulo anterior, no se observaron puntos fríos (zonas del genoma con menor frecuencia mutacional debido a una mayor presión selectiva) o puntos calientes (zonas del genoma con mayor frecuencia mutacional debido a una menor presión selectiva), asociados a

RESULTADOS: Diversidad genética

alguna condición (**figura 20**). Por tanto, confirmamos que la transferencia colectiva asociada a membranas mantenida en el tiempo no tiene ningún efecto observable en la acumulación de diversidad viral del virus CVB3.

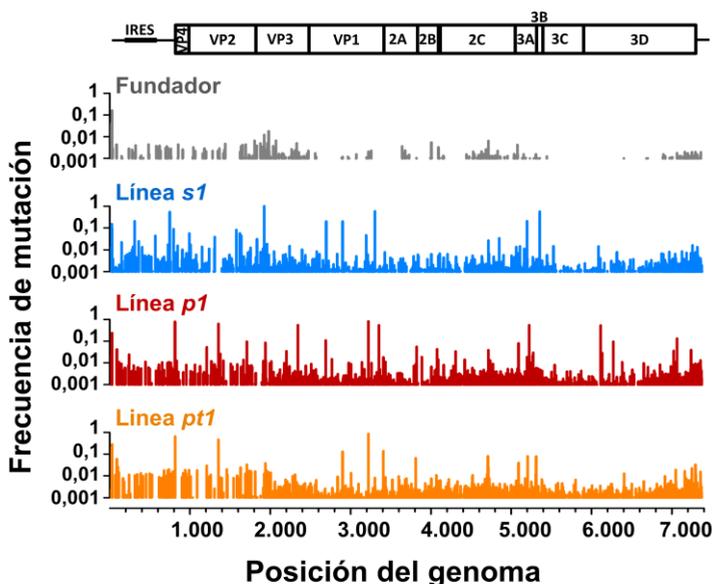


Figura 20. Frecuencia de mutación a lo largo del genoma de CVB3. Se muestra la frecuencia de mutación (calculada como el cociente entre el número de bases mutantes y la cobertura en cada posición) para el virus fundador y la línea 1 de las poblaciones evolucionadas como resultado de la transferencia seriada a baja MOI (0,1 PFUs/célula) de VAMs (P₃) y VAMs tratados con tritón (Pt₃). Las líneas 2 de cada condición tienen patrones muy similares a los mostrados.

4. Costes y efectos de la transmisión colectiva asociada a membranas en la eficacia de CVB3

4.1 La infección con grupos de VAMs acelera las dinámicas intracelulares tempranas del ciclo de CVB3 y pierde menos infectividad en células poco permisivas que la infección con virus libres

Si bien los grupos de VAMs no parecen ser buenos vehículos para fomentar interacciones cooperativas basadas en diversidad, como se ha mencionado en la introducción existen otro tipo de beneficios que son independientes de la diversidad y que podrían explicar el éxito evolutivo de este mecanismo de transmisión. Por ejemplo, el aumento de la MOI a nivel celular puede aumentar la infectividad del virus (Andreu-Moreno and Sanjuán, 2018; Santiana *et al.*, 2018; Stiefel *et al.*, 2012). Para comprobar si esto también ocurre en el caso de los grupos de VAMs producidos por células infectadas con CVB3 utilizamos tres tipos celulares: HeLa-H1, Vero (células epiteliales de riñón de mono verde); y A549 (células humanas de adenocarcinoma de pulmón). Recolectamos la fracción P por centrifugación a 12 hpi a partir de un cultivo de HeLa-H1 inoculado con CVB3-eGFP a MOI alta (10 PFUs/célula) e infectamos cada cultivo con 5×10^4 PFUs de esta fracción (MOI $\approx 0,075$) por un lado y con la misma cantidad de VAMs pero incubándolas primero con detergente para liberar su contenido viral (fracción Pt) por otro lado. De este modo, en ambas condiciones las células fueron infectadas con el mismo número total de viriones infecciosos y la comparación entre ellos nos permitirá saber si la transmisión colectiva obtiene un beneficio neto per cápita. Por medio de microscopía de fluorescencia automatizada, se midió la

RESULTADOS: Costes y efectos

confluencia de eGFP (porcentaje de la monocapa celular que muestra fluorescencia eGFP) en distintos puntos del ciclo infeccioso del virus (**figura 21**). Todas las curvas de crecimiento alcanzaron el *plateau* correspondiente al primer ciclo de infección a las 8 hpi, tiempo en el que todas las células infectadas en el primer ciclo de infección mostraban fluorescencia y no había fluorescencia atribuible a sucesivos ciclos de infección que podrían llevarnos a malinterpretar los resultados.

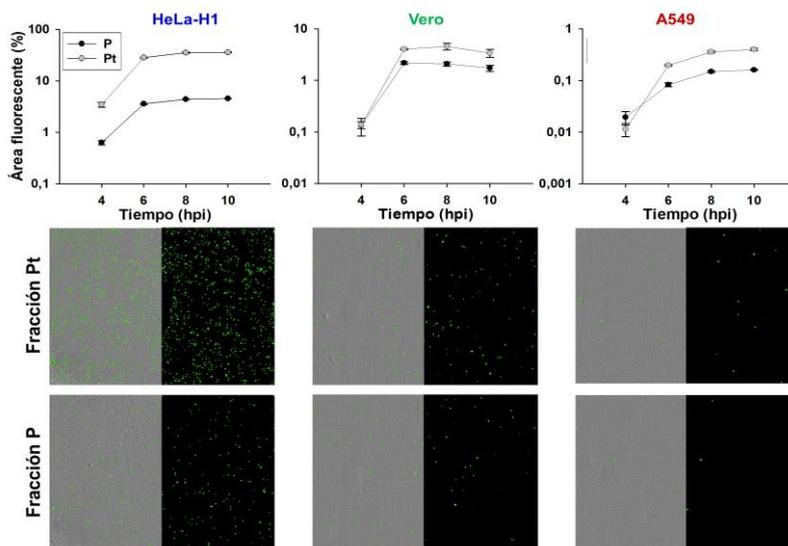


Figura 21. Progreso del ciclo infeccioso de CVB3-eGFP en HeLa-H1, Vero y A549. Las células fueron infectadas con 5×10^4 PFUs (fracción P, negro) y con la misma cantidad pero tratadas con tritón x-100 (fracción Pt, gris). Arriba, curva de crecimiento de la confluencia fluorescente durante el primer ciclo de infección. Las barras de error representan el error estándar de la media ($n = 3$ réplicas). Abajo imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de la infección en cada tipo celular a 8 hpi. La mitad izquierda de cada panel muestra los canales de contraste de fases (células) y

RESULTADOS: Costes y efectos

fluorescencia verde (células infectadas), mientras que la mitad derecha sólo muestra el canal de la fluorescencia.

Lo primero que cabe destacar es la diferencia de permisividad entre los distintos tipos celulares ante la infección de la fracción Pt a 8 hpi: más de $8,00 \pm 0,87$ veces menor en Vero y $98,81 \pm 3,05$ veces menor en A549 (test t de Welch de Log(Pt) contra HeLa-H1: $p < 0,01$; figura 22a).

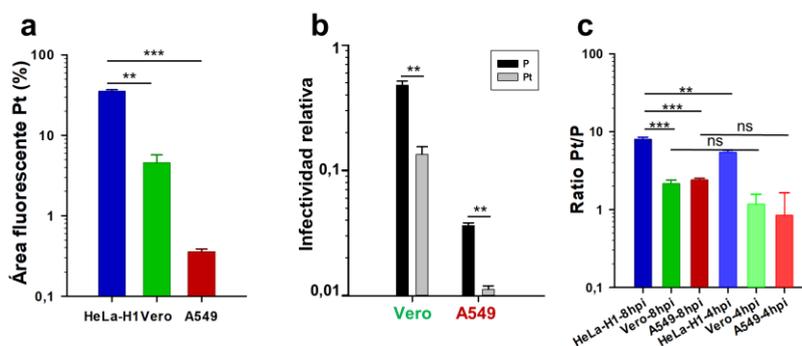


Figura 22. Ensayo de infectividad en distintos tipos celulares. a. Infectividad del virus en los distintos tipos celulares con la misma cantidad de inóculo de la fracción Pt. b. Infectividad relativa de las fracciones P y Pt. La infectividad relativa se calculó como la ratio del área fluorescente de la fracción P o Pt en Vero o A549 y el área fluorescente de la misma fracción en HeLa-H1. c. Ratio de las áreas fluorescentes de Pt y P en los distintos tipos celulares a 8 y 4 h post inoculación (hpi). Las barras de error indican el error estándar de la media (n = 3 réplicas). Nivel de significatividad del test de Welch: ns > 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001.

Sorprendentemente, estos valores de caída de infectividad fueron significativamente inferiores en el caso de células infectadas con la fracción P, por lo que al calcular la infectividad de cada fracción en Vero y A549 de forma relativa a los valores de la misma fracción en

RESULTADOS: Costes y efectos

HeLa-H1, observamos que la fracción P conserva una mayor infectividad al enfrentarse a ambientes más restrictivos como, por ejemplo, otros tipos celulares (test t de Welch P vs Pt en Vero y A549: $p < 0,01$; **figura 22b**). Concretamente, la infectividad relativa a HeLa-H1 de la fracción P resultó ser más de 3 veces superior que la de los viriones libres tanto en Vero como en A549.

Este cambio de infectividad entre los viriones libres y grupos de VAMs sugiere que no todos los viriones incluidos en estas unidades de infección colectiva son capaces de llevar a término el proceso infeccioso en otros tipos celulares, por lo que debería haber un cambio en la relación Pt/P en HeLa-H1 respecto a Vero y A549. Para comprobar esto comparamos la confluencia eGFP en células infectadas por Pt y células infectadas por P. A 8hpi, la confluencia eGFP aumentó $8,06 \pm 0,26$ veces en el caso de HeLa-H1 tras el tratamiento con detergente, mientras que en Vero y A549 el incremento fue sólo de $2,17 \pm 0,13$ y $2,41 \pm 0,07$ veces, respectivamente (test t de Welch de $\log(Pt/P)$ contra HeLa-H1: $p < 0,001$; **figura 22c**). Curiosamente, en el caso de HeLa, si realizamos la misma operación con los datos de confluencia eGFP en un tiempo más temprano el incremento es significativamente inferior, concretamente $5,48 \pm 0,18$ veces (test t de Welch de $\log(Pt/P)$ 8hpi contra 4hpi en HeLa-H1: $p = 0,001$; **figura 22c**). Esto podría sugerir que las células infectadas por grupos de VAMs alcanzan valores de fluorescencia detectables, en promedio, más temprano, que las células infectadas por viriones libres. Es decir, que la infección grupal mediante VAMs podría estar acelerando la tasa de traducción de las

RESULTADOS: Costes y efectos

proteínas codificadas por el virus, entre ellas, la proteína fluorescente, lo que podría deberse al hecho de iniciar la infección con un mayor número de genomas virales.

Para comprobar esta hipótesis de una forma más directa analizamos la intensidad de fluorescencia integrada de cada célula infectada y comprobamos si había diferencias entre aquellas células que fueron infectadas por VAMs y las que fueron infectadas por viriones libres (**figura 23**). Sin embargo, no encontramos ninguna evidencia significativa de que la intensidad de fluorescencia fuese mayor a tiempo temprano en células infectadas por VAMs.

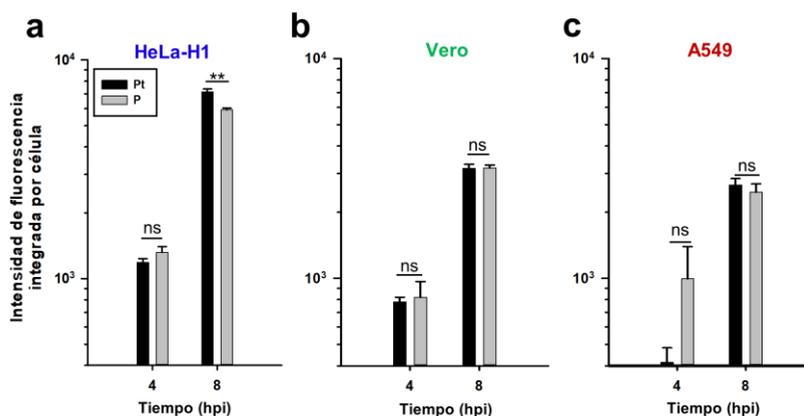


Figura 23. Cuantificación de fluorescencia a tiempo temprano y tardío. Para cada célula se obtuvo un valor de intensidad de fluorescencia integrada, tanto en aquellas infectadas por VAMs (gris) como en las infectadas por viriones libres (negro) en HeLa-H1 (izquierda), Vero (centro) y A549 (derecha) a tiempo temprano (4 horas post infección) y tardío (8 horas post infección). Las barras de error indican el error estándar de la media. Nivel de significatividad del test de Welch: ns > 0,05; ** < 0,01.

RESULTADOS: Costes y efectos

4.2 El coste de dispersión asociado a la dispersión colectiva no se compensa a nivel de productividad, pero la infección colectiva adelanta la liberación de partículas infecciosas

Recordemos que la agrupación de partículas virales en estructuras membranosas tiene un coste a nivel de dispersión (**figura 2**). Aunque los grupos de VAMs, como hemos visto, contienen entre 8 y 26 viriones infecciosos cada uno, éstos van a infectar una única célula, en lugar de las 8-26 células potenciales que podrían llegar a infectar si se transmitiesen libremente. Por tanto, en términos de productividad neta, esto sólo puede ser compensado si la célula infectada por una unidad colectiva asociada a membranas genera una progenie al menos 8-26 veces mayor que una célula infectada por un único virión. Con el fin de comparar la producción per cápita de los grupos de VAMs frente a la de los viriones libres infectamos células HeLa-H1, Vero y A549 en las mismas condiciones que en el apartado anterior, pero utilizando el virus sin marcar. Entonces, recogimos muestras de sobrenadante a 4, 6, 8 y 10 hpi para analizar la progenie liberada a lo largo del primer ciclo de infección. A su vez, para los tiempos 4, 6 y 8 hpi recolectamos el resto de sobrenadante, así como también las células infectadas, y lo sometimos todo a tres ciclos de congelación-descongelación para estimar el total de progenie viral producida en estos tiempos. Entonces, titulamos cada tiempo para cada condición (partículas infecciosas liberadas y progenie viral producida en total) y ajustamos el resultado a la

RESULTADOS: Costes y efectos

ecuación de crecimiento exponencial, $N(t) = N_0 e^{rt}$, para obtener la tasa de crecimiento (r) de cada muestra (**figura 24**).

Las curvas de crecimiento mostraron que, en todas las células ensayados, la tasa de crecimiento del título viral en el sobrenadante fue mayor en células infectadas con viriones libres que en las que fueron infectadas con grupos de VAMs: $1,30 \pm 0,01$ vs $1,08 \pm 0,02$ en HeLa-H1 (test t de Welch: $p < 0,001$), $0,90 \pm 0,01$ vs $0,76 \pm 0,02$ en Vero (test t de Welch: $p = 0,005$) y $0,23 \pm 0,01$ vs $0,15 \pm 0,01$ en A549 (test t de Welch: $p = 0,03$; **figura 24a**).

Lo mismo sucedió con los datos relativos a la progenie total: $1,96 \pm 0,01$ vs $1,46 \pm 0,02$ en HeLa-H1 (test t de Welch: $p < 0,001$), $1,24 \pm 0,01$ vs $1,09 \pm 0,01$ en Vero (test t de Welch: $p = 0,004$) y $0,71 \pm 0,09$ vs $0,39 \pm 0,01$ en A549 (test t de Welch: $p > 0,05$; **figura 24b**). En conjunto, estos resultados nos sugieren que los costes de dispersión asociados a la transmisión colectiva no son compensados a nivel de productividad neta de progenie viral.

RESULTADOS: Costes y efectos

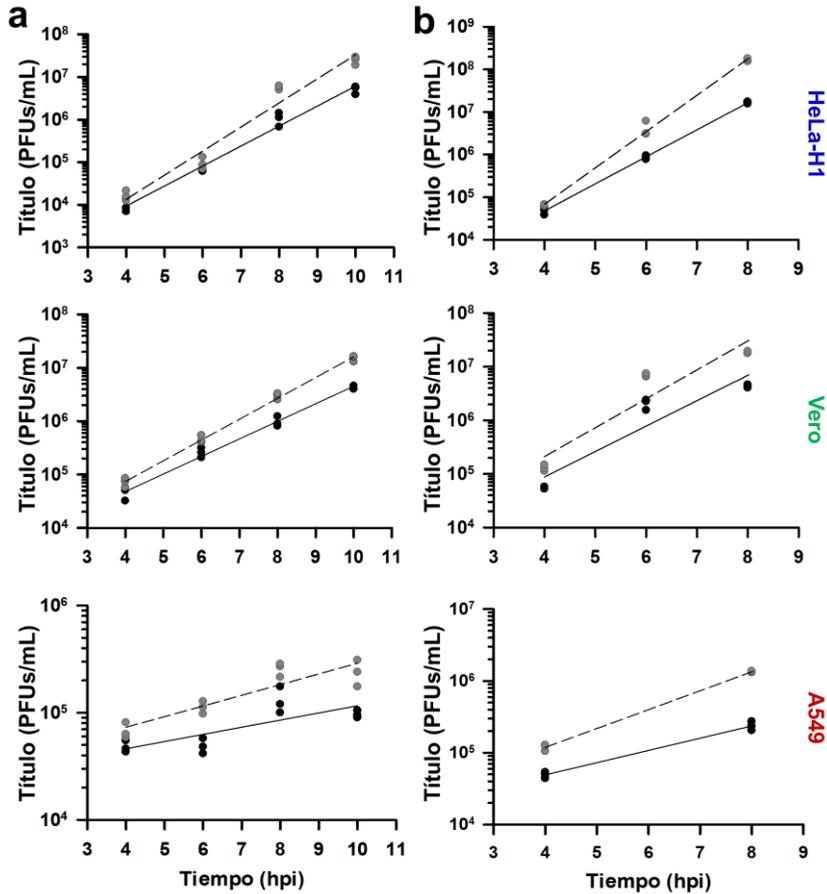


Figura 24. La infección con virus libres es más productiva. Células HeLa-H1, Vero y A549 fueron infectadas con 5×10^4 PFUs de la fracción P (negro) y con esa misma cantidad, pero tratadas previamente con tritón x-100 (fracción Pt, gris). **a.** Progenie viral liberada al sobrenadante a 4, 6, 8 y 10 hpi. **b.** Progenie viral producida en total a 4, 6 y 8 hpi. Se muestran los 3 datos obtenidos experimentalmente para cada condición. Los puntos se ajustaron al modelo de crecimiento exponencial $N(t) = N_0 e^{rt}$ (rectas sólidas para las infecciones con P y las discontinuas para las infecciones con Pt; $R^2 > 0,8$).

RESULTADOS: Costes y efectos

Sin embargo, aunque la tasa de crecimiento de las infecciones colectivas sea menor que la de las infecciones individuales, una aceleración de las dinámicas intracelulares, tal y como sugieren los datos de fluorescencia en HeLa-H1, podría significar un aceleramiento de la liberación de partículas infecciosas al medio extracelular. Para comprobar esta posibilidad, calculamos la proporción de progenie liberada respecto al total de progenie producida a las 8hpi (**figura 25**). Al hacer este sencillo cálculo observamos que en todas las células ensayadas la proporción de progenie producida que había sido liberada era mayor en células infectadas por grupos de VAMs y que este efecto era más significativo cuanto menor fuese la permisividad de las células.

RESULTADOS: Costes y efectos

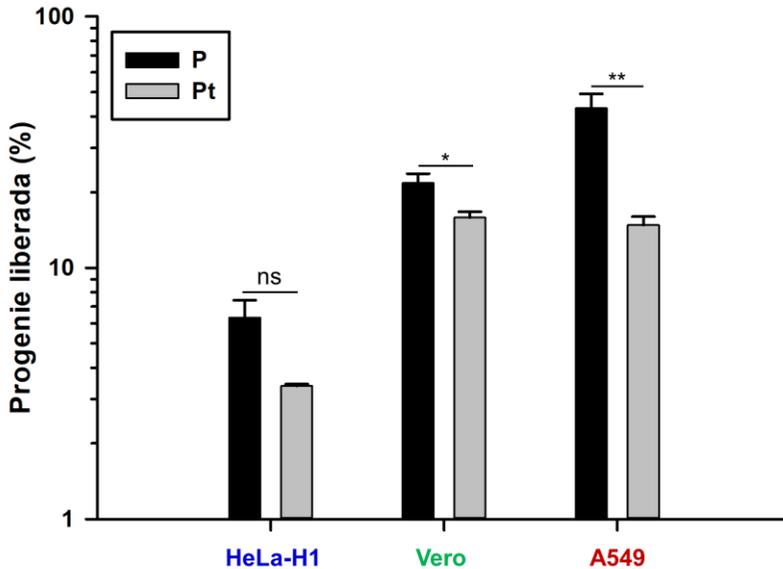


Figura 25. Las células infectadas con grupos de VAMs liberan su progenie más rápido. La proporción de progenie liberada se calculó como la ratio entre la progenie liberada al medio extracelular y la progenie total producida a 8 hpi. Las barras de error indican el error estándar de la media (n = 3 réplicas). Nivel de significatividad del test de Welch: * < 0,05; ** < 0,01.

Por lo tanto, aunque la agrupación de la progenie viral en grupos de VAMs no compensa los costes de dispersión en términos de producción viral, las infecciones colectivas no sólo aceleran la tasa de traducción de las proteínas codificadas por el virus, sino que también parecen acelerar la liberación de la progenie viral producida al medio extracelular.

4.3 La transmisión colectiva asociada a membranas disminuye la tasa de adsorción del virus a la célula

Por último, la infección mediante vesículas extracelulares requiere tanto de la unión al receptor de fosfatidilserinas como al receptor del virus (Chen *et al.*, 2015) lo que podría suponer otro posible coste asociado a la transmisión mediante grupos de VAMs si ello altera de algún modo los procesos de unión y entrada del virus a la célula. Para comprobar esto, medimos la tasa a la que las fracciones P y S del virus fundador se adsorbieron a las células en un ensayo en placa estándar. El número de PFUs incrementó con el tiempo de inoculación aproximadamente el doble de rápido en la fracción S que en la P (**figura 25**). En contraste, al tratar la fracción P con detergente antes de la inoculación, su tasa de adsorción se volvió muy similar a la de la fracción S, indicando que la asociación de viriones a membranas era, probablemente, responsable de la baja eficiencia de adsorción de la fracción P.

RESULTADOS: Costes y efectos

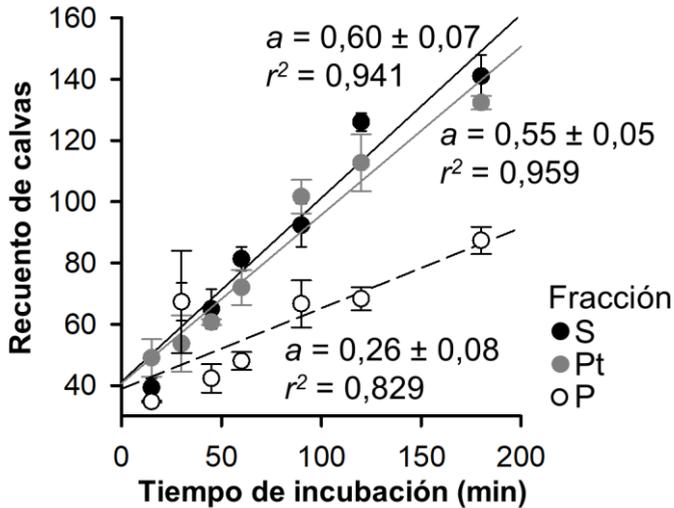


Figura 25. Tasa de adsorción de las fracciones S, P y Pt. Incremento del número de calvas o PFUs de las fracciones S (negro), P (blanco) y Pt (gris) como una función del tiempo de incubación en ensayos en placa estándar. Se muestra la regresión para cada fracción junto con su pendiente (a) y su coeficiente de determinación (r^2). Regresión de S, línea negra; regresión de P, línea discontinua; regresión de Pt, línea gris. Las barras de error representan el error estándar de la media ($n = 3$ réplicas).

DISCUSIÓN

1. Obtención y purificación de grupos de viriones asociados a membranas

Hemos comprobado que, tanto por un sencillo procedimiento de centrifugación diferencial como utilizando un kit de perlas magnéticas conjugadas con anexina V, se pueden obtener fracciones enriquecidas en grupos de viriones asociados a membrana. Tal es así que el tratamiento con detergente aumenta el título viral en una mayor proporción cuando lo aplicamos directamente sobre la fracción enriquecida en VAMs (fracción P) respecto a si lo aplicamos sobre el sobrenadante crudo ($11,6 \pm 1,1$ veces vs $3,2 \pm 0,4$ veces, respectivamente). Sin embargo, la identidad de estos grupos de VAMs no queda completamente demostrada. Si bien nuestras imágenes de microscopía electrónica muestran estructuras vesiculares con viriones en su interior, así como la literatura sugiere que mediante estos procedimientos se pueden obtener virus transportados a través de vesículas extracelulares (Chen *et al.*, 2015), los análisis proteicos mediante *western blot* no son completamente concluyentes. Estos análisis muestran la presencia de la versión inmadura de la proteína LC3 (pro-LC3), la cual se utiliza como marcador de autofagosomas, que son el principal tipo de vesícula extracelular que se considera responsable de este mecanismo de transmisión grupal en enterovirus. Obtener pro-LC3 sugiere que mediante estos procedimientos podríamos estar obteniendo otro tipo de estructuras membranosas ricas en fosfatidilserina que no sean vesículas extracelulares como, por ejemplo, los orgánulos de replicación que utiliza el virus para el proceso homónimo. Por lo que

DISCUSIÓN

para ser conservadores en este aspecto decidimos llamar a nuestras unidades de infección colectiva grupos de viriones asociados a membranas o VAMs.

2. La transmisión colectiva asociada a membranas está codificada en el genoma de CVB3

Nuestra evolución experimental muestra que ciertas mutaciones aparecen de forma reproducible después de seleccionar las fracciones S (viriones libres) y P (grupos de viriones asociados a membrana, VAMs). De ello podemos deducir que la capacidad de CVB3 para ser transmitido en grupo por medio de este tipo de unidades de infección colectiva o CIU está codificada en el genoma del virus.

Encontramos cinco sustituciones de aminoácido que alcanzaron altas frecuencias en al menos dos líneas evolutivas independientes y que eran específicas para líneas *s* o para algunas líneas que favorecían la selección de VAMs (*p*, *p*^{*}, *bp* y *bp*^{*}). Dentro del último grupo, la variante 257M se encontraba favorecida sobre la variante 257Q en las líneas *bp* y *bp*^{*}, mientras que estaban a una frecuencia similar en las líneas *p* y *p*^{*}. Es posible que la variante M sea más eficaz que la variante Q pero que conlleve algún coste de eficacia relacionado con la transmisión entre una transferencia y la siguiente. Como hemos mostrado, esto podría deberse al hecho de que los grupos de VAMs tienen una eficiencia de adsorción menor que los viriones libres. Al degradar las membranas antes de realizar la transferencia, podríamos estar aliviando este coste y favorecer la variante 257M sobre la 257Q.

DISCUSIÓN

La sustitución de N63H en la proteína VP3 tuvo el efecto más claro, por diversos motivos: primero, N63H aumenta el número de viriones infecciosos y disminuye la cantidad de grupos de VAMs; segundo, en el sedimento de 10.000 × g de un cultivo infectado por N63H hay un menor número de unidades infecciosas ricas en fosfatidilserina; tercero, N63H reduce el efecto del tratamiento con detergente de la fracción P. En total, el mutante N63H redujo la proporción de progenie viral asociada a membranas más de 130 veces. Como se esperaba de este conjunto de observaciones, la sustitución N63H aumentó la capacidad del virus para propagarse en cultivos celulares. Sin embargo, esta sustitución no aceleró el ciclo de infección celular ni tampoco aumentó la citotoxicidad viral.

El residuo 63 de la proteína VP3 se encuentra en la superficie del virión cerca del sitio de unión del factor acelerador de la descomposición (DAF), que funciona como correceptor de CAR y es especialmente importante cuando éste no se encuentra accesible, por ejemplo, en células polarizadas (Bergelson *et al.*, 1994, 1997; Coyne and Bergelson, 2006; Patel *et al.*, 2009; Yoder *et al.*, 2012). El mutante N63Y de la proteína VP3 se aisló de ratones infectados con CVB3 (Wang and Pfeiffer, 2016). Las mutaciones N63Y, N63S, N63D y N63H también se observaron en virus transferidos en serie en células HeLa o en células A549 (Bordería *et al.*, 2015). Dado que en las células HeLa, tanto DAF como CAR están disponibles en la superficie celular, no cabría esperar que estas mutaciones en el residuo 63 de VP3 estén relacionadas con cambios en el uso del receptor. En base a esto y a nuestros resultados anteriores,

DISCUSIÓN

sugerimos que el residuo 63 de la proteína VP3 está involucrado en la transmisión por medio de grupos de VAMs.

También hemos estimado que en el caso del virus WT hasta el 69% de la progenie producida es transmitida por medio de grupos de VAMs. Nuestra sistemática selección de las fracciones S redujo satisfactoriamente la producción de grupos de VAMs, como queda evidenciado por la emergencia del mutante N63H. La pérdida de la transmisión colectiva asociada a membranas aumentó el número de unidades infecciosas liberadas por célula, mejorando la capacidad de propagación viral y, por lo tanto, la eficacia del virus en ambientes permisivos, como es el caso del cultivo celular. Por el contrario, la selección favorable de VAMs tiene un efecto menos obvio. Como hemos discutido, una explicación plausible de este hecho es que la transmisión colectiva asociada a membranas conlleva ciertos costes de eficacia en nuestras condiciones experimentales. A pesar de la ausencia de selección en estas líneas en relación al ratio P/S, aparecieron varias mutaciones en paralelo que estaban ausentes en las líneas s, sugiriendo una respuesta a la selección, aunque no la esperada. Algunas de esas mutaciones reducían el ratio bP/P, sugiriendo la producción de grupos de VAMs que contenían una cantidad menor de viriones asociados. Por ello, podemos especular que esas líneas se han adaptado reduciendo el coste de dispersión asociado a la transmisión grupal por medio de grupos VAMs.

Por otra parte, mediante esta evolución experimental, logramos promover satisfactoriamente la evolución de ratios P/S reducidos, pero no de ratios P/S incrementados. Una interpretación sencilla de

este hecho es que la transmisión asociada a membranas conlleva un coste de eficacia en nuestras condiciones experimentales. Existen diversos motivos que podrían explicar esto. La acumulación de mutaciones desfavorables a través de complementación genética es improbable, dado que las líneas *bp* y *bp** parecen evolucionar del mismo modo que las líneas *p* y *p**. Sin embargo, un coste de eficacia podría originarse del bajo número de unidades infecciosas formadas por grupos de VAMs comparado con el mismo número de viriones libres. Para comprobar esto, usamos Tritón X-100 para degradar las membranas de un cultivo infectado por el virus fundador. El tratamiento con detergente del sobrenadante crudo (sin separar las fracciones P y S) aumentó $3,2 \pm 0,4$ veces, mostrando la presencia de grupos de VAMs. Este efecto del tratamiento con detergente es mucho mayor en las fracciones P, que experimentan un aumento de título de $11,6 \pm 1,1$ veces. En cambio, este tratamiento sólo aumenta el título de la fracción S $1,3 \pm 0,1$ veces (**figura 7b**). Estos resultados muestran un coste asociado con la transmisión de grupos de VAMs a nivel de número de unidades infecciosas formadas por una cantidad dada de progenie viral, que debería tener un impacto en la capacidad dispersiva del virus.

3. Los grupos de VAMs transmiten virus emparentados

Por otra parte, hemos examinado la diversidad de los viriones infecciosos que se transportan conjuntamente asociados a membrana con el fin de comprobar si este mecanismo de transmisión permite la cotransmisión de distintas variantes genéticas del virus. En el caso de grupos de VAMs recolectados por centrifugación tras la lisis, sólo el

DISCUSIÓN

13,0% \pm 0,5% cotransmitían las dos variantes fluorescentes del virus. Al repetir esto con grupos de VAMs recolectados por centrifugación antes de la lisis observamos que este porcentaje aumentó, pero seguía siendo sólo un 21,9% \pm 1,7% de cotransmisión. La fracción P puede contener viriones libres que pueden provenir, por ejemplo, de la rotura espontánea de membranas durante el proceso de obtención. Tras considerar este problema potencial, estimamos que los grupos de VAMs tenían en promedio unas 20,3 \pm 3,8 partículas infecciosas en su interior y que si las variantes se agrupan indiscriminadamente, el 37,8% \pm 1,6% de las unidades infecciosas de la fracción P debería contener una mezcla de variantes virales. También probamos a obtener VAMs ricos en fosfatidilserina haciendo uso del kit de perlas magnéticas asociadas a anexina V, el tratamiento con detergente aumentaba el título 20,6 \pm 5,3 veces, un valor muy similar a los viriones infecciosos por VAM estimados según nuestro modelo, pero sólo una cotransmisión del 27,2% \pm 0,3%, lo que podría deberse, en este caso, a un desvío observado en las frecuencias de las variantes fluorescentes. En cualquier caso, las frecuencias de cotransmisión fueron significativamente menores de lo esperado bajo la hipótesis nula de que los grupos de VAMs contienen una mezcla aleatoria de los viriones infecciosos presentes en las células productoras.

Nuestros resultados sugieren que las variantes del virus no segregan aleatoriamente en VAMs. Una posible explicación de esta segregación discriminada puede proceder de la dinámica replicativa del virus. Como se ha mencionado en la introducción, CVB3 remodela las membranas intracelulares de la célula para formar orgánulos de

DISCUSIÓN

replicación en los que se lleva a cabo los procesos de replicación y ensamblaje del virus, una característica típica de la mayoría de virus de ARN positivos (Altan-Bonnet, 2017; Belov, 2016; Fernández de Castro *et al.*, 2016; Hsu *et al.*, 2010; Ravindran *et al.*, 2016; Romero-Brey and Bartenschlager, 2016; Shulla and Randall, 2016). Como resultado, esto puede dar lugar a una estructuración de la población viral a nivel intracelular. Es decir, que las distintas variantes del virus no estarían uniformemente distribuidas dentro de la célula. Por tanto, si la formación de una vesícula extracelular o cualquier otra estructura membranosa que pueda formar parte de nuestra fracción P acontece en las inmediaciones de estos centros replicativos, los grupos de virus liberados conjuntamente en la misma unidad colectiva VAM tenderían a proceder del mismo orgánulo de replicación y, por tanto, de un mismo genoma parental.

Puede haber otras explicaciones adicionales para la baja frecuencia a la cual las dos variantes del virus son cotransmitidas en nuestros experimentos, aunque consideramos que son menos probables. Por ejemplo, podría haber una distribución muy variable de la cantidad de viriones infecciosos por VAM, de modo que algunas podrían contener decenas o centenas de viriones infecciosos, mientras que la mayoría contendrían sólo unos pocos. Sin embargo, nuestros análisis estadísticos de la expresión de eGFP y mCherry sugieren que, incluso para grupos de sólo 3 viriones infecciosos, los niveles de coinfección observados son menos de lo esperado bajo la hipótesis nula de segregación aleatoria. Por lo tanto, es poco probable que esta variación del tamaño sea la causa de nuestros

DISCUSIÓN

resultados. Otra posible explicación para nuestros resultados es que la mayoría de grupos de VAMs lleven la mezcla de variantes que esperaríamos, pero que esta diversidad se pierde en las células receptoras debido a respuestas antivirales de la célula o a efectos estocásticos asociados a las etapas iniciales del ciclo de infección. Sin embargo, esto es difícil de concebir si, en promedio, cada CIU inicia la infección con 10 o más genomas virales.

Sea cual sea la causa, nuestros resultados descartan que la dispersión grupal de Coxsackievirus asociada a membrana sea un mecanismo eficaz para promover interacciones cooperativas entre distintas variantes genéticas del virus mantenidas en el tiempo. Esto concuerda con resultados observados en otro tipo de CIUs (Law *et al.*, 2016; Miyashita *et al.*, 2015) en los que se observó también una baja frecuencia de cotransmisión de variantes fluorescentes así como fuertes cuellos de botella a pesar de la transmisión colectiva. No obstante, la dispersión colectiva de genomas altamente emparentados vuelve a este sistema de transmisión colectiva resistente a la emergencia de variantes interferentes defectivas. Estructuras poblacionales espaciales que favorecen interacciones entre individuos emparentados previenen la dispersión de variantes egoístas o defectivas y pueden promover la evolución de la cooperación (Gardner *et al.*, 2011; Nowak, 2006; West *et al.*, 2006).

4. La transmisión colectiva asociada a membranas no es beneficiosa a nivel de productividad, pero acelera el ciclo de infección

Para estudiar los beneficios de iniciar el ciclo con un mayor número de genomas virales, independientemente de su diversidad, analizamos la productividad de células infectadas con grupos de VAMs de CVB3 (fracción P), así como también de células infectadas con la misma cantidad de VAMs pero previamente tratadas con detergente para liberar su contenido viral (fracción Pt). Así, en ambas condiciones infectamos el cultivo con la misma cantidad de viriones, pero no infectamos el mismo número de células. De este modo, al comparar estas condiciones podemos observar los efectos netos *per capita* de la transmisión colectiva. En todos los casos y tiempos analizados, los títulos obtenidos al infectar células con grupos de VAMs fueron inferiores a los obtenidos al infectar las células con virus libres, por lo que la infección colectiva producida por la transmisión colectiva asociada a membranas es desventajosa en relación a la producción de progenie viral *per capita*. Esto puede deberse a dos razones que no son mutuamente excluyentes. Primero, los grupos de VAMs que CVB3 usa para transmitir colectivamente tienen un tamaño promedio de 400 nm de diámetro, mientras que las partículas virales de este virus tienen un diámetro de 30 nm, por lo que potencialmente estos VAMs pueden transportar cientos de partículas virales (Chen *et al.*, 2015). Aunque observamos un aumento en el título de hasta casi 30 veces al romper estos VAMs según el procedimiento de obtención y el experimento, muchas de las partículas virales que se encuentran

DISCUSIÓN

asociadas a membranas pueden no ser infecciosas de forma independiente debido a defectos genéticos, pero podrían ser infecciosas en condiciones de coinfección mediada por VAMs. Esto provocaría que la infección de una célula por una unidad colectiva VAM no sea iniciada por un número de genomas virales equivalente al aumento de título observado al romper los VAMs, sino por un número incluso mayor de genomas virales. Como ya se ha descrito en otros estudios, aumentar la multiplicidad de infección (MOI) puede aumentar la infectividad y la productividad en Vaccinia y VSV (Andreu-Moreno and Sanjuán, 2018; Stiefel *et al.*, 2012). Sin embargo, la curva sigmoidea se satura en ocho genomas infecciosos en el caso de Vaccinia y tres genomas infecciosos en el caso de VSV, por lo que comenzar una infección con decenas o cientos de genomas puede ser perjudicial a nivel productivo ya que los recursos de la célula son limitados y podrían producirse fenómenos de competencia. En segundo lugar, el aumento de la MOI debido a la infección por una CIU y la coinfección de una célula en condiciones de alta densidad poblacional (PFUs/célula $\gg 1$) no implica necesariamente las mismas consecuencias (Sanjuán and Thoulouze, 2019). En el caso de infectar una célula a alta MOI, esta célula se infectará en diferentes puntos y los genomas que inician la infección en esta célula se encontrarán dispersos dentro de la célula. Por el contrario, al infectar una célula con una CIU que contiene decenas de viriones infecciosos, se genera una entrada concentrada de genomas virales en un punto determinado de la célula, tal y como se observó en vesículas extracelulares mediante hibridación fluorescente *in situ*

(Altan-Bonnet and Powell, 2015; Chen *et al.*, 2015). Esta entrada focalizada de genomas virales puede dar lugar a competencias intracelulares localizadas por los recursos de la célula, especialmente en virus con un sistema de replicación asociado a orgánulos (Altan-Bonnet, 2017).

También hemos comparado la infectividad de grupos de VAMs y de viriones libres en células menos permisivas: Vero y A549. Al hacer esto, observamos que la infectividad relativa a HeLa-H1 (ratio entre la infectividad observada en Vero o A549 y la observada en HeLa-H1) era superior en grupos de VAMs en ambos tipos celulares. Es decir, que el porcentaje de infectividad que se pierde al cambiar a un ambiente más restrictivo es menor en el caso de la transmisión colectiva. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en otros estudios previos realizados en VIH-1 y VSV (Andreu-Moreno and Sanjuán, 2018; Zhong *et al.*, 2013). Además, los datos de fluorescencia también sugieren que las células se “encienden” antes al ser infectadas por grupos de VAMs, lo que sugiere un avance en la concentración de la proteína fluorescente en las células infectadas y, por lo tanto, un adelanto del ciclo a nivel de traducción, que es consistente también con los avances del ciclo infeccioso observados en VIH y VSV (Andreu-Moreno and Sanjuán, 2018; Boullé *et al.*, 2016). No obstante, esta hipótesis no se ha logrado confirmar de un modo más directo, pues no se observaron diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia integrada por célula a tiempo temprano. Sin embargo, es posible que cuantificar la fluorescencia GFP con un microscopio de fluorescencia no sea todo lo cuantitativo que debiera,

DISCUSIÓN

por lo que para corroborar o descartar esta hipótesis sería interesante realizar este tipo de ensayo mediante una técnica más cuantitativa, bien sustituyendo el gen de fluorescencia por uno de luciferasa o cuantificando la fluorescencia de las células infectadas mediante citometría de flujo, por ejemplo.

Al comparar el porcentaje de progenie viral liberada a 8 hpi en células infectadas por grupos de VAMs y por virus libres, los datos muestran que se encontró un mayor porcentaje de la progenie producida en el medio extracelular en el caso de células infectadas por grupos de VAMs. Esto sugiere nuevamente un avance del ciclo infeccioso del virus.

Finalmente, otro posible coste de producir grupos de VAMs es que las partículas dentro de las estructuras membranosas podrían tener un acceso reducido al receptor de CVB3, haciendo que la unión o entrada del virus sea menos eficiente. Concluimos por tanto que la producción de grupos de VAMs probablemente incurre en al menos dos tipos de costes de eficacia: Una menor capacidad dispersiva y tasas de unión o entrada a la célula menores. Esto puede contribuir a explicar por qué nuestras líneas p , p^* , bp y bp^* no respondieron al régimen selectivo aumentando el ratio P/S.

5. Discusión general

Durante el desarrollo de esta tesis hemos confirmado que el virus Coxsackie b3 utiliza un mecanismo de transmisión colectiva asociada a membranas ricas en fosfatidilserina que, además, permite al virus liberar su progenie antes de la lisis celular, tal y como muestra la literatura (Bird *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015; Robinson *et al.*, 2014).

Hemos estimado que cada una de esas unidades colectivas contiene, en promedio, entre 8 y 26 viriones infecciosos, lo que puede llegar a suponer que el 69% de los viriones producidos sean transmitidos en grupos asociados a membranas. Esto significa que CVB3 realiza una gran inversión en la transmisión colectiva asumiendo su coste a nivel de dispersión.

Una de las propuestas para compensar este coste es que la transmisión colectiva promueva interacciones cooperativas entre variantes distintas mantenidas a lo largo de diversas generaciones. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la progenie viral no se distribuye indiscriminadamente entre estas unidades de transmisión colectiva, sino que existe una segregación selectiva que favorece que la mayoría de grupos de VAMs contengan conjuntos de viriones que provienen del mismo genoma parental y, probablemente, del mismo centro replicativo. Por tanto, la transmisión conjunta de variantes distintas se debería ir diluyendo a lo largo de las generaciones, tal y como sugieren nuestros análisis de foco, los que muestran que después de dos o tres generaciones sólo el 5% de las células continúan coinfectadas. Tampoco cabría esperar, pues, que la transmisión colectiva asociada a membranas aumente la diversidad poblacional tal y como confirman nuestros datos de secuenciación. Si no hay una cotransmisión de variantes distintas mantenida en el tiempo, los costes de ciertas mutaciones deletéreas no pueden ser continuamente compensados por variantes funcionales y la selección acabará actuando sobre ellas.

DISCUSIÓN

Otra de las propuestas para compensar el coste antes mencionado es que iniciar el ciclo de infección con un elevado número de genomas virales, sean o no similares, puede dar lugar a un efecto masa que establezca una relación positiva entre la progenie producida y la cantidad de genomas que inician la infección (es decir, efecto Allee) o que acelere el ciclo de infección, permitiendo al virus superar o adelantarse a determinadas respuestas antivirales de la célula infectada o aumentar la infectividad (Andreu-Moreno and Sanjuán, 2018; Boullé *et al.*, 2016; Stiefel *et al.*, 2012). Sin embargo, al infectar células con la misma cantidad de viriones infecciosos, agrupados o libres, en todos los casos y tiempos analizados, los títulos obtenidos en células infectadas con grupos de VAMs fueron inferiores a los obtenidos al infectar las células con virus libres, lo que nos lleva a concluir que en condiciones de cultivo celular la infección con grupos de VAMs no confiere un beneficio neto a nivel de productividad. No obstante, sí que observamos que las células infectadas por VAMs habían liberado al medio una mayor proporción de la progenie producida y que mostraban niveles de fluorescencia detectables antes que las células infectadas con viriones libres. Esto sugiere que la infección colectiva produce un adelantamiento de ciertas dinámicas del ciclo de infección del virus, por ejemplo, a nivel de traducción. Además, al cambiar a ambientes más restrictivos, como es el caso de células menos permisivas, la infección colectiva pierde una menor proporción de infectividad respecto a la observada en un ambiente más permisivo. No queda claro, en cambio, si estos efectos son suficientes para compensar la inversión del virus en la

transmisión colectiva asociada a membranas. A pesar de favorecer la transmisión colectiva asociada a membrana durante 20 transferencias (líneas p , p^* , pt y pt^*), no conseguimos obtener ninguna variante del virus con mejores capacidades de transmisión grupal. Sin embargo, la selección en contra de este tipo de transmisión (líneas s) sí que dio frutos en este aspecto. El mutante N63H, obtenido mediante esta presión selectiva, se expande más rápido por el cultivo celular que el virus WT.

6. Temas pendientes, perspectivas de futuro y posibles aplicaciones

Nuestros resultados sugieren que la transmisión colectiva asociada a membranas es un carácter deletéreo en cultivos celulares y, probablemente, en cualquier otro tipo de ambiente permisivo. Sin embargo, dado que no podemos afirmar fehacientemente que nuestros grupos de VAMs sean exclusivamente vesículas extracelulares, sería interesante ahondar un poco más en este aspecto para saber en qué medida nuestros resultados son aplicables al caso de las vesículas extracelulares. Además, el componente genético de esta forma de transmisión y su ubicuidad sugieren que debe haber una razón subyacente que justifique su éxito evolutivo. Por ejemplo, aunque no logramos demostrar un beneficio *per capita* de la transmisión grupal en CVB3, es posible que en células más restrictivas, no a nivel de permisividad, sino células primarias cuya respuesta inmune funcione apropiadamente en las que la transmisión grupal podría ser beneficiosa ya que hemos comprobado que sí acelera los procesos de traducción y liberación de progenie viral.

DISCUSIÓN

Además, existen otros beneficios de este tipo de transmisión independientes del efecto de la MOI. Viajar envueltos en estructuras vesiculares confiere a los viriones protección ante agentes del entorno, por ejemplo de anticuerpos neutralizantes o de proteasas que puedan degradar la partícula viral (Feng *et al.*, 2013; van der Grein *et al.*, 2019; Santiana *et al.*, 2018). En el trabajo de Santiana y colaboradores infectaron ratones por vía oral (la vía natural de entrada de estos virus) con vesículas o virus libres y observaron que la infección era más productiva en el caso de infectarlos con vesículas. Pero no discernen si esto es un efecto de la transmisión colectiva *per se* o si es porque las vesículas resisten mejor todos los estreses a los que se ve sometido el virus desde la cavidad oral hasta el intestino donde infecta al ratón. Es decir, si introdujésemos el virus por otra vía para que no sufriese los estreses del tracto intestinal ¿las vesículas seguirían siendo beneficiosas respecto a la infección por virus libres? Realizar experimentos *in vivo* con mutante N63H podría ayudar a obtener respuestas en este aspecto.

También es cierto que la transmisión colectiva asociada a membranas se ha descrito en otros virus con dinámicas replicativas muy distintas a las de CVB3. Es posible que en esos virus la progenie esté más mezclada en las células y que sus vesículas sean más eficaces en la cotransmisión de distintas variantes. Por lo tanto, es necesario ampliar nuestros resultados. Por un lado, quizás haya un modo de visualizar la segregación de los genomas en células infectadas por grupos de VAMs, como por ejemplo mediante fluorescencia de hibridación *in situ*. Por otro lado, se podrían realizar

nuestros experimentos en otros virus con dinámicas replicativas distintas para comprobar si nuestros resultados son aplicables en estos casos.

Existen modelos matemáticos para estudiar la evolución de las unidades de infección colectiva que sugieren que las CIUs que contienen un menor número de genomas virales logran una mayor ventaja evolutiva (Leeks *et al.*, 2019). Se ha observado que hay virus que utilizan otro tipo de vesículas extracelulares más pequeñas como, por ejemplo, cuerpos multivesiculares o exosomas (Feng *et al.*, 2013; van der Grein *et al.*, 2019; Nagashima *et al.*, 2014). Al ser más pequeñas, deberían transportar una menor cantidad de viriones infecciosos, lo que supondría un menor coste en la dispersión del virus y, a su vez, lo acercaría a valores en los que el virus podría mostrar un efecto Allee. Por tanto, resultaría interesante averiguar si la transmisión colectiva mediante otro tipo de estructuras vesiculares se comporta del mismo modo que los grupos de VAMs que hemos analizado en esta tesis.

Siguiendo en la línea del número de viriones infecciosos por CIU, otra opción sería estudiar en más detalle alguna de las mutaciones que hemos encontrado en las líneas pro-VAMs (líneas p , p^* , pt y pt^*). Hemos observado que ninguna de ellas aumenta la ratio P/S, pero sí disminuyen la ratio Pt/P. Es decir, es posible que las vesículas que producen estos mutantes contengan una menor cantidad de viriones infecciosos y que eso reduzca el coste de la transmisión grupal, por lo que podría resultar interesante realizar ensayos de competencia entre estos mutantes, el WT y N63H.

DISCUSIÓN

Por último y para poner fin a este apartado antes de abordar las conclusiones finales de esta tesis, nuestros estudios con el mutante N63H se han centrado especialmente en las implicaciones evolutivas del cambio. Sin embargo, desentrañar los mecanismos moleculares subyacentes que median las interacciones virus-membrana que son responsables de la transmisión colectiva asociada a membranas sería un punto muy interesante en el que este mutante podría resultar muy útil. Comprender mejor estas interacciones podría resultar especialmente importante a la hora de comprender cómo hacen estos virus para escapar de los sistemas de defensa del hospedador, así como para crear nuevas estrategias antivirales. Si la transmisión colectiva resulta ser un carácter crítico en la eficacia *in vivo* del virus, es posible que haya algún modo de bloquear este mecanismo de transmisión o de exponer a los viriones que se encuentran asociados ante los sistemas de defensa del hospedador, como anticuerpos neutralizantes o proteasas. Compuestos que tengan alguno de estos efectos podrían resultar ser nuevos y prometedores tratamientos contra virus que utilicen este tipo de transmisión colectiva.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- CVB3 puede transmitirse en grupos de entre 8 y 26 viriones infecciosos asociados a membranas.
- El 69% de la progenie viral producida por CVB3 utilizan este mecanismo de transmisión colectiva.
- La tasa de adsorción de las agrupaciones de viriones asociados a membrana es menor que la de los viriones libres. Por lo que esta forma de transmisión tiene un coste a nivel de unión y/o entrada en la célula.
- La transmisión colectiva asociada a membranas de CVB3 tiene un componente genético. Mutaciones en proteínas estructurales parecen modular esta capacidad.
- Entre todas las mutaciones ensayadas, la mutación N63H en la proteína VP3 es la que tiene un mayor efecto en la capacidad de transmisión colectiva asociada a membranas de CVB3. Disminuye tanto la proporción de unidades infecciosas compuestas por agrupaciones de virus asociados a membranas como la cantidad de viriones infecciosos por agrupación.
- El mutante N63H muestra una mayor eficacia que el virus silvestre en cultivos celulares. Al menos en parte, esto se debe a que reduce la inversión de recursos en la transmisión colectiva asociada a

CONCLUSIONES

membranas y el consiguiente coste a nivel de dispersión.

- La cotransmisión de variantes distintas por medio de agrupaciones de viriones asociados a membranas es mayor que la esperada bajo un modelo de monodispersión, pero menor de la esperada si la agrupación fuese aleatoria.
- Existe algún tipo de estructura poblacional a nivel intracelular responsable de que los grupos de viriones infecciosos que se transportan conjuntamente tiendan a estar emparentados.
- Esto hace improbable la posibilidad de que la transmisión colectiva asociada a membranas promueva interacciones virus-virus a largo plazo, ya sea interacciones cooperativas o interferentes
- La transmisión colectiva asociada a membranas mantenida no tiene efectos en la acumulación de diversidad genética poblacional
- Las agrupaciones de viriones asociados a membrana mantienen una mayor proporción de su infectividad al cambiar a ambientes más restrictivos que los viriones libre, pero no suponen un beneficio neto a nivel de producción de progenie viral

CONCLUSIONES

- Iniciar la infección con un mayor número de genomas virales acelera la traducción de las proteínas codificadas por el virus y la liberación de progenie viral al medio extracelular
- La transmisión colectiva asociada a membranas es un carácter deletéreo en el virus CVB3 en ambientes permisivos

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, N., Leaman, D.P., Rowcliffe, E., Kinkead, H., Nohria, R., Akagi, J., Bauer, K., Du, S.X., Whalen, R.G., Burton, D.R., *et al.* (2011). Functional stability of unliganded envelope glycoprotein spikes among isolates of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *PLoS One* 6.
- Akers, J.C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B.S., and Chen, C.C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J. Neurooncol.* 113, 1–11.
- Altan-Bonnet, N. (2017). Lipid tales of viral replication and transmission. *Trends Cell Biol.* 27, 201–213.
- Altan-Bonnet, N., and Powell, K. (2015). Nihal Altan-Bonnet: Tracking viruses that hijack membranes. *J. Cell Biol.* 210, 1038–1039.
- Altan-Bonnet, N., Perales, C., and Domingo, E. (2019). Extracellular vesicles: Vehicles of en bloc viral transmission. *Virus Res.* 265, 143–149.
- Andino, R., and Domingo, E. (2015). Viral quasispecies. *Virology* 479–480, 46–51.
- Andreu-Moreno, I., and Sanjuán, R. (2018). Collective infection of cells by viral aggregates promotes early viral proliferation and reveals a cellular-level allee effect. *Curr. Biol.* 0.
- 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.

BIBLIOGRAFÍA

- Baggen, J., Thibaut, H.J., Strating, J.R.P.M., and van Kuppeveld, F.J.M. (2018). The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nat. Rev. Microbiol.* *16*, 368–381.
- Bailey, J.M., and Tappich, W.E. (2007). Structure of the 5' nontranslated region of the Coxsackievirus b3 genome: Chemical modification and comparative sequence analysis. *J. Virol.* *81*, 650–668.
- Bandín, I., Dopazo, C.P., Lago, M., and Rodríguez, J.F. (2016). Aquabirnavirus polyploidy: a new strategy to modulate virulence? *J. Gen. Virol.* *97*, 1168–1177.
- Banerjee, R., Tsai, W., Kim, W., and Dasgupta, A. (2001). Interaction of poliovirus-encoded 2C/2BC polypeptides with the 3' terminus negative-strand cloverleaf requires an intact stem-loop b. *Virology* *280*, 41–51.
- Basavappa, R., Filman, D.J., Syed, R., Flore, O., Icenogle, J.P., and Hogle, J.M. (1994). Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: Structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution. *Protein Sci.* *3*, 1651–1669.
- Belov, G.A. (2016). Dynamic lipid landscape of picornavirus replication organelles. *Curr. Opin. Virol.* *19*, 1–6.
- 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 virus reveals a capacity for extensive, modular polyploidy. *PLoS One* *7*, e29608.
- Bergelson, J.M., Chan, M., Solomon, K.R., John, N.F.S., Lin, H., and Finberg, R.W. (1994). Decay-accelerating factor (CD55), a

BIBLIOGRAFÍA

glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *91*, 6245–6248.

Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L., and Finberg, R.W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* *275*, 1320–1323.

Betancourt, M., Fereres, A., Fraile, A., and García-Arenal, F. (2008). Estimation of the effective number of founders that initiate an infection after aphid transmission of a multipartite plant virus. *J. Virol.* *82*, 12416–12421.

Bird, S.W., Maynard, N.D., Covert, M.W., and Kirkegaard, K. (2014). Nonlytic viral spread enhanced by autophagy components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 13081–13086.

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.F., Osuna, B.A., Wiedenheft, B., and Bondy-Denomy, J. (2018). Bacteriophage cooperation suppresses CRISPR-Cas3 and Cas9 immunity. *Cell* *174*, 917–925.e10.

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

BIBLIOGRAFÍA

by multiple infections per cell. *PLOS Pathog.* 12, e1005964.

Cabot, B., Martell, M., Esteban, J.I., Sauleda, S., Otero, T., Esteban, R., Guàrdia, J., and Gómez, J. (2000). Nucleotide and amino acid complexity of hepatitis c cirrus quasispecies in serum and liver. *J. Virol.* 74, 805–811.

Chen, Y.-H., Du, W., Hagemeyer, M.C., Takvorian, P.M., Pau, C., Cali, A., 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.

Coyne, C.B., and Bergelson, J.M. (2006). Virus-induced abl and fyn kinase signals permit Coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* 124, 119–131.

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.

Dalldorf, G., and Sickles, G.M. (1948). An unidentified, filtrable agent isolated from the feces of children with paralysis. *Science* 108, 61–62.

Danthi, P., Tosteson, M., Li, Q.-H., and Chow, M. (2003). Genome delivery and ion channel properties are altered in VP4 mutants of poliovirus. *J. Virol.* 77, 5266–5274.

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

Drab, M. (2018). Phage aggregation–dispersion by Ions: Striving beyond antibacterial therapy. *Trends Biotechnol.* 36, 875–881.

Dutkiewicz, M., Swiatkowska, A., Ojdowska, A., Smólska, B.,

BIBLIOGRAFÍA

- Dymarek-Babś, T., Jasińska, A., and Ciesiołka, J. (2012). Molecular mechanisms of genome expression of Coxsackievirus B3 that belongs to enteroviruses. *BioTechnologia* 4, 414–423.
- 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.
- Ertel, K.J., Brunner, J.E., and Semler, B.L. (2010). Mechanistic consequences of hnRNP C binding to both RNA termini of poliovirus negative-strand RNA intermediates. *J. Virol.* 84, 4229–4242.
- 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.
- Fensterl, V., and Sen, G.C. (2009). Interferons and viral infections. *BioFactors* 35, 14–20.
- Fernández de Castro, I., Tenorio, R., and Risco, C. (2016). Virus assembly factories in a lipid world. *Curr. Opin. Virol.* 18, 20–26.
- Floyd, R. (1979). Viral aggregation: mixed suspensions of poliovirus and reovirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 980–986.
- Fredericksen, B.L., Wei, B.L., Yao, J., Luo, T., and Garcia, J.V. (2002). Inhibition of endosomal/lysosomal degradation increases the infectivity of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 76, 11440–11446.
- Galasso, G.J. Quantitative studies on the quality, effects of aggregation and thermal inactivation of vesicular stomatitis virus.

BIBLIOGRAFÍA

Arch. Gesamte Virusforsch. 21, 437–446.

Gardner, A., West, S.A., and Wild, G. (2011). The genetical theory of kin selection. *J. Evol. Biol.* 24, 1020–1043.

Geller, R., Vignuzzi, M., Andino, R., and Frydman, J. (2007). Evolutionary constraints on chaperone-mediated folding provide an antiviral approach refractory to development of drug resistance. *Genes Dev.* 21, 195–205.

Gerba, C.P., and Betancourt, W.Q. (2017). Viral aggregation: Impact on virus behavior in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 51, 7318–7325.

van der Grein, S.G., Defourny, K.A.Y., Rabouw, H.H., Galiveti, C.R., Langereis, M.A., Wauben, M.H.M., Arkesteijn, G.J.A., van Kuppeveld, F.J.M., and Nolte-'t Hoen, E.N.M. (2019). Picornavirus infection induces temporal release of multiple extracellular vesicle subsets that differ in molecular composition and infectious potential. *PLoS Pathog.* 15, e1007594.

Gross, C., and Thoma-Kress, A. (2016). Molecular mechanisms of HTLV-1 cell-to-cell transmission. *Viruses* 8, 74.

He, L., Zhu, D., Wang, J., and Wu, X. (2018). A highly efficient method for isolating urinary exosomes. *Int. J. Mol. Med.* 43, 83–90.

Hober, D., and Sauter, P. (2010). Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: interplay between enterovirus and host. *Nat. Rev. Endocrinol.* 6, 279–289.

Horwitz, M.S., Knudsen, M., Ilic, A., Fine, C., and Sarvetnick, N. (2006). Transforming growth factor- β inhibits Coxsackievirus-mediated autoimmune myocarditis. *Viral Immunol.* 19, 722–733.

BIBLIOGRAFÍA

- Hsu, N.-Y., Ilnytska, O., Belov, G., Santiana, M., Chen, Y.-H., Takvorian, P.M., Pau, C., van der Schaar, H., Kaushik-Basu, N., Balla, T., *et al.* (2010). Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell* 141, 799–811.
- Iglesias-Sánchez, M.J., and López-Galíndez, C. (2005). Each genomic RNA in HIV-1 heterozygous virus generate new virions. *Virology* 333, 316–323.
- Imperiale, M.J., and Casadevall, A. (2015). The importance of virology at a time of great need and great jeopardy. *MBio* 6.
- 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.
- Jackson, W.T., Giddings, T.H., Taylor, M.P., Mulinyawe, S., Rabinovitch, M., Kopito, R.R., and Kirkegaard, K. (2005). Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol.* 3, e156.
- Jridi, C., Martin, J.-F., Marie-Jeanne, V., Labonne, G., and Blanc, S. (2006). Distinct viral populations differentiate and evolve independently in a single perennial host plant. *J. Virol.* 80, 2349–2357.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19, 5720–5728.

BIBLIOGRAFÍA

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.

Kalra, H., Adda, C.G., Liem, M., Ang, C.-S., Mechler, A., Simpson, R.J., Hulett, M.D., and Mathivanan, S. (2013). Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. *Proteomics* *13*, 3354–3364.

Klasse, P.J. (2015). Molecular determinants of the ratio of inert to infectious virus particles. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* *129*, 285–326.

Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., Aguirre-Ghiso, J.A., *et al.* (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* *8*, 445–544.

Kräusslich, H.-G., Nicklin, M.J.H., Lee, C.-K., and Wimmer, E. (1988). Polyprotein processing in picornavirus replication. *Biochimie* *70*, 119–130.

Kumar, D., Kumar, R., Hyun, T.K., and Kim, J.-Y. (2015). Cell-to-cell movement of viruses via plasmodesmata. *J. Plant Res.* *128*, 37–47.

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

BIBLIOGRAFÍA

- neurons requires cell contact but not CD46 expression, Syncytium Formation, or Extracellular Virus Production. *J. Virol.* **74**, 1908.
- Layne, S.P., Merges, M.J., Dembo, M., Spouge, J.L., Conley, S.R., Moore, J.P., Raina, J.L., Renz, H., Gelderblom, H.R., and Narat, P.L. (1992). Factors underlying spontaneous inactivation and susceptibility to neutralization of human immunodeficiency virus. *Virology* **189**, 695–714.
- Leeks, A., Sanjuán, R., and West, S.A. (2019). The evolution of collective infectious units in viruses. *Virus Res.* **265**, 94–101.
- Lin, J.-Y., Chen, T.-C., Weng, K.-F., Chang, S.-C., Chen, L.-L., and Shih, S.-R. (2009). Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. *J. Biomed. Sci.* **16**, 103.
- Lindberg, A.M., Stålhandske, P.O.K., and Pettersson, U. (1987). Genome of Coxsackievirus B3. *Virology* **156**, 50–63.
- Lopez, J., and Webster, R.E. (1983). Morphogenesis of filamentous bacteriophage f1: Orientation of extrusion and production of polyphage. *Virology* **127**, 177–193.
- 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.
- Mao, L., Wu, J., Shen, L., Yang, J., Chen, J., and Xu, H. (2016). Enterovirus 71 transmission by exosomes establishes a productive infection in human neuroblastoma cells. *Virus Genes* **52**, 189–194.
- Marriott, A.C., and Dimmock, N.J. (2010). Defective interfering viruses and their potential as antiviral agents. *Rev. Med. Virol.* **20**, 51–62.

BIBLIOGRAFÍA

McDonald, D. (2010). Dendritic cells and HIV-1 trans-infection. *Viruses* 2, 1704–1717.

Melchers, W.J., Hoenderop, J.G., Bruins Slot, H.J., Pleij, C.W., Pilipenko, E. V, Agol, V.I., and Galama, J.M. (1997). Kissing of the two predominant hairpin loops in the Coxsackie B virus 3' untranslated region is the essential structural feature of the origin of replication required for negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 71, 686–696.

Melnick, J.L., Shaw, E.W., and Curnen, E.C. (1949). A virus isolated from patients diagnosed as non-paralytic poliomyelitis or aseptic meningitis. *Exp. Biol. Med.* 71, 344–349.

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.

Monaco, D.C., Ende, Z., and Hunter, E. (2017). Virus-host gene interactions define HIV-1 disease progression. In *Current Topics in Microbiology and Immunology*, (Springer Verlag), pp. 31–63.

Moury, B., Fabre, F., and Senoussi, R. (2007). Estimation of the number of virus particles transmitted by an insect vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 17891–17896.

Muckelbauer, J.K., Kremer, M., Minor, I., Diana, G., Dutko, F.J., Groarke, J., Pevear, D.C., and Rossmann, M.G. (1995). The structure of Coxsackievirus B3 at 3.5 Å resolution. *Structure* 3, 653–667.

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

BIBLIOGRAFÍA

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

Murray, J.M., Kelleher, A.D., and Cooper, D.A. (2011). Timing of the components of the HIV life cycle in productively infected CD4+ T cells in a population of HIV-infected individuals. *J. Virol.* 85, 10798–10805.

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.

Nowak, M.A. (2006). Five rules for the evolution of cooperation. *Science* 314, 1560–1563.

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.

Patel, K.P., Coyne, C.B., and Bergelson, J.M. (2009). Dynamin- and lipid raft-dependent entry of decay-accelerating factor (DAF)-binding and non-DAF-binding Coxsackieviruses into nonpolarized cells. *J. Virol.* 83, 11064–11077.

Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334, 320–325.

BIBLIOGRAFÍA

- Pybus, O.G., and Rambaut, A. (2009). Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease. *Nat. Rev. Genet.* *10*, 540–550.
- Rager, M., Vongpunsawad, S., Duprex, W.P., and Cattaneo, R. (2002). Polyploid measles virus with hexameric genome length. *EMBO J.* *21*, 2364–2372.
- Ramakrishnaiah, V., Thumann, C., Fofana, I., Habersetzer, F., Pan, Q., de Ruiter, P.E., Willemsen, R., Demmers, J.A.A., Stalin Raj, V., 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.
- Ramratnam, B., Bonhoeffer, S., Binley, J., Hurley, A., Zhang, L., Mittler, J.E., Markowitz, M., Moore, J.P., Perelson, A.S., and Ho, D.D. (1999). Rapid production and clearance of HIV-1 and hepatitis C virus assessed by large volume plasma apheresis. *Lancet* *354*, 1782–1785.
- Raposo, G., and Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* *200*, 373–383.
- Ravindran, M.S., Bagchi, P., Cunningham, C.N., and Tsai, B. (2016). Opportunistic intruders: how viruses orchestrate ER functions to infect cells. *Nat. Rev. Microbiol.* *14*, 407–420.
- Robinson, S.M., Tsueng, G., Sin, J., Mangale, V., Rahawi, S., McIntyre, L.L., Williams, W., Kha, N., Cruz, C., Hancock, B.M., *et al.* (2014). Coxsackievirus B exits the host cell in shed microvesicles displaying autophagosomal markers. *PLoS Pathog.* *10*, e1004045.
- Romero-Brey, I., and Bartenschlager, R. (2016). Endoplasmic reticulum: The favorite intracellular niche for viral replication and assembly. *Viruses* *8*, 160.

BIBLIOGRAFÍA

- Sacristan, S., Diaz, M., Fraile, A., and Garcia-Arenal, F. (2011). Contact transmission of tobacco mosaic virus: a quantitative analysis of parameters relevant for virus evolution. *J. Virol.* 85, 4974–4981.
- Sanjuán, R. (2017). Collective infectious units in viruses. *Trends Microbiol.* 25, 402–412.
- Sanjuán, R. (2018). Collective properties of viral infectivity. *Curr. Opin. Virol.* 33, 1–6.
- Sanjuán, R., and Thoulouze, M.-I. (2019). Why viruses sometimes disperse in groups†. *Virus Evol.* 5.
- 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.
- Schmieder, R., and Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27, 863–864.
- Schwartz, O., Maréchal, V., Friguet, B., Arenzana-Seisdedos, F., and Heard, J.-M. (1998). Antiviral activity of the proteasome on incoming human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72, 3845–3850.
- Sean, P., and Semler, B.L. (2008). Coxsackievirus B RNA replication: Lessons from poliovirus. In *group B Coxsackieviruses*, (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 89–121.
- Sherer, N.M., Lehmann, M.J., Jimenez-Soto, L.F., Horensavitz, C., Pypaert, M., and Mothes, W. (2007). Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission. *Nat. Cell Biol.* 9, 310–315.

BIBLIOGRAFÍA

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

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, 95–98.

Silvas, J.A., Popov, V.L., Paulucci-Holthauzen, A., and Aguilar, P. V. (2016). Extracellular vesicles mediate receptor-independent transmission of novel tick-borne bunyavirus. *J. Virol.* 90, 873–886.

Slack, J., and Arif, B.M. (2006). The baculoviruses occlusion-derived virus: Virion structure and function. *Adv. Virus Res.* 69, 99–165.

Smith, D.R., Adams, A.P., Kenney, J.L., Wang, E., and Weaver, S.C. (2008). Venezuelan equine encephalitis virus in the mosquito vector *Aedes taeniorhynchus*: Infection initiated by a small number of susceptible epithelial cells and a population bottleneck. *Virology* 372, 176–186.

Stephens, P.A., Sutherland, W.J., and Freckleton, R.P. (1999). What is the allee effect? *Oikos* 87, 185.

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.

Suhy, D.A., Giddings, T.H., Kirkegaard, K., and Pasamontes, L. (2000). Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *J. Virol.* 74, 8953–8965.

Tkach, M., and Théry, C. (2016). Communication by extracellular

BIBLIOGRAFÍA

- vesicles: Where we are and where we need to go. *Cell* 164, 1226–1232.
- Tosteson, M.T., and Chow, M. (1997). Characterization of the ion channels formed by poliovirus in planar lipid membranes. *J. Virol.* 71, 507–511.
- Tracy, S., and Gauntt, C. (2008). Group B Coxsackievirus virulence. In group B Coxsackieviruses, (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 49–63.
- Turner, P.E., and Chao, L. (1999). Prisoner's dilemma in an RNA virus. *Nature* 398, 441–443.
- 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.
- Wallis, C., and Melnick, J.L. (1967). Virus aggregation as the cause of the non-neutralizable persistent fraction. *J. Virol.* 1, 478–488.
- Wang, Y., and Pfeiffer, J.K. (2016). Emergence of a large-plaque variant in mice infected with Coxsackievirus B3. *MBio* 7, e00119.
- Wei, B.L., Denton, P.W., O'Neill, E., Luo, T., Foster, J.L., and Garcia, J.V. (2005). Inhibition of lysosome and proteasome function enhances human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 79, 5705–5712.
- West, S.A., Griffin, A.S., Gardner, A., and Diggle, S.P. (2006). Social evolution theory for microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 597–607.
- Wong, J., Zhang, J., Si, X., Gao, G., Mao, I., McManus, B.M., and Luo, H. (2008). Autophagosome supports Coxsackievirus B3 replication in host cells. *J. Virol.* 82, 9143–9153.

BIBLIOGRAFÍA

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.

Yoder, J.D., Cifuentes, J.O., Pan, J., Bergelson, J.M., and Hafenstein, S. (2012). The crystal structure of a Coxsackievirus B3-RD variant and a refined 9-angstrom cryo-electron microscopy reconstruction of the virus complexed with decay-accelerating factor (DAF) provide a new footprint of DAF on the virus surface. *J. Virol.* 86, 12571–12581.

Zaichick, S. V, Bohannon, K.P., and Smith, G.A. (2011). Alphaherpesviruses and the cytoskeleton in neuronal infections. *Viruses* 3, 941–981.

Zhong, P., Agosto, L.M., Ilinskaya, A., Dorjbal, B., Truong, R., Derse, D., Uchil, P.D., Heidecker, G., and Mothes, W. (2013). Cell-to-cell transmission can overcome multiple donor and target cell barriers imposed on cell-free HIV. *PLoS One* 8, e53138.

INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

Anexo 1

Tabla S1. Lista de todas las mutaciones encontradas a una frecuencia >5% en al menos una línea evolutiva.

Mutación	Proteína	Cambio de aminoácido	Fundador	s1	s2	p1	p2	pt1	pt2	p*1	p*2	pt*1	pt*2
A26G	5UTR	-	2,1	1,1	5,2	2,3	2,7	0,3	3,5	4,5	0,4	2,2	1,6
C27U		-	3,0	13,5	5,6	6,0	8,6	3,7	5,6	7,5	4,4	6,9	4,1
C28U		-	4,8	13,8	11,1	21,6	20,8	18,3	19,6	27,7	21,6	23,1	15,2
C29U		-	2,8	9,7	5,5	14,5	11,3	12,0	9,5	10,4	21,9	16,1	14,4
A30U		-	7,1	2,0	0,4	0,3	2,3	0,8	1,0	1,8	1,2	1,2	0,4
A30G		-	8,1	5,7	11,2	11,3	16,3	19,5	20	16,0	20	14,3	18,1
C31U		-	4,6	5,1	4,7	23,4	16,3	26,9	20	8,6	18,5	17,7	26,1
A32G		-	4,0	5,7	12,9	13,6	12,8	10,6	12,2	15,6	6,4	12,6	15,1
C90U		-	0	0,1	0	4,1	2,7	5,9	5,0	0,8	1,5	4,6	3,3
A139G		-	0	0	0,1	0	5,2	0	0	0	0,1	0	0
A266U		-	0	0	0	0	8,1	0	0	0	0	2,7	0
A312G		-	0	20,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0,6
G499U		-	0	0	0	0,5	0,4	1,3	0,1	6,4	0,6	0,4	10,6
C655U		-	0	0	0	0	0	0	0	10,3	0	0	0
C719U		-	0	0,1	0,1	0	5,3	0	0	0	0	0	0

Tabla S1. Lista de todas las mutaciones encontradas a una frecuencia >5% en al menos una línea evolutiva (continuación).

Mutación	Proteína	Cambio de aminoácido	Fundador	s1	s2	p1	p2	pt1	pt2	p*1	p*2	pt*1	pt*2
G749A	VP4	A3T	0	54,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0,9
U796A		N18K	0	8,9	63,8	0	0,2	0	4,5	0	0,1	0	0
U808A		N22K	0	0	0	0	0	0	0,1	0	6,7	0	0
U813C		I24T	0	0,2	0,8	77,6	57,1	64,4	44,7	27,4	33,3	55,7	46,6
A958U	VP2	-	0	0	11,3	0	0	0	0	0	0	0	0
U992A		S15T	0	5,6	10,7	0	0	0	0	0	0	0	0
A1117G		-	0	0	0	0	0	0	5,9	0	0	0	0,1
G1210A		-	0	0,2	0	5,2	2,1	3,0	0,7	3,4	3,0	3,5	2,9
U1294C		-	0	0,1	0,1	0	6,3	0	0,6	0	0	0	0
A1354U		-	0	0	0	62,0	26,4	46,4	32,2	22,8	48,6	37,5	30,6
G1577A		V210I	0	8,1	0,9	0	0	0	0	0	0	0	0
G1622A		V225I	0	5,7	20	0	0	0	0	0	0	0	0
G1687A		-	0,1	0,1	0,4	0	0	0	0	0	5,6	0	0,2
G1708A		-	0	0	0	9,4	3,7	3,3	7,6	5,1	20,7	11,9	0
A1720G		-	0	0,7	0,1	0	5,1	0	0	0,5	0,1	0	0,8
G1842U	VP3	R35M	0	0	0	0	5,9	0	0	0	0	0	0
A1925C		N63H	0,9	98,9	97,7	0,1	0,1	1,2	1,1	0	0,1	0,2	2,0

Tabla S1. Lista de todas las mutaciones encontradas a una frecuencia >5% en al menos una línea evolutiva (continuación).

Mutación	Proteína	Cambio de aminoácido	Fundador	s1	s2	p1	p2	pt1	pt2	p*1	p*2	pt*1	pt*2
A1939G		-	0	0,1	0,1	8,4	2,9	3,8	7,2	4,3	15,9	10,9	0
U2175C		V146A	0	0	0	0,9	6,1	0,1	0,1	16,0	4,4	0,2	0,1
G2344A		-	0	0,1	0,1	54,0	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,2	0,1
G2569A	VP1	-	0,1	0,1	19,8	0,5	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2
C2641U		-	0	0	0	0	0,1	0,1	7,8	0,1	0	0,1	0,1
A2690G		K80E	0	0	0,1	10,8	1,3	0	0,1	3,9	18,7	0	0,1
U2696A		S82T	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G2900A		V150I	0,1	19,9	30,1	0,1	0	12,9	0,6	0,1	0	0,1	0,1
A3005G		I185V	0	0	0	0,9	8,8	1,3	0,2	28,6	1,4	0,1	0
A3140G		K230E	0	0	0	1,0	0,4	0,1	0	1,3	24,6	0,1	0
A3196G		-	0	0	0	0,1	5,5	0,1	0	0,1	0	0,1	0
A3221C		K257Q	0,1	0	0	80,6	72,8	2,1	0,8	42,5	49,8	0,5	1,4
A3222U		K257M	0,1	0,2	0	18,9	26,5	84,5	96,7	56,9	49,4	99,3	98,2
A3231G		N260S	0	0	0	0,2	0,3	0	0	0,2	6,0	0	0
U3302C	2A	F3L	0	0,1	0,1	0,2	0	0	7,2	0,1	0,1	0	0,1
U3303C		F3S	0	57,5	0	0	0	0	0	0,1	0,1	0	0
U3352C		-	0	0,1	0	53,8	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,3	0

Tabla S1. Lista de todas las mutaciones encontradas a una frecuencia >5% en al menos una línea evolutiva (continuación).

Mutación	Proteína	Cambio de aminoácido	Fundador	s1	s2	p1	p2	pt1	pt2	p*1	p*2	pt*1	pt*2
A3409G		-	0	0	0	1,8	4,6	13,6	16,9	11,9	4,7	16,4	13,1
C3519U		S75L	0	0,4	28,8	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0
C3622U		-	0	0,4	0	0	0,1	0,1	0,1	0,1	6,1	0,1	0,1
G3810A	2B	C22Y	0	0	17,0	0,9	1,1	6,5	0,7	0,2	0,2	0,3	0,6
A3822G		N26S	0	0	0	5,4	0	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0,2
G3913A		-		0	0,1	0	8,2	0	0	0	0	0	0,1
A3955G		-	0	0,4	30,8	0	0,1	0	0,1	0	0,1	0,1	0
A4123G	2C	-	0	0	18,1	0,2	0,2	0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2
U4711C		-	0	0,1	0,4	0,4	0,2	7,9	0,2	0,1	0,1	0,3	0,1
A4717U		-	0,6	2,5	1,8	3,5	1,9	1,9	2,8	2,6	10,2	3,2	2,2
C4735U		-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1	16,6	0,4	0,4
U4909C		-	0	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	9,1	0,4	0,2	0,2
C5044U	3A	-	0,1	0,1	5,8	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1
A5093G		I22V	0,1	0,7	0,3	7,9	2,8	3,9	3,2	0,3	1,4	0,7	5,3
C5198U		H57Y	0	20,4	0,4	1,8	4,6	0,7	2,5	1,6	0,9	1,1	1,4
G5205C		S59T	0	0	0	0,4	0	7,9	0,3	0	0	0	0,1
A5224G		-	0,1	0,1	0,1	54,6	0,2	0,2	0,3	0,3	0,1	0,2	0,3

Tabla S1. Lista de todas las mutaciones encontradas a una frecuencia >5% en al menos una línea evolutiva (continuación).

Mutación	Proteína	Cambio de aminoácido	Fundador	s1	s2	p1	p2	pt1	pt2	p*1	p*2	pt*1	pt*2
G5312A	3B	V6M	0	0,1	0,3	0,3	0,2	7,6	0,3	0,1	0,2	0,4	0,6
A5356G		-	0,1	56,6	13,4	0,1	0,5	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
C5782U	3C	-	0	0	0,1	0	7,2	0,4	0,1	0	0	0	0,1
U5952A	3D	F14Y	0	0	18,7	0	0	0	0,3	0	0	0	0
A6115U		-	0	0	0	52,3	0	0	0	0	0	0	0
A6142G		-	0	0	0	0,1	0,1	0	0,6	8,9	0,1	0,2	9,7
G6202A		-	0	0	0	0,1	8,6	0,2	0	0,1	0	0	0
U6271C		-	0	0	0,1	9,4	0,2	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,1
U6405C		I165T	0	0,2	0,1	0,2	0,5	0,3	0,8	11,3	0,6	0,4	9,9
C6712U		-	0	0,1	19,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,1
A6905C		I332L	0	0	0,1	0	0	0	0	0,2	19,6	0	0,1
A7019G		T370A	0	0,1	6,5	0,4	0,2	0,2	1,2	0,6	0,4	0,3	0,2
C7066U		-	0	0	0,1	13,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
C7258U		-	0,1	1,6	0,2	0,8	6,2	0,4	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4
C7294U		-	0,2	0,7	1,8	0,9	1,8	3,1	3,5	12,8	1,8	4,0	14,6
C7357U	3UTR	-	0,1	0,4	10,4	1,3	0,4	1,5	0,5	0,7	1,0	1,0	1,0

