



**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA INTEGRATIVA DE  
SISTEMAS**

**Programa de Doctorado en Biodiversidad y Biología Evolutiva**

# **EVOLUCIÓN SOCIAL DE VIRUS**

**Tesis doctoral**

**Ernesto Alejandro Segredo Otero**

**Director: Rafael Sanjuán Verdeguer**

**Abril 2023**



**A LOS ÁNDALOS, LOS RHOYNAR  
Y LOS PRIMEROS HOMBRES**



---

# ÍNDICE

---

<b>PRÓLOGO</b> .....	9
• <b>Agradecimientos</b> .....	11
• <b>Contribuciones</b> .....	14
<b>RESUMEN</b> .....	15
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	19
• <b>Mecanismos virales de co-infección</b> .....	21
➤ <i>Transmisión mediada por estructuras de infección colectiva</i> .....	24
• <b>Interacciones directas mediadas por la co-infección</b> .....	27
➤ <i>Cooperación homotípica</i> .....	29
➤ <i>Cooperación heterotípica</i> .....	32
• <b>Interacciones sociales más allá de la co-infección</b> .....	35
➤ <i>Interacciones por medio de sustancias que facilitan las infecciones</i> .....	35
➤ <i>Interacciones sociales mediadas por el sistema inmune</i> .....	36
• <b>Conflicto social en poblaciones virales</b> .....	38
➤ <i>Conflicto social en co-infección</i> .....	44
➤ <i>Conflicto social de las interacciones indirectas</i> .....	46
➤ <i>Implicaciones sociales del dilema de la prudencia</i> .....	47
<b>OBJETIVOS</b> .....	52
<b>METODOLOGÍA</b> .....	54
• <b>Cultivos celulares eucariotas y VSV</b> .....	56
➤ <i>Microscopía de fluorescencia en tiempo real automatizada</i> .....	59
• <b>Cultivos de <i>B. subtilis</i> y bacteriófago phi3T</b> .....	60
➤ <i>Competencia y cuantificación de fracción de variantes por qPCR</i> .....	62
<b>CAPÍTULO 1: Interacciones directas: complementación genética, diversidad y adaptabilidad</b> .....	64

- **Estudio de la complementación genética durante la co-transmisión** ..... 66
  - *Modelos de Wright-Fisher con mutación selección* ..... 66
  - *Modelo de mutaciones letales* ..... 67
  - *Complementación genética en un paisaje adaptativo* ..... 74
  
- **Estudio experimental del efecto de la co-transmisión en la adaptabilidad de VSV** ..... 91
  - *Evolución experimental con parentesco genético* ..... 92
  - *Estudio de la co-transmisión en la adaptabilidad a la temperatura* ..... 97

## **CAPÍTULO 2: Interacciones indirectas: evasión social de la respuesta inmune innata** ..... 104

- **Estudio experimental de la naturaleza social de la evasión de la inmunidad innata** ..... 106
  - *Modelo de evolución social para el efecto del IFN* ..... 109
  - *Cálculo de los parámetros sociales* ..... 112
  - *Cuellos de botella y meta-poblaciones* ..... 119
  
- **Modelo de difusión-reacción con autómatas celulares para el estudio de la evasión de la inmunidad** ..... 122
  - *Efecto del coste de la evasión y la viscosidad del medio* ..... 131
  - *Efecto autocrino del IFN* ..... 132

## **CAPÍTULO 3: Interacciones indirectas: dilema de la prudencia en fagos lisogénicos** ..... 135

- **Rendimiento y competencia de fagos lisogénicos** ..... 137
  - *Dilema de la prudencia frente a la virulencia* ..... 138

➤ <i>Efecto de la super-infección</i> .....	143
➤ <i>Modelo complejo con regulación de la lisogenia</i> .....	147
• <b>Evolución de variantes prudentes</b> .....	159
<b>DISCUSIÓN</b> .....	165
• <b>La complementación genética aumenta la frecuencia de mutaciones letales</b> .....	167
• <b>La complementación genética fomenta la adaptabilidad en mapas de eficacia epistáticos</b> .....	171
• <b>Papel de la complementación genética en la eficacia de la co-transmisión</b> .....	176
• <b>Los virus presentan interacciones sociales sin co-infectar la misma célula</b> .....	178
• <b>Influencia de los parámetros moleculares/mecanísticos del sistema virus/hospedador en la naturaleza social de los caracteres cooperadores</b> .....	179
• <b>Los virus prudentes también pueden ser tramposos</b> .....	182
• <b>La importancia de la exclusión de la superinfección en el dilema de la prudencia</b> .....	185
• <b>Perspectivas futuras</b> .....	187
<b>CONCLUSIONES</b> .....	193
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	198



---

# **PRÓLOGO**

---



## **Agradecimientos**

Desarrollar este trabajo de tesis, pandemia de por medio, ha sido un trabajo intenso, arduo, pero también interesante y divertido en muchas ocasiones. Y lo ha sido, fundamentalmente, por todas las personas con las que pude compartir este viaje, y que han hecho que acabe recordando esta parte de mi vida como una de las mejores, sin duda alguna. Sería imposible recaer en todas las personas que han tenido un papel, grande o pequeño, en mi vida previa a la tesis, y que de una forma u otra influyeron en que tomara este camino. Recuerdo perfectamente un profesor de filosofía de Bachillerato que despertó mi interés por el pensamiento crítico, profesores de Biología, Física, Química y Matemáticas con los que poco a poco fui descubriendo que me gustaba la ciencia en todas sus facetas, y que mi vida la quería orientar hacia aquí. Durante la carrera fueron varios los profesores que me impartieron materias que me llamaron la atención, pero debo destacar sobre todas, la asignatura de Biología de Sistemas, de cuarto año de Bioquímica, impartida por Ximo Moreno, con la cual confirmé una sospecha que siempre tuve durante la carrera: dedicarme a investigar en biología no tiene por qué estar reñido con las matemáticas. En ese curso aprendí muchas cosas que he podido poner en práctica durante esta tesis, me inclinó a profundizar más en todas las herramientas matemáticas que pueden tener aplicaciones en biología, a buscar un Máster en Biofísica con el que potenciar mis conocimientos y pensamiento cuantitativo, entre otras muchas cosas. Otra figura destacada en mi camino previo a la tesis es Carlos Peña Garay, quien fue mi tutor durante mi trabajo en el proyecto ‘The Stool Project’, para el concurso iGEM de Biología Sintética del MIT. Carlos fue otra persona determinante en mi pensamiento cuantitativo aplicado a la biología, y la primera persona que me dirigió un trabajo de este tipo, además de ser la primera vez que se confiaba en mi para el desarrollo de un proyecto, o de una parte de un proyecto en este caso. Además, gracias a Carlos Peña y al contacto que decidió mantener conmigo en los siguientes años, pude llegar a contactar con Rafa, así que se puede decir que, sin él, esta tesis no habría existido.

Las personas más importantes que han estado antes, durante, y espero que estén durante muchísimos años más, son mi familia y amigos. Tanto las

que están en Miami, como las que están en La Habana, Maastrich, Denia, Madrid, Albacete, Castellón, Osaka... o donde vayan a dar, su influencia en lo que soy a día de hoy es inmensurable. Por encima de todos, tengo que destacar a Patry, que durante tantos años de mi vida fue la hermanita que me seguía a todas partes, que aprendía a jugar a los mismos juegos que yo, que quería ver las mismas cosas que veía yo, y quería pasar todo el tiempo que pudiera conmigo. Al final acabó siendo mejor que yo en muchos, y descubriéndome ella a mí muchos juegos (sí, hablo de Overwatch), series o películas. Ahora, aunque tenga su vida lejos, y aunque alguna vez nos desespere un poco a todos, hay una cosa que nunca he dejado de sentir, y es que sé que puedo confiar en ti, y eso es un tesoro. De mis padres la verdad es que se podría escribir una tesis en sí, de todo lo que nos han dado. De lo que lucharon para sacarnos adelante en Cuba, de lo que lucharon para sacarnos de Cuba, de esos tres años en los que mi padre estuvo solo en España por nosotros, y mi madre sola a nuestro cargo en Cuba, del valor que tuvieron al elegir emigrar por segunda vez, con 50 años, pero sin obligarme, ni siquiera pedirme, que les acompañara, sabiendo la importancia de mi carrera y la vida que estaba teniendo en España. En mi vida han ido y venido muchas personas, pero nunca jamás, ni una sola vez, me he sentido solo, y eso se lo debo a ellos. Nada de lo que he hecho en estos años de la tesis, antes, o después, se entiendo sin la educación, apoyo y enseñanzas que me han dado. Los amigos que hacen durante la carrera suelen ser importantes, pero en mi caso, si cabe, un poco más, ya que fue el verdadero primer grupo de amigos que formé en mi vida. Marco, Kristie, Paula, y sobre todo Carmen Suay, que fue durante la carrera, Máster, y los primeros años de la tesis, una de las personas más importantes, y que más ha creído en mí.

Y así llegué al laboratorio de Rafa, estando sólo en la ciudad, y con cierto miedo, ya que mi conocimiento de evolución social era prácticamente nulo, casi a la par que el de virología. Y entre el propio Rafa, y el extraordinario grupo de personas que había, no sólo me sentí completamente arropado, sino que aprendí mucho, y muy rápido. Son muchas las personas que han estado en el grupo y merecen mención, como María Durán, María Cebriá, Jose, Alejandra, Jenny, Lucas, Raquel, y otros muchos que han sido increíbles compañeros, a la par que jugadores terribles de fútbol y

baloncesto. Pilar es una de esas personas que no te pasa desapercibida, aunque lo intentes. No sólo te ayuda con todo lo que pueda en el propio trabajo, que es muchísimo dado lo inteligente y capaz que es, también te empapa de su entusiasmo por los fagos (ya ves, acabaron siendo parte de mi tesis cuando no me interesaban nada al principio), sino que te hace sentirte como si fueras uno más desde el minuto uno. Ya sé que no he ido a muchas de las comidas o cenas que me ha invitado a lo largo de estos años, pero la realidad es que no habría a ni una sola si no fuera por su insistencia, y menos mal, porque me habría perdido el conocer a gente tan buena. Sobre Rafa puedo decir muchas cosas, pero la verdad es que espero que esta tesis, los artículos que salen de ella, y el resto de mi carrera, hablen de él mejor que yo. Rafa es una de las personas más inteligentes que conozco, tanto para el ámbito de la ciencia, que lo demuestra su carrera, como en muchos otros aspectos de la vida, que lo demuestra cualquier conversación que se tenga con él. Me dio el apoyo y conocimiento necesario, los empujones adecuados, y todo lo que un predoc podría necesitar, no sólo para desarrollar este trabajo, sino, sobre todo, para aprender haciéndolo, y formarme en ser, espero, un buen científico.

Por último, no puedo acabar sin mencionar a algunas personas que llegaron a mi vida durante la tesis, y que han sido fundamentales. Del mismo laboratorio de Rafa, pero que ya son parte de mi vida fuera del trabajo, está la Friki Pandi. JuanVi, menos mal que accediste aquel día a ayudarme con la cama del piso, no sé dónde estaría durmiendo ahora, o dónde habría pasado tantas tardes y noches jugando a videojuegos, juegos de mesa, viendo pelis, o adivinando personajes. Dévora, a ti se aplican las mismas cosas, y a ambos os agradezco todo el apoyo que me disteis aquel verano nefasto. Y las tartas de queso. Por parte de Iván, primero debo pedirle perdón por la insufrible expansión del Catán, y además agradecer todos esos ratos que hemos pasado en congresos, en el lab, o donde sea, hablando de ciencia, de mates, de cualquier debate raro y filosófico que nos venga a la mente. A los tres, espero que, desde continentes diferentes, no nos perdamos nunca. Y no puedo olvidarme de la persona que ha sido, y es, la más importante de mi vida. No hace falta ninguna mención, pues lo sabes todo. Me conoces mejor que nadie, me has hecho ver la vida de otra

manera, hemos superado tantas cosas, y seguimos adelante. Ni mi tesis, ni todo el resto de mi vida, sería lo mismo sin ti.

### **Contribuciones**

El desarrollo de esta tesis ha generado resultados recogidos en los siguientes artículos:

1. Domingo-Calap, P., Segredo-Otero, E., Durán-Moreno, M. & Sanjuán, R. Social evolution of innate immunity evasion in a virus. *Nat Microbiol* 4, 1006–1013 (2019).
2. Segredo-Otero, E. & Sanjuán, R. The effect of genetic complementation on the fitness and diversity of viruses spreading as collective infectious units. *Virus Research* 267, 41–48 (2019).
3. Segredo-Otero, E., & Sanjuán, R. The role of spatial structure in the evolution of viral innate immunity evasion: A diffusion-reaction cellular automaton model. *Plos Comp Biol*, 16(2), e1007656 (2020).
4. Segredo-Otero, E., Sanjuán, R. Genetic complementation fosters evolvability in complex fitness landscapes. *Sci Rep* 13, 662 (2023).

---

# RESUMEN

---





Durante muchos años se ha asumido que los virus se transmiten como elementos individuales, en forma de partículas que contienen un único genoma y grupo de proteínas esenciales para la infección. Estas partículas virales o *viriones* constituyen la forma de vida extracelular de los virus, y deben proteger el material genético del mismo e iniciar una infección en un nuevo hospedador. En los últimos años, se ha incrementado sustancialmente la evidencia de que muchos virus son capaces de transmitirse en grupos de viriones, lo que les permite iniciar infecciones con más de un individuo, ya sea en un nuevo hospedador, o en una nueva célula, dentro de un organismo pluricelular. Concretamente, se han descrito multitud de estructuras, promovidas por genes virales, a las que se conoce como unidades de infección colectivas, que permiten el agrupamiento, transporte, y llegada conjunta de múltiples genomas o partículas virales, desde una célula u hospedador infectado, hacia uno sano. Independientemente de las características específicas de cada una de éstas estructuras, lo común en todas ellas es que incrementan el número de genomas virales que inician una nueva infección. La transmisión colectiva abre la puerta a los virus a múltiples interacciones, las cuales pueden ser estudiadas desde el punto de vista de la evolución social, al igual que ocurre con otros microorganismos. En esta tesis estudiamos tres ejemplos de interacciones virales que, como demostramos, se pueden entender desde la óptica de la evolución social.

En el primer capítulo de la tesis estudiamos el efecto de la diversidad durante la co-transmisión de variantes, algo que se ha demostrado que ocurre con muchos tipos diferentes de estructuras de transmisión colectiva. Demostramos que la complementación genética durante la co-infección no mejora *per se* la eficacia de los grupos de individuos que se co-transmiten, pero sí aumenta su diversidad. En segundo lugar, demostramos que este aumento de diversidad puede conllevar, en función de las características del mapa genotipo-fenotipo, un aumento de la adaptabilidad. También estudiamos el efecto de la presencia de secuencias defectivas, las cuales se comportan como tramposos sociales en un sistema de cooperación. Nuestras simulaciones indican que este tipo de secuencias son capaces de invadir la población si la transmisión colectiva implica la mezcla de genomas que proceden de diferentes células, pero que si la co-transmisión

se limita a individuos que provienen de la misma célula, los tramposos no proliferan. Las ventajas de adaptabilidad en este contexto se reducen, pero no se pierden completamente. En los capítulos 2 y 3 de la tesis estudiamos interacciones en virus que no llegan a infectar la misma célula, pero sí las mismas poblaciones, demostrando que puede haber interacciones sociales sin necesidad de co-infección. En el capítulo 2 demostramos que la evasión de la inmunidad innata por parte del virus de la estomatitis vesicular es un carácter social, que evoluciona fundamentalmente por el efecto que tiene en individuos que no son el propio virus que ejerce dicho bloqueo. También demostramos que la naturaleza social de este carácter depende de algunas características específicas del sistema virus/hospedador, tales como la viscosidad del medio, el coste de dicho bloqueo o el tiempo característico de producción de viriones e interferón por parte de las células infectadas. En el capítulo 3 de la tesis estudiamos la naturaleza social del dilema de la prudencia en bacteriófagos capaces de realizar ciclos líticos y lisogénicos, y encontramos que existen condiciones que favorecen a variantes sobreprudentes, las cuales reducen la cantidad total de genomas virales que el sistema puede producir. En concreto, demostramos que con poco o nulo recambio de las poblaciones de bacterias hospedadoras, las variantes con una mayor tendencia a reducir la lisis presentan una ventaja evolutiva, aunque esto signifique reducir la cantidad total de genomas virales al que tiende el sistema. Estas variantes, por tanto, se comportan como tramposos, ya que reducen el rendimiento poblacional, pero desplazan en competencia directa a fagos con mayor tendencia a lisar. Se trataría de un caso excepcional dentro del dilema de la prudencia en virus, ya que los tramposos en este caso no son los individuos más virulentos, sino los que no explotan a sus hospedadores tanto como podrían.

---

# **INTRODUCCIÓN**

---



La evolución social estudia los caracteres cuya evolución depende, al menos parcialmente, del efecto que éstos tienen en individuos diferentes al poseedor del genotipo de dicho carácter (West et al., 2007b; Gardner et al., 2011). Durante muchos años, este campo se centró en organismos superiores, no siendo hasta finales del siglo XX que se comenzó a estudiar con profundidad la naturaleza social de muchas interacciones de microorganismos (West et al., 2007a). La extensión de estos estudios a virus llegó más tarde, fundamentalmente centrada en las interacciones sociales que pueden ocurrir durante las co-infecciones, (Sanjuán, 2021). En años recientes, especialmente en la última década, ha surgido abundante evidencia de que los virus poseen múltiples formas de transportar conjuntamente varios genomas virales, capacitándolos para iniciar infecciones con muchos individuos a la vez (Sanjuán, 2017), lo cual ha incrementado el interés por lo que se podría denominar como *sociovirlogía*. Por otro lado, aun en ausencia de co-infección de la misma célula, dentro de un hospedador pueden ocurrir multitud de interacciones entre virus, lo que lleva a que la infección de una célula condicione el progreso de otras infecciones. En esta tesis presentamos el estudio de diversas formas de cooperación en virus, tanto de forma directa, mediante co-infección, como de forma indirecta, con virus que no infectan las mismas células, pero que tiene un impacto en la eficacia de otros virus dentro de la misma población.

### **Mecanismos virales de co-infección.**

Existen multitud de factores que promueven las infecciones múltiples, desde una simple ratio elevada entre viriones y células del hospedador, hasta sofisticados mecanismos estructurales. Para empezar, la co-infección por azar no es un mecanismo menor. En un contexto en el que haya el

mismo número de partículas virales que de células u organismos hospedadores, es decir, que la *Multiplidad de Infección* (MOI, del inglés *Multiplicity Of Infection*) sea 1, el azar genera multitud de co-infecciones. Si asumimos una distribución de Poisson en cuanto al número de viriones que infectan cada individuo (o célula), aunque la media nos indica que cada infección será producida por un único virus, existe un 18,39% de probabilidad de tener una infección doble, y un 26,42% de probabilidad de tener una infección múltiple en general. Para diferenciar este valor promedio de partículas virales por célula u organismo, del número real de partículas o genomas que inician una infección, en el trabajo nos referiremos a este último como MOI celular o cMOI.

Los virus animales suelen producir un gran número de partículas infecciosas por célula infectada, normalmente entre 100 y 10000 (Chen et. al., 2007, Stray and Air, 2001, Novella et. al., 2004), que a menudo difunden desde una célula infectada, hacia las que tiene a su alrededor, en medios viscosos como son los tejidos animales (Stirbat et. al., 2013). Esta naturaleza focal de las infecciones eleva la concentración local de viriones, provocando infecciones con una cMOI elevada en la vecindad de una célula infectada, aunque la MOI general, tomando en cuenta todas las células del tejido, sea sustancialmente menor. No obstante, esta elevada concentración local de viriones tampoco garantiza una cMOI alta. Otros factores determinantes son la adhesividad de los viriones a las células, o la permisividad de las células a la infección. Con todo, existe mucha evidencia de co-infección *in vivo* en virus animales, como el mero hecho de detectar partículas virales defectivas (Felt et al., 2021; Hein et al., 2021), que sólo pueden existir en co-infección con virus funcionales, como explicaremos más adelante.

Los virus que, en vez de infectar tejidos bidimensionales, se enfrentan a infecciones en un medio líquido, como pueden ser los bacteriófagos en un

cultivo de bacterias en medio líquido, no pueden generar infecciones focales. En este caso, sabemos que muchos fagos presentan eficiencias de adsorción extremadamente altas (Storms et al., 2010; Shao and Wang, 2008, Storms and Sauvageau, 2015) que, junto con su ubicuidad ambiental, promueven altos niveles de co-infección. En el caso de virus animales que infectan tejidos líquidos como la sangre, existe una forma más sofisticada: la transmisión célula a célula. Este mecanismo, muy importante también en muchos virus de plantas, permite que se transmitan partículas virales maduras, o a veces incluso únicamente genomas virales, desde una célula infectada a una nueva, sin pasar en ningún momento por el medio extracelular.

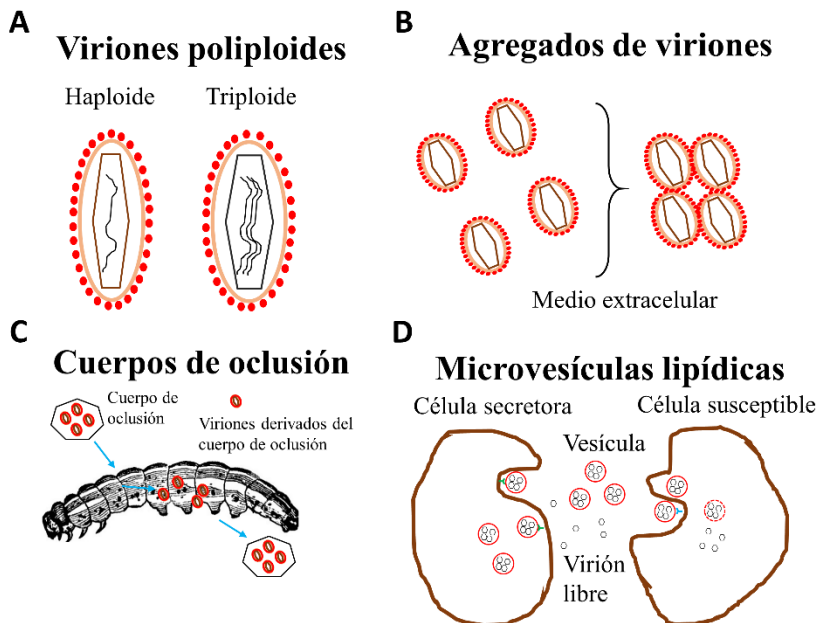
El virus vaccinia es capaz de inducir la formación de fibras de actina que impulsan el transporte de partículas virales de una célula infectada hacia una no infectada (Cudmore et al., 1995), de forma similar a como hacen otros patógenos como *Listeria*, *Shigella* o *Rickettsia*. Otros virus son capaces de explotar estructuras celulares como los filopodios en el caso del virus de la leucemia murina (MLV, del inglés *Murine Leukemia Virus*) (Lehman et al., 2005), o los nanotubos de membrana en el caso del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Sowinski et al., 2008), que conectan diferentes tipos celulares, como células neuronales y del sistema inmune. Algunos virus son también capaces de inducir estructuras de unión para favorecer su transmisión. El virus del sarampión (MeV, del inglés *Measles Virus*) o el virus de la varicela-zóster poseen genes que promueven la formación de sincitios (Takeuchi et al., 2003; Cole and Grose, 2003) para inducir la fusión entre membranas celulares. El VIH induce la formación de sinapsis entre dos linfocitos T, o entre linfocitos T y macrófagos, que potencian significativamente el progreso de las infecciones, ya que, en su caso, la vía de transmisión por viriones libres es mucho menos eficaz (Álvarez et al., 2014; Dupont and Sattentau, 2020).

Como mencionamos, la transmisión célula a célula también es especialmente importante en virus de plantas, los cuales utilizan los plasmodesmos para transmitirse a través de su hospedador (Kawakami et al., 2004; Kumar et al., 2015). Sin embargo, en este caso, sabemos que la cMOI que se alcanza no siempre es alta, y depende de la ruta de transmisión (Gutiérrez et al., 2010; Gutiérrez et al., 2015).

### ***Transmisión mediada por estructuras de infección colectiva.***

El creciente interés en el estudio de las consecuencias de la co-infección ha venido de la mano del descubrimiento, en los últimos años, de mecanismos que activamente impulsan la transmisión colectiva de virus. Se han descrito multitud de estructuras, promovidas por genes virales, que favorecen la agrupación y co-transmisión de numerosos viriones, o bien de varios genomas virales dentro de una misma partícula infectiva. En conjunto, a todas estas estructuras se les conoce como *Unidades de Infección Colectivas*, o CIUs (del inglés *Collective Infectious Units*), las cuales están presentes en virus de todo tipo (Sanjuán, 2017; Altan-Bonnet, 2016; Altan-Bonnet and Chen, 2015), aunque se han descrito mayoritariamente en virus animales. En la Figura 0.1 mostramos un resumen de las CIUs más importantes que se conocen a día de hoy.





**Figura 0.1. Unidades de infección colectivas. A.** Viriones poliploides. **B.** Agregados extracelulares de viriones. **C.** Cuerpos de oclusión de baculovirus. **D.** Vesículas extracelulares lipídicas.

*Viriones poliploides.*

Desde hace ya más de 20 años se sabe que algunos virus son capaces de empaquetar más de un genoma en su cápside. El MeV puede producir viriones con dos o más genomas, y sabemos que dichos genomas pueden complementarse mutuamente mutaciones deletéreas (Rager et al., 2002). También se han descrito viriones diploides o poliploides en otros virus como el VIH (Iglesias-Sánchez and López-Galindez, 2005), el virus del Ébola (Beniac et al., 2012), el virus de la bursitis infecciosa (IBDV, del inglés *Infectious Bursal Disease Virus*) (Luque et al., 2009) o el aquabirnavirus (Lago et al., 2016). Es importante recalcar que, en estos tres últimos, se ha encontrado que la poliploidía puede estar relacionada con un aumento en la infectividad. Como discutiremos más adelante, este es uno

de los posibles mecanismos por los que las CIUs pueden conferir ventajas adaptativas a los virus.

#### *Agregados extracelulares de viriones.*

Los agregados de viriones constituyen un tipo particular de CIU, ya que suponen la co-transmisión de viriones (y por tanto genomas) provenientes de infecciones de células diferentes. Esto se debe a que el proceso de agregación se produce con los viriones maduros, en el medio extracelular. Sabemos que el VIH es capaz de adherirse a fibras amiloides del semen para formar unas estructuras denominadas *potenciadores de infección viral derivados del semen* (SEVI, del inglés *Semen-derived Enhancer of Viral Infection*). Como su nombre indica, estas estructuras favorecen sustancialmente la infectividad del VIH (Münch et al., 2007; Kim et al., 2010). También se ha descrito la agregación en el virus de la estomatitis vesicular (VSV, del inglés *Vesicular Stomatitis Virus*), pero en saliva (Cuevas et al., 2017; Anschau and Sanjuán, 2020). En ambos casos, la agregación se especula que tiene un papel importante en la transmisión entre hospedadores.

#### *Cuerpos de oclusión de baculovirus.*

Los cuerpos de oclusión son cristales de poliedrina que albergan decenas de nucleocápsides, formados por virus de insectos como son los baculovirus (Yang et al., 2017). Se trata de estructuras que juegan un papel fundamental, una vez más, en la transmisión entre hospedadores, ya que confieren una gran resistencia a la desecación y a la radiación UV, y protegen la nucleocápside de la degradación en el tubo digestivo de los insectos (Sajjan and Hinchigeri, 2016).

### *Vesículas extracelulares.*

El tipo de CIUs más común de todos los que se conocen son las vesículas extracelulares contenientes de viriones. Se trata de exosomas, estructuras membranosas derivadas de endosomas tardíos, que algunos virus son capaces de utilizar para el transporte de múltiples viriones simultáneamente. Se han descrito en una gran variedad de virus, tanto en cuanto a hospedadores, como en cuanto a tipo de material genético. Algunos de los ejemplos más importantes son las vesículas de norovirus y rotavirus (Santiana et al., 2018), picornavirus como coxsackievirus B3 (CVB3) (Bou et al., 2019), poliovirus (Chen et al., 2015) y el virus de la hepatitis A (HAV, del inglés *Hepatitis A Virus*) (Ramakrishnaiah and Van der Laan, 2014), y marseillevirus (Arantes et al., 2016). Su diversidad también se encuentra en el número de viriones que son capaces de transportar, desde decenas en el caso de algunos enterovirus, o norovirus y rotavirus, hasta centenares o incluso miles en el caso de marseillevirus. A diferencia de los cuerpos de oclusión o los agregados, para las vesículas no existe un consenso de cuál es su función principal en el ciclo de vida viral. Se sabe que algunas mejoran la infectividad, como es el caso de rotavirus o norovirus, pero en otros como el HAV se ha observado que confieren resistencia a anticuerpos.

### **Interacciones directas mediadas por la co-infección.**

La característica principal que comparten todos los mecanismos de co-infección, ya sea por medio de CIUs, transmisión célula a célula, o por una alta MOI general, es que todas aumentan la cMOI, es decir, el número de genomas que comienzan el ciclo infectivo, y en la mayoría de casos

también las proteínas virales. Debido a toda la creciente evidencia de que la co-transmisión, más que la excepción, puede ser la norma, algunos autores han señalado la posibilidad de que existan factores, comunes a todos los virus, que favorezcan la evolución estos mecanismos, independientemente de las particularidades de cada sistema virus-hospedador (Sanjuán and Thoulouze, 2019). La alta cMOI puede ser ventajosa favoreciendo interacciones cooperativas de varias maneras, ya sea entre genomas potencialmente idénticos (homotípicas), o entre diferentes variantes genéticas de un mismo virus (heterotípicas). Por otro lado, la co-infección también puede promover interacciones perjudiciales, como la epistasia negativa o la interferencia. Por último, también es importante destacar el coste intrínseco de la dispersión en grupos: la competición por recursos, que reduciría siempre la eficacia de la población viral. Si  $m$  viriones infectan una misma célula, en vez  $m$  células diferentes, y todas las infecciones producen la misma cantidad  $P$  de partículas infecciosas, entonces su cantidad se reduce  $m$  veces por generación en comparación al caso de mono-infección, ya que las mismas  $P$  partículas virales se tienen que repartir entre los  $m$  genomas iniciales, correspondiéndole a cada genoma  $P/m$  viriones, a menos que alguno posea una ventaja intracelular. En contraste, con la dispersión individual, cada uno de los  $m$  genomas tiene acceso  $P$  viriones. Por tanto, especulamos que todo mecanismo de transmisión colectiva debería no sólo conllevar una ventaja evolutiva, sino que esta ventaja debe ser suficientemente alta para compensar dicho coste, que aumenta con el tamaño de las unidades colectivas.

### ***Cooperación homotípica.***

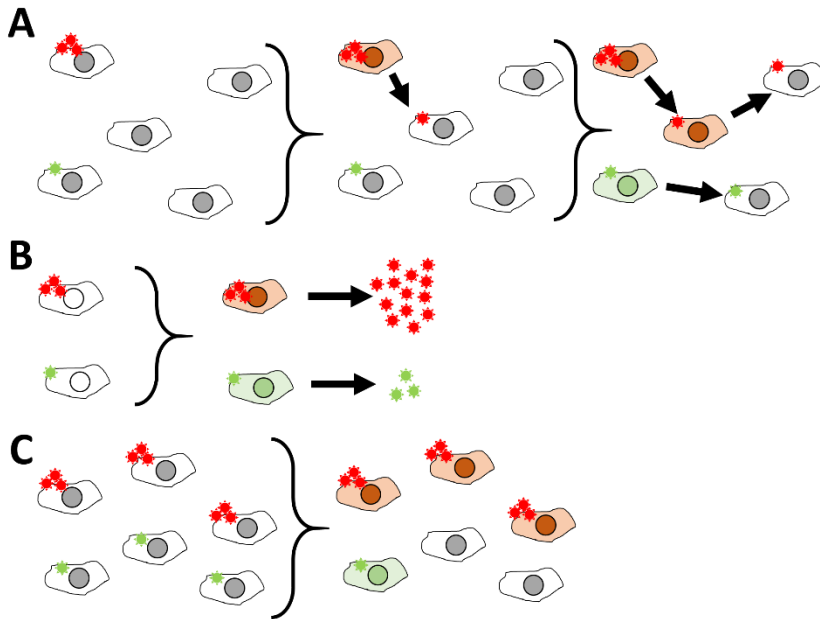
Una característica general de los virus es que existe, durante la replicación, una retroalimentación positiva entre el número de genomas y el número de proteínas virales, ya que los genomas codifican proteínas promotoras de su propia replicación (Andreu-Moreno et al., 2020). Esto hace que, al aumentar uno de estos dos elementos (genomas o proteínas), se produzca un aumento desproporcionado de la tasa de replicación de ambos. Varias líneas de evidencia apoyan esta idea, como el hecho de que el aumento de la cMOI conduce a un aumento directo de los niveles de expresión de genes virales a tiempos cortos post-infección en herpesvirus (Cohen and Kobilier, 2016). Se ha descrito que las vesículas extracelulares de algunos virus aumentan su tasa de replicación, como es el caso de algunos enterovirus (Chen et al., 2015), norovirus y los rotavirus (Santiana et al., 2018). También se ha demostrado que las vesículas de marseillevirus aceleran el ciclo infeccioso (Arantes et al., 2016), pero en este caso los autores consideran que podría deberse a que las vesículas utilizan un mecanismo de entrada diferente a los viriones, por lo que la co-transmisión no jugaría un papel importante. Acelerar el ciclo infeccioso facilitaría la liberación pronta de nuevos viriones, y por tanto el llegar antes a nuevos hospedadores. Pensando en términos de compensación del coste de dispersión, para que el aceleramiento del ciclo sea un factor importante en la evolución de las infecciones colectivas, las células infectadas por  $m$  viriones deberían realizar su ciclo infeccioso  $m$  veces más rápido que las células mono-infectadas (Figura 0.2A).

Otra ventaja posible es que la co-infección aumente el rendimiento, es decir, el número de genomas producidos por ciclo infeccioso (Figura 0.2B). Al igual que señalamos con la aceleración del ciclo, en una célula co-infectada por  $m$  genomas, el aumento del rendimiento debe ser  $m$  veces superior al de las células mono-infectadas para aumentar el número de

viriones más que el coste de dispersión. El aumento de la producción general de viriones con la cMOI se ha demostrado ya en varios virus como el virus de la gripe (Heldt et al., 2015; Jacobs et al., 2019; Martin et al., 2020; Phipps et al., 2020) o el IBDV (Luque et al., 2009), pero un aumento *per cápita* de la producción sólo se ha demostrado, hasta donde sabemos, en VSV (Andreu-Moreno and Sanjuán, 2018) y el virus vaccinia (Stiefel et al., 2012).

Finalmente, la co-infección también podría reducir la frecuencia de infecciones abortivas. Al comienzo de las infecciones, la degradación (espontánea o impulsada por mecanismos celulares) del ADN o ARN, o de las proteínas virales, puede ocurrir antes de los pasos clave del ciclo infectivo, dando lugar a infecciones abortivas. Esta estocasticidad, junto a la gran variabilidad que presentan los virus, son las razones principales por las que un gran número de partículas víricas no son realmente partículas infectivas (McCormick and Mermel, 2021). La co-transmisión podría incrementar la infectividad reduciendo la probabilidad de que se degraden todos los genomas o proteínas virales clave antes de su replicación o expresión (Figura 0.2C). Tenemos evidencia de esto en vaccinia (Stiefel et al., 2012), en el cual se ha demostrado que aumenta la proporción de infecciones productivas por partícula vírica conforme aumenta la cMOI. También se ha observado algo similar en el VIH con la transmisión célula a célula que mencionamos anteriormente. Sin embargo, al ser un mecanismo infectivo diferente, las causas del aumento de la infectividad pueden ser ajenas al aumento de la cMOI. Los viriones poliploides del IBDV también muestran una mayor infectividad (Luque et al., 2009), pero dado que se trata de un virus segmentado, dicho aumento podría explicarse por una mayor probabilidad de transmisión de todos los segmentos del genoma. Una vez más, el factor clave sería si la ventaja en infectividad supera el coste de dispersión, que se alcanzaría si la infectividad de los

viriones individuales, en comparación con CIUs de tamaño  $m$ , es inferior a  $1/m$ .



**Figura 0.2. Posibles ventajas conferidas por la cooperación homotípica.** **A.** Acelerar el ciclo infeccioso, que se traduce en infectar nuevas células más rápidamente. **B.** Aumentar el rendimiento viral por célula infectada. **C.** Disminuir el número de infecciones abortivas.

Aunque hemos presentado estas tres posibles ventajas de forma independiente, la realidad es que todas pueden estar interconectadas y ocurrir al mismo tiempo. La clave la encontramos en un concepto mencionado anteriormente: la naturaleza cooperativa de la replicación viral. Como se demuestra en (Andreu-Moreno et al., 2020), la retroalimentación positiva que existe entre genomas y proteínas virales conlleva que cualquier aumento de uno de los dos provoca un aumento no lineal del otro. Con esta aceleración inicial del ciclo, además de reducir el

tiempo en el que se comienzan a producir los viriones, también puede redundar en un aumento del rendimiento viral. Esto ocurrirá si el límite de viriones que puede producir una infección no depende de la disponibilidad de recursos celulares, sino del tiempo que una célula infectada es productiva antes de la muerte celular. Dicha muerte celular ocurre principalmente por mecanismos apoptóticos, que se desencadenan en las células infectadas tras el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos, como el ARN de cadena doble (Kumar et al., 2011). Se produce por tanto una carrera entre la producción de viriones, y la respuesta inmune innata (la primera en activarse en toda infección), que deja una ventana temporal para la producción que los virus deben maximizar. De esta forma, un aceleramiento del ciclo infectivo, que ya de por sí puede ser beneficioso, puede además aumentar el rendimiento viral, confiriendo dos ventajas en una. Por último, el aceleramiento del ciclo también podría redundar en una mayor frecuencia de infecciones exitosas, ya que se disminuye la probabilidad de degradación de genomas o proteínas virales si todos los procesos replicativos clave ocurren más rápidamente.

### ***Cooperación heterotípica.***

Al aumentar el número total de individuos que inician una infección, también puede aumentar el número de variantes diferentes que lo hacen. Los virus son los sistemas genéticos con las tasas de mutación más elevadas que se conocen, en especial los virus de ARN (Sanjuán and Domingo-Calap, 2016). Esta alta variabilidad, junto con otros mecanismos como la recombinación, crean poblaciones muy diversas y con una gran adaptabilidad, a costa de sufrir con frecuencia mutaciones deletéreas o letales (Sanjuán et al., 2010). Teniendo esto en cuenta, la complementación



genética es otro de los mecanismos que se ha especulado que juegue un papel importante durante la co-infección. En concreto, algunos autores han sugerido que la complementación genética entre variantes deletéreas o letales puede compensar estos defectos genéticos y así aumentar la eficacia de estas variantes (Vignuzzi et al., 2006; Borderia et al., 2015; Luring and Andino, 2010; Domingo and Perales, 2018; Villarreal and Witzany, 2015; Andino and Domingo, 2015; Leeks et al., 2018). Como hemos mencionado anteriormente, la capacidad de complementación genética durante las co-infecciones se ha observado experimentalmente en virus que se transmiten por medio de CIUs, como los viriones poliploides del MeV (Rager et al., 2002).

Por otro lado, existe evidencia teórica y experimental de que la complementación genética, al disminuir el efecto de la selección sobre las variantes letales, provocaría un aumento de su frecuencia en la población, disminuyendo la eficacia de dichas poblaciones a largo plazo (Sardanyes and Elena, 2010; Gao and Feldman, 2009). Sin embargo, esta acumulación de variación también podría ser beneficiosa si redundara en una mayor adaptabilidad. En el primer apartado de la tesis exploramos estos dos aspectos fundamentales respecto a la complementación genética: si es capaz de aumentar la eficacia al amortiguar el efecto de mutaciones letales, y si fomenta la adaptabilidad debido al aumento de la diversidad genética.

Planteamos que la co-transmisión puede ser particularmente importante en la adaptación de caracteres que presenten abundante epistasia. Las interacciones epistáticas entre diferentes genes que afecten a un mismo carácter, o entre diferentes posiciones en un mismo gen, pueden crear un mapa genotipo-fenotipo accidentado, lleno de estados de alta eficacia, rodeados de otros de menor valor. En este contexto, la evolución por mutación-selección habitualmente lleva al sistema a uno de estos máximos locales, que suponen puntos de equilibrio sub-óptimos. En estos puntos,

todas o la mayoría de mutaciones serán perjudiciales, por lo que los mutantes que surjan serán purgados por la selección.

Se han propuesto varias explicaciones para superar esta limitación. En primer lugar, con tasas de mutación suficientemente altas, podrían emerger ciertas combinaciones de alelos favorables simultáneamente, evitando así los intermedios de baja eficacia (Iwasa et al., 2004). Sin embargo, esto se ve limitado a sistemas de pocos alelos, ya que es improbable que una combinación específica de más de 3 o 4 mutaciones surja, por azar, en la misma generación. Además, la tasa de mutación necesaria para ello aumentaría fuertemente la carga mutacional, lo que también podría lastrar la adaptación. En segundo lugar, la deriva genética aleatoria puede permitir a las poblaciones atravesar valles de eficacia bajo la acción de la selección neutral, alcanzando posteriormente combinaciones más óptimas (Barton, 2016). En tercer lugar, mecanismos de tolerancia mutacional pueden favorecer la acumulación de variación genética críptica. Estas variantes condicionalmente neutras pueden potenciar la adaptabilidad al volverse beneficiosas cuando ocurren cambios en el fondo genético o en el entorno (Zeng et al., 2019; Paaby and Rockman, 2014). También se ha demostrado que la propia acción de la selección natural puede promover la adaptabilidad al aumentar la robustez mutacional (Zeng et al., 2020). Sin embargo, los determinantes genéticos y poblacionales de la adaptabilidad aún no están perfectamente descritos. Mediante simulaciones y experimentos, estudiamos si el aumento de la diversidad que conlleva el amortiguamiento de las mutaciones deletéreas, debido al efecto de la complementación genética, es capaz de aumentar la adaptabilidad de los virus que se transmiten en grupos de genomas, al permitir la acumulación de intermedios de baja eficacia.

## **Interacciones sociales más allá de la co-infección.**

Las interacciones entre virus pueden tener lugar aun en ausencia de co-infección celular. Si dos virus infectan el mismo organismo hospedador, aunque no infecten las mismas células, las características de una infección pueden condicionar otras, al estar en el mismo organismo. De la misma forma, los bacteriófagos que infecten la misma población de bacterias pueden interactuar de diferentes maneras.

### ***Interacciones por medio de sustancias que facilitan las infecciones.***

Existen varios ejemplos en la naturaleza de este tipo de interacciones indirectas, sobre todo en el mundo de los bacteriófagos. Uno de los más destacados son las proteínas depolimerasas, enzimas capaces de degradar las cápsulas de exo-polisacáridos que producen algunas bacterias. Se trata de un proceso fundamental, ya que, en muchos casos, dichas barreras de carbohidratos enmascaran los receptores que los viriones necesitan para comenzar las infecciones. Las depolimerasas se han encontrado en fagos de *Escherichia coli* (*E. coli*) (Jakobsson et al., 2007; Muhlenhoff et al., 2003; Kwiatkowski et al., 1983; Thompson et al., 2010; Schwarzer et al., 2012), *Klebsiella pneumoniae* (Kassa and Chhibber, 2012; Lin et al., 2014; Liu et al., 2014; Shang et al., 2015), *Pseudomonas* (Cornelissen et al., 2011; Glonti et al., 2010; Cornelissen et al., 2012), entre otras. Estas enzimas pueden estar adheridas a los propios viriones, o difundir libremente por el medio.

Las proteínas anti-CRISPR representan otro ejemplo conocido de cooperación en fagos. El sistema CRISPR-Cas (del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and Associated*

*Proteins*) es un sistema de inmunidad adquirida en procariotas, consistente en un *locus* del genoma de bacterias que incorpora fragmentos del genoma de fagos que la infectan. Durante sub-siguientes infecciones, las bacterias expresan una enzima nucleasa (la proteína Cas) que degrada el ADN de los fagos, guiada por secuencias de ARN transcritas a partir de las secuencias de ADN incorporadas al genoma previamente (Brouns et al., 2008). En respuesta a este sistema, muchos fagos han desarrollado proteínas inhibitoras, llamadas anti-CRISPR, o Acrs (Bondy-Denomy et al., 2013). En años recientes se ha visto que este sistema puede presentar interacciones cooperativas mediante co-infección, pero también mediante super-infecciones. Se han descrito casos en los que un fago que infecta una bacteria, por sí solo, no es capaz de superar la barrera que supone el sistema CRISPR, pero sus proteínas Acrs dejan a la bacteria comprometida, haciendo que un segundo fago que llegue a la misma sí sea capaz de infectarla (Landsberger et al., 2018; Borges et al., 2018). Se trata de un punto intermedio entre cooperación directa e indirecta, ya que las infecciones afectan al mismo hospedador, pero no mediante co-infección directa, sino super-infección, es decir, infección secuencial del hospedador por parte de dos viriones distintos. En este caso, el primer fago actuaría como altruista, ya que no generará una infección, pero facilitará la infección del segundo fago.

### ***Interacciones sociales mediadas por el sistema inmune.***

Existen muchos ejemplos de interacciones ambientales e inmunológicas entre diferentes virus, las más importantes relacionadas con la alteración de la susceptibilidad a los huéspedes, la modificación o supresión de la respuesta al interferón (IFN) o la alteración de la activación de las células inmunitarias (Da Palma et al., 2010). Por ejemplo, el VIH es capaz de

aumentar la replicación del citomegalovirus humano en diversos tejidos debido a la activación de linfocitos (Biancotto et al., 2008); o también, sabemos que las personas infectadas por el virus del herpes simple (HSV, del inglés *Herpes Simplex Virus*) son más susceptibles a las infecciones por VIH y más contagiosos debido a una mayor expresión del receptor CCR5 (Corey et al., 2004; Sheffield et al., 2007), por sólo poner dos ejemplos.

La respuesta inmune innata es la primera barrera de defensa de los mamíferos frente a las infecciones. Las células infectadas reconocen patrones moleculares asociados a patógenos y secretan interferones de tipo I, que actúan de forma autocrina y paracrina para bloquear el progreso de las infecciones a nivel local (Ivashkiv and Donlin, 2014; Fensterl and Sen, 2015). La señalización autocrina desencadena respuestas antivirales en la célula infectada, que conllevan fundamentalmente el bloqueo de la expresión génica y la activación de la apoptosis, mientras que la señalización paracrina induce un estado de resistencia antiviral en las células vecinas. La inmunidad innata impone, por tanto, una fuerte presión selectiva a los virus, que han desarrollado una gran diversidad de mecanismos de evasión. Muchos consisten en bloquear la detección del propio virus, la transducción de señales y/o la expresión génica (Fensterl and Sen, 2015; García-Sastre, 2017; Coccia et al., 2015). En muchos casos, la vía más eficaz para los virus es adelantarse a la expresión de la respuesta inmune, lo cual ocurre con virus como VSV o HSV (Voigt et al., 2016; Howat et al., 2006; Voigt and Yin, 2015). Esto provoca que el beneficio del bloqueo del IFN pueda recaer, fundamentalmente, en virus que infecten otras células posteriormente, debido al bloqueo del efecto paracrino, más que en el propio individuo que esté ejerciendo dicha inhibición.

Sabemos que VSV es capaz de bloquear la expresión génica por medio su proteína de matriz o proteína M. En concreto, durante el progreso de la infección, la proteína M migra al núcleo celular y bloquea la transcripción,

el transporte de ARNs mensajeros y la traducción, uniéndose al factor de exportación Rae1, entre otras proteínas celulares importantes (Redondo et al., 2015; Rajani et al., 2012; Ahmed et al., 2003). Dicho bloqueo impide la expresión de IFN, que requiere de la expresión de nuevos genes, pero también desencadena la apoptosis en las células infectadas. Se sabe que este bloqueo activa la apoptosis por vía mitocondrial (la vía intrínseca), al inhibir la expresión de Mcl1 e inactivar a BclX<sub>L</sub> vía la proteína Bid (de la familia BH3-only). Ambas son proteínas anti-apoptóticas que, al inhibirse o eliminarse, dejan de bloquear a la proteína pro-apoptótica Bak (Pearce and Lyles, 2009; Kopecky and Lyles, 2003), que activa a la caspasa-9. Por otro lado, también sabemos que existen variantes mutantes de VSV cuya proteína M no bloquea la expresión génica, pero que mantienen el resto de funciones, por lo que son totalmente viables. Estas variantes, como la conocida como VSV-Δ51, también activan la apoptosis durante las infecciones, pero en este caso es por la vía extrínseca, dependiente de Fas y la PKR, la misma vía por la que se activa la apoptosis en respuesta a IFN (Gaddy and Lyles, 2005; Gaddy and Lyles, 2007). En el segundo capítulo de la tesis estudiamos las implicaciones sociales del bloqueo o no del IFN por parte de VSV, prestando especial atención a la interacción entre variantes bloqueantes y no bloqueantes, y al efecto autocrino y paracrino del IFN.

### **Conflicto social en poblaciones virales.**

Además de las interacciones positivas que hemos presentado, tanto los virus que co-infectan una misma célula, como aquellos con interacciones indirectas, pueden presentar también interacciones negativas. La más evidente de todas es la propia competencia por recursos, que serían los

recursos celulares (energía y biomoléculas) durante las co-infecciones, o las diferentes células a infectar, dentro un organismo o población. Incluso con la intervención de interacciones cooperativas, la competencia por los recursos es intrínseca en cualquier población, lo que genera una fuerte presión de selección a favor de los virus con mayor tendencia a adueñarse de los recursos compartidos.

Desde los tiempos de Charles Darwin, el dilema de la cooperación ha supuesto un problema para la teoría de la evolución (Gardner et al., 2011), ya que se trata de caracteres que tienen un impacto positivo en la eficacia de individuos que no son necesariamente el que posee dicho genotipo. El altruismo va un paso más allá, ya que es un fenotipo que reduce la eficacia del propio individuo que lo realiza mientras que incrementa la eficacia de otros. Para estudiar este fenómeno se han desarrollado varios marcos teóricos, como son la selección por grupos, la teoría de juegos o la teoría de evolución por parentesco (Nowak, 2006; Bourke, 2014; West et al., 2007b). A pesar de que en algunos casos el enfoque pueda ser diferente, algunos autores han señalado que estos marcos teóricos son reconciliables y matemáticamente equivalentes (Fletcher and Doebeli, 2009; Marshall, 2011; Lehmann et al., 2007).

Para estudiar este tipo de caracteres, se subdivide la eficacia total de los individuos en dos partes: (1) la parte directa de la eficacia, que es aquella que depende del propio carácter del individuo; y (2) la parte indirecta de la eficacia, que es la que depende de los individuos con los que interaccione. A la suma de ambas contribuciones se le conoce como eficacia inclusiva. En el caso de poblaciones homogéneamente distribuidas, el carácter promedio de los individuos con los que se interaccione será una media de las frecuencias de los caracteres de todos los individuos de la población. Se define que un determinado carácter será cooperativo si su evolución se explica, al menos parcialmente, por el efecto de dicho carácter sobre

individuos de la población diferentes al propio actor, lo que implica que la parte indirecta de la eficacia debe ser al menos del mismo orden que la parte directa. En la Figura 0.3 podemos ver este modelo de partición de la eficacia. Definiendo  $b$  como la parte indirecta, y  $c$  como la parte directa, según el signo de ambos parámetros podemos tener cuatro tipos de caracteres: Mutualista, beneficioso tanto para el actor como para el receptor ( $b > 0$  y  $c < 0$ ); altruista, perjudicial para el actor y beneficioso para el receptor ( $b > 0$  y  $c > 0$ ); egoísta, beneficioso para el actor y perjudicial para el receptor ( $b < 0$  y  $c < 0$ ); y maliciosos, perjudicial para ambos ( $b < 0$  y  $c > 0$ ). La población podrá estar formada por dos tipos de individuos: Cooperadores (C), que pagan el coste de la cooperación ( $c$ ), ya sea positivo o negativo, y Desertores o tramposos (D), que no lo pagan. Cualquier individuo que interaccione con un cooperador recibe el beneficio ( $b$ ), y si interacciona con un desertor, no lo recibe. En muchos microorganismos, este beneficio de la cooperación se manifiesta en forma de la producción de una serie de sustancias que aumentan la eficacia de todos los individuos de la población (bienes comunes), pero cuya producción es costosa para los cooperadores. Mientras que los caracteres mutualista y egoísta tienen un efecto positivo en la eficacia individual, y por tanto su evolución por selección natural es intuitiva, el gran reto ha estado siempre en explicar la evolución de caracteres altruistas y maliciosos, que tienen un efecto negativo en la eficacia individual.



		<b>Dilema del prisionero</b>		<b>Selección por parentesco</b>	
		<b>C</b>	<b>D</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
Receptor	Actor				
	<b>C</b>	$b - c$	$-c$	<b>C</b>	$(b - c) \times (1 + r)$
	<b>D</b>	$b$	$0$	<b>D</b>	$br - c$

**Figura 0.3. Matrices de partición de la eficacia en diferentes modelos de cooperación. Dilema del prisionero:** Escenario en el que tenemos una población con interacciones al azar entre todos los individuos sin importar su fenotipo, los cooperadores pagan un coste de su eficacia ( $-c$ ) para aumentar la eficacia de aquellos con los que interaccionan ( $b$ ). En la **selección por parentesco**, cada fenotipo interacciona preferentemente consigo mismo, aumentando en la eficacia de los cooperadores de forma proporcional al grado de parentesco ( $r$ ).

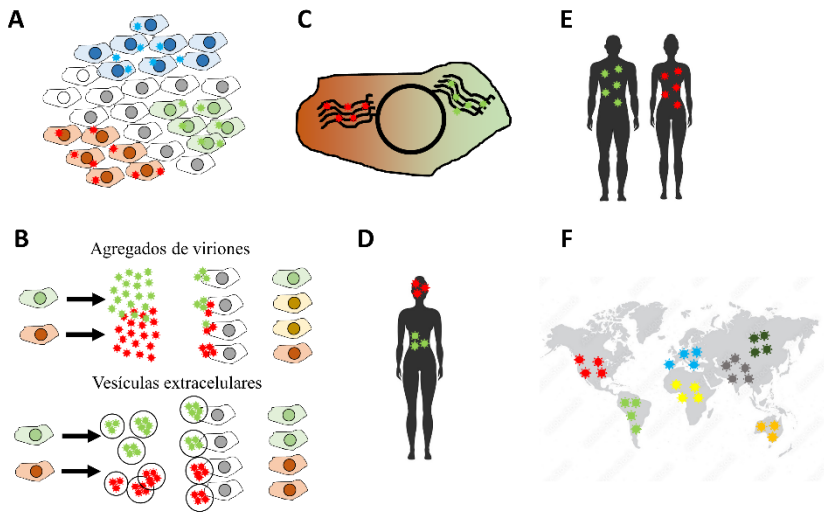
Partiendo de la subdivisión de la eficacia mostrada en la Figura 0.3 (izquierda), asumiendo que las interacciones entre individuos ocurren al azar, y llamando  $p$  a la frecuencia de cooperadores en la población, la eficacia media de ambos genotipos será:  $w_C = bp - c$  y  $w_D = bp$ . La diferencia entre la eficacia de ambos es  $w_C - w_D = bp - c - bp = -c$ . Con lo cual, en el caso de caracteres altruistas ( $c > 0$ ), y en poblaciones en las que los individuos interaccionan de forma homogénea, la eficacia de los cooperadores siempre será inferior a la de los tramposos, por lo que el carácter está abocado a desaparecer, a pesar de que la eficacia global se maximiza si todos los individuos de la población fueran cooperadores (en cuyo caso  $\bar{w} = w_C = b - c$ , siempre que  $b > c$ , que es lo habitual en este tipo de caracteres). A este escenario se le conoce como dilema del prisionero (PD, del inglés *Prisoner's dilemma*), y surge porque,

independientemente del fenotipo del individuo con el que se interaccione, la eficacia individual siempre será mayor en el caso de ser desertor (ya que  $b > b - c$ , y  $0 > -c$ ).

Uno de los principales resultados de la teoría de la evolución por parentesco es que los cooperadores serán capaces de imponerse sobre los tramposos si las interacciones se realizan preferentemente entre individuos de su mismo genotipo (West et al., 2007b; Gardner et al., 2011). La matriz de interacciones se ve modificada debido a la interacción preferente entre individuos del mismo tipo (Figura 0.3, derecha), de forma tal que tenemos  $w_C = pb + rb - pcr - c$ ,  $w_D = pb - pcr$  y finalmente  $w_C - w_D = pb + rb - pcr - c - (pb - pcr) = rb - c$ , de la cual emana la famosa regla de Hamilton, que establece que un carácter cooperador podrá imponerse en la población si  $r > c/b$ , siendo  $r$  el parentesco genético entre los individuos que interaccionan. La regla de Hamilton establece que los caracteres altruistas sólo pueden existir si el beneficio ( $b$ ) se reparte en mayor medida entre los individuos que comparten el genotipo, favoreciendo así a cooperadores sobre desertores. En ausencia de mecanismos complejos de reconocimiento del fenotipo, como son la memoria y el aprendizaje, los microorganismos tienen en la estructura espacial de la población la forma más fácil de aumentar el parentesco genético en sus poblaciones y evitar así la propagación de tramposos.

Los virus presentan estructura espacial a diferentes niveles, que van desde el sub-celular hasta las poblaciones de hospedadores (Figura 0.4). Las infecciones en tejidos sólidos (como son la mayoría de organismos pluricelulares) suelen progresar en forma de focos fundados por una o unas pocas partículas. Esta naturaleza focal crea una región en la que cada célula está infectada por virus genéticamente emparentados (Figura 0.4A). Las co-infecciones mediadas por CIUs presentan también diferentes grados de parentesco genético. Por ejemplo, las vesículas extracelulares o los cuerpos

de oclusión favorecen la co-transmisión de genomas procedentes de la misma célula infectada, limitando las interacciones a genomas "hermanos", al igual que ocurre con la transmisión célula a célula. En cambio, los agregados de viriones generan mezclas de partículas procedentes de células diferentes, reduciendo el parentesco entre genomas que cooperan (Figura 0.4B). También surge estructura poblacional si, al infectar una misma célula, las distintas variantes se organizan en centros de replicación independientes (Figura 0.4C). Sabemos que muchos virus de ARN llevan a cabo los pasos clave de su ciclo replicativo en centros de replicación membranosos (de Castro Martin et al., 2017; Altan-Bonnet, 2017; Hsu et al., 2010; Belov, 2016; Romero-Brey and Bartenschlager, 2016; Ravindran et al., 2016; Shulla and Randall, 2016), los cuales pueden aislar la replicación de variantes que co-infecten la misma célula. En (Bou et al., 2019) se ha demostrado que vesículas derivadas de células co-infectadas por CVB3 tienen una capacidad limitada de co-transmitir variantes diferentes, lo que indica que dichas variantes replican de forma independiente a nivel sub-celular. Otros niveles importantes de estructura poblacional en virus son, por ejemplo, la distribución a lo largo de tejidos y órganos de organismos pluricelulares, la distribución entre diferentes hospedadores o incluso entre poblaciones de hospedadores (Figura 0.4D-F).



**Figura 0.4. Niveles de estructura poblacional en virus.** **A.** Estructura poblacional derivada de la naturaleza focal de las infecciones en tejidos animales o colonias de bacterias. **B.** Los diferentes tipos de CIUs generaran diferente grado de parentesco genético, según si permiten o no la mezcla de genomas procedentes de diferentes células infectadas. **C.** Los centros de replicación sub-celulares pueden aislar variantes genéticas que co-infecten la misma célula, reduciendo sus interacciones. **D.** Segregación en diferentes tejidos y órganos dentro de hospedadores pluricelulares. **E-F.** Segregación por infección de diferentes hospedadores o poblaciones de hospedadores.

### *Conflicto social en co-infección.*

Durante una infección, los virus tienen que lograr un equilibrio entre dos procesos: (1) la expresión génica, necesaria para sintetizar todas las proteínas clave, tanto de la replicación del genoma (proteínas replicativas) como de la formación de nuevos viriones (proteínas estructurales); y (2) la propia replicación de su genoma. Esto conlleva un conflicto del tipo de PD si los productos génicos de un virus pueden ser explotados por otros con los que co-infecten, algo que es habitual (Gelderblom et al., 2008; Appel et al., 2005). Dichos productos génicos, que son esenciales para la replicación, constituyen un bien común, ya que su producción se lleva a

cabo a costa de sacrificar poder replicativo (reduciendo la eficacia de los genomas que las producen), pero su producción aumenta rendimiento de la infección. Las variantes que reducen su tendencia a la transcripción y priorizan la replicación producirán más genomas que sus homólogos que invierten más en la transcripción, adueñándose de más proteínas estructurales para crear una mayor progenie de viriones con su genoma. Sin embargo, una célula infectada sólo con tramposos que priorizan la replicación produciría poca progenie, ya que destinan muy pocos recursos a la síntesis de las proteínas esenciales. El PD se cumple de lleno, ya que las infecciones con sólo cooperadores producen más progenie en global, pero las co-infecciones entre cooperadores y tramposos siempre están dominadas por los tramposos. En (Turner and Chao, 1999), los autores demuestran experimentalmente que dicho dilema se cumple en una población de bacteriófagos.

Existe un caso extremo de variantes tramposas en virus, las conocidas como partículas interferentes defectuosas (DIPs, del inglés *Defective Interfering Particles*). Las DIPs son virus que han sufrido grandes deleciones, por lo que han perdido la mayor parte de su genoma, y con ello los genes esenciales para la infección. Son incapaces de completar un ciclo infeccioso excepto si un virus normal o "ayudante" está presente en la misma célula (Szathmáry, 1992; Kirkwood and Bangham, 1994; Bangham and Kirkwood, 1990). La presencia de DIPs se ha demostrado en virus tras evolucionarlos en un régimen de alta MOI, como en VSV (Andreu-Moreno and Sanjuán, 2020), IAV (Hein et al., 2021), entre otros. También se ha demostrado que la interacción entre DIPs y virus ayudantes lleva, bajo ciertas condiciones, a generar un juego social conocido como juego de la gallina o *snowdrift* (SD), con el cual la cooperación no estaría condenada a desaparecer, sino que generaría una coexistencia entre cooperadores y tramposos (Chao and Elena, 2017). Sin embargo, esta condición genera una

población con una eficacia que es siempre inferior a la de una población de sólo cooperadores. Es presumible que, si los cooperadores encuentran mediante la estructura poblacional una forma de aislar a las DIPs, esto sea más ventajoso que la co-existencia por SD.

### *Conflicto social de las interacciones indirectas.*

Como mencionamos antes, existen varios ejemplos de poblaciones virales que interaccionan sin llegar a infectar la misma célula. Las depolimerasas de los bacteriófagos, por ejemplo, que podían estar adheridas a la cola de los fagos, o ser proteínas que difunden en el medio. En el segundo caso, son un ejemplo perfecto de bien común, ya que se trata de una sustancia producida por individuos de la población, que potencialmente aumenta la eficacia de muchos otros, no sólo de quienes la producen. Las primeras, las depolimerasas adheridas a la cola de los fagos, pueden considerarse bienes privados (frente a los bienes comunes que suponen las que difunden), ya que beneficiarán fundamentalmente al fago que la posee. Sin embargo, las depolimerasas adheridas también pueden suponer un carácter cooperador, ya que se ha demostrado que hay interacciones sinérgicas cuando varias enzimas degradan la cápsula de una misma bacteria (Schmerer et al., 2014), facilitando la infección de varios fagos. Se trataría entonces de un bien común que favorecería preferentemente a los cooperadores, un mecanismo llamado altruismo recíproco, y que hace que la cooperación sea evolutivamente estable (West et al., 2007b; Nowak, 2006).

En el caso de las proteínas Acrs, al igual que en el caso de las depolimerasas, un elemento crucial para entender su estabilidad evolutiva es si el beneficio es exclusivo de fagos con el carácter (lo que generaría altruismo recíproco), o lo puede obtener cualquier otro fago (lo que generaría un carácter altruista clásico). En (Borges et al., 2018) los autores

realizan un ensayo en el que miden el título obtenido por fagos que infectan una cepa de *P. aeruginosa* previamente comprometida, y comparan el resultado de dos fagos, uno que expresa la misma proteína Acrs, y otro que no lo hace. El resultado obtenido en este caso es que el fago que sí expresa la misma Acr tiene un título 4 órdenes de magnitud superior al que no lo hace, demostrando una amplia ventaja de los fagos con proteínas Acr que cooperan. Se necesitan más ensayos en el campo con otros fagos y bacterias para comprobar si este caso representa la norma o la excepción, ya que la diferencia entre existir o no este beneficio recíproco en el carácter cooperador es fundamental. En su ausencia, la evolución del carácter dependerá de otros mecanismos para mantener las interacciones preferentemente entre cooperadores, como la estructura espacial.

### ***Implicaciones sociales del dilema de la prudencia.***

La explotación prudente de recursos ha sido una fuente de estudios en evolución social desde hace años (Lipson, 2015). Existen muchos casos, tanto en el mundo de la biología como fuera de ella, en los que se ha descrito la incompatibilidad entre explotar los recursos de forma eficiente (maximizando el rendimiento) y hacerlo de forma rápida (maximizando la velocidad). En cuanto a microorganismos, se sabe que en muchos casos existen compromisos entre el máximo número de individuos que puede alcanzar una población, y la tasa de crecimiento de la misma (Lipson, 2015; Pfeiffer et al., 2001; Pfeiffer and Bonhoeffer, 2002). Dicho compromiso tiene una raíz termodinámica, que impide la maximización simultánea de la tasa de conversión de energía ambiental (obtenida de los nutrientes) a ATP, y también un compromiso catabólico, ya que las rutas de fermentación ofrecen una mayor tasa de producción de ATP, pero las rutas basadas en la respiración oxidativa presentan un mayor rendimiento.

En lo que respecta a los virus, o parásitos en general, existe también un compromiso similar, ya que infectar y matar a los organismos hospedadores muy rápido puede llevar a su extinción, y por tanto a la extinción de la población de parásitos. Sin embargo, los virus que más rápido infecten y exploten a su hospedador tendrán por lo general una ventaja en competencia directa frente a variantes prudentes. Desde el punto de vista de la evolución social, los virus prudentes se pueden considerar cooperadores, ya que sacrifican parte de los recursos a los que podrían acceder si no lo fueran, en aras de aumentar la eficacia global de la población (que viene con la explotación prudente de los hospedadores). Las variantes rapaces serían los tramposos, ya que su fenotipo les lleva a infectar a más hospedadores que los cooperadores, pero a reducir la eficacia global de la población. Los enfoques teóricos basados en evolución social predicen que las poblaciones con estructura poblacional evolucionarán a ser menos virulentas, lo cual concuerda con el hecho de que la estructura espacial sea un factor determinante a la hora de incrementar el parentesco genético en virus (Buckling and Brockhurst, 2008; Cressler et al., 2016), y que el factor cooperador de la prudencia siga la regla de Hamilton.

La evidencia empírica disponible en el campo, aunque escasa, también apunta en esta dirección. En (Kerr et al., 2006), los autores describen cómo responde una población del bacteriófago T4 de *E. coli* a diferentes grados de migración a través de una red de subpoblaciones. Encontraron que, en las poblaciones con mayor migración, y por tanto con menos parentesco genético, los cultivos estaban dominados por variantes menos productivas, que generaban menos título total de fago. En cambio, en las poblaciones con migración limitada, las variantes evolucionadas presentaban un mayor rendimiento. Sin embargo, en competencia directa, las variantes de la condición de mucha migración superaban a las de poca migración. Este experimento cumple de lleno la predicción teórica, ya que en el sistema con

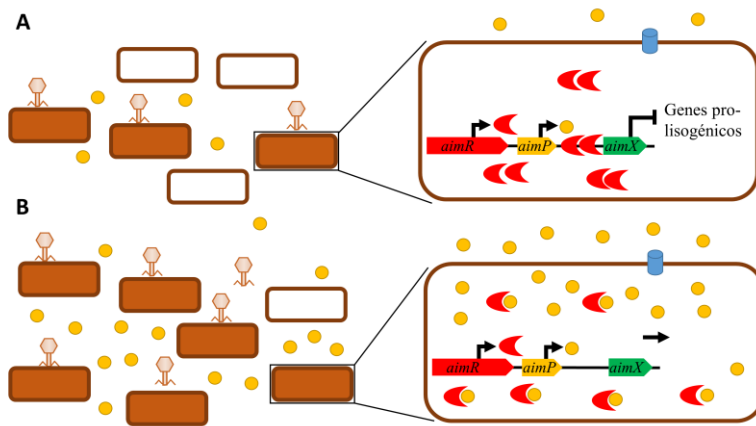


poco parentesco genético triunfan las variantes rapaces, mientras que en el de alto parentesco, las prudentes, es decir, las cooperadoras. En otro ensayo con el fago ID11 de *E. coli* (Roychoudhury et al., 2014) los autores encuentran que, tras una evolución experimental de 550 pases en placas de agar (y por tanto con poblaciones estructuradas), se seleccionan variantes que presentan menor adhesividad a las bacterias, manteniendo el mismo tiempo característico de lisis y el mismo rendimiento de fagos por célula lisada. Esto genera poblaciones con mayor rendimiento total de fagos, ya que la menor infectividad permite crecer más a la población de bacterias antes de infectarlas y producir fagos. Una vez más, evolucionan variantes prudentes que aumentan el rendimiento a cambio de comprometer la tasa de crecimiento, y en una población estructurada.

Los fagos lisogénicos representan un caso especial dentro del estudio de virus prudentes, ya que tienen la capacidad de integrar su genoma en el cromosoma de la bacteria hospedadora y replicar con el ciclo celular de la misma en forma de profagos o lisógenos. Esto les confiere un mecanismo de propagación que no depende de matar a su hospedador, como mucho de causarle un pequeño coste de eficacia debido a la replicación del genoma del virus además del de la bacteria. Sin embargo, los datos disponibles indican que este efecto es despreciable (Berngruber et al., 2013, Gama et al., 2013; Cortes et al., 2019). La propensión a activar el ciclo lítico o lisogénico depende de varios factores, como el estado nutricional de las bacterias infectadas, la cMOI de infección, o la respuesta a daños del ADN (Oppenheim et al., 2005; Zeng et al., 2010).

Recientemente se ha descrito un sistema molecular novedoso de control de la decisión lisis/lisogenia en fagos de la familia SPBeta, capaces de infectar la bacteria *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*). Este sistema, llamado arbitrium, controla la decisión inicial, en el momento de la infección, de realizar un ciclo lítico o lisogénico (Erez et al., 2017; Bruce et al., 2021). Se trata de

un sistema molecular sencillo, de tan sólo tres genes, consistente en un péptido señal (AimP), un receptor de dicho péptido (AimR) y un operador (AimX), que controla la expresión de los genes pro-lisogénicos (Figura 0.5). En ausencia de péptido, el receptor AimR dimeriza consigo mismo, y actúa como un factor de transcripción, activando la expresión del operador AimX, que es un represor de los genes pro-lisogénicos (Figura 0.5A). Así, en ausencia de péptido, la decisión por defecto es realizar el ciclo lítico. Las bacterias infectadas sintetizan el péptido AimP y lo secretan al medio exterior, el cual se acumula y retorna al interior de las bacterias. Allí, AimP se une a AimR, bloqueando su dimerización, y por tanto la expresión de AimX, activando con ello el ciclo lisogénico (Figura 0.5B). También se ha descubierto que el sistema arbitrium no sólo controla la decisión inicial, sino también el proceso de reactivación del ciclo lítico en los lisógenos (Brady et al., 2021). En el tercer capítulo de la tesis estudiamos las implicaciones sociales, desde el punto de vista de la paradoja de la prudencia, del proceso de lisogenia y su control molecular por parte del sistema arbitrium en los fagos phi3T y spbeta, ambos con este mecanismo de control, pero con un fenotipo, en cuanto a la reactivación del ciclo lítico, ligeramente diferente.



**Figura 0.5. Esquema de la regulación de la lisogenia por el sistema arbitrium.** **A.** Con ausencia o poca cantidad de células infectadas se promueve la lisis, ya que la concentración del péptido AimP es tan baja que no actúa, AimR es capaz de dimerizar y activar la expresión de AimX, un represor de los genes pro-lisogénicos. **B.** En presencia de un gran número de bacterias infectadas se promueve la lisogenia, ya que éstas sintetizan el péptido AimP, se eleva su concentración, se internaliza en las bacterias y se une al receptor AimR, que ya no es capaz de dimerizar, ni por tanto de activar la expresión de AimX, cesando la inhibición de los genes pro-lisogénicos.

---

# **OBJETIVOS**

---

El objetivo principal de esta tesis es el estudio de la naturaleza social de diversas interacciones en virus, tanto las que emanan de la co-infección de la misma célula (interacciones directas), como aquellas que ocurren cuando dos o más virus infectan el mismo organismo pluricelular o la misma población, pero no las mismas células. En concreto, hemos dividido la tesis en tres capítulos, cada uno abarcando un objetivo diferente:

1. Primer capítulo: estudiar el efecto de la diversidad entre variantes en co-infección, analizando el impacto de la complementación genética en la eficacia media de las poblaciones, y cómo esto repercute en su capacidad adaptativa.
2. Segundo capítulo: estudiar la naturaleza social de la evasión de la inmunidad innata en VSV, prestando especial atención a los elementos mecanísticos del virus y las células que influyen en el carácter altruista de la inhibición de la producción de IFN.
3. Tercer capítulo: estudiar las interacciones sociales del sistema arbitrium de control de la decisión entre lisis y lisogenia de los fagos de la familia SPBeta, bajo la óptica del dilema social de la prudencia en virus.

---

# **METODOLOGÍA**

---



## *Cultivos celulares eucariotas y VSV.*

### *Cultivos celulares.*

Para el desarrollo de la parte experimental de los dos primeros capítulos se utilizaron dos líneas celulares diferentes, ambas adherentes. Por un lado, utilizamos células BHK-21, procedentes de tejido renal de hámster neonato (*Mesocricetus auratus*), y las células MEF, procedentes de fibroblastos embrionarios de ratón. Todas las células se cultivaban en medio DMEM (el medio de Eagle modificado por Dulbecco), con glucosa a 4,5 g/L, L-glutamina a 0,6 g/L, piruvato sódico a 0,11 g/L, bicarbonato sódico a 3,7 g/L y CO<sub>2</sub> a pH 7,4. El medio se filtraba por poros de 0,2 µm para su esterilización, y se suplementaba con aminoácidos esenciales a 0,4 mM y suero bovino fetal (FBS) al 10% (medio DMEM completo). También añadimos antibióticos (penicilina 10 u/mL y estreptomycinina 10 µg/mL) y antifúngicos (anfotericina B 25 ng/mL). Las células se cultivaban en placas de poliestireno pre-tratadas para facilitar la adherencia, de diversos formatos: p100 (100 mm), y multipocillo de 6 (W6) y 12 (W12). Las condiciones de cultivo fueron, salvo indicación, 37 °C, con 95% de humedad relativa y 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos se renovaban periódicamente, y tanto al descongelar como cada dos semanas se comprobaba la ausencia de contaminación por micoplasmas por PCR.

### *Subcultivos.*

Tanto para la renovación periódica de los cultivos, como para preparar los cultivos de infección, las células se subcultivaban, partiendo siempre de placas confluentes (90%-100% del área de la placa ocupada), normalmente p100. Primero se retiraba el medio, luego se lavaba la monocapa con



tampón fosfato salino (PBS), y luego se añadía tripsina-EDTA (0,25%), incubando a 37 °C durante aproximadamente 1 minuto, o hasta que se apreciara visualmente que las células se despegaban. En ese momento se añadían 10 mL de medio DMEM con el que se recogían las células y se traspasaban a un tubo con un volumen correspondiente a la dilución y el número total de nuevas placas que se deseara. Para BHK, se realizaban pases de dilución 1:3 para obtener células confluentes en un día, 1:10 para dos días, y 1:20 para tres días. En el caso de las células MEF, se hacían pases 1:2, 1:5 y 1:10, respectivamente. Para cultivos de mantenimiento, se realizaban pases a placas p100, haciendo pases de dos o tres días, mientras para la mayoría de experimentos se hacían en placas W6 o W12, y haciendo siempre pases de un día.

Las células se mantenían en stocks al 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) a -80 °C. En el momento de comenzar un cultivo, se descongelaban los tubos a 37 °C, se añadían a un tubo con 10 mL de medio DMEM, se centrifugaban las células a 300xg durante 5 minutos, se descartaba el sobrenadante y se resuspendían las células en 12 mL de medio DMEM completo, y se cultivaban en placas p100. Para almacenar un nuevo stock de células, se partía de una monocapa confluyente que se traspasaba a un tubo mediante la tripsinización descrita anteriormente, se centrifugaban y resuspendían en medio DMEM completo, suplementado con 5% de DMSO, y se congelaban a -80 °C en criotubos.

#### *Stocks y variantes de VSV.*

Para los ensayos del primer y segundo capítulo se utilizó el virus VSV marcado con diferentes proteínas fluorescentes. Se trataba de variantes recombinantes con el gen de la proteína mCherry, o GFP, que se expresaban en las células infectadas. Las variantes VSV-WT-mCherry,

VSV-WT-GFP y el VSV- $\Delta$ 51-GFP se obtuvieron a partir de un clon de cDNA infeccioso proporcionado amablemente por el Dr. Valery Z. Grdzlishvili (Universidad de Carolina del Norte).

#### *Cultivos celulares para infecciones en medio líquido y semisólido.*

Para realizar las infecciones, tanto en medio líquido como medio semisólido (DMEM-agar), las células se cultivaban en placas de W6 o W12. En el momento de la infección, el medio se retiraba, y se añadían 200  $\mu$ L del medio con virus a la concentración deseada en el caso de placas W6, y 100  $\mu$ L en el caso de W12. Se realizaba una incubación a 37 °C durante 45 minutos, agitando cada 15 minutos. Pasado este tiempo, se añadía medio DMEM líquido suplementado con FBS al 2%. En el caso de infección en medio semisólido, se añadía DMEM-agar al 0,8% y FBS también al 2%.

#### *Ensayos de titulación.*

El método estándar de cuantificación viral utilizado en la tesis es la medición de partículas formadoras de calvas (PFUs, del inglés *Plaque Forming Units*), para el cual se realizaban infecciones en medio semisólido, siempre en células BHK-21. En el caso de cuantificación total de PFUs, las infecciones se realizaban durante 16-18h, tras lo cual se fijaba el cultivo con formaldehído al 10% durante una hora, se retiraba tanto el formaldehído como el agar, y se teñían los pocillos con cristal violeta al 2% en formaldehído al 10%, que permitía contar las calvas de la monocapa correspondientes a células muertas por la infección del virus. En el caso de cuantificación de variantes diferenciadas por el marcador fluorescente, las infecciones se realizaban en el mismo medio, tomando imágenes de microscopía de fluorescencia. Para la cuantificación, se tomaban imágenes

a 10-12 horas post-infección (hpi), y se contaban todos los focos de cada color. En ambos casos, la medida siempre se tomaba como cantidad de focos por mL incubado (0,2 en el caso de W6 y 0,1 en el caso de W12), teniendo siempre como medida PFUs/mL.

### ***Microscopía de fluorescencia en tiempo real automatizada.***

Todas las imágenes de microscopía de fluorescencia se tomaron en un IncuCyte S3 Live-Cell Analysis System (Essen BioScience), un microscopio de fluorescencia que se encuentra dentro de un incubador. Las variantes VSV-WT-mCherry, VSV-WT-GFP y VSV- $\Delta$ 51-GFP desencadenan en las células infectadas la producción de dichas proteínas fluorescentes (mCherry y GFP), lo que nos permite seguir el progreso de las infecciones en tiempo real, ya que la fluorescencia actúa como marcador de que se expresan las proteínas virales. Las imágenes se tomaron utilizando el contraste de fase (que permite medir el área total ocupada por células) y los canales verde y rojo (para los marcadores GFP y mCherry, respetivamente), siempre con un aumento de 4X. Para corregir el fondo, las imágenes se sometían a una transformación *top-hat*, con un disco de 100  $\mu$ m. Para medir el área total ocupada por la señal fluorescente, se definía un umbral de intensidad, tal que las áreas fluorescentes de las variantes silvestres (VSV-WT-GFP y VSV-WT-mCherry) fueran similares. Se definieron unos parámetros umbral diferentes para las infecciones en células MEF y BHK-21. En el caso de éstas últimas, al realizarse experimentos de co-infección, los umbrales mínimos (que marcaban el límite inferior para considerar una célula como infectada) se diseñaron para evitar que ninguna célula con un solo marcador fluorescente pudiera considerarse co-infectada.

## **Cultivos de *B. subtilis* y bacteriófagos.**

### *Cepas y cultivo de B. subtilis.*

La cepa de *B. subtilis*  $\Delta 6$  fue proporcionada amablemente por el grupo del Dr. José Penadés, obtenidas del Centro de Reservas Genéticas de Bacillus 569 (BGSC). Se cultivaban a 37°C en placas de LB572-agar (Miller, 20% de agar) suplementadas con CaCl<sub>2</sub> 130 mM o en medio líquido de caldo LB (Miller) suplementado con MgCl<sub>2</sub> 1M y MnCl<sub>2</sub> 20 mM, agitando a 250 rpm, en tubos de 13 mL con 2 mL de volumen de líquido.

### *Cepas y extracción de fagos.*

Los lisógenos de *B. subtilis* de los fagos phit3T y spbeta también fueron proporcionados por el grupo del Dr. José Penadés. Los stocks de ambos fagos se obtuvieron purificando los viriones de un cultivo de 6 horas de lisógenos en LB suplementado con kanamicina 50 µg/mL, ya que la infección e integración de este fago en el genoma de la bacteria (lisogenización) le proporciona una resistencia a la kanamicina. Todo el cultivo se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante se filtró con poros de 0,2 µm.

### *Infecciones y titulación de fagos.*

Como norma general, las infecciones correspondientes a ensayos se realizaban con 10<sup>5</sup> PFUs de fagos en un cultivo de bacterias a densidad óptica (DO) de 0,005. Para seguir el crecimiento de las bacterias, medíamos la DO en tiempo real a una longitud de onda de 600 nm con un Thermo

Scientific Multiskan™ FC en una placa w96, utilizando 100 uL de volumen final, incubando a 37 °C y agitando a 250 rpm.

El título de viriones se medía por ensayo en placa, eliminando previamente todas las bacterias por centrifugación (ya que algunas o la mayoría podían ser lisógenos, que producirían más viriones). Realizábamos las diluciones pertinentes e incubábamos 100 uL de fagos con 100 uL de una dilución 1/5 de un cultivo saturado de bacterias ( $DO \geq 1$ ) durante 5 minutos, para luego añadir esta mezcla a 0,65 mL de top-agar (LB-agar al 0,8%, en vez del 2% estándar de las placas) y verterlo inmediatamente sobre placas W6 de LB-agar + CaCl<sub>2</sub>. Se contaron las calvas después de una incubación durante toda la noche (en adelante, ON) a 37 °C. El título de lisógenos se medía también mediante ensayo en placas, vertiendo diluciones seriadas del cultivo de infección (más los 0,65 mL de top-agar) en placas de agar suplementadas con kanamicina 50 µg/mL, y contando después la cantidad de colonias obtenidas, para calcular la concentración de Unidades formadoras de colonias (CFUs).

#### *Evolución experimental de fagos lisogénicos.*

La evolución experimental de los fagos lisogénicos se desarrolló realizando pases seriados de viriones y lisógenos conjuntamente. La población inicial era la mezcla de viriones y lisógenos generada cuando los lisógenos de phi3T se cultivan ON en LB-kanamicina, que producen aproximadamente  $(3 \pm 3) \times 10^8$  PFUs/mL y  $(1 \pm 3) \times 10^8$  CFUs/mL de viriones y lisógenos, respectivamente. Realizamos pases del cultivo de lisógenos, diluyendo 1/100 el paso anterior, y sin añadir bacterias no infectadas. Después de los pases 5, 10, 15 y 20, almacenamos alícuotas del cultivo con glicerol a -80 °C.

### ***Competencia y cuantificación de fracción de variantes por qPCR***

Realizamos un experimento de competencia entre la variante WT de phi3T, y una híbrida phi3T-spbeta de la que disponíamos en el laboratorio, la cual presenta la mayor parte de su genoma idéntico al phi3T-WT, salvo por una recombinación en la región que afecta a los genes que van del *phi3T\_20* al *phi3T\_27*, en la cual posee los homólogos de spbeta (*yomE-yomI*). Esta variante se comporta de forma similar a la silvestre (WT), salvo por el hecho de que produce menos viriones cuando sus lisógenos crecen en solitario. El punto inicial de la competencia fue una mezcla 1:1 de un cultivo ON de lisógenos de ambas variantes, el cual, previa dilución 1/100, se mezclaba con una dilución 1/100 de un cultivo ON de bacterias no infectadas, y se dejaba crecer hasta que el sistema alcanzara una DO estable de en torno a 2. Posteriormente, recogemos un extracto del tubo, el cual diluimos 1/100 y mezclamos nuevamente con una dilución 1/100 de bacterias, comenzando así el siguiente pase de competencia. Realizamos este proceso durante 6 pases, evaluando el resultado de competencia en los pases 2, 4 y 6. Para ello, medimos el título de viriones generados tras el crecimiento en esos pases, y realizamos una qPCR del extracto crudo de esos pases de competencia. Dicha qPCR se realizó con dos parejas de cebadores que responden únicamente a la variante WT o la híbrida, respectivamente. De entre varias parejas testadas, seleccionamos aquellas que presentaban una eficacia de amplificación superior a 95% e inferior a 105%, con lo cual podemos asumir una amplificación homogénea de ambas variantes, por lo que el cociente entre ambas coincide con el valor  $2^{-\Delta Ct}$ .

Los cebadores utilizados fueron:

Phi3T-WT forward: 'ACTGTTTCACGATTTGTTGTACC'.

Phi3T-WT reverse: 'GTATGCAAACGTTTTTTGAAT'.

Phi3T-Hyb forward: 'ACTGTTTCACGATTTGTTGTACC'.

Phi3T-Hyb reverse: 'ATATGCAAACGTTTTTTGCAC'.

---

# **CAPÍTULO 1**

---



---

**INTERACCIONES DIRECTAS:  
COMPLEMENTACIÓN  
GENÉTICA, DIVERSIDAD Y  
ADAPTABILIDAD.**

---

## **Estudio de la complementación genética durante la co-transmisión.**

El primer capítulo de la tesis consistió en un estudio teórico/experimental del efecto de la diversidad genética durante la co-transmisión de variantes. Como hemos mencionado, la transmisión colectiva de virus, ya sea por azar debido a un alto ratio entre partículas infectivas y células hospedadoras, o debido a estructuras especializadas, permite que muchas infecciones virales comiencen con más de un genoma. El objetivo de este capítulo es estudiar los posibles efectos de que, dentro de un determinado grupo de infección, exista cierta variabilidad genética. Como discutimos en la Introducción, se ha especulado que la complementación genética entre variantes podría contribuir a paliar el efecto de mutaciones deletéreas, fenómeno que puede ser importante en poblaciones virales debido a su alta tasa de mutación, especialmente los de cadena simple de ARN (Vignuzzi et al., 2006; Borderia et al., 2015; Luring and Andino, 2010; Domingo and Perales, 2018; Villarreal and Witzany, 2015; Andino and Domingo, 2015; Leeks et al., 2018).

### ***Modelos de Wright-Fisher con mutación selección.***

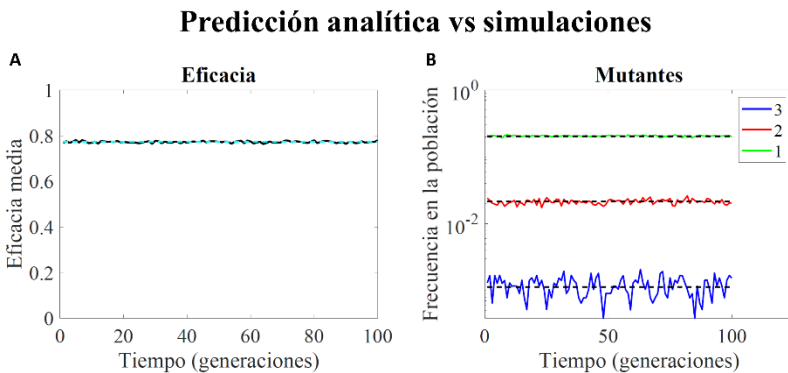
Para estudiar el efecto de la diversidad biológica en infecciones múltiples, realizamos dos tipos de simulaciones estocásticas basadas en modelos de Wright-Fisher, a los que añadíamos el equilibrio mutación-selección. En ambos casos la población consiste en un número constante de genomas virales,  $S$ , agrupados en infecciones de tamaño  $m$ . Para mantener siempre constante número de genomas independientemente del tamaño de las unidades infecciosas, el número total de infecciones por generación es  $S/m$ .

La variable  $m$  representa, por tanto, la cMOI, valor que puede ser mayor que 1 debido a un alto ratio viriones/células susceptibles, o debido a la transmisión por CIUs, como explicamos en la Introducción. Cada una de las  $m$  secuencias consiste en una cadena binaria de  $n$  genes esenciales, por lo que cada grupo de infección se representa con una matriz  $m \times n$ . En cada generación, la población consiste en  $S/m$  matrices binarias. Para construir la siguiente generación, se realizan  $S$  rondas de selección aleatorias, que determinan los genomas de la siguiente generación. En el caso más simple posible tenemos grupos de tamaño 1 ( $m = 1$ ), cada grupo conteniendo un único genoma, y siendo todos los genomas funcionales, por lo que su eficacia es  $1/S$ . Cada genoma tiene, por tanto, una probabilidad  $1/S$  de generar una infección en cada ronda de selección, lo que conlleva una probabilidad  $1 - (1 - 1/S)^S$  de formar parte de la siguiente generación.

### ***Modelo de mutaciones letales.***

Con el modelo de mutaciones letales, cada gen podía ser funcional ('1'), o no funcional como resultado de una mutación ('0'). Asumimos que al menos una copia funcional de cada uno de los genes era necesaria (y suficiente) para producir una infección exitosa, y que el número de copias genéticas funcionales no tenía ningún efecto sobre la producción de progenie. Para ello, asignamos la misma eficacia biológica a cada infección funcional, independientemente de si contenía solo una o varias copias funcionales de cada gen, siempre y cuando haya al menos un gen funcional (es decir, un '1') en cada una de las  $n$  posiciones. En cada generación, cada gen que forma parte de una secuencia seleccionada puede mutar a una copia no funcional con probabilidad  $\alpha$ , ignorando las mutaciones reversas. Como los genes sólo tienen dos estados posibles y la producción viral es independiente del número de copias genéticas funcionales, la eficacia de

cada grupo será  $1/(S/m)_F$  o 0 si no contiene copias funcionales de algún gen, siendo ' $(S/m)_F$ ' el número de grupos funcionales. La eficacia media de la población es igual a la fracción de células infectadas que experimentan una infección productiva. Con el caso simple de  $m = 1$ , la eficacia media de la población es simplemente la fracción de genomas con todos sus genes no mutados, es decir:  $\bar{w} = (1 - \alpha)^n$ . De la misma forma, como todos los genomas con mutaciones son completamente eliminados en cada generación, la abundancia media de genomas con  $k$  mutaciones será simplemente la probabilidad de tener ese número  $k$  de mutaciones en cada generación en una misma secuencia, que se puede calcular con la distribución binomial (la probabilidad de mutantes con  $k$  cambios, habiendo  $n$  genes, es:  $P_k = \binom{n}{k} \alpha^k (1 - \alpha)^{(n-k)}$ ). En la Figura 1.1 podemos ver que las simulaciones cumplen estas predicciones analíticas.



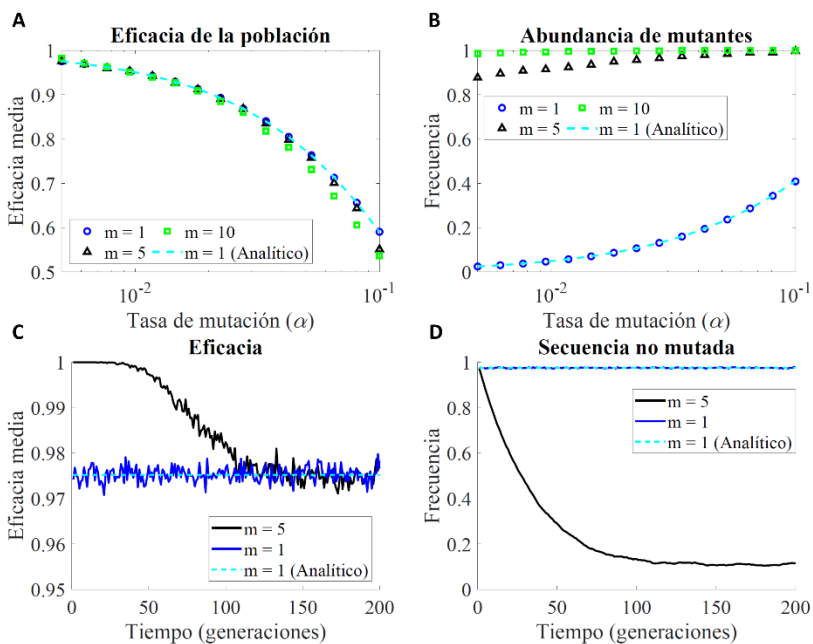
**Figura 1.1. Modelo Wright-Fisher con mutaciones letales. A.** Mostramos la eficacia media de la población (en negro) en una simulación y, sobreimpresionada en cian punteado, la predicción analítica, correspondiente a la ecuación:  $\bar{w} = (1 - \alpha)^n$ . **B.** De la misma simulación, mostramos la frecuencia de mutantes simples (verde), dobles (rojo) y triples (azul), sobreimpresionando una vez más las predicciones analíticas, correspondiente a la frecuencia teórica de dichos mutantes calculada con la distribución binomial. **Parámetros.**  $S = 10^4$ ,  $\alpha = 0,05$ ,  $n = 5$ ,  $m = 1$ .

### *Transmisión colectiva.*

A continuación, estudiamos el efecto de la complementación genética de las mutaciones letales con la transmisión colectiva, utilizando grupos de varios tamaños ( $m = \{1,5,10\}$ ). Para ello, establecimos que, dentro de un grupo, una única copia funcional de cada gen era necesaria y suficiente para que las infecciones fueran exitosas. De esta forma, un grupo formado por dos secuencias, en el que una de ellas tenga todos sus genes funcionales, y el otro una o varias copias mutadas, tiene la misma eficacia que uno en el que ambas secuencias tengan todos sus genes funcionales. Igualmente, un grupo formado por dos secuencias con algunos genes mutados también tiene la misma eficacia, siempre y cuando esas mutaciones no afecten al mismo gen, en cuyo caso la eficacia del grupo es nula. El proceso de selección de cada genoma que formará parte de la siguiente generación tiene dos fases: (1) primero seleccionamos un grupo de entre todos los que son funcionales, y (2) luego una secuencia dentro de dicho grupo (proceso que se repite  $S$  veces para seleccionar los  $S$  genomas de la población). Para la selección intra-grupo consideramos que todos los genomas tienen la misma eficacia, salvo en el caso de secuencias interferentes, que presentaremos más adelante.

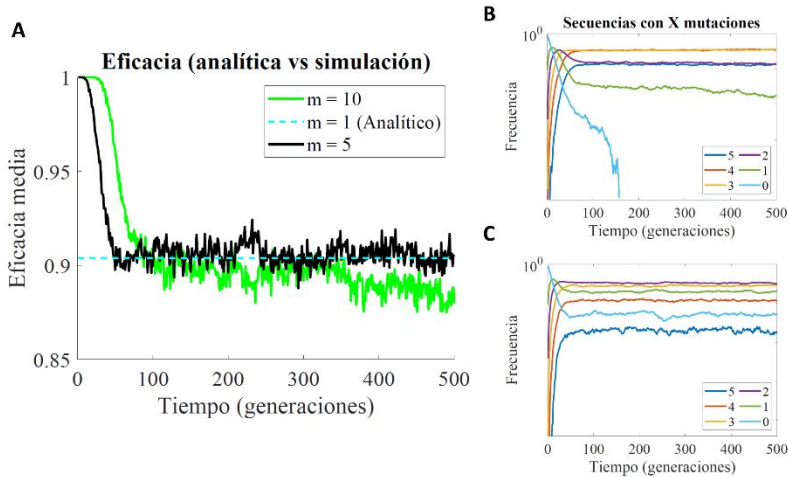
Con las reglas de complementación y selección descritas anteriormente, realizamos múltiples simulaciones variando la tasa de mutación ( $\alpha$ ) y el tamaño de grupo ( $m$ ). Tras 200 generaciones (suficiente para que el sistema llegue al equilibrio), medimos la eficacia media de la población y la abundancia media de mutantes, como vemos en la Figura 1.2. El resultado muestra claramente que la transmisión colectiva ( $m > 1$ ) no aumenta la eficacia media de la población (Figura 1.2A), sino que esta es igual, o en algunos casos incluso inferior, al caso de transmisión individual ( $m = 1$ ). En cambio, sí que se observa un aumento en la abundancia de las secuencias mutantes (Figura 1.2B). Analizando la dinámica temporal del

sistema, lo que observamos es que la transmisión colectiva inicialmente mantiene alta la eficacia media de la población, reduciendo el efecto de las mutaciones letales. Sin embargo, dichas mutaciones aumentan progresivamente su abundancia, disminuyendo con ello la eficacia de la población, hasta llegar al mismo punto de equilibrio que en el caso de transmisión individual (Figura 1.2C-D).



**Figura 1.2. Efecto de la complementación genética de mutaciones letales en co-transmisión.** **A.** Eficacia media de las poblaciones en equilibrio con diferente tamaño de grupo, en función de la probabilidad de mutación de un alelo funcional a uno no funcional. **B.** Frecuencia de secuencias con al menos una mutación en la población en equilibrio. **C.** Eficacia media de la población en una simulación. **D.** Frecuencia de secuencias mutantes en una simulación. **Parámetros:**  $S = 10^4$ . En **C-D**:  $\alpha = 0,001$ . En **A-B** se muestra la media y el error estándar de la media (SEM, inapreciable en la mayoría de casos) de 100 simulaciones, con 200 generaciones. En todos los paneles mostramos  $m = 1$  en azul,  $m = 5$  en negro y  $m = 10$  en verde, además de la predicción analítica para  $m = 1$  en línea punteada en cian.

En la Figura 1.2A se aprecia que, con tasas de mutación suficientemente altas, la eficacia media alcanzada en el equilibrio por los sistemas de transmisión colectiva ( $m > 1$ ) llega a ser inferior al sistema de transmisión individual. Además, podemos ver que el sistema de grupos de 10 se desvía de la eficacia teórica con tasas de mutación inferiores al caso de grupos de 5. En la Figura 1.3 mostramos la diversidad de mutantes y la eficacia media de la población en uno de los puntos en los que la población de 10 ya se diferencia de la predicción analítica, pero no así el sistema de grupos de 5. En 1.3A se aprecia cómo la eficacia media de los grupos de 10 disminuye rápidamente al punto de equilibrio teórico, coincidiendo con la extinción de la secuencia no mutada (Figura 1.3B). Posteriormente, oscila en torno a este valor, para luego disminuir y oscilar en torno a un punto ligeramente inferior. En el caso  $m = 5$  solo observamos la primera caída, hasta el punto de equilibrio analítico, y sin la extinción de ningún tipo de mutantes, ni siquiera de la secuencia no mutada (Figura 1.3C). Se trata del fenómeno de catástrofe de error: la tasa de mutación es tan alta que lleva a la pérdida de la información genética. En este caso, debido a la complementación, la población no colapsa, pero su eficacia sí disminuye. A mayor complementación (debido a un mayor número de secuencias por grupo), menor es el umbral de mutación requerido para que el sistema entre en esta dinámica.



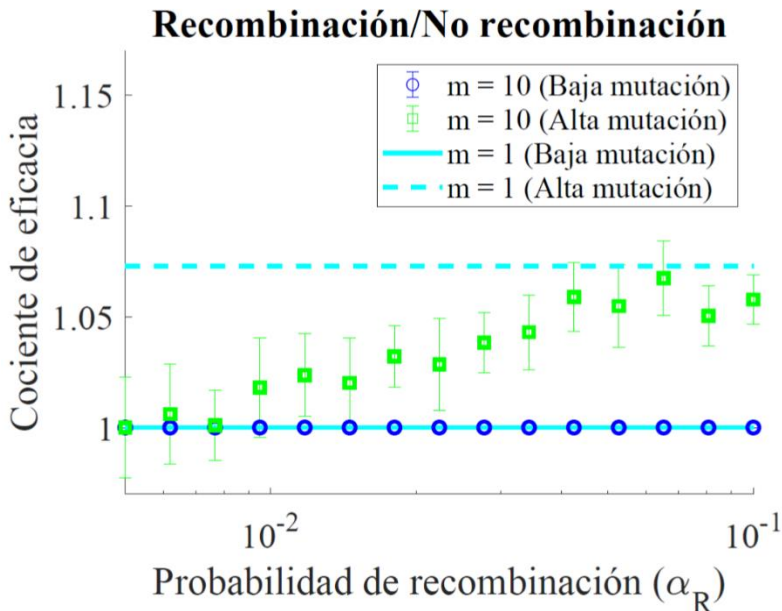
**Figura 1.3. La complementación conlleva la reducción de la eficacia debido a la acumulación de mutaciones deletéreas.** **A.** Eficacia media de la población en una simulación, con un valor de tasa de mutación que lleva al sistema de  $m = 10$  a reducir la eficacia media respecto al caso de transmisión individual, no siendo así con  $m = 5$ . **B.** Frecuencia de secuencias mutantes en el sistema de grupos de 10. **C.** Frecuencia de secuencias mutantes en el sistema de grupos de 5. **Parámetros:**  $S = 10^4$  y  $\alpha = 0,01$ . En **A**  $m = 5$  en negro y  $m = 10$  en verde, además de la predicción analítica para  $m = 1$  en línea punteada en cian. En **B-C** las líneas de colores representan la frecuencia de secuencias no mutadas (cian), y secuencias con entre 1 y 5 mutaciones, en verde, morado, amarillo, rojo y azul, respectivamente.

#### *Efecto de la recombinación.*

Finalmente, también analizamos el posible efecto de la recombinación, ya que este fenómeno solo puede ocurrir en contextos de co-infección entre variantes diferentes. Para ello, en los grupos con más de una secuencia ( $m > 1$ ), introducimos una probabilidad  $\alpha_r$  de que se genere una nueva secuencia mediante un reordenamiento aleatorio de dos secuencias parentales. Con cada evento de recombinación se generaba un número entero aleatorio ( $I$ ) entre 1 y  $n$ , y la secuencia recombinada estaría compuesta por los genes desde uno hasta  $I$  de una secuencia, y desde  $I + 1$



hasta  $n$  de otra secuencia. Descubrimos que los efectos negativos de la transmisión colectiva en la eficacia de la población se compensan parcialmente con la recombinación, siempre en el caso de población bajo la catástrofe de error, pero necesitando para ello altas tasas de recombinación (Figura 1.4). Se trata de un resultado intuitivo, ya que la recombinación permite recuperar secuencias libres de mutaciones.



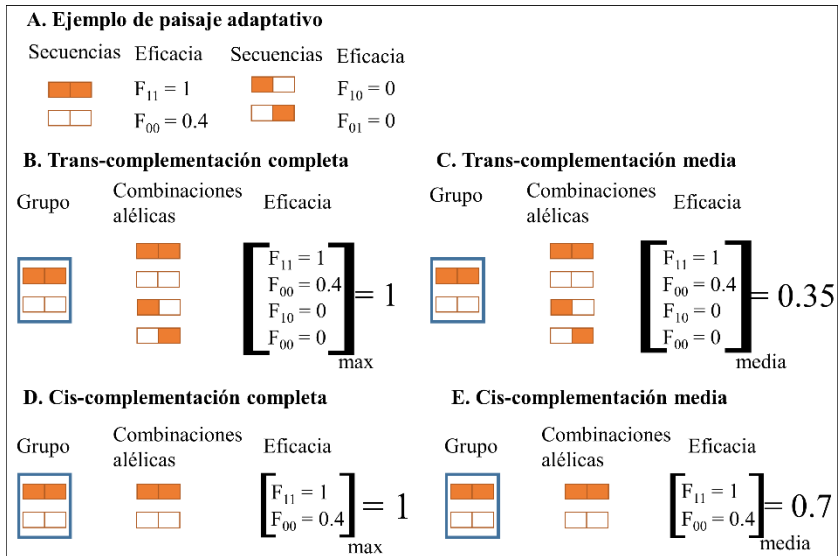
**Figura 1.4. Efecto de la recombinación en la eficacia.** Mostramos el cociente entre las eficacias promedio alcanzadas en equilibrio por una población con una determinada probabilidad de recombinación, frente a la eficacia media alcanzada en ausencia de recombinación. En azul mostramos las simulaciones con baja probabilidad de mutación ( $\alpha = 0,001$ ), y en verde con alta probabilidad de mutación ( $\alpha = 0,1$ ). En cian continuo y punteado mostramos el cociente entre la eficacia media de las poblaciones en ausencia de complementación ( $m = 1$ ) y la de la población de grupos de 10 en ausencia de recombinación. **Parámetros.**  $S = 10^4$  y  $m = 5$ . Mostramos la media de 100 simulaciones y el SEM, con 200 generaciones.

### ***Complementación genética en un paisaje adaptativo.***

Con los resultados anteriores, podemos concluir que la co-trasmisión de variantes no es capaz de aumentar la eficacia de las poblaciones virales por efecto de la complementación genética de mutaciones deletéreas, pero que sí es capaz de aumentar la diversidad genética en dichas poblaciones. Nos preguntamos a continuación si dicho aumento de la diversidad podría conllevar un aumento en la adaptabilidad. Para estudiar este fenómeno, modificamos nuestro modelo de Wright-Fisher, haciendo que las mutaciones no sean deletéreas *per se*. En el nuevo modelo, la población sigue estando formada por  $S$  secuencias binarias, pero ahora a cada secuencia se le asigna una eficacia en función de un mapa genotipo-fenotipo, también conocido como paisaje adaptativo o paisaje de eficacia (del inglés *fitness landscape*). Cada posición de la cadena se sigue representando únicamente con ‘1’ o ‘0’, pero estos ya no significan funcional y no funcional, sino simplemente estados diferentes, como alelos diferentes de un gen, o nucleótidos alternativos de una posición de un gen. La eficacia de cada secuencia o grupo de secuencias es calculada en función de los alelos que presenta, utilizando modelos de paisajes adaptativos que asignan un determinado valor cuantitativo a una secuencia binaria. En el caso simple de  $m = 1$ , cada secuencia posee una determinada eficacia,  $w_i$ , lo que le confiere una probabilidad  $P_i = w_i / \sum_j^S w_j$  de ser seleccionada en cada ronda de selección, y una probabilidad total de  $1 - (1 - w_i / \sum_j^S w_j)^S$  de formar parte de la siguiente generación. Al igual que en el modelo anterior, cada secuencia seleccionada tiene una probabilidad  $\alpha$  de mutar cada uno de sus alelos, pero siendo bidireccional en este caso.

Al igual que en el modelo anterior, aumentando el valor de  $m$  simulamos poblaciones de infecciones múltiples. El factor determinante es el modo de calcular la eficacia de los grupos que contenían varias secuencias distintas,

para lo cual usamos diferentes modelos (resumidos en la Figura 1.5). En primer lugar, consideramos la trans-complementación genética clásica, por la cual genes de diferentes genomas comparten sus productos génicos para generar un fenotipo común (en este caso, la eficacia de la infección). Para simularla, primero determinamos todas las posibles combinaciones de alelos producidas por las secuencias de un grupo, y luego utilizamos el paisaje adaptativo predefinido para calcular la eficacia de cada una de estas combinaciones alélicas. Por ejemplo, en los grupos de tamaño dos ( $m = 2$ ) formados por las secuencias [1-1] y [0-0] hay cuatro combinaciones alélicas posibles: [1-1], [1-0], [0-1] y [0-0]. Una vez obtenidas las eficacias correspondientes a dichas secuencias, la eficacia del grupo se calcula de dos formas alternativas: como la eficacia de la combinación alélica más apta presente en el grupo (Figura 1.5B), o como la eficacia media de todas las combinaciones alélicas (Figura 1.5C). La primera representa alelos dominantes, en los que una sola copia de un gen es suficiente para recuperar el fenotipo asociado más apto (trans-complementación completa), mientras que la segunda representa un sistema en el que la dosis génica determina el fenotipo (trans-complementación media).



**Figura 1.5. Modelo Wright-Fisher de paisaje adaptativo.** **A.** Ejemplo de paisaje adaptativo epistático, en el que existe un máximo absoluto en [1-1], un máximo local en [0-0], y dos secuencias intermedias de eficacia nula [1-0] y [0-1]. **B-C.** Modelos de trans-complementación, en los que la eficacia de los grupos depende de todas las combinaciones alélicas posibles, considerando todos los alelos de cada posición de entre todas las secuencias del grupo. La eficacia del grupo se calcula como la de la combinación más apta (**B**, trans-complementación completa) o como la media de todas las combinaciones (**C**, trans-complementación media). **D-E.** Modelos de cis-complementación, en los que la eficacia de los grupos depende de las secuencias específicas presentes en el grupo, sin considerar las combinaciones entre alelos de diferentes secuencias. La eficacia del grupo se calcula como la de la secuencia más apta (**D**, cis-complementación completa) o como la media de todas las secuencias (**E**, cis-complementación media).

También modelamos un tipo diferente de complementación, en el que los elementos de una secuencia no representaban diferentes *loci*, sino diferentes posiciones dentro de un *locus* (nucleótidos o aminoácidos). Este modelo, al que denominamos ‘cis-complementación’, ya no considera todas las combinaciones alélicas de las secuencias de los grupos, sino cada secuencia real presente en un grupo (Figura 1.5D-E). Siguiendo con el

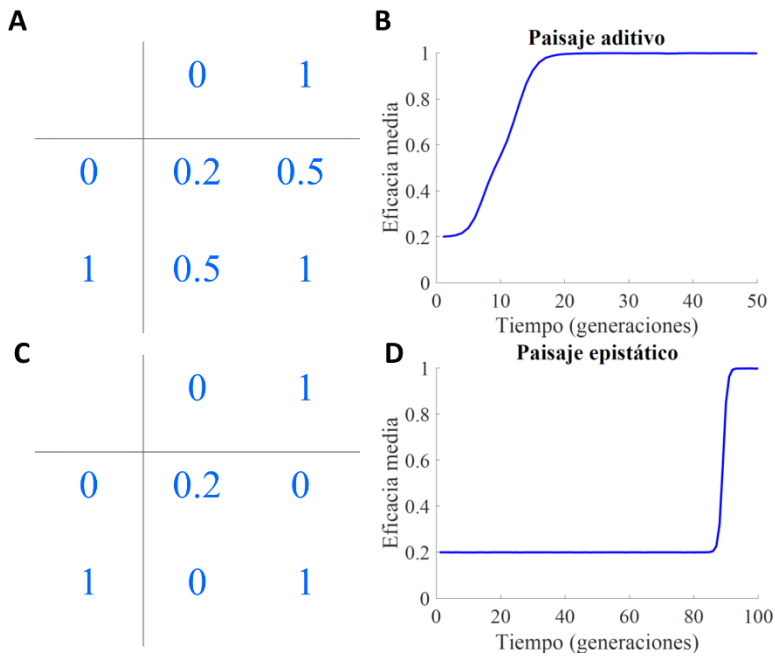
ejemplo anterior, en un grupo con las secuencias [1-1] y [0-0], calculamos sólo la eficacia de esas secuencias en concreto, sin considerar las combinaciones [1-0] y [0-1], que requieren mezclar alelos de dos secuencias distintas. La epistasia conformacional (Ortlund et al., 2007) es un ejemplo de esta situación, en la que un único gen debe acumular varias mutaciones para producir una proteína con un fenotipo diferente. Como en el caso anterior, la eficacia del grupo se calcula como la eficacia de la secuencia más apta (cis-complementación completa, Figura 1.5D), o como la media de todas las secuencias dentro del grupo (cis-complementación media, Figura 1.5E).

Una vez más, el proceso de selección se realiza en dos pasos. Una vez definidos los grupos de secuencias (las infecciones de cada generación), calculamos la eficacia de cada grupo ( $w_g$ ) utilizando las reglas definidas anteriormente. A continuación, obtenemos la eficacia competitiva intra-grupo de cada secuencia individual, que es la misma para todas las secuencias en ausencia de secuencias defectivas. Así, la probabilidad de una secuencia  $i$  dentro de un grupo  $g$  de ser seleccionado en cada ronda de selección es  $P_{i|g} = 1/m \times w_g / \sum_j^{S/m} w_j$ .

#### *Sistema simple de dos loci, dos alelos, dos secuencias.*

Comenzamos este estudio con el caso más simple posible: un sistema de dos *loci*, con dos alelos por *locus*, y con grupos de dos secuencias. En este sistema existen cuatro secuencias individuales ([0-0], [1-0], [0-1] y [1-1]) y 10 pares de secuencias diferentes. Es fácil imaginar que, si el paisaje adaptativo es estrictamente aditivo, en el que existe un único punto máximo de eficacia absoluto, y al que se llega añadiendo mutaciones que siempre aumentan la eficacia, el sistema llegará a dicho equilibrio rápidamente, dependiendo de la tasa de mutación, la ventaja de eficacia conferida por las

mutaciones y el tamaño poblacional. Podemos simular un escenario de este tipo con un paisaje como el que usamos en la Figura 1.6A, en el que existe un mínimo absoluto ( $w_{00} = 0,2$ ), dos estados de eficacia intermedia ( $w_{10} = w_{01} = 0,5$ ) y un máximo absoluto ( $w_{11} = 1$ ). En estas condiciones, la evolución por mutación-selección lleva al sistema rápidamente al óptimo global (Figura 1.6B).

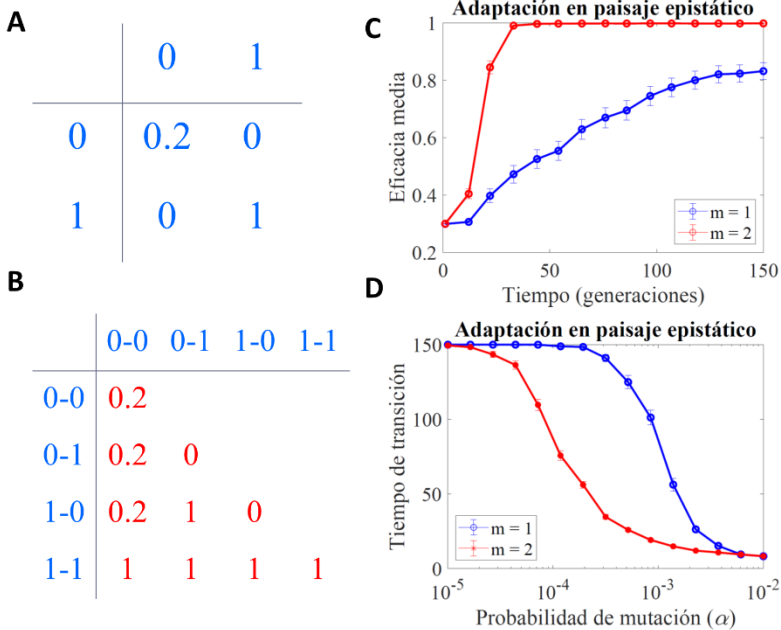


**Figura 1.6. Adaptabilidad en diferentes paisajes adaptativos. A.** Paisaje adaptativo aditivo correspondiente a un sistema de dos *loci* con dos alelos por *locus*. **B.** Eficacia media de la población correspondiente a una simulación del modelo con el paisaje aditivo. **C.** Paisaje adaptativo epistático correspondiente a un sistema de dos *loci* con dos alelos por *locus*. **D.** Eficacia media de la población correspondiente a una simulación del modelo con el paisaje epistático. **Parámetros.**  $S = 10^4$  y  $\alpha = 0,001$ .

Sin embargo, la adaptabilidad se ve comprometida si dicho paisaje adaptativo no es estrictamente aditivo, sino que presenta interacciones epistáticas, lo que lleva a que el efecto de una mutación no sea siempre beneficioso, sino que depende del estado de otras posiciones de la secuencia. Con nuestro modelo podemos simular un paisaje epistático haciendo que el sistema presente, además del máximo absoluto, uno o varios máximos locales. Se trata de estados con eficacia intermedia, alejados del máximo absoluto por más de una mutación. Esto conlleva que, para que el sistema pase de un máximo local al máximo absoluto, deba pasar por, al menos, un estado intermedio de menor eficacia que ambos. Este tipo de paisajes adaptativos se suelen llamar rugosos, haciendo referencia a un valle con varias colinas de diversa altura (los máximos locales y el máximo global), separadas por zonas de valle de menor altura (los estados intermedios de baja eficacia), en contraposición con los paisajes adaptativos lisos, que representarían una subida lineal desde cualquier punto del mapa al máximo absoluto. Con nuestro modelo podemos simular un paisaje adaptativo epistático con un sistema tal que  $w_{11} = 1$ ,  $w_{00} = 0,2$  y  $w_{10} = w_{01} = 0$  (Figura 1.6C). De esta forma, la secuencia [1-1] sigue siendo el máximo global, la secuencia [0-0] el máximo local, y las secuencias [1-0] y [0-1] estados intermedios de baja eficacia (nula en este caso). Como vemos en la Figura 1.6D, el sistema tarda mucho más en alcanzar el máximo global, ya que la única posibilidad es que ocurra un evento de mutación doble en la misma secuencia.

Para estudiar el efecto de la complementación genética durante la co-transmisión, agrupamos las secuencias como en el apartado anterior, y utilizamos las diversas reglas de complementación, descritas anteriormente. Comenzamos el estudio con el modelo de trans-complementación completa, por la cual la eficacia de un grupo se calcula como la eficacia máxima de entre todas las combinaciones alélicas posibles

que se podrían formar con las secuencias del grupo. En la Figura 1.7A-B podemos ver una tabla con todas las combinaciones de secuencias y su eficacia correspondiente dado el paisaje descrito. Simulamos este sistema únicamente con grupos de tamaño 2 ( $m = 2$ ), y se aprecia en 1.7C-D que la ventaja de adaptabilidad frente a la transmisión individual ( $m = 1$ ) es evidente, ya que el sistema de grupos requiere muchas menos generaciones para alcanzar el punto de máxima eficacia, dadas las mismas tasas de mutación.



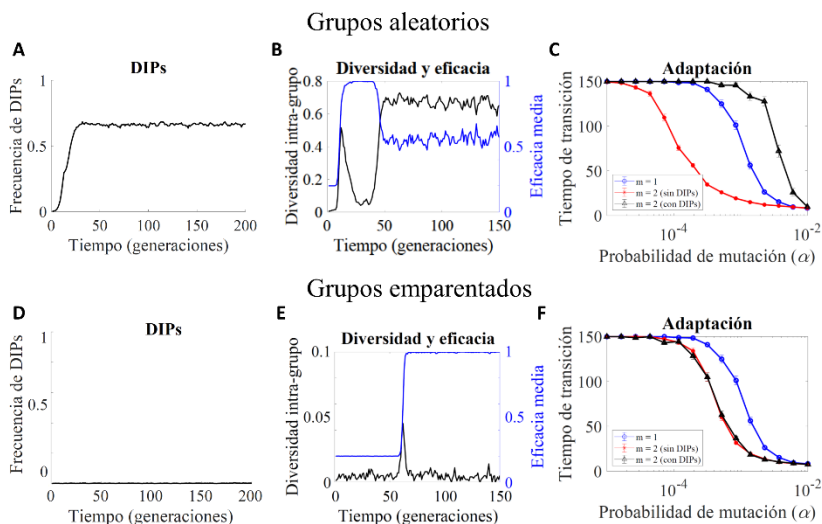
**Figura 1.7. Efecto de la complementación genética en la adaptabilidad con paisajes epistáticos.** **A.** Paisaje adaptativo epistático (mismo que en 1.6C). **B.** Matriz de todas las interacciones posibles y la eficacia de los grupos correspondientes, usando el modelo de trans-complementación máxima. **C.** Eficacia media de la población a lo largo de 100 simulaciones con transmisión individual (azul) y con grupos de tamaño 2 (rojo), mostrando la media y la SEM cada 10 generaciones. **D.** Tiempo medio en el que las poblaciones alcanzan el estado de máxima eficacia (en el que la eficacia media es superior a 0,95), a lo largo de 100 simulaciones.



Mostramos la media y la SEM, para sistemas de transmisión individual (azul) y grupos de 2 (rojo). Si la transición no ocurre, asignamos 150, ya que es el número máximo de generaciones simuladas. **Parámetros:**  $S = 10^4$ . En C:  $\alpha = 0,002$ .

### *Partículas defectivas y parentesco genético.*

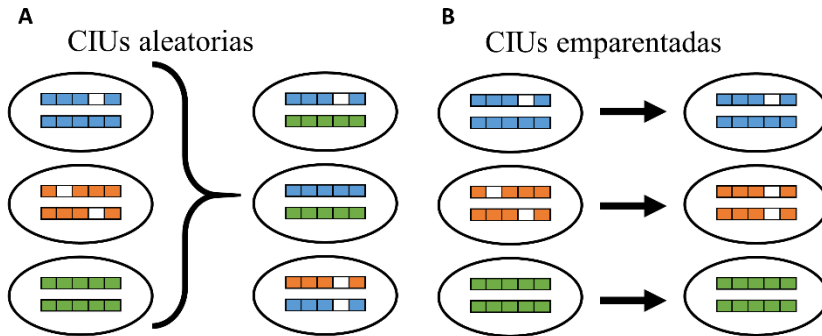
A continuación, introducimos en el sistema los parásitos genéticos más importantes de los virus, las partículas defectivas interferentes o DIPs, que actúan como tramposos sociales al co-infectar con variantes WT. Para introducir las DIPs en el modelo, simulamos secuencias con las dos características principales de este tipo de genomas virales: pierden una parte de sus genes debido a deleciones, y presentan una ventaja competitiva frente a las WT en co-infección. En cada generación, las secuencias normales tenían una probabilidad  $\alpha_D$  de mutar a una DIP. Para cada secuencia dentro de un grupo, la probabilidad de ser seleccionada en cada ronda se vuelve  $P = w_g / \sum_{j=1}^{S/m} w_j \times \beta_i / \sum_{j=1}^m \beta_j$ . De este modo, la eficacia intra-grupo,  $\beta$ , no afecta a la eficacia del grupo, sólo a la probabilidad de que las secuencias que son parte de un mismo grupo sean seleccionadas para la siguiente generación, una vez seleccionado dicho grupo. Consideramos una ventaja promedio de 5 a 1 de las DIPs frente a las secuencias WT ( $\beta_W = 1$  y  $\beta_D = 5$ ). Para simular las deleciones, que suponen la pérdida de una parte importante de los genes esenciales, al generar una DIP, un número aleatorio de sus genes (desde la posición 1 hasta como máximo la posición  $n$ ) ya no se tienen en cuenta nunca para la complementación, y los grupos formados únicamente por DIPs tienen siempre eficacia 0. Comprobamos que estos parásitos se apoderan de la población y reducen tanto su eficacia media como la adaptabilidad ganada por la complementación (Figura 1.8A-C).



**Figura 1.8. Efecto de las DIPs en poblaciones con grupos aleatorios y grupos emparentados.** **A.** Frecuencia de DIPs en una simulación con grupos aleatorios de tamaño 2. **B.** Diversidad genética intra-grupo y eficacia media de la población en una simulación con DIPs y grupos aleatorios ( $m = 2$ ). **C.** Tiempo medio de transición hacia el estado de máxima eficacia en poblaciones de transmisión individual (azul), y poblaciones de grupos de tamaño 2 aleatorios con DIPs (negro) y sin DIPs (rojo). **D-F.** Mostramos las mismas simulaciones que en **A-C**, pero con grupos emparentados. **Parámetros:**  $S = 10^4$  y  $\alpha_D = 0,001$ . En **A-B** y **C-D**:  $\alpha = 0,002$ . En **C** y **F** se muestra la media y SEM de 100 simulaciones.

El parentesco genético entre los cooperadores es fundamental a la hora de evitar la invasión de tramposos. En el caso de virus y otros microorganismos, la estructura poblacional es una de las formas más eficaces de aumentar dicho parentesco. En el caso de virus que se transmiten mediante CIUs, existen varios ejemplos de transmisión en los que la agrupación de viriones tiene lugar extracelularmente, y por tanto se pueden mezclar genomas procedentes de diferentes células infectadas, como es el caso de los agregados de viriones de VSV o VIH, o la transmisión a una MOI general alta. Por otro lado, cuando la co-transmisión ocurre por medio de vesículas extracelulares que contienen

viriones, las cápsides poliploides o los cuerpos de oclusión, así como por transmisión célula-célula, todos los genomas que infectan una célula provienen de la misma célula anterior, restringiendo las interacciones a genomas ‘hermanos’. En nuestro modelo, la agrupación de genomas se hacía tomando todas las secuencias de la población, por lo que simulaban CIUs del primer tipo, a las que llamamos CIUs aleatorias (Figura 1.9A). Para estudiar el efecto de la transmisión de genomas emparentados, introducimos el parentesco genético haciendo que todas las secuencias que infectan un grupo en una generación provengan del mismo grupo de la generación anterior (grupos emparentados, en contraposición con los grupos aleatorios usados hasta ahora). Descubrimos que este tipo de estructuras aumentan el parentesco genético lo suficiente como para evitar la invasión de las DIPs (Figura 1.8D).



**Figura 1.9. Modelos de CIUs.** **A.** CIUs aleatorias, en las que los genomas procedentes de un grupo en una generación pueden provenir de cualquier grupo de la generación anterior. **B.** CIUs emparentadas, en las que los genomas pertenecientes a un grupo en una generación provienen todos del mismo grupo de la generación anterior.

Como se aprecia comparando los paneles B y E de la Figura 1.8, el mayor impacto de la transmisión por grupos emparentados se encuentra a nivel de

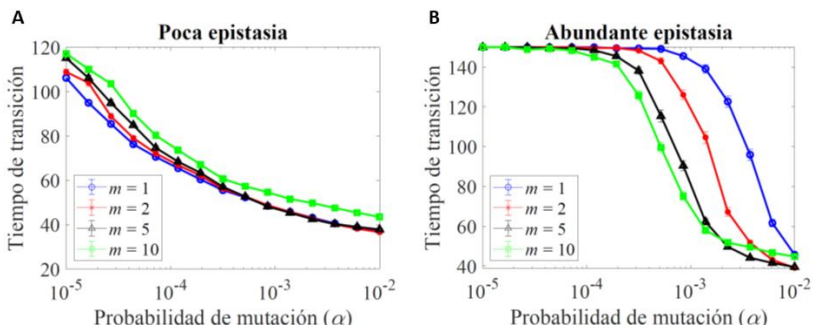
la diversidad genética intra-grupo. En el caso de grupos aleatorios, observamos un primer pico de diversidad, correspondiente a la transición entre el estado de baja y alta eficacia, que luego disminuye cuando la secuencia 1-1 se impone en la población. Seguidamente, se observa un segundo pico de diversidad, correspondiente a la expansión de las DIPs, que es concomitante con la reducción de la eficacia de la población. La diversidad en este caso se mantiene, ya que existe una convivencia entre las DIPs y las secuencias WT (Figura 1.8A). En el caso de grupos emparentados, observamos el primer pico de diversidad, correspondiente a la adaptación, pero no el de la expansión de las DIPs. Las CIUs emparentadas restringen las interacciones a genomas derivados del mismo grupo previo, evitando que las DIPs se expandan de un grupo a otro, y por tanto manteniéndolas a una frecuencia muy baja (Figura 1.8D). Este aumento de parentesco y la consiguiente disminución de diversidad disminuyen la adaptabilidad en comparación al sistema de grupos aleatorios si no hubiera DIPs, pero protege al sistema de estos tramposos a la par que permite una adaptabilidad superior comparada con el sistema en ausencia de complementación genética (Figura 1.8F).

#### *Sistema multi-loci y tamaño de grupo.*

En todos los resultados anteriores utilizamos el sistema simple de dos *loci*, y grupos de tamaño dos. Para generalizar el modelo para múltiples *loci* y grados de epistasia, utilizamos modelos  $NK$  aleatorios (Kauffman and Weinberger, 1989). Estos paisajes de eficacia se construyen al azar, creando secuencias de longitud  $N$  con  $K$  interacciones epistáticas. Los valores de eficacia de las secuencias se calculan como una contribución aleatoria de cada una de las  $N$  posiciones. La epistasia se introduce haciendo que la contribución de cada una de las posiciones no dependa sólo

de su estado (0 o 1), sino también del estado de otras  $K$  posiciones aleatorias.  $K = 0$  produce un paisaje de aptitud puramente aditivo (no epistático), mientras que  $K = N - 1$  produce un paisaje totalmente aleatorio con correlación cero entre secuencias vecinas. Si se aumenta  $K$ , se incrementa el número de interacciones epistáticas de cada *locus* y, en consecuencia, el número de máximos locales.

Decidimos utilizar siempre una  $N$  de 5, y explorar diferentes valores de  $K$ . Este valor de  $N$  puede parecer bajo, ya que en el genoma de la mayoría de organismos existen muchos más *loci*. Sin embargo, el número de *loci* que intervienen en un mismo proceso, y por tanto pueden tener interacciones epistáticas, no es tan alto, por lo que nuestra aproximación de 5 es adecuada. Mantener un  $N$  bajo, además, nos permitía reducir mucho los tiempos de computación de las simulaciones. Como era de esperar, el aumento de  $K$  dificulta en general la optimización evolutiva. Con una epistasia mínima ( $K = 1$ ), observamos que la co-transmisión ( $m > 1$ ) es neutra, o incluso ligeramente perjudicial, para la adaptabilidad (Figura 1.10A), mientras que con paisajes con abundante epistasia ( $K = 4$ ), la adaptabilidad se ve fuertemente favorecida por la co-transmisión, efecto que es mayor cuanto mayor es el tamaño de los grupos (Figura 1.10B).

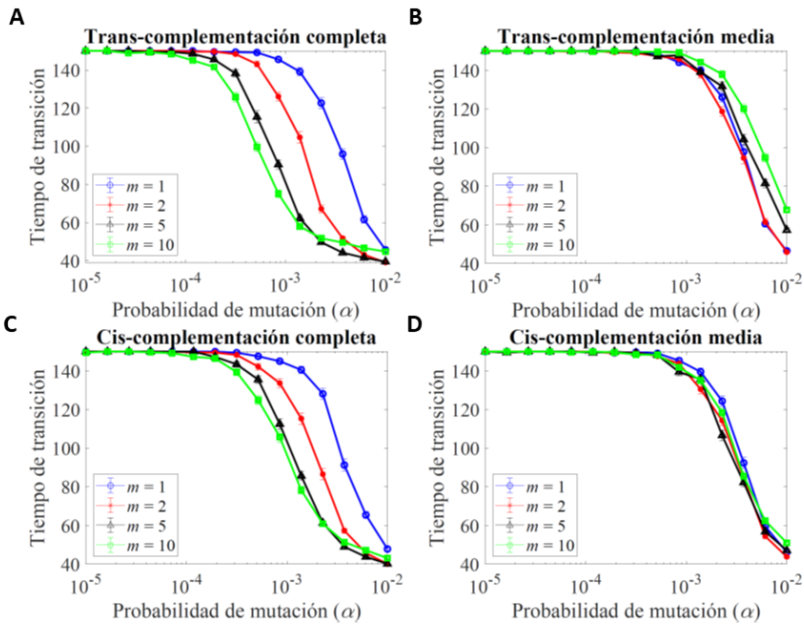


**Figura 1.10. Adaptabilidad con sistema multi-*loci* de diferente grado de epistasia. A:** Adaptabilidad en un paisaje con poca epistasia ( $N = 5$ ,  $K$

= 1). **B.** Adaptabilidad en un paisaje con abundante epistasia ( $N = 5$ ,  $K = 4$ ). Mostramos el tiempo medio de transición hacia el estado de máxima eficacia en poblaciones de transmisión individual (azul), y poblaciones de grupos de tamaño 2 (rojo), 5 (negro) y 10 (verde). **Parámetros:**  $S = 10^4$  y  $\alpha_D = 0,001$ , usando el sistema de grupos emparentados y de trans-complementación completa. Se muestra la media y SEM de 100 simulaciones.

### *Modelos de complementación.*

Hasta ahora, en todas las simulaciones asumíamos el modelo de trans-complementación completa (Figura 1.5B), que asume una complementación máxima entre alelos de diferentes secuencias dentro de los grupos. Para estudiar otros contextos biológicos, empezamos por la trans-complementación media, en la que la eficacia asignada a un grupo era igual a la media de todas las combinaciones de alelos en el grupo. Se trata de un modelo que simula una situación en la que la dosis génica determina el fenotipo, en contraposición con la complementación completa, en la que un solo alelo del fenotipo de alta eficacia era suficiente para expresar dicho carácter. Estudiamos la adaptabilidad de este sistema en un paisaje epistático ( $N = 5$ ,  $K = 4$ ), ya que es el único en el que encontramos ventaja para la co-transmisión, y en un sistema con DIPs y CIUs emparentadas. En la Figura 1.11B podemos ver que este sistema tiene una adaptabilidad claramente menor que la trans-complementación completa (Figura 1.11A, misma que Figura 1.10B), siendo incluso menor al caso de transmisión individual.



**Figura 1.11. Efecto del grado de complementación en la adaptabilidad.** Adaptabilidad en un paisaje con abundante epistasia ( $N = 5$ ,  $K = 4$ ). **A.** Trans-complementación completa (misma figura que 1.10B). **B.** Trans-complementación media. **C.** Cis-complementación completa. **D.** Cis-complementación media. Mostramos el tiempo medio de transición hacia el estado de máxima eficacia en poblaciones de transmisión individual (azul), y poblaciones de grupos de tamaño 2 (rojo), 5 (negro) y 10 (verde). **Parámetros:**  $S = 10^4$  y  $\alpha_D = 0,001$ . Se muestra la media y SEM de 100 simulaciones.

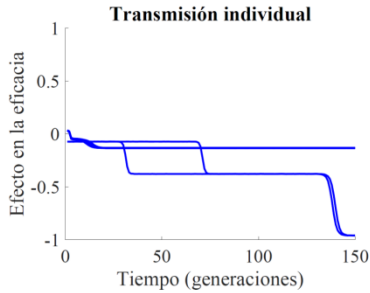
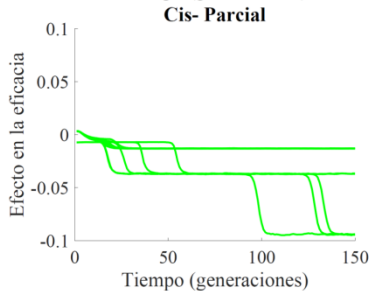
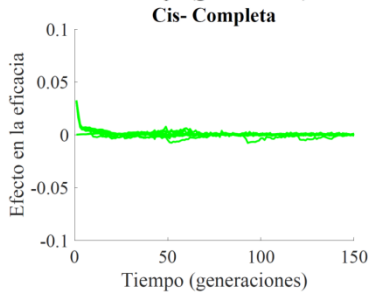
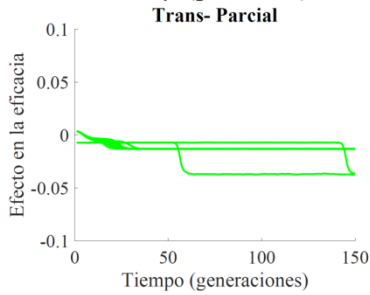
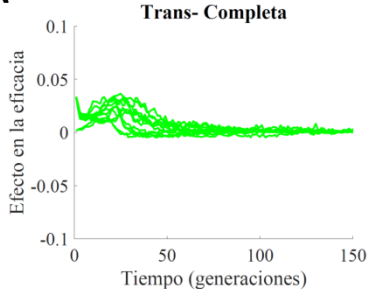
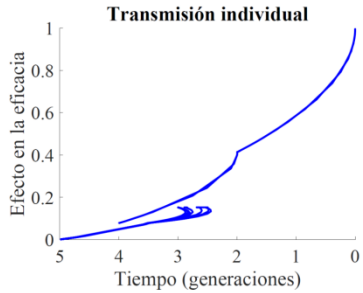
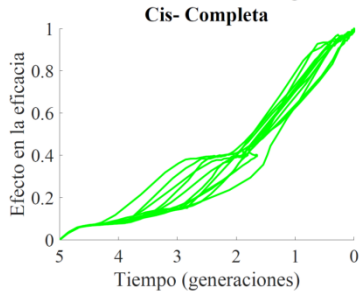
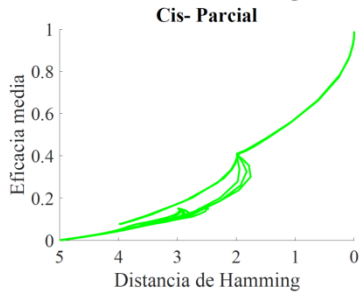
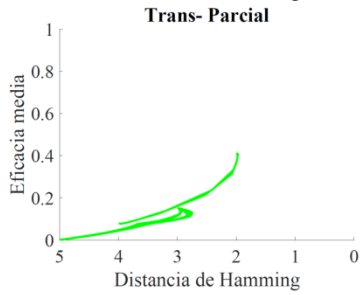
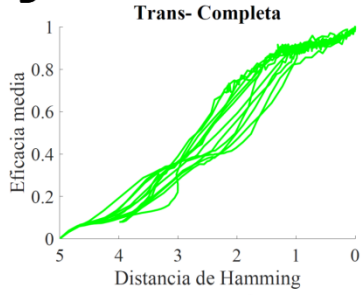
Finalmente, también analizamos la adaptabilidad con los modelos de cis-complementación, en los cuales la eficacia de los grupos no viene determinada por la complementación entre alelos de diferentes secuencias, sino por la eficacia de cada secuencia individual. Las secuencias, en este caso, no simulan genomas, sino genes o proteínas. De forma análoga al modelo de trans-complementación, también analizamos dos alternativas para calcular la eficacia del grupo en función de las de las secuencias: en el modelo cis-complementación completa (Figura 1.5D) se toma la eficacia de la secuencia más apta, mientras que en el modelo de cis-

complementación media (Figura 1.5E), el promedio de las eficacias de las todas secuencias del grupo. En la Figura 1.11C-D comparamos el resultado de ambas versiones del modelo, en las mismas condiciones que las simulaciones anteriores (paisaje epistático, DIPs y CIUs emparentadas), encontrando un resultado similar: el modelo de cis-complementación completa confiere más adaptabilidad al sistema que el modelo cis-complementación media. También observamos que la cis-complementación completa presenta una adaptabilidad reducida frente a la trans-complementación completa, aunque es un efecto muy ligero.

Los resultados anteriores muestran que tanto la trans- como la cis-complementación completa promueven la adaptabilidad, siendo mucho menor, cuando no perjudicial, el efecto de la complementación media. El hecho de que la ventaja mayoritaria se encuentre en que la complementación sea completa, en vez de en la contribución de alelos de diferentes secuencias (que no ocurre en el modelo cis), indica que el principal efecto de la complementación radica en la capacidad para amortiguar el efecto negativo de las mutaciones deletéreas, y no en el acceso a combinaciones de diferentes secuencias. Para entender más en profundidad este fenómeno, realizamos nuevas simulaciones en las que estudiamos el efecto de las mutaciones en la eficacia de los grupos. Para ello, en cada generación, medimos la eficacia de los grupos antes y después de mutar cada uno de los alelos de cada una de las secuencias, de forma independiente, y calculamos la diferencia, que no es más que el efecto en la eficacia de cada mutación. Observamos en la Figura 1.12A que este efecto es nulo en el caso de los modelos de complementación completa, y negativo en los modelos de complementación parcial o la transmisión individual. Por otro lado, también inspeccionamos las trayectorias evolutivas en el paisaje de eficacia ( $N = 5$ ,  $K = 4$ ). En la Figura 1.12B representamos la eficacia media de la población en función de la distancia



Hamming media de la población a la secuencia más apta (óptimo global), con varias simulaciones que comienzan en secuencias diferentes. Según avanzan las generaciones, la distancia media va disminuyendo, y conforme a esto, la eficacia media aumenta. En el caso de los modelos de complementación parcial y la transmisión individual, la mayoría de las poblaciones se quedan sistemáticamente atrapadas en máximos locales sub-óptimos. En cambio, las poblaciones con complementación completa son capaces, por lo general, de alcanzar el máximo global.

**A****B**

**Figura 1.12. Caminos evolutivos a través del paisaje adaptativo. A.** Efecto medio de las mutaciones a lo largo de las generaciones **B.** Eficacia media de la población en función de la distancia media de Hamming a la secuencia óptima. El punto de inicio son los valores altos de la distancia de Hamming, que corresponden a valores bajos de eficacia media de la población. Cada línea de color corresponde a una simulación, con una secuencia inicial diferente. **Parámetros:**  $S = 10^4$ ,  $\alpha = 0,002$  y  $\alpha_D = 0,001$ , con 150 generaciones y grupos emparentados.

En conjunto, estos resultados nos indican que la complementación permite la exploración de nuevos caminos en el paisaje adaptativo, al amortiguar los efectos de las mutaciones deletéreas. En el caso de mapas de eficacia con poca o nula epistasia, esta complementación no es necesaria para llegar en pocas generaciones al óptimo global (Figura 1.10A). En cambio, en el caso de mapas de eficacia con abundante epistasia (valores alto de  $K$ ), la complementación se vuelve fundamental. La transmisión en grupo abre nuevos caminos hacia el máximo global, ya que permite la acumulación transitoria de secuencias de baja eficacia, que en el caso de la transmisión individual serían inmediatamente purgadas por la selección. Sin embargo, este efecto sólo se aprecia si la complementación genética es completa, y por tanto es capaz de amortiguar totalmente el efecto de las mutaciones deletéreas. En cambio, si la complementación es parcial, y las secuencias intermedias entre picos reducen la eficacia de los grupos en los que se encuentran, el efecto positivo se pierde.

### **Estudio experimental del efecto de la co-transmisión en la adaptabilidad de VSV.**

Con el resultado teórico acabado, decidimos explorar experimentalmente la principal predicción del modelo: que la transmisión colectiva es capaz

de potenciar la adaptabilidad. Nuestro organismo modelo para el estudio de la transmisión colectiva era el virus VSV, que sabemos que es capaz de presentar complementación genética durante la co-transmisión, ya sea mediante agregados, o simplemente por una alta MOI general.

### ***Evolución experimental con parentesco genético.***

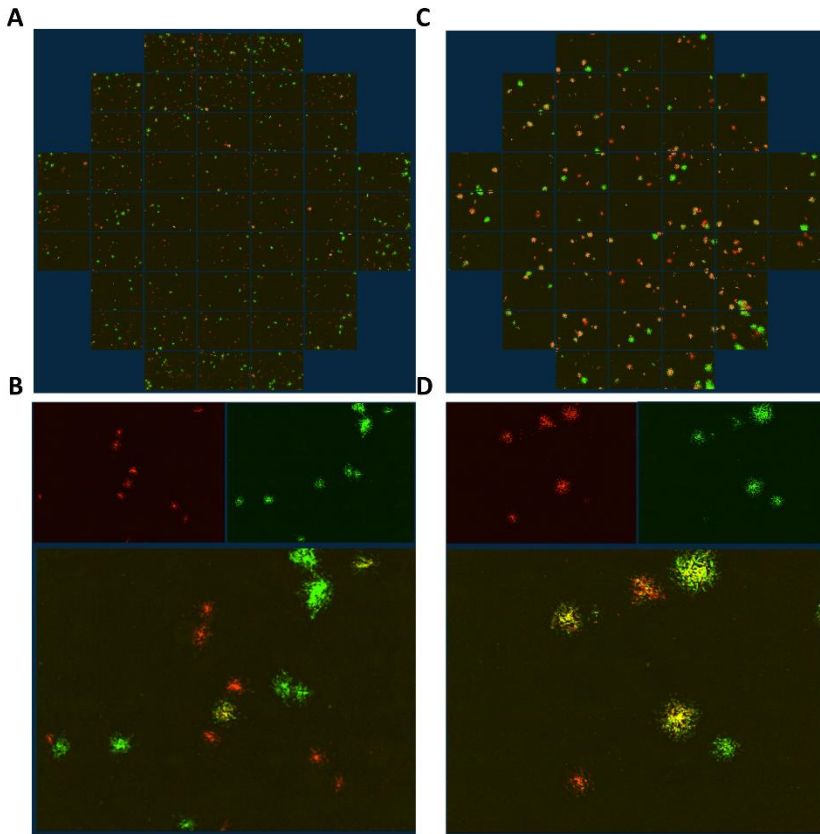
La evolución experimental es el estudio de procesos evolutivos en condiciones controladas de laboratorio. Para realizar este tipo de ensayos con virus, realizamos infecciones encadenadas, en las que las partículas infectivas generadas en una infección (pase X), son utilizadas para realizar una nueva infección (pase X + 1), de forma tal que la población irá acumulando mutaciones progresivamente que serán fijadas, eliminadas o mantenidas a cierta proporción por selección, mutación o deriva genética. Como hemos mencionado, elegimos VSV como organismo modelo, ya que sabemos que sus co-infecciones presentan complementación genética. Sin embargo, por resultados experimentales ya publicados (Andreu-Moreno and Sanjuán, 2020), sabemos que cuando VSV es transmitido mediante agregados, o a alta MOI, se acumulan DIPs en muy pocos pases de evolución, algo coherente con nuestro modelo de CIUs aleatorias. Para realizar una evolución experimental en la que haya transmisión colectiva, pero que además mantuviera cierto grado de parentesco entre las variantes co-transmitidas, ideamos un sistema de transmisión de células infectadas por VSV. La idea era realizar infecciones en las que las partículas infectivas fueran células infectadas previamente. Como hemos mencionado, la transmisión célula-célula es un vehículo de transmisión colectiva que restringe las interacciones a partículas derivadas de la misma célula. Se trata del requisito que impone nuestro modelo en las CIUs emparentadas, que deberían contener la emergencia de DIPs. Estas células

infectadas, al ser colocadas en placas nuevas sobre un césped de células susceptibles, deberían liberar un gran número de viriones. Para potenciar la co-infección en las células de la vecindad, realizamos infecciones en agar, que reduce la difusión de los viriones, y, por tanto, aumentan la MOI local.

En primer lugar, generamos un stock de células co-infectadas, y comprobamos su capacidad para co-transmitir genomas diferentes cuando iniciaban una nueva infección. Para ello, inicialmente infectamos una placa p100 confluyente a una MOI de 5, de dos variantes de VSV: VSV-mCherry, y VSV-GFP, de forma tal que la inmensa mayoría de las células quedaran infectadas con ambas variantes. Pasadas apenas 4 horas, recogimos las células infectadas. Para ello, primero eliminamos el medio de infección, y posteriormente realizamos 10 lavados con PBS, a fin de eliminar la mayor cantidad posible de viriones libres. Posteriormente, levantamos las células de la placa con tripsina (con el mismo protocolo usado para subcultivos), y las trasvasamos a tubos de 1,5 mL, en un 1 mL de medio DMEM. Centrifugamos las células a 300xg 5 minutos, eliminamos el medio, y resuspendimos en medio nuevo, para continuar eliminando viriones remanentes. Realizamos estos lavados por triplicado, y finalmente guardamos 20 alícuotas de las células con DMSO a -80 °C, que supuso nuestro stock ancestral para la evolución.

Para comprobar si este stock estaba ausente de viriones, y si contiene mayoritariamente células co-infectadas capaces de co-transmitir diferentes variantes, realizamos una primera infección en DMEM-agar, y por microscopía de fluorescencia a tiempo real, comprobamos el progreso de las infecciones provenientes de estas células infectadas. En la Figura 1.13A-B se aprecia que la mayoría de los focos de infección presentaban solo una de las dos variantes (90% de los focos presentan solo mCherry o GFP). Esto podía deberse a dos motivos: Por un lado, que las células,

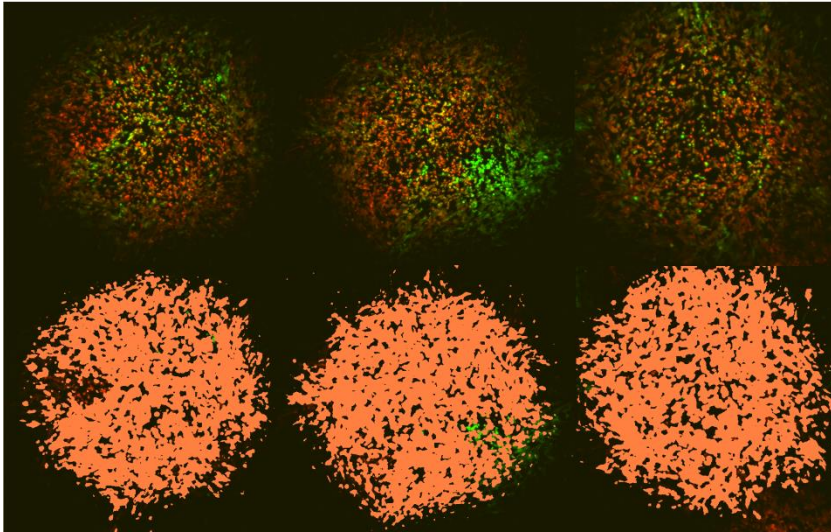
aunque fueran co-infectadas, solo producían partículas infecciosas de una de las dos variantes. Por otro lado, también podía deberse a que, por muchos esfuerzos de lavado que realizamos, los viriones siempre estaban en mayor cantidad que las células infectadas recuperadas. Para discernir entre ambas, realizamos una nueva infección con el stock de células, en la que previamente a la incubación de infección, realizamos una incubación del stock con un anticuerpo neutralizante (Ac) durante 5 minutos a 37 °C, haciendo que la inmensa mayoría de los viriones quedaran inactivos. Posteriormente, centrifugamos y re-suspendemos dos veces para eliminar los restos de Ac, y procedemos a infectar una nueva monocapa de células. En la Figura 1.13C-D podemos comprobar cómo, a la misma dilución, el número de focos de infección disminuye considerablemente con la incubación con Ac, y que además aumenta significativamente el número de focos infectados por ambas variantes (70% de los focos con las dos marcas).



**Figura 1.13. Análisis de las células co-infectadas y su capacidad de co-transmitir variantes en infecciones en medio semisólido. A.** Infección con el stock de células doblemente infectadas, sin Ac, sobreimpresionando en naranja el área con las dos marcas fluorescentes (rojo mCherry y verde GFP), y fusionando las imágenes correspondientes a los canales de rojo y verde. **B.** Mostramos una sección de la imagen A. Arriba ambos canales por separado (rojo y verde), y abajo la fusión de ambas imágenes. **C-D.** Infección con el stock de células doblemente infectadas, pero con una previa incubación con Ac.

Una vez comprobado que las células co-infectadas sí son capaces de co-transmitir variantes, analizamos si dicha co-transmisión se mantiene a lo largo de las sucesivas infecciones. En las primeras 16 hpi apreciamos que los focos co-infectados presentaban células con doble marca tanto en el centro como en los bordes del mismo (Figura 1.14), debido a que el agar

limita mucho la difusión de los viriones y genera una MOI local alta, manteniendo así un alto grado co-transmisión de diferentes variantes.



**Figura 1.14. Focos de infección en DMEM-agar 0,8% a 16 hpi.** Mostramos tres focos de una infección en agar con el stock de células doblemente infectadas (con las variantes VSV-WT-GFP y VSV-WT-mCherry), previa incubación con Ac, a 16 hpi. Arriba: Fusión de las imágenes de los canales de rojo y verde. Abajo: Mismas imágenes, sobrepresionando en naranja el área que contiene las dos marcas fluorescentes. Se mantiene la co-transmisión en los bordes del foco, correspondiente a infecciones de segundo ciclo.

Los pases de evolución, en el caso de la evolución por células infectadas, se realizaban de la siguiente manera:

1. Incubamos las células stock o pase correspondiente, a una dilución que genere una media de 500 focos por pocillo, con un Ac, durante 5 minutos a 37 °C.
2. Realizamos dos lavados por centrifugación para eliminar el anticuerpo.

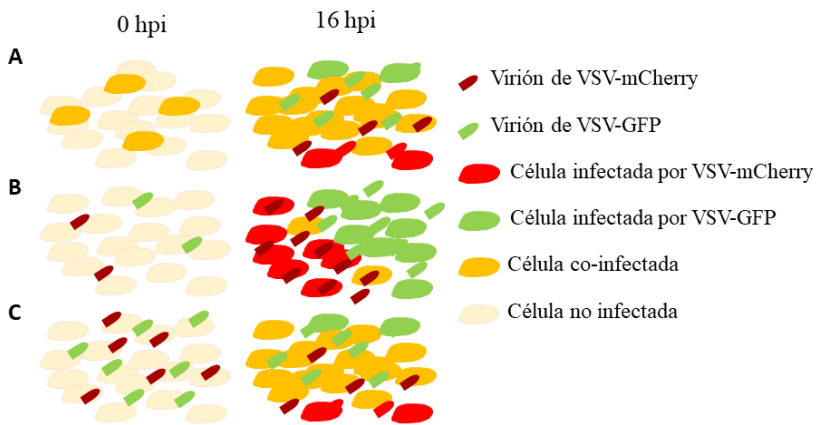


3. Incubamos a 37 °C grados durante 45 minutos, y tras lo cual se añadía el medio DMEM-agar.
4. La infección se realizaba durante 12 horas, en el IncuCyte S3, que nos permite comprobar el progreso de la misma, llevando un control en tiempo real de la infección.
5. Extraemos las células infectadas y las almacenamos con DMSO a -80 °C para realizar el pase siguiente. Para la extracción, retiramos la capa de agar con una espátula de plástico, con el mayor cuidado posible para no dañar la monocapa de células. Realizamos dos lavados con PBS, y luego extraemos las células con tripsina, de la misma forma que preparamos el stock.

### ***Estudio de la co-transmisión en la adaptabilidad a la temperatura.***

Una vez puesto a punto el método de evolución experimental, diseñamos las condiciones para comparar la adaptabilidad de VSV a infectar células BHK a una temperatura superior a la habitual: 39 °C, bajo la cual VSV alcanzaba un título de aproximadamente  $10^7$  PFUs/mL, en lugar de las  $10^9$  PFUs/mL que se alcanzan infectando BHK a 37 °C. Nuestro objetivo era comparar la adaptabilidad cuando la transmisión es individual, frente al caso de co-transmisión. Para ello, diseñamos varias condiciones de evolución diferentes. A cada una de las dos temperaturas, realizamos una evolución en agar, utilizando como partículas infectivas las células infectadas, como describimos anteriormente (Figura 1.15A). Como control, realizamos una evolución en la que usamos viriones libres como partículas infectivas, e infecciones en medio líquido, reduciendo la co-infección alrededor de las células inicialmente infectadas (Figura 1.15B). Por último, realizamos una segunda línea control igual a la anterior, pero aumentando 100 veces el inóculo inicial (Figura 1.15C). Esta última línea

control la añadimos para paliar el efecto de que, al iniciar infecciones con células, éstas liberan una gran cantidad de viriones al medio, con lo cual la cantidad total de genomas que inician la infección, en el caso de la primera condición (células como partícula infectiva), sería muy superior a la segunda, lo que le proporcionaría una clara ventaja en término de adaptabilidad (más genomas conllevan mayor probabilidad de emergencia de variantes nuevas).



**Figura 1.15. Condiciones de la evolución experimental.** **A.** Evolución experimental con células infectadas como vehículo de la infección. **B.** Evolución experimental con viriones como vehículo de la infección, con bajo inóculo ( $10^3$  PFUs iniciales). **C.** Evolución experimental con viriones como vehículo de la infección, con alto inóculo ( $10^5$  PFUs iniciales).

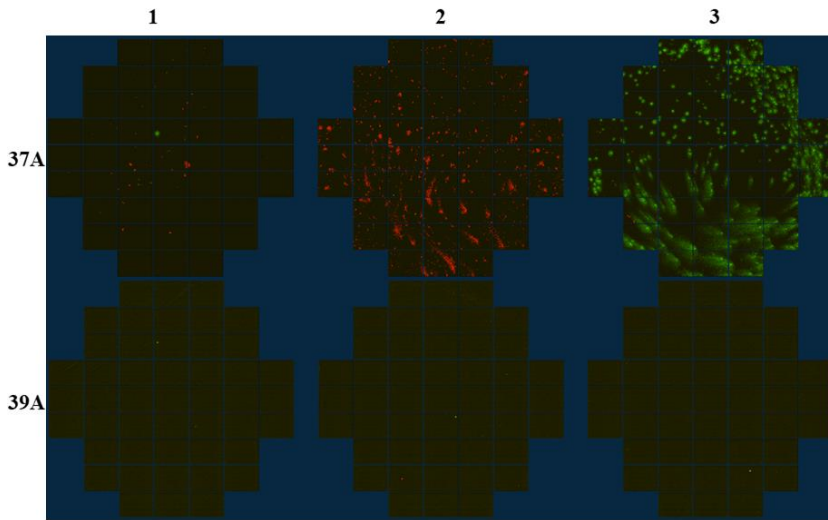
Estas tres variantes de líneas evolutivas se usaron para estudiar la adaptabilidad de VSV a infectar BHK a 39 °C, teniendo también las correspondientes líneas de evolución control a 37 °C. En la Tabla 1.1 resumimos las 6 condiciones de evolución, cada una con 3 réplicas. Para mantener un control de la capacidad de co-infección, usamos como virus ancestro una mezcla 1:1 de VSV-GFP y VSV-Cherry en el caso de las

líneas evolutivas con viriones, y un stock de células co-infectadas a alta MOI de esa misma mezcla en el caso de las líneas evolutivas con células.

Partícula infectiva/medio de infección	37 °C	39 °C
Células infectadas/DMEM-Agar	37A	39A
Viriones/DMEM-Líquido	37L	39L
Viriones (inóculo x100)/DMEM-Líquido	37LH	39LH

**Tabla 1.1 Nomenclatura y condiciones de las líneas evolutivas.**

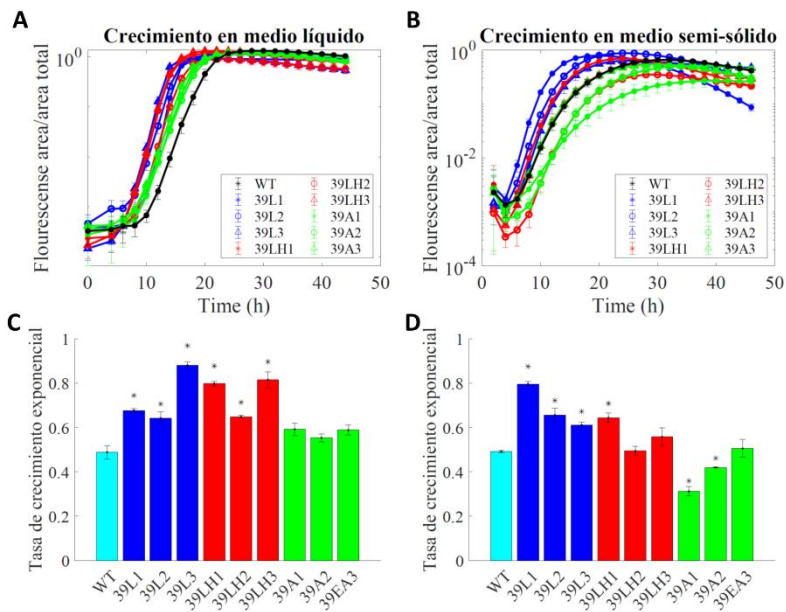
El primer resultado reseñable que tenemos es la emergencia de variantes resistentes a Ac, con sólo 5 pases de evolución. Como mencionamos antes, en las evoluciones con células era necesario incubar con Ac neutralizante, que eliminara los viriones libres remanentes después de la extracción de las células infectadas. De las 3 réplicas de evolución de la línea 37A, dos desarrollaron variantes mutantes que resistían la neutralización. Curiosamente, surgió una en una variante VSV-mCherry, y la otra en una variante VSV-GFP, como podemos ver en la Figura 1.16A. Esto nos impedía continuar con esta línea evolutiva, y por tanto con los controles a 37 °C. Sin embargo, en la Figura 1.16B vemos que ninguna variante resistente a Ac surgió en las líneas homólogas a 39 °C a pase 5, por lo cual extendimos la evolución hasta llegar al pase 10.



**Figura 1.16. Evolución de la resistencia a Ac.** Mostramos el resultado, a 16 hpi, de una infección con viriones derivados de las líneas evolutivas con células (37A **arriba** y 39A **abajo**), previa incubación con el Ac neutralizante. En ambos casos se muestra la fusión de las imágenes correspondientes a los canales de verde y rojo. El área fluorescente corresponde a células infectadas por viriones resistentes al Ac.

Con 10 pases de evolución, decidimos evaluar el comportamiento de las líneas evolutivas a 39 °C. Realizamos infecciones tanto en medio líquido como en agar, a 39 °C, y medimos el progreso de la infección mediante la expansión del área fluorescente, sumando la GFP y la mCherry. Para evaluar el crecimiento en medio líquido, utilizamos viriones libres como unidades infectivas, tanto del ancestro (mezcla 1:1 de VSV-GFP y VSV-mCherry), como de las líneas 39L y 39LH. En el caso de las líneas 39A, previo a las infecciones, obtuvimos un stock de viriones incubando en una placa vacía las células infectadas. Las curvas de crecimiento que vemos en la Figura 1.17A indican que, al menos a tiempos cortos, la mayoría de líneas se comportaban mejor que el ancestro. Para analizar estas posibles ventajas, realizamos un ajuste de dichas curvas de crecimiento a una función logística, con la ecuación  $A = K + \log(1/(1 + Ce^{-rt}))$ , siendo

A la fracción de área fluorescente. La tasa de crecimiento exponencial ( $r$ ) es el parámetro que indica cuán rápido se expande la infección a tiempos cortos. En la Figura 1.17C podemos ver que todas las líneas evolutivas de medio líquido presentan un valor significativamente superior al WT. Las líneas de agar, aunque su valor medio es ligeramente superior, no presentan diferencias significativas, por lo que asumimos que su comportamiento es similar, indicando que no hubo adaptación en dichas líneas.



**Figura 1.17. Eficacia de las líneas evolucionadas a 39 °C.** **A.** Infecciones en medio líquido, a partir de viriones, a 39 °C y una MOI de 0,001, del stock ancestro (negro), y de las líneas 39A (verde), 39L (azul) y 39LH (rojo). **B.** Infecciones en medio semisólido, a partir de células infectadas, a 39 °C y una MOI de 0,001, del stock ancestro (negro), y de las líneas 39A (verde), 39L (azul) y 39LH (rojo). **C-D.** Tasa de crecimiento exponencial ( $r$ ) del ajuste de las curvas de crecimiento a una función logística (con la ecuación:  $A = K + \log(1/(1 + Ce^{-rt}))$ ) en medio líquido (**C**) y agar (**D**). En todos los casos mostramos la media y la SEM de tres réplicas de crecimiento. En **C-D** los asteriscos indican diferencias significativas (test t-student, \* indicando p-valor < 0,05) respecto al WT.

Para las curvas de crecimiento en agar, las unidades infecciosas fueron células infectadas. Para ello, usamos las células ancestro, las células de las líneas 39A, y células infectadas por viriones de las líneas 39L y 39LH. Observamos en estas curvas de crecimiento (Figura 1.17B-D) que las líneas que mejor se comportan son las 39L (viriones a bajo inóculo). Dos de las tres líneas 39A presentan una eficacia claramente inferior a la del ancestro, mientras que la otra, en la que surgió una variante parcialmente resistente a Ac en uno de los últimos pases, se comporta de forma similar a las variantes 39L. Las líneas de viriones de alto inóculo, salvo una, también se comportan peor o similar al ancestro.

Con los datos obtenidos se aprecia que las líneas 39A no han ganado adaptabilidad frente a las otras, ya que su crecimiento es igual o inferior a líneas 39L y 39LH en las dos condiciones. Al observar su comportamiento en agar, descubrimos que las dos líneas 39A que no presentan resistencia al Ac se expanden de forma claramente peor que todas las demás, incluyendo al ancestro. Como este efecto no se aprecia en medio líquido, cuyas partículas infectivas son viriones individuales, la conclusión más plausible es que estas dos líneas evolutivas han acumulado un gran número de variantes defectivas que merman su crecimiento. Dichas variantes reducirían el crecimiento cuando las infecciones las inician células infectadas, ya que habría co-infección junto a otros genomas no defectivos. En cambio, en medio líquido, solo observaríamos el crecimiento de los viriones no defectivos, por lo que su dinámica es similar al WT.

Estos resultados nos indican que, a pesar de nuestros esfuerzos por mantener un alto grado de parentesco, durante la evolución se acumularon variantes defectivas, algo que también parece ocurrir en al menos una de las tres líneas 39LH, que presenta un crecimiento similar a las dos variantes defectivas 39A. Como la exclusión de las DIPs era condición necesaria en nuestro modelo para que la co-transmisión potenciara la adaptabilidad,

nuestros ensayos no permiten sacar conclusiones sobre la predicción del modelo respecto a la adaptabilidad, más allá del hecho de que la acumulación de variantes defectivas anularía cualquier posible ventaja de la co-transmisión, si es que esta existe.

---

# CAPÍTULO 2

---



---

**INTERACCIONES INDIRECTAS:  
EVASIÓN SOCIAL DE LA  
RESPUESTA INMUNE INNATA.**

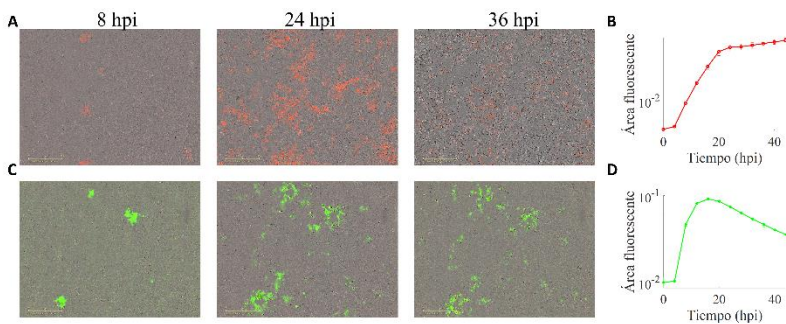
---

## **Estudio experimental de la naturaleza social de la evasión de la inmunidad innata.**

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa que deben superar los virus al inicio de las infecciones. Como mencionamos en la Introducción, el IFN tiene como objetivo principal contener el progreso de dicha infección. Sus dos acciones principales son la activación de la apoptosis en las células infectadas (autocrino y paracrino) y la activación de un estado de bloqueo de nuevas infecciones en las células no infectadas (paracrino). La naturaleza social del bloqueo o no del IFN radica en que, de una célula infectada por un virus, se provoca una respuesta (producción de IFN) que actúa no sólo sobre la célula infectada por ese individuo (actor), sino sobre otras, infectadas o que podrán serlo, por otros miembros de la población viral (receptores). De esta forma, bloquear o no la producción de IFN se vuelve, potencialmente, un carácter social, ya que afecta no sólo al individuo, sino también a otros miembros de esa población.

En esta parte del estudio, nuestro organismo modelo fue una vez más VSV, ya que sabemos que la variante WT es capaz de bloquear la producción de IFN a través de su proteína M, lo que le permite infectar muchos tipos celulares, aunque éstos sean capaces de producir y responder a IFN, como es el caso de las células MEF. Al igual que en el capítulo anterior, usamos variantes fluorescentes de VSV, con lo que podemos seguir en tiempo real el progreso de las infecciones. En la Figura 2.1A-B mostramos una infección de la variante WT de VSV en un cultivo de células MEF, la cual se extiende infectando toda la monocapa. El mutante VSV- $\Delta$ 51 tiene una delección de un triplete en la proteína M, lo que le impide llevar a cabo esta función de bloqueo del IFN, pero que no afecta al resto de sus funciones.

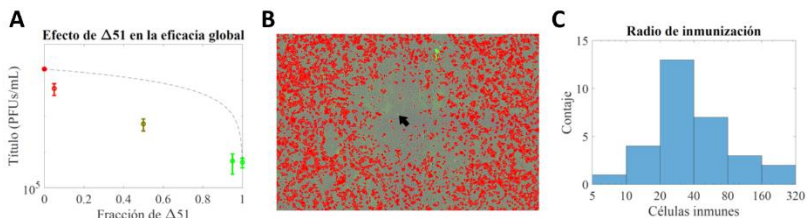
Por tanto, VSV- $\Delta$ 51 es capaz de infectar eficientemente un cultivo de células que no responden o producen IFN, pero no es capaz de extenderse en un cultivo de MEF, más allá de unas pocas células alrededor de las inicialmente infectadas. Estas pocas infecciones de segundo ciclo son posibles gracias a que el ciclo de replicación de VSV es más rápido que la producción, secreción y expresión de los genes activados por IFN en las células vecinas (Voigt et al., 2016), por lo que VSV- $\Delta$ 51 es capaz de producir viriones e infectar nuevas células antes de que estas entren en el estado antiviral. Sin embargo, pasadas unas 16/18 hpi, la mayoría de las células del cultivo se vuelven inmunes, y la infección de VSV- $\Delta$ 51 se queda bloqueada (Figura 2.1C-D).



**Figura 2.1. Infección de un cultivo de células MEF por parte de VSV-WT y VSV- $\Delta$ 51.** **A.** Infección de un cultivo de células MEF en placas W6 confluentes con  $10^3$  PFUs de VSV-WT-mCherry. **B.** Fracción del área del cultivo que presenta fluorescencia (correspondiente a células infectadas), en función del tiempo. **C.** Infección de un cultivo de células MEF en placas W6 confluentes con  $10^3$  PFUs de VSV- $\Delta$ 51-GFP. **D.** Fracción del área del cultivo que presenta fluorescencia (correspondiente a células infectadas), en función del tiempo.

Analizando el crecimiento de las variantes en células MEF, observamos que a tiempos cortos (8 hpi), VSV- $\Delta$ 51 se expande más rápidamente que la variante WT, como podemos ver comparando el avance de la

fluorescencia de GFP, frente a la mCherry a tiempos tempranos. A tiempos tardíos la variante WT se extiende por todo el cultivo, a diferencia de la  $\Delta 51$ , alcanzando el WT títulos mucho más altos (Figura 2.2A). Para estudiar el efecto de VSV- $\Delta 51$  sobre la eficacia global de la población, realizamos infecciones mixtas, las cuales presentaban un título viral mucho más bajo de lo esperado si no hubiera interacción entre las variantes. En el supuesto caso de no interacción, el título generado en co-infección debería ser la media (ponderada por la fracción inicial) de ambas variantes puras, pero vemos que esta predicción se aleja mucho de la realidad (Figura 2.2A), demostrando el efecto nocivo de VSV- $\Delta 51$  en la población viral. Para observar la naturaleza focal de la inhibición, realizamos infecciones a baja MOI con VSV- $\Delta 51$ -GFP, y seguidamente bloqueamos toda infección secundaria por medio de un Ac neutralizante. Pasadas 20 horas, infectamos el cultivo con una MOI de 10 de una variante VSV-WT-mCherry resistente al Ac, de forma tal que infectaba toda célula susceptible. En la Figura 2.2B-C se aprecia que, alrededor de las células infectadas por VSV- $\Delta 51$ -GFP (verdes) existe un área en la que muchas células no se infectan por VSV (de unas 50 en promedio), las cuales están presumiblemente en el estado antiviral inducido por el IFN sintetizado en las células infectadas inicialmente por VSV- $\Delta 51$ .



**Figura 2.2. Interacción entre VSV-WT y VSV- $\Delta 51$ .** A. Título viral obtenido a 44 hpi. Los extremos representan las infecciones puras de WT (Fracción de  $\Delta 51 = 0$ ) y  $\Delta 51$  (Fracción de  $\Delta 51 = 1$ ). Los tres puntos

intermedios representan el resultado de infecciones mixtas con fracción de  $\Delta 51$  de 0,05, 0,5 y 0,95. La línea punteada representa la media ponderada de los títulos de las infecciones puras, en función de la frecuencia inicial de cada variante. **B-C:** Área de influencia de una célula infectada por VSV- $\Delta 51$ . **B.** Infectamos un cultivo con pocas PFUs de VSV- $\Delta 51$ , bloqueamos sucesivas infecciones con un Ac neutralizante de VSV, y tras 16 hpi, realizamos una nueva infección con una variante de VSV-WT resistente a dicho Ac, a una MOI 10, de forma tal que infectaría todas las células que no se encontraran en el estado de bloqueo antiviral inducido por el IFN producido por las primeras infecciones. **C.** Por inspección visual, contamos el número de células, alrededor de cada una de las que tenían fluorescencia verde (infectadas por  $\Delta 51$ ), que no habían sido infectadas por VSV-WT debido a la inmunización por IFN. Representamos los resultados de 34 células inmunes.

### ***Modelo de evolución social para el efecto del IFN.***

Uno de los sistemas más clásicos en los que se aplica la evolución por parentesco es el crecimiento de una población en la que sus individuos producen una sustancia que aumenta la eficacia de todos los miembros de la población, aumentando así la eficacia global. Este tipo de *bienes comunes* se han descrito en multitud de organismos, como, por ejemplo, los sideróforos producidos por bacterias (West and Buckling, 2003). Si la producción de estos bienes comunes acarrea un coste directo para eficacia de los individuos que lo realizan, los productores o cooperadores se convierten en altruistas: pagan un coste en término de eficacia individual, para aumentar la eficacia de toda la población. En el caso de VSV y el IFN, lo que tenemos es una sustancia que inhibe el crecimiento de la población, y que los individuos cooperadores, presumiblemente, pagan un coste en términos de su eficacia individual para bloquear su producción. El bloqueo de este *mal común* aumenta la eficacia global de la población, que de lo contrario se vería fuertemente inhibida. Esta inhibición se evidencia en el hecho de que la eficacia media de la población se ve fuertemente afectada por la presencia de VSV- $\Delta 51$  (Figura 2.2A). Tenemos por tanto dos tipos

de individuos en este sistema, los cooperadores (W), virus VSV-WT, que bloquean la producción de IFN; y los tramposos o desertores (D), virus VSV-Δ51, que no inhiben la producción de IFN, y cuya presencia reduce la eficacia de la población.

Para estudiar el carácter social de la inhibición del IFN por parte de VSV, planteamos un modelo de partición de la eficacia (en escala logarítmica) de cada variante en función del ambiente en el que se encuentra. Para ambas variantes, tenemos las particiones:  $f_W = r_W f_{W|W} + (1 - r_W) f_{W|D}$  y  $f_D = (1 - r_D) f_{D|W} + r_D f_{D|D}$ . Los valores  $f_{W|W}$  y  $f_{D|D}$  representan la contribución de individuos W o D que se encuentren influenciados únicamente por individuos de su mismo fenotipo. Análogamente,  $f_{W|D}$  y  $f_{D|W}$  representan la contribución de individuos que encuentren en un ambiente totalmente dominado por individuos del fenotipo contrario. Las variables  $r_W$  y  $r_D$ , cuyo valor definimos entre 0 y 1, miden, en una infección mixta, cuánto está cada variante influenciada por los virus vecinos de su propio tipo o del contrario. En infecciones puras de WT y Δ51 tendríamos que  $r_W = r_D = 1$ , y por tanto,  $f_W = f_{W|W}$  y  $f_D = f_{D|D}$ .

Para cualquier individuo, estar rodeado de virus bloqueantes de IFN (W) tiene un efecto positivo en relación a estar rodeado de virus no bloqueantes (D), ya que el IFN no se libera de las células vecinas. Llamamos  $b$  a este efecto, que está determinado por la acción paracrina del IFN, y es la contribución de la población a la eficacia de cada individuo, o lo que es lo mismo, la parte indirecta de la eficacia en la teoría de la eficacia inclusiva (Bourke, 2011; Bourke, 2014; West et al., 2007b; Gardner et al., 2011). Por otro lado, llamamos  $c$  al efecto de bloquear la producción de IFN por parte de cada virus, independiente de la vecindad. Se trata por tanto de la parte directa de la eficacia, que depende del fenotipo del individuo, y del efecto del IFN sobre las células infectadas. Dado que el IFN tiene este efecto

exponencial en la eficacia de las infecciones (Figura 2.2A), analizaremos el sistema en términos de la eficacia en escala logarítmica. Tomamos como situación de referencia el crecimiento de un cultivo puro de VSV-WT, lo que nos lleva a que  $w_{W|W} = 1$ , y por tanto:  $f_{W|W} = \log_{10}(w_{W|W}) = 0$ . Tenemos, por definición, que un individuo W en un ambiente dominado completamente por individuos D, no recibirá nada del beneficio de la cooperación, por tanto:  $f_{W|D} = -b$ . Un individuo D, en un ambiente totalmente dominado por W recibiría el máximo beneficio, pero además tendría la ventaja (o desventaja, dependiendo de su signo) de no pagar el coste de bloquear IFN, por lo que:  $f_{D|W} = c$ . Finalmente, un individuo D en un ambiente D tendría la suma de ambas cantidades,  $f_{D|D} = c - b$ .

Sustituyendo estos valores en el cálculo de la eficacia de cada variante, es fácil ver que:  $f_W = -b(1 - r_W)$  y  $f_D = c - r_D b$ . En una infección mixta de ambas variantes, el carácter de bloqueo de IFN se verá favorecido si  $f_W > f_D$ , o lo que es lo mismo, si  $f_W - f_D > 0$ . Esta cantidad la podemos obtener de las relaciones anteriores:  $f_W - f_D = (r_W + r_D - 1)b - c$ , y tomando  $r = r_W + r_D - 1$ , obtenemos que el carácter será favorecido si  $rb - c > 0$ , con lo cual recuperamos la regla de Hamilton, uno de los resultados centrales de la teoría de la evolución por parentesco (West et al., 2007b; Gardner et al., 2011). Aunque  $r$  suele interpretarse como una medida de parentesco genético, en nuestro contexto se define mejor como la diferencia entre los vecindarios sociales de los individuos W y D. Por tanto, es una descripción de la estructura espacial, determinando cuánto afecta la respuesta inmunitaria (desencadenada por los individuos D) a cada variante.

Una particularidad de este sistema es que el proceso social está mediado por una proteína antiviral que difunde desde una célula infectada hacia otras (infectadas o no). Por lo tanto, el IFN actúa de forma esencialmente

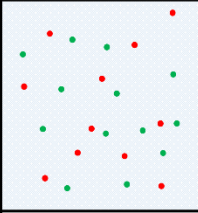
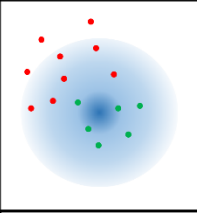
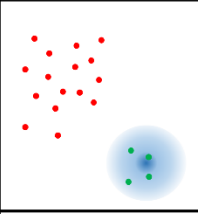
opuesta a un bien común clásico: en vez de ser una sustancia secretada por un individuo, y que favorece a los que tiene a su alrededor (West et al., 2007a), tenemos una sustancia secretada por un individuo (una infección), y que reduce la eficacia de aquellos a su alrededor. La supresión de la secreción de IFN (por parte de individuos W) crea un espacio favorable al crecimiento viral. Por otro lado, la presencia de vecinos que estimulen el IFN podría hacer ineficaz esta cooperación, ya que unas pocas infecciones de las variantes D pueden generar el suficiente IFN para inhibir casi por completo el progreso de nuevas infecciones. En la Figura 2.2A podemos ver que, a una fracción inicial del 50% de cada variante, el título está muy por debajo de la media aritmética del que generaría un 50% de infecciones de cada tipo, lo que nos indica la alta capacidad de la variante  $\Delta 51$  para inhibir el crecimiento global. Basándonos en esto, esperamos que los individuos D ejerzan un efecto muy negativo sobre los W, mientras que la variante W proporcionaría poco beneficio a D. En términos del modelo, esta predicción se establece como  $r_D > r_W$ .

### ***Cálculo de los parámetros sociales.***

Dependiendo del signo de los valores de  $b$  y  $c$ , podemos tener 4 tipos de caracteres sociales o cooperativos: Mutualista ( $b > 0$  y  $c < 0$ ), altruista ( $b > 0$  y  $c > 0$ ), egoísta ( $b < 0$  y  $c < 0$ ) o malicioso ( $b < 0$  y  $c > 0$ ). Dado el claro efecto inhibitorio que tiene el IFN sobre el crecimiento, es intuitivo que en nuestro sistema  $b$  será positivo, y estaremos ante un carácter mutualista o altruista. La clave de la diferenciación entre ambos está en el signo de  $c$ , es decir, en el efecto que tiene sobre los individuos el hecho de bloquear la producción de IFN. Dicho bloqueo puede proporcionar un beneficio directo evitando los efectos autocrinos del IFN ( $c < 0$ ), pero también puede implicar costes en términos de producción de

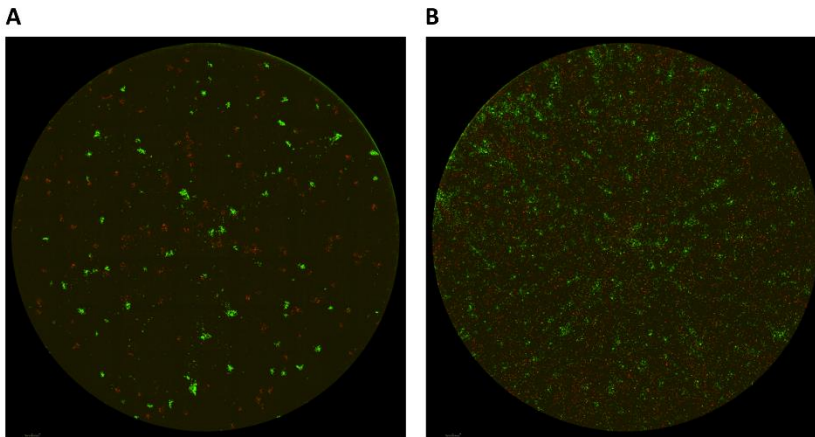


viriones ( $c > 0$ ). Planteando diferentes escenarios de competencia entre las variantes, somos capaces de calcular los valores de estos parámetros (Figura 2.3). Como mencionamos antes, en un escenario de aislamiento completo entre variantes, tenemos que  $r_W = r_D = 1$ ,  $f_W = f_{W|W}$  y  $f_D = f_{D|D}$ , y por tanto la diferencia entre las eficacias en solitario de cada variante nos da la cantidad  $f_W - f_D = b - c$  (Figura 2.3D). En una infección completamente desestructurada, tendríamos que  $r = 0$ , y por tanto  $f_W - f_D = -c$  (Figura 2.3B), teniendo además  $r_W = 1 - r_D$ . Finalmente, en una infección mixta (Figura 2.3C), con cierto grado de estructura poblacional, la diferencia de eficacia sería:  $f_W - f_D = rb - c$ , siendo  $r = r_W + r_D - 1$ .

		A	B	C	D
Modelo social					
Eficacia directa	Eficacia indirecta	W D			
	W D	0 -b			
	D	c c-b			
Eficacia inclusiva					
		$f_W = -b(1 - r_W)$	$r = 0$	$r = r_W + r_D - 1$	$r = r_W = r_D = 1$
		$f_D = c - br_D$	$r_W = 1 - r_D$	$f_W - f_D = rb - c$	$f_W - f_D = b - c$
		$f_W - f_D = rb - c$	$f_W - f_D = -c$		
		$r = r_W + r_D - 1$			

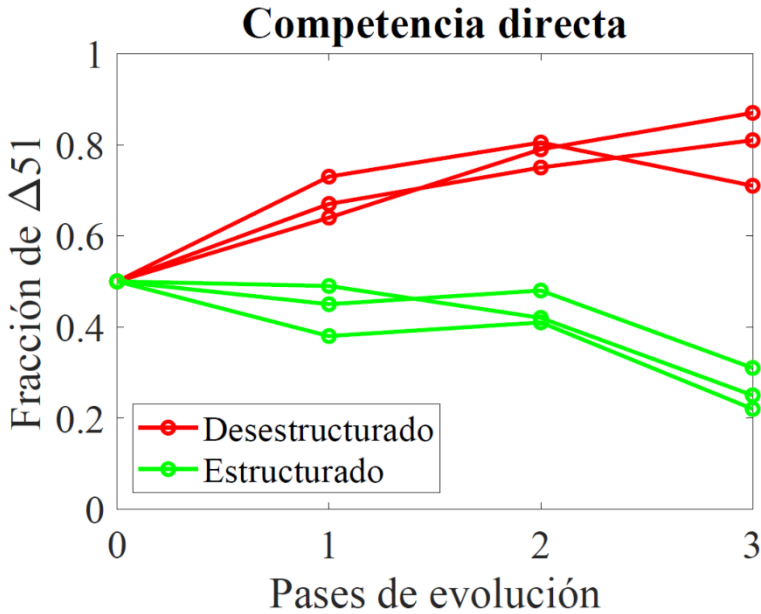
**Figura 2.3. Modelo de evolución social de la evasión del IFN por parte de VSV.** **A.** Matriz de pagos correspondiente a la contribución a la eficacia del carácter individual y del ambiente en el que se encuentre cada individuo. **B.** Población completamente desestructurada, en el que cada individuo se encuentra con un ambiente de influencia similar, y por tanto  $r = 0$ , lo que lleva a que  $f_W - f_D = -c$ . **C.** Población parcialmente estructurada, en el que cada individuo se encuentra en un ambiente dominado preferentemente por individuos de su mismo genotipo, pero con cierta influencia de la otra variante. En este caso, al ser  $r > 0$ , tenemos que  $f_W - f_D = rb - c$ . **D.** Población completamente estructurada, en el que cada individuo se encuentra en un ambiente influido únicamente por individuos de su mismo genotipo. En este caso  $r = 1$ , por lo que  $f_W - f_D = b - c$ .

La mayoría de los escenarios de infección descritos de la Figura 2.3 eran fáciles de conseguir. Una infección con estructura poblacional completa (Figura 2.3D) se consigue haciendo infecciones por separado de WT y  $\Delta 51$ . Una infección mixta estructurada (Figura 2.3C) la obtenemos realizando una infección estándar de ambas variantes en la misma placa. Las infecciones virales en placa son esencialmente estructuradas, ya que las células crecen como una monocapa totalmente adherida a la superficie de los pocillos de las placas, y las infecciones progresan como focos (Figura 2.4A). Para comparar esa situación con otra en la que hubiera menos estructura poblacional, en las que los virus de una célula puedan infectar otras en zonas muy alejadas dentro de la placa, primero intentamos realizar las infecciones en agitación. Por desgracia, nos encontramos que las infecciones no progresan en estas condiciones, ya que los viriones generados se pierden en el volumen de líquido que cubre las células. Como alternativa, optamos por ‘barajar’ las células. En momentos puntuales de la infección (a 8 y a 24 hpi), retiramos el medio de infección, lavamos con PBS, añadimos tripsina y levantamos las células, las centrifugamos a 300xg durante 5 minutos para eliminar la tripsina, y resuspendimos en el medio original, para luego ponerlas en una nueva placa. De esta forma, las células infectadas quedaban completamente entremezcladas respecto a sus posiciones originales en la placa anterior, y se rompe la estructura poblacional en las infecciones (Figura 2.4B).



**Figura 2.4. Competencia entre variantes en medios con y sin estructura poblacional. A-B** Competencia entre VSV-WT y VSV-  $\Delta$ 51 manteniendo la estructura poblacional (**A**) y rompiéndola con tripsina (**B**). En ambos casos se infectaban con 500 PFUs de ambas variantes, y mostramos el resultado a 16 hpi.

Para comprobar que esta tripsinización tenía un efecto significativo sobre la interacción de las variantes, realizamos dos evoluciones por competencia entre variantes. Partiendo de una frecuencia inicial de 1:1 entre VSV-WT y VSV- $\Delta$ 51, realizamos tres pases de competencia con y sin romper la estructura poblacional con tripsina. En la Figura 2.5 podemos ver que, cuando la estructura poblacional se mantiene, la variante D disminuye progresivamente, mientras que en la competencia con tripsinización, su frecuencia aumenta en cada pase. Esta combinación de situaciones sólo es posible si  $c > 0$  y la tripsina rompe la estructura poblacional lo suficiente, lo que refuerza nuestra teoría de que el bloqueo de IFN conlleva un coste para VSV.

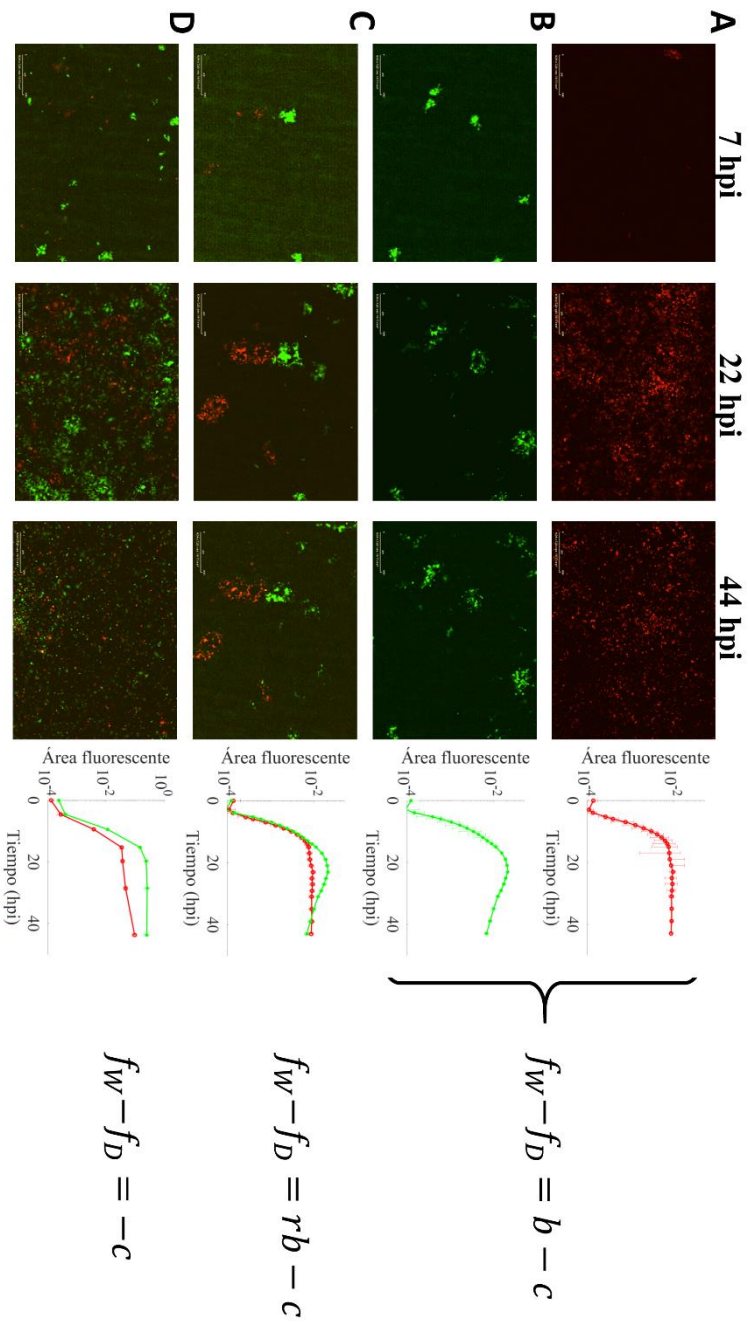


**Figure 2.5. Evolución por competencia directa entre VSV-WT y VSV- $\Delta 51$ .** Frecuencia de  $\Delta 51$  a lo largo de 3 pases de evolución, en dos tipos de poblaciones: una población con infecciones estructuradas (verde) y otra con infecciones en las que tripsinizamos el cultivo para romper la estructura poblacional (rojo). Medimos la fracción de  $\Delta 51$  como la fracción de título de virus GFP, respecto al título total obtenido después de cada pase.

Asumiendo que la tripsinización rompe completamente la estructura poblacional, podemos calcular los parámetros sociales. Usamos como medida de las infecciones la expansión del área fluorescente ( $A_X$ ), y tomamos como población de referencia a la variante W pura. Así, la eficacia de una variante cualquiera viene definida como:  $w_X = A_X/A_W$ , y por tanto:  $w_W = 1$ . Como trabajamos siempre en escala logarítmica:  $f = \log_{10} w$ , esto nos lleva a  $f_X = \log_{10} A_X - \log_{10} A_W$ . Podemos calcular la eficacia de cada variante en cualquier momento de las infecciones, por lo que los valores de los parámetros sociales irán cambiando con el progreso de la fluorescencia. Para iniciar el análisis, tomamos las medidas de los

tiempos finales de las infecciones (44 hpi), momento en el que todas las células del cultivo se han infectado o inmunizado.

Comparando la eficacia de ambas variantes en una competencia por separado (Figura 2.6A-B), obtenemos que  $f_{D|D} = c - b = -1,221 \pm 0,018$ . Comparando las eficacias en una competencia con tripsinización (Figura 2.6D), tenemos que  $f_W - f_D = -c = -0,394 \pm 0,03$ , o lo que es lo mismo  $c = 0,394 \pm 0,03$ , y por tanto inferimos que  $b = 1,615 \pm 0,048$ . De la infección estructurada (Figura 2.6C) podemos inferir los parámetros estructurales, ya que tenemos que  $f_W = -b(1 - r_W)$  y  $f_D = c - r_D b$ , de los que podemos despejar  $r_W = f_W/b + 1 = 0,295$  y  $r_D = (c - f_D)/b = 1,009$ . Estos resultados confirman de lleno nuestra predicción teórica: Al ser tanto  $b$  como  $c$  mayores que 0, queda demostrado que el bloqueo del IFN evoluciona como un carácter altruista. En la población desestructurada por la tripsina, la variante D tiene ventaja sobre los cooperadores ( $f_W - f_D = -c = -0,394$ ). En la población estructurada es la variante W la que presenta ventaja, cumpliendo la regla de Hamilton, ya que  $f_W - f_D = rb - c = 0,097$ . También demostramos que  $r_D > r_W$ , lo cual se explica por el hecho de que la variante D tiene un efecto muy importante sobre la eficacia de W, mientras la presencia de W tiene poco o ningún efecto sobre D.



**Figura 2.6. Cálculo de los parámetros sociales de la evasión del IFN en VSV. A-B.** Infecciones puras de VSV-WT (**A**) y VSV- $\Delta 51$  (**B**), mediante las cuales medimos la magnitud  $f_W - f_D = b - c$ . **C.** Infección mixta estructurada, de la que extraemos  $f_W - f_D = rb - c$ . **D.** Infección mixta con tripsinización a 8 y 24 hpi, rompiendo la estructura poblacional, en la cual  $f_W - f_D = -c$ . En todos los casos mostramos imágenes de fluorescencia a 7, 22 y 44 hpi. Las dos primeras corresponden al momento previo a la tripsinización (aunque esto sólo ocurre en el caso **D**), y la última corresponde al momento final de las infecciones, que es el tiempo en el que tomamos las medidas para calcular los parámetros sociales. En la mitad derecha de la imagen mostramos la fracción de área fluorescente correspondiente a cada infección y a cada color dentro de la misma (rojo para WT y verde para  $\Delta 51$ ).

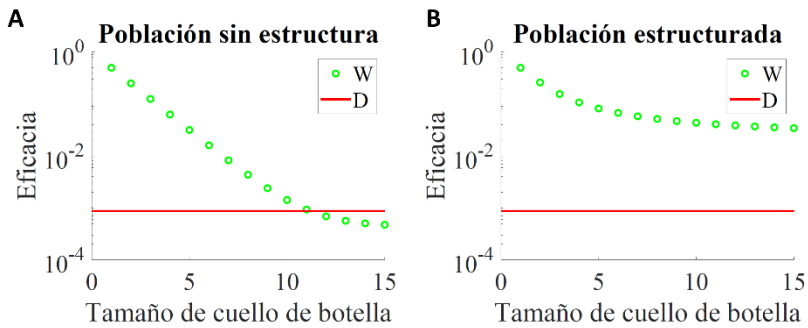
### *Cuellos de botella y meta-poblaciones.*

Como demostramos en el apartado anterior, en infecciones mixtas, la variante WT ve su eficacia mermada debido a la presencia de  $\Delta 51$ , aunque gana la competencia al término de las mismas. En la naturaleza, las infecciones virales muestran una marcada estructura meta-poblacional, en la que subpoblaciones fundadas por un pequeño número de partículas permanecen en gran medida aisladas de otras subpoblaciones (Zwart and Elena, 2015; Gutiérrez et al., 2012; McCrone et al., 2018). Es un fenómeno que ocurre normalmente en la transmisión entre hospedadores, creando grandes cuellos de botella, pero también a nivel intra-hospedador, como resultado de la compartimentación de tejidos u órganos (Richard et al., 2018; Salemi and Rife, 2016).

Para estudiar la influencia del efecto fundador, adaptamos nuestro modelo social para calcular la eficacia de grupos fundados por pocos individuos. Dado que el virus  $\Delta 51$  no obtiene ningún beneficio del WT, podemos asumir una eficacia constante de  $f_D = c - b$  independientemente de si es un crecimiento puro o en presencia de WT. En los grupos mixtos empezamos asumiendo ausencia de estructura (debido a que hablamos de

poblaciones muy pequeñas), en las que la población estaría completamente influenciada por D, lo cual nos lleva a que  $r_W = 0$ , y por tanto  $f_W = -b$ . Finalmente, en los grupos puros de WT,  $f_W = 0$ , Por tanto, la eficacia global de W depende de la frecuencia de infecciones puras, que depende inversamente del tamaño del cuello de botella. Tomando  $p$  como la frecuencia global de  $\Delta 51$  y un tamaño poblacional de  $S$ , la probabilidad de tener una infección con al menos un virus D sería  $P = 1 - (1 - p)^S$ . En estas condiciones, la eficacia global de W la podemos calcular como  $w_W = P \times 10^{-b} + (1 - P) \times 10^0 = 1 - P(1 - 10^{-b})$ , y como  $\Delta 51$  no obtiene ninguna ventaja del WT,  $w_D = 10^{c-b}$ . Para comprobar esta aproximación, realizamos infecciones en pocillos de W96, en los que apenas hay una población de  $10^4$  células MEF aproximadamente. En estos pocillos, comparando el crecimiento de ambas variantes por separado, tenemos que:  $f_W - f_D = b - c = 2,960$ . Asumiendo que la parte directa de la eficacia ( $c = 0,295$ ) no se ve alterada, ya que es intrínseca a la infección de una sola célula, recalculamos el valor de  $b$  en este nuevo tipo de placa, obteniendo  $b = 3,354$ . En estas condiciones, la eficacia de W, marcada por la ecuación  $w_W = 1 - P(1 - 10^{-b})$  (con  $P = 1 - (1 - p)^S$ ), escala inversamente exponencial con el tamaño del cuello de botella, que determina la probabilidad de encontrar infecciones puras de W, como vemos en la Figura 2.7A. Asumiendo una frecuencia inicial del 50% y ausencia completa de estructura poblacional dentro de las subpoblaciones, esperamos que el W se imponga sobre D cuando los cuellos de botella generen subpoblaciones de menos de 11 virus iniciales por infección.





**Figura 2.7. Papel de los cuellos de botella poblacionales en la evolución de la evasión de la inmunidad. A.** Eficacia relativa de VSV-WT y VSV- $\Delta 51$  asumiendo que las meta-poblaciones pierden completamente su estructura. **B.** Eficacia relativa de VSV-WT y VSV- $\Delta 51$  asumiendo que las meta-poblaciones tienen cierto grado de estructura, como vemos en las infecciones de placas W96.

Realizamos luego una infección mixta, con diluciones límite, en las mismas placas W96, de forma tal que tuviéramos entre 0 y 2 unidades infecciosas por pocillo. Observamos infección en 71 de los 96 pocillos, de los cuales 20 eran puros de W, 35 puros de D, y 16 mixtos. Consecuente con nuestros datos anteriores, el título logarítmico de W superaba claramente al de D, siendo  $7 \pm 0,14$  y  $4,04 \pm 0,13$  respectivamente. Lo más interesante que observamos es que, en los pocillos mixtos, el W igualmente ganaba la competencia, teniendo títulos de  $5,34 \pm 0,30$  para W y  $4,13 \pm 0,20$  para D. Por un lado, nos confirman que el virus W se ve claramente inhibido por la presencia de D, mientras que este último no obtiene beneficio de la presencia del primero, lo cual se traduce a nuestro modelo en que  $r_D \approx 1$  y  $r_W \ll 1$ . Por otro lado, también nos indican que en los pocillos mixtos sí que existe cierto grado de estructura poblacional.

Asumiendo esta diferencia de título (5,34 frente a 4,13) como referencia en infecciones mixtas, podemos recalcular la eficacia de W basándonos en la observación de que el título global de las infecciones se reduce de forma

exponencial con la frecuencia de D (Figura 2.2C). Como nuestro modelo de eficacia se define en escala logarítmica, podemos aproximar la eficacia de W en infecciones mixtas como:  $f_W = -bp$ , y mantener  $f_D = c - b$ , ya que hemos comprobado que D no se ve favorecido por la presencia de W. La probabilidad ( $P$ ) de tener una infección de frecuencia inicial  $p_i = v/S$  de D en cada sub-infección viene dada por la ecuación:  $P = \text{Bi}(v|S, p)$ , donde Bi representa la distribución binomial, que nos da la probabilidad de tener  $v$  viriones de D en una infección con  $S$  viriones iniciales totales, dada una frecuencia global de  $p$ . La eficacia global de W la calculamos como:  $w_W = \sum_{v=0}^{n-1} (\text{Bi}(v|S, p) \times 10^{-p \times v/S})$ , excluyendo las infecciones puras de D, que no contribuyen a la eficacia de W. Vemos en la Figura 2.7B que la eficacia de W siempre será superior a la D en estas condiciones, pero que la diferencia sigue siendo exponencialmente superior con poblaciones pequeñas, en las que W tiene mayor probabilidad de aislarse de D.

### **Modelo de difusión-reacción con autómata celular para el estudio de la evasión de la inmunidad.**

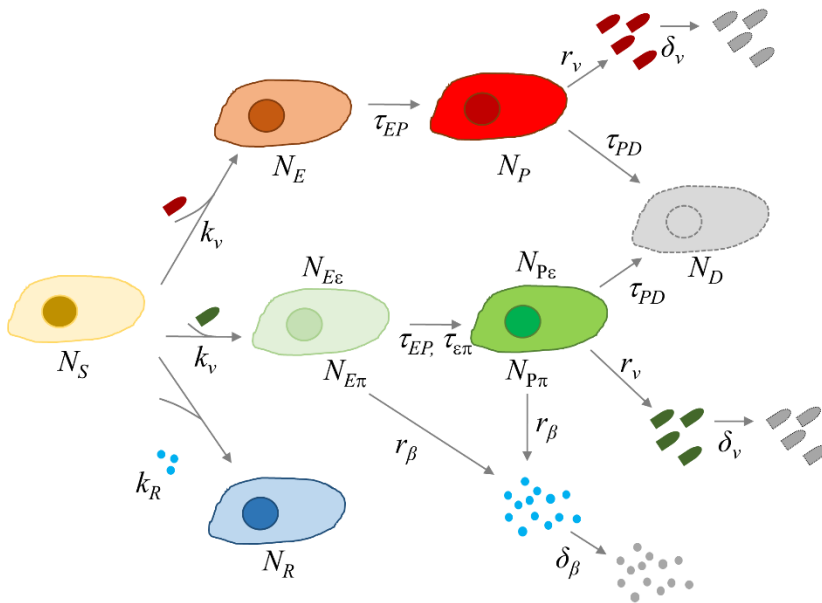
Una vez demostrado que la evolución de la inhibición del IFN en VSV se debe fundamentalmente al efecto indirecto sobre la eficacia, y que se trata de un carácter altruista, pasamos a estudiar algunos parámetros clave, tanto del virus como de la respuesta inmune, que afectan a su naturaleza social. Para ello, desarrollamos un modelo híbrido entre autómata celular y difusión-reacción, que simula las células como elementos individuales que pueden estar en diferentes estados (autómata celular), y tanto viriones como IFN como una sustancia que difunde en un espacio bidimensional (difusión-reacción). Dicho espacio se encuentra subdividido en celdas cuyo tamaño puede variar, y en nuestro caso representaba el tamaño aproximado

que ocupa una célula animal en cultivo, como las células MEF usadas en los experimentos anteriores.

El modelo simula células en diferentes estados:  $N_S$ , susceptibles de ser infectadas por un virus (no infectadas);  $N_E$ , infectadas, pero no productoras de viriones (fase de eclipse);  $N_P$ , infectadas productoras de viriones; y  $N_D$ , muertas. Las células muertas no se remplazan por nuevas células y, por lo tanto, son equivalentes a posiciones vacías en la cuadrícula. Consideramos dos variantes del virus, W y D. Para simplificar, ignoramos la posibilidad de co-infección (exclusión completa de la super-infección y de CIUs). La variante W bloquea o no estimula la producción de IFN. En cambio, las células infectadas con la variante D sí son productoras de IFN, para lo cual establecemos también una fase de eclipse ( $N_{\epsilon}$ ) que precede al estado de producción de IFN ( $N_{\pi}$ ). Como el modelo permite variar la velocidad relativa de la infección y la producción de IFN, y los trata como procesos totalmente independientes, las células en fase de eclipse de viriones ( $N_E$ ) pueden estar en fase de eclipse de producción de IFN ( $N_{E\epsilon}$ ) o ser productoras ( $N_{E\pi}$ ), y lo mismo ocurre con las células productoras de viriones ( $N_{P\epsilon}$  y  $N_{P\pi}$ , respectivamente). También simulamos la inmunización por IFN de las células susceptibles, de forma tal que una célula en estado  $N_S$  se convierte en inmune a la infección ( $N_R$ ), pero no produce IFN por sí misma (Levy 2002). Las infecciones ( $N_S \rightarrow N_E$ ) e inmunizaciones ( $N_S \rightarrow N_R$ ) se simulan como procesos estocásticos de Poisson, cuya probabilidad, en un intervalo  $\Delta t$  de tiempo, es:

$$P = 1 - e^{-\lambda \Delta t} \quad (2.1)$$

Siendo  $\lambda = k_v V N_S$  para las infecciones, donde  $k_v$  es la tasa de infección,  $V$  es la concentración local de viriones en una determinada celda y  $N_S$  es 0 o 1 dependiendo de si en esa celda hay o no una célula susceptible. Análogamente, para la inmunización tenemos que  $\lambda = k_R \beta N_S$ , siendo  $k_R$  la tasa de inmunización y  $\beta$  es la concentración local de IFN. El resto de transiciones de estado se modelan como transiciones de orden uno, con una función de probabilidad delta de Kronecker, siendo  $P = 0$  si  $t_T < t_T + \tau$ , y  $P = 1$  si  $t_T > t_T + \tau$ , donde  $t_T$  es el tiempo en el que la célula entró en dicho estado y  $\tau$  el tiempo de vida media de dicho estado (por ejemplo,  $\tau_{EP}$  representa la transición  $N_E \rightarrow N_P$ ). En la Figura 2.8 mostramos un diagrama con las transiciones de estado simuladas.



**Figura 2.8. Modelo de autómatas celulares.**  $N_S$ : células susceptibles (amarillas).  $N_E$ : células infectadas en fase de eclipse.  $N_P$ : células productoras de viriones.  $N_D$ : células muertas (gris).  $N_R$ : células inmunizadas (azul). Células infectadas con W: rojo. Células infectadas con D: verde. También se considera una fase de eclipse entre la detección del virus ( $N_\epsilon$ ) y la secreción de IFN ( $N_\pi$ ). La velocidad relativa de la infección y de la producción de IFN puede variar. Por lo tanto, las células infectadas

con D pueden estar en cuatro fases posibles ( $N_{E\varepsilon}$ ,  $N_{P\varepsilon}$ ,  $N_{E\pi}$ ,  $N_{P\pi}$ ).  $k_v$ : infectividad de los viriones.  $k_R$ : tasa de inmunización por IFN.  $\tau_{EP}$ : tiempo medio de eclipse viral.  $\tau_{\varepsilon\pi}$ : tiempo medio entre la infección y la secreción de IFN.  $\tau_{PD}$ : tiempo medio entre la producción de viriones y la muerte celular. La duración total del ciclo de infección es, pues:  $\tau_{EP} + \tau_{PD}$ .  $r_v$ : tasa de producción de viriones. El número de viriones producidos por células infectadas es, por tanto,  $K = r_v \tau_{PD}$ .  $\delta_v$ : tasa de degradación/salida del medio de viriones.  $r_\beta$ : Tasa de producción de IFN por las células infectadas por D ( $N_{E\pi} + N_{P\pi}$ ).  $\delta_\beta$ : Tasa de degradación/salida del medio de IFN.

La dinámica de los viriones obedece a un proceso de difusión-reacción en un espacio dividido ortogonalmente, siguiendo la ecuación:

$$\frac{\partial V}{\partial t} = r_v N_P - \delta_v V + \Delta V \times D_V / \Delta x^2 \quad (2.2)$$

Dicha derivada parcial representa la evolución de la concentración de viriones en una de las celdas del espacio ( $V(x,y)$ ). Los dos primeros términos corresponden a la parte de reacción, donde  $r_v$  es la tasa de producción de viriones por parte de las células infectadas. Para el virus D utilizamos, en vez de  $N_P$ , la suma  $N_{P\varepsilon} + N_{P\pi}$  (es decir, todas las células productoras de D, independientemente del estado del IFN). Inicialmente usamos la misma tasa de producción de viriones para W y D, sin embargo, esta asunción sería modificada más adelante para reproducir los resultados experimentales, usando entonces  $r_v(W)$  y  $r_v(D)$ , respectivamente. El parámetro  $\delta_v$  es la tasa de pérdida de viriones, ya sea por degradación o por flujo hacia las capas superiores del volumen del cultivo, e ignoramos la pérdida de viriones debida a la adsorción a las células. El último término describe la difusión, donde  $D_V$  es el coeficiente de difusión de Stokes-Einstein,  $\Delta x$  es el tamaño de la cuadrícula y  $\Delta V$  la diferencia de

concentración de viriones entre las subunidades de la cuadrícula. Análogamente, para el IFN usamos la ecuación:

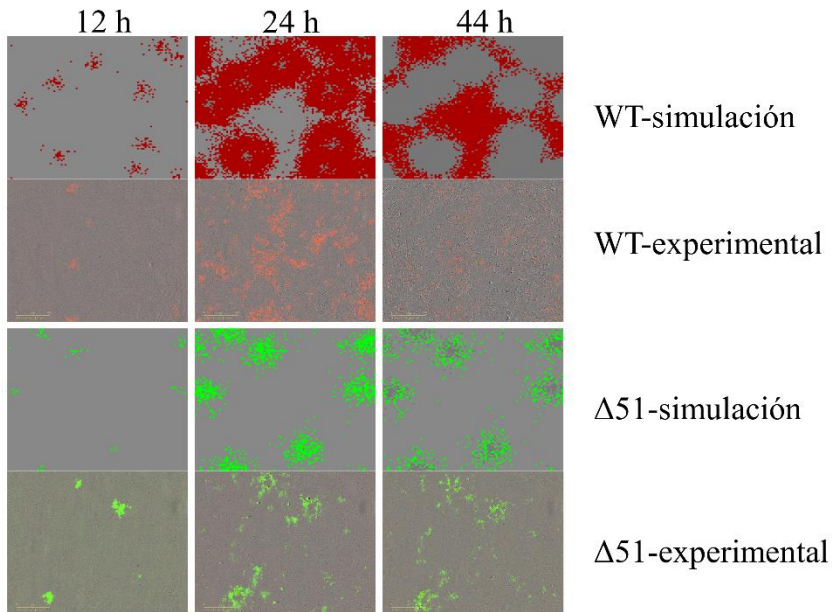
$$\frac{\partial \beta}{\partial t} = r_{\beta} N_{\pi} - \delta_{\beta} \beta + \Delta \beta \times D_{\beta} / \Delta x^2 \quad (2.3)$$

Donde  $r_{\beta}$  es la tasa de producción de IFN (por parte de las células productoras,  $N_{\pi}$ ),  $\delta_{\beta}$  la tasa de pérdida de IFN y  $D_{\beta}$  el coeficiente de difusión. Consideramos únicamente la difusión entre celdas ortogonalmente adyacentes, de forma que  $\Delta V$  (o  $\Delta \beta$ ) se calcula como:

$$\Delta V = V(x - 1, y) + V(x + 1, y) + V(x, y - 1) + V(x, y + 1) - 4V(x, y) \quad (2.4)$$

En los márgenes de la cuadrícula utilizamos un enfoque de sistema continuo, lo que significa que las celdas vecinas a las de más a la derecha eran las celdas más a la izquierda, y lo mismo ocurría con las celdas superiores e inferiores. El número total de células (o celdas de la cuadrícula) era de aproximadamente 50000, que corresponde a más o menos un tercio de un pocillo de placa W12 totalmente confluyente. Por eficiencia computacional, la unidad de tiempo ( $\Delta t$ ) de todas las simulaciones era siempre 0,5 minutos, pero se necesitaba una resolución temporal más fina para calcular el proceso de difusión del IFN. Por lo tanto, utilizamos incrementos de tiempo más cortos sólo para la parte de difusión, y asumimos una aproximación de estado cuasi-estacionario para el resto de variables en estos intervalos inferiores a 0,5 minutos. En la Figura 2.9 podemos ver que nuestro modelo (con los parámetros resumidos en la

Tabla 2.1) reproduce fielmente las infecciones que observamos siguiendo la fluorescencia.



**Figura 2.9. Comparación entre nuestro modelo y el resultado de infecciones observadas por el microscopio de fluorescencia.** En la mitad superior mostramos el resultado del modelo (más arriba) y la observación experimental (fila central superior) de una infección de VSV-WT, marcando en rojo las células infectadas por WT, y en gris las células no infectadas, homólogo a como se ven en las imágenes reales, ya que la fase se observa en escala de grises, y VSV-WT está marcado con la proteína mCherry. En la mitad inferior mostramos el caso homólogo, pero usando la variante VSV-Δ51, marcando en verde las células infectadas, y en gris tanto las células no infectadas como las inmunes. En ambos casos, las células muertas las marcamos con un gris ligeramente más oscuro.

Proceso	Parámetro	Valor	Unidades	Definición	
Difusión	$kT$	$4,28 \times 10^{-21}$	J	Constante de Boltzmann $\times$ temperatura (37°C)	
	$\mu$	$6,91 \times 10^{-4}$	Pa s	Viscosidad del medio (agua)	
	$D_v$	0,18	$\mu\text{m}$	Radio hidrodinámico de los viriones <sup>1</sup>	
	$D_\beta$	0,007	$\mu\text{m}$	Radio hidrodinámico del IFN <sup>2</sup>	
	Infección	$k_v$	$10^{-8}$	$\text{célula}^{-1} \text{virión}^{-1} \text{cm}^2 \text{min}^{-1}$	Infectividad de los viriones <sup>3</sup>
$\delta_v$		0,002	$\text{min}^{-1}$	Tasa de degradación/salida de viriones <sup>4</sup>	
$\tau_{EP}$		6	h	Vida media de la fase de eclipse <sup>5</sup>	
$\tau_{PD}$		6	h	Vida media de la fase de producción de viriones <sup>5</sup>	
$r_v$		0,28	$\text{viriones célula}^{-1} \text{min}^{-1}$	Tasa de producción de viriones <sup>7</sup>	
Inmunización		$\tau_{\varepsilon\pi}$	9	h	Vida media de la fase de eclipse de IFN <sup>5</sup>
		$r_\beta$	1	$\text{IFN cm}^{-2} \text{cell}^{-1} \text{min}^{-1}$	Tasa de producción de IFN <sup>9</sup>
	$k_R$	0,01	$\text{célula}^{-1} \text{min}^{-1} \text{IFN}^{-1} \text{cm}^2$	Tasa de inmunización <sup>10</sup>	
	$\delta_\beta$	$2 \times 10^{-4}$	$\text{min}^{-1}$	Tasa de degradación/salida de IFN <sup>11</sup>	

**Tabla M.1. Significado, unidades y valores de los parámetros del modelo de difusión-reacción.**

<sup>1</sup>Tamaño de partícula de los viriones de VSV (Cureton et al., 2010).

<sup>2</sup>Inferida a partir de la constante de difusión dinámica del IFN de pollo utilizando la ecuación de Stokes-Einstein (Kreuz and Levy, 1965).

<sup>3</sup>Aproximadamente 1/24 viriones infectan con éxito las células después de 1 h, es decir, una relación partícula-foco de 24 en un ensayo típico de infectividad. Esta proporción varía ampliamente entre los virus, desde cerca de 1 a 1:1000 (Klasse, 2015).

<sup>4</sup>Una vida media de aproximadamente 18 h, como se estima para el VSV (Zimmer et al., 2013).

<sup>5</sup>Tiempo de eclipse típico de muchos virus animales de replicación rápida.

<sup>6</sup>Duración total del ciclo de infección fijada en  $\tau_{EP} + \tau_{PD} = 12$  h, un valor típico para muchos virus animales.

<sup>7</sup>Ajustado para producir  $r_v \tau_{EP} = 100$  viriones/célula en dos dimensiones. En tres dimensiones, este valor escalaría a  $100^{3/2} = 1000$  viriones por célula, un valor típico para un virus animal.



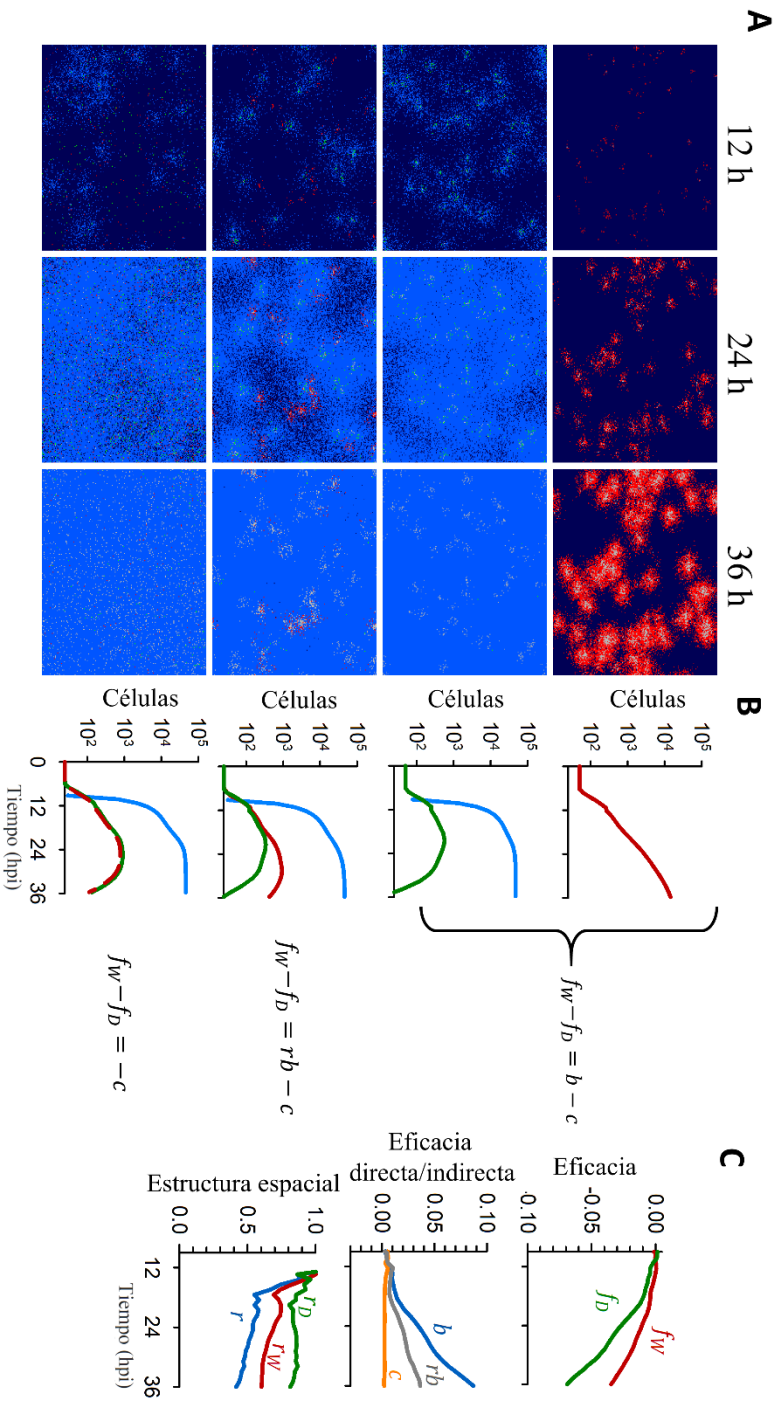
<sup>8</sup>Basado en la observación de que el IFN comienza a liberarse después de los viriones (Voigt et al., 2016; Howat et al., 2006) y en la cinética de producción de IFN (Voigt and Yin, 2015).

<sup>9</sup>En unidades arbitrarias; una población celular entera infectada con el virus D produciría aproximadamente 200 unidades (o  $200^{3/2} = 2800$  unidades en tres dimensiones).

<sup>10</sup>De tal forma que, junto al parámetro anterior, 1 unidad inmuniza aproximadamente el 50% de las células en 1h (nuestra observación experimental).

<sup>11</sup>Estabilidad de IFN determinada empíricamente (Voigt and Yin, 2015).

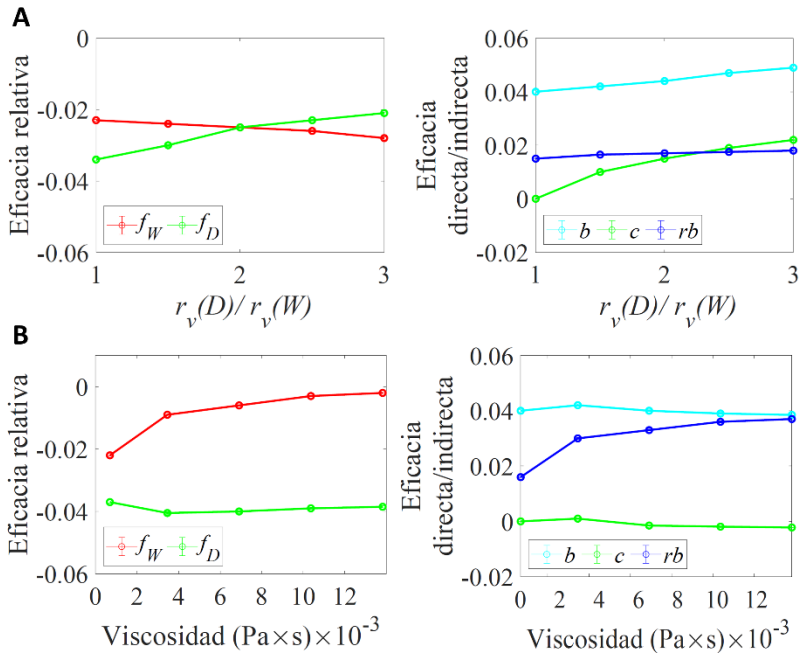
Con estos parámetros, nuestro primer objetivo fue reproducir los resultados obtenidos experimentalmente, y analizar los parámetros sociales que obtenemos haciendo un análisis homólogo. La principal ventaja del modelo en este caso es que podemos controlar homogeneidad del sistema a voluntad. Así, para simular infecciones desestructuradas, sencillamente homogeneizamos la concentración de viriones e IFN en cada paso de integración. Al tener esta facilidad, también podemos calcular la evolución temporal de todos los parámetros sociales en cada paso de integración. En la Figura 2.10 tenemos un ejemplo homólogo al análisis experimental presentado en la Figura 2.6, con un sistema en el que el bloqueo del IFN no reduce la producción de viriones, lo que significa que no hay un coste asociado al carácter cooperador. Con este escenario como referencia, en los paneles 2.10C representamos la evolución temporal de todos los parámetros sociales para el caso de la infección estructurada. Se aprecia claramente como  $c$  es siempre cero, y que el factor indirecto de la eficacia ( $rb$ ) aumenta con el tiempo, según aumenta la producción y difusión de IFN. A tiempos finales, como  $rb > c$ , concluimos que, aún en ausencia de coste en el bloqueo del IFN, el factor determinante de la evolución seguiría siendo la parte social, la parte indirecta de la eficacia, aunque ya no se trate de un carácter estrictamente altruista.



**Figura 2.10. Estudio de los parámetros sociales, de forma homóloga a como lo realizamos en la Figura 2.6.** **A.** Imágenes generadas por el modelo de simulación de las infecciones. Mostramos en azul oscuro las células susceptibles, rojo y verde las infectadas por WT y  $\Delta 51$  respectivamente, gris las células muertas, y azul claro las células inmunes. **B.** Gráficas mostrando el número de células infectadas e inmunes en función del tiempo. **C.** Evolución temporal de la eficacia de las variantes y los valores de los parámetros sociales.

### *Efecto del coste de la evasión y la viscosidad del medio.*

Para continuar el análisis, introducimos ahora un coste para la producción de IFN. Para ello, realizamos una serie de simulaciones en las que  $r_v(D)$  varía entre 1.5 y 3 veces el valor de  $r_v(W)$ . Podemos ver en la Figura 2.11A que, en estas nuevas condiciones, la inhibición de la producción de IFN se convierte en altruista ( $c > 0$ ), y el W se impone a D siempre que el coste de dicha inhibición no supere el 100% del valor de los viriones producidos por célula infectada. Con  $r_v(D) > 2 r_v(W)$ , tendríamos que  $f_D > f_W$  manteniendo idénticos el resto de parámetros y la estructura espacial. El caso opuesto lo encontramos al incrementar la viscosidad del medio (Figura 2.11B), que limita la difusión tanto de viriones como de IFN, y por tanto restringe el rango de influencia entre focos. Tomando como referencia un sistema con la viscosidad del agua, aumentamos progresivamente su valor y, consecuentemente, aumentaba la eficacia relativa del W sobre D. Observando los parámetros sociales, ocurre que ni  $b$  ni  $c$  se ven apenas afectadas, sino que, al aumentar mucho la estructura espacial, el factor  $rb$  crece, y con ello el componente indirecto de la eficacia.

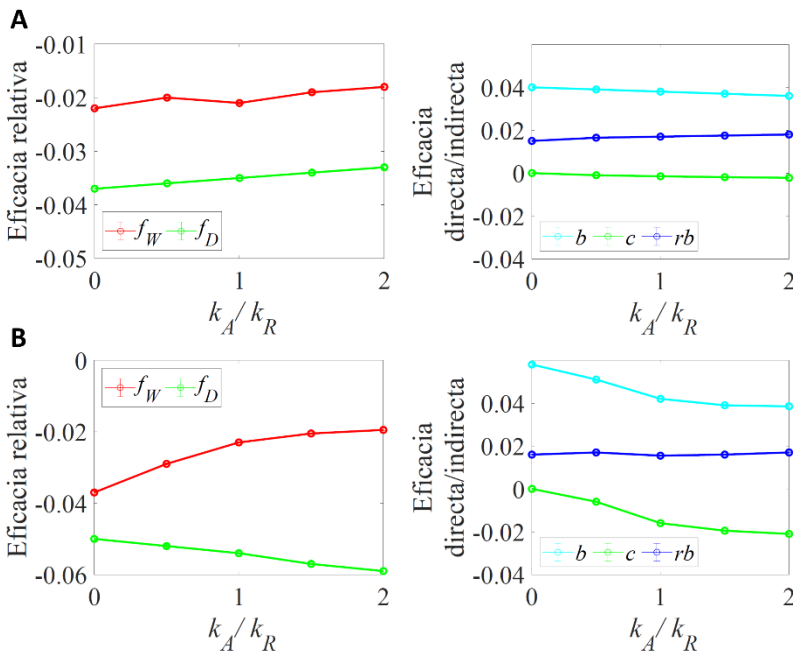


**Figura 2.11. Efecto del coste de la evasión y la viscosidad del medio en el carácter social de la evasión del IFN.** **A.** Dependencia de las eficacias relativas y los parámetros sociales del coste de bloquear el IFN, medido como la ventaja en término de producción de viriones de la variante  $\Delta 51$ . **B.** Dependencia de las eficacias relativas y los parámetros sociales de la viscosidad del medio, comenzando en el punto de viscosidad del agua a 37 °C ( $0,006913 \text{ Pa} \times \text{s}$ ) y acabando en un valor 25 veces superior.

### *Efecto autocrino del IFN.*

Como hemos mencionado anteriormente, el IFN no sólo actúa sobre las células no infectadas, sino que también activa la apoptosis en células infectadas. Esto genera un efecto tanto paracrino como autocrino, ya que la apoptosis se puede activar tanto en la misma célula inicialmente infectada que produce el IFN, como en otras de su vecindad. Intuitivamente, esto podría indicar que bloquear el IFN producirá un beneficio directo sobre el virus que infecta dicha célula, ya que mantener bloqueada la apoptosis es fundamental para el desarrollo del ciclo viral.

Para estudiar este efecto, modificamos el sistema incorporando el hecho de que las células infectadas, independientemente de su estado, pueden realizar una nueva transición a células muertas ( $N_E \rightarrow N_D$ ,  $N_P \rightarrow N_D$ ), con una dinámica de orden 2 similar a la inmunización, con media:  $\lambda = k_A \beta N_I$ . Simulamos el sistema con diferentes valores de  $k_A$ , la constante que determina la tasa de activación de la apoptosis. Al ser un proceso activado por IFN al igual que la inmunización, usamos un rango que iba desde  $k_R/2$  hasta  $2k_R$ . En la Figura 2.12A podemos ver que ni la eficacia relativa de W frente a D ni los parámetros sociales se ven fuertemente afectados por la introducción de este nuevo proceso. La explicación a esto la tenemos en el hecho de que el IFN se libera mucho más tarde que los viriones en una célula infectada (Voigt et al., 2016), por lo que su efecto sobre la eficacia del propio virus es prácticamente despreciable.



**Figura 2.12.** Impacto de la activación autocrina de la apoptosis por

**parte del IFN en el carácter social de su evasión.** Dependencia de las eficacias relativas y los parámetros sociales del efecto autocrino y paracrino que tiene el IFN para activar la apoptosis. Medimos dichos valores alterando la constante característica controla la activación de la apoptosis en células infectadas ( $k_A$ ). En **A**, el sistema se utiliza con los parámetros mostrados en la Tabla 2.1, mientras que, en **B**, usamos un tiempo característico de producción de IFN de 5 horas, una hora menos que el tiempo característico de la fase de eclipse de la infección ( $\tau_{\pi} < \tau_{EP}$ ).

Continuamos el estudio simulando nuevamente el sistema, pero haciendo que el tiempo de transición al estado de producción de IFN de las células infectadas por D sea menor al tiempo de eclipse de la producción de viriones. Con este nuevo escenario, el efecto autocrino tiene un peso mucho mayor (Figura 2.12B). Ahora, La eficacia de W sobre D se ve claramente incrementada conforme aumentamos la tasa de activación de la apoptosis, pero esta ventaja ya no se debe a la parte indirecta de la eficacia. Mientras que  $b$  disminuye,  $c$  se vuelve cada vez más negativa, convirtiendo la inhibición del IFN en un carácter mutualista, beneficioso para el individuo, y aumentando el peso de la parte directa sobre la parte indirecta ( $c < 0$ , con  $|c| > |rb|$ ). Con este resultado se evidencia la importancia de la dinámica relativa del ciclo viral y el IFN en la evolución de la inmunidad innata. En un virus que se adelante a la producción de IFN, su inhibición beneficiará fundamentalmente a la población, no tanto al propio individuo, y por tanto la evolución de este carácter será de naturaleza social. En cambio, si el virus no es capaz de superar en velocidad a la respuesta innata celular, su inhibición se vuelve crítica, además de para la población viral, para sí mismo, aumentando el carácter egoísta o mutualista de dicha inhibición.

---

# **CAPÍTULO 3**

---

---

**INTERACCIONES INDIRECTAS:  
DILEMA DE LA PRUDENCIA EN  
FAGOS LISOGÉNICOS.**

---



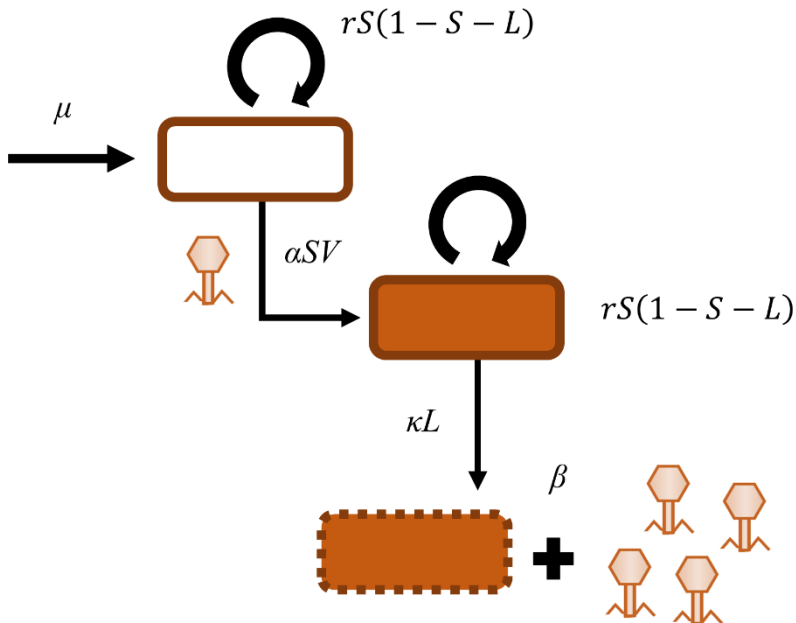
## **Rendimiento y competencia de fagos lisogénicos.**

Durante el tercer y último capítulo de la tesis estudiamos el dilema de la prudencia en fagos lisogénicos. Para comenzar el estudio, desarrollamos un modelo determinista que simula el crecimiento de una población de bacterias infectadas por este tipo de fagos, que son capaces de, al comenzar la infección, llevar a cabo un ciclo lítico o lisogénico. El primero conlleva la muerte inmediata de la bacteria y la producción de viriones, mientras que con el ciclo lisogénico los fagos insertan su genoma en el cromosoma de la bacteria, y replican con el mismo. Inicialmente, desarrollamos un modelo que engloba el dilema de virulencia en un único parámetro, que representa la tendencia de cada virus a ser más o menos proclive a matar a su hospedador para producir viriones, o a replicar junto a su ciclo de vida. Para ello, simulamos una población de bacterias hospedadoras ( $S$ ) que se introducen en el sistema a una tasa constante  $\mu$ , se reproducen siguiendo un modelo de crecimiento logístico, con una tasa de crecimiento exponencial  $r$ , y son infectadas por viriones por un proceso de segundo orden, de tasa  $\alpha$ . Estas infecciones producen bacterias infectadas (lisógenos,  $L$ ), que se reproducen siguiendo el mismo modelo logístico que las bacterias no infectadas, y que activan el ciclo lítico a una tasa  $\kappa$ , siendo este el único parámetro que determina la virulencia de los fagos. Dicha lisis produce una cantidad  $\beta$  de viriones libres ( $V$ ), que se eliminan del sistema por adhesiones a todo tipo de bacterias (hospedadoras o lisógenos) y por degradación espontánea a una tasa  $\delta_V$ . Para este primer modelo generalista, tomamos valores de parámetros estándar de fagos lisogénicos, usados en otros trabajos similares (Bruce et al., 2021, Berngruber et al., 2013, Li et al., 2020, Cortes et al., 2019). Representado en la Figura 3.1, el modelo se rige por el sistema de ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dS}{dt} = \mu + rS(1 - S - L) - \alpha SV$$

$$\frac{dL}{dt} = \alpha SV + rL(1 - S - L) - \kappa L \quad (3.1)$$

$$\frac{dV}{dt} = \beta \kappa L - \delta_v V - \alpha(S + L)V$$

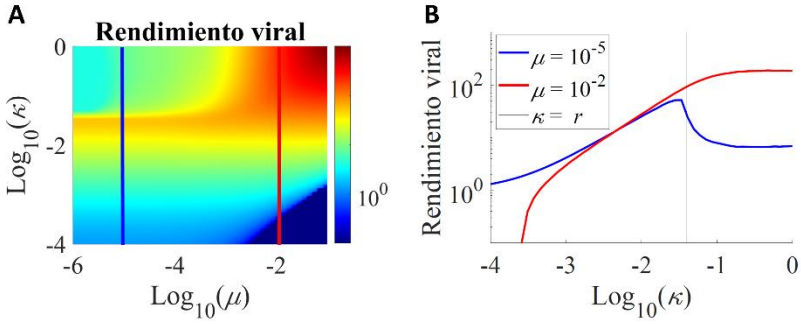


**Figura 3.1.** Modelo simple de crecimiento de bacterias y fagos lisogénicos.

***Dilema de prudencia frente a virulencia.***

Para evaluar el comportamiento del sistema en base a la virulencia, tomamos como medida de la eficacia poblacional la cantidad total de

genomas virales una vez que el sistema llega a su equilibrio. Esta cantidad total de genomas consiste en la suma de lisógenos y viriones, y nos referiremos a ello como rendimiento viral. Resolvemos numéricamente el sistema, y analizamos la dependencia de esta cantidad en función de la constante de lisis ( $\kappa$ ), en un amplio rango de parámetros de entrada de bacterias susceptibles ( $\mu$ ), que es el parámetro principal que describe la disponibilidad de hospedadores. Como se observa en la Figura 3.2A, existen dos zonas claramente diferenciadas en cuanto al efecto de la virulencia en función de  $\mu$ . Cuando hay poca cantidad de hospedadores disponibles, el rendimiento del sistema presenta un compromiso entre matarlos para producir viriones, y permitir su replicación para evitar la extinción. Como vemos en la Figura 3.2B, el punto óptimo se encuentra justo por debajo de la tasa de replicación de las bacterias. Un fago que presente  $\kappa > r$  tendrá lisógenos incapaces de crecer, ya que su lisis ocurre más rápido que el ciclo de replicación de la bacteria, como corresponde a un comportamiento estrictamente lítico. Para maximizar la cantidad de genomas totales en un ambiente de baja  $\mu$ , los fagos tendrían que acercarse a ese límite sin sobrepasarlo, teniendo lisógenos capaces de crecer, pero con una alta tendencia a producir viriones. Cruzando cierto umbral de  $\mu$  (en torno a  $5 \times 10^{-3}$ ), la lisis se vuelve la estrategia óptima, ya que hay suficiente cantidad de hospedadores para que todos los viriones puedan infectar uno nuevo. A este umbral nos referiremos en el trabajo como umbral lítico, ya que marca el punto en el que la lisogenia deja de ser la estrategia óptima para maximizar los genomas virales. En esta región de valores de  $\mu$ , ser excesivamente prudente puede incluso llevar a la extinción de los virus, ya que sus hospedadores infectados no podrían crecer a comparación del gran recambio que existe de nuevos hospedadores (como se aprecia en la zona inferior derecha del mapa de la Figura 3.2A).



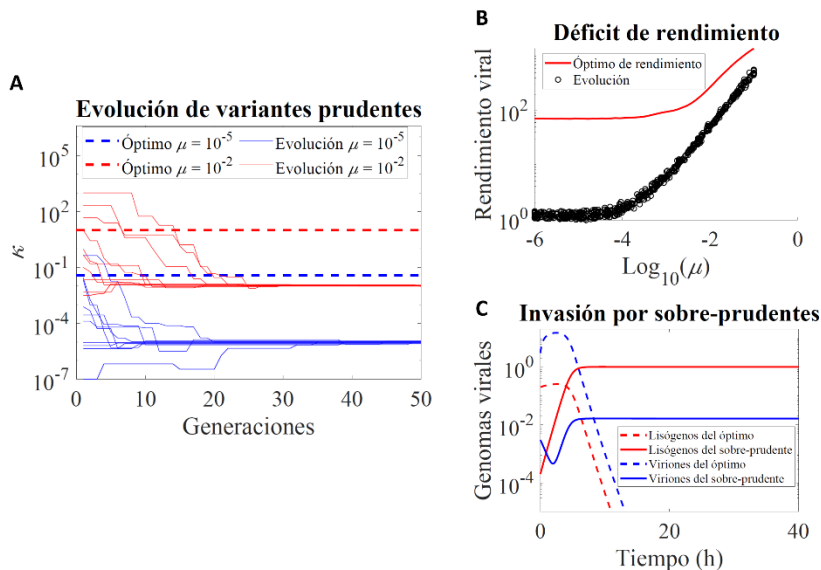
**Figura 3.2. Efecto de la virulencia sobre el rendimiento viral.** Simulamos el sistema 3.1 y representamos el número total de genomas (suma de viriones y lisógenos) en equilibrio, en función de la tasa de entrada de bacterias ( $\mu$ ) y la tasa de lisis ( $\kappa$ ). En **B** mostramos los valores de rendimiento en función de  $\kappa$ , a lo largo de las dos líneas de  $\mu$  indicadas sobre el mapa **A**. Con la línea negra vertical representamos el punto de  $\kappa$  que coincide con la tasa de replicación de los lisógenos ( $r$ ). **Parámetros:**  $r = 0,04$ ;  $\alpha = 10^{-2}$ ;  $\delta_v = 10^{-3}$ ;  $\beta = 50$ .

A continuación, exploramos la capacidad del sistema para evolucionar hacia los valores óptimos. Para ello, modificamos el sistema para simular la competencia entre dos fagos que infectan la misma población de bacterias, diferenciándose en su tendencia a lisar:

$$\begin{aligned} \frac{dS}{dt} &= \mu + rS(1 - S - L_1 - L_2) - \alpha S(V_1 + V_2) \\ \frac{dL_1}{dt} &= \alpha S V_1 + r L_1(1 - S - L_1 - L_2) - \kappa_1 L_1 \\ \frac{dL_2}{dt} &= \alpha S V_2 + r L_2(1 - S - L_1 - L_2) - \kappa_2 L_2 \quad (3.2) \\ \frac{dV_1}{dt} &= \beta \kappa L_1 - \delta_v V_1 - \alpha(S + L_1 + L_2)V_1 \end{aligned}$$

$$\frac{dV_2}{dt} = \beta\kappa L_2 - \delta_v V_2 - \alpha(S + L_1 + L_2)V_2$$

Estudiamos la capacidad de la evolución para optimizar el sistema mediante simulaciones en las que sistemáticamente competíamos dos fagos con diferentes valores de  $\kappa$ , seleccionábamos el ganador, y comenzábamos una nueva simulación con éste, y uno nuevo con valores ligeramente diferentes. En todas las simulaciones, el fago ‘nuevo’ comienza a una frecuencia mil veces menor que el primero, que se encuentra cerca de su equilibrio, con lo que simulamos la emergencia de variantes. Al representar estos valores a lo largo de 50 generaciones de competencia (Figura 3.3A), con diferentes puntos iniciales de  $\kappa$ , vemos claramente que convergen en los mismos valores, indicando que la evolución es robusta. Lo más interesante que encontramos es que estos puntos a los que tiende el sistema se alejan significativamente de los óptimos de rendimiento, convergiendo en valores órdenes de magnitud inferiores. En la Figura 3.3B vemos que, efectivamente, la evolución lleva al sistema a valores que presentan un rendimiento sustancialmente menor al máximo que se podría alcanzar dado ese valor de  $\mu$ . Se trata, por tanto, de variantes sobre-prudentes, que no producen todos los genomas virales que les permite su población de hospedadores. En la Figura 3.3C podemos ver un ejemplo de esto, con una variante sobre-prudente invadiendo una población de uno que se encuentra en el óptimo de rendimiento.



**Figura 3.3. Evolución de la sobre-prudencia.** **A.** Réplicas evolutivas en las que representamos los valores seleccionados de  $\kappa$  a lo largo de 50 generaciones de evolución. Iniciamos con diferentes valores de  $\kappa$ , compitiendo un fago ‘residente’, con uno que emerge a una frecuencia 1000 veces menor, y con valor ligeramente diferente de  $\kappa$ , y representamos el valor del ganador en cada generación. **B.** Rendimiento obtenido con las tasas de lisis que optimizan el rendimiento, frente a los valores a los que tiende el sistema durante la simulación de evolución, para cada valor de  $\mu$ . **C.** Simulación en la que una variante sobre-prudente ( $\kappa = 3 \times 10^{-5}$ ) invade una población de fagos con los valores óptimos de rendimiento ( $\kappa = 3 \times 10^{-2}$ ). **Parámetros:**  $r = 0,04$ ;  $\alpha = 10^{-2}$ ;  $\delta_V = 10^{-3}$ ;  $\beta = 50$ , en **C:**  $\mu = 10^{-5}$ .

Este resultado evidencia que la competencia directa entre dos fagos favorecerá variantes sobre-prudentes, que no producen todos los genomas virales que podrían, pero que tienen una ventaja frente a las que sí optimizan este valor. En el estado al que tiende el sistema en competencia directa existe una ratio entre viriones y lisógenos muy por debajo de 1 (Figura 3.3C), indicando que las variantes que triunfan tienen una marcada tendencia a lisogenizar, y mantenerse en forma de profagos. Esto es consecuente con el hecho de que muchos fagos lisogénicos estudiados

presenten una tasa de reactivación espontánea del ciclo lítico muy baja, de entre 10 y 1000 veces menor al ciclo de generación de la bacteria (Cortes et al., 2019; Zeng et al., 2010; Little and Michalowski, 2010). Esta predicción de nuestro modelo es coherente con resultados teóricos previos (Wahl et al., 2019), que predicen que los fagos pro-lisogénicos tienen ventaja sobre variantes líticas a menos que exista una tasa de entrada de bacterias suficientemente alta. Sin embargo, estos resultados previos no analizaban el impacto a nivel poblacional. Nuestro modelo desvela que las variantes prudentes que se imponen reducen el rendimiento de la población. Se trata del mismo fenómeno poblacional que ocurre en la paradoja del rendimiento vs la tasa (en inglés ‘*yield vs rate*’). Dicha paradoja se asocia normalmente a parásitos que, al ser más virulentos, reducen la eficacia o directamente colapsan la población al ser demasiado perjudiciales para sus hospedadores. En este caso, lo paradójico es que las variantes que aumentan el rendimiento son las más líticas, que podrían considerarse las más virulentas, mientras que las variantes prudentes son las que reducen el rendimiento de la población, pero tienen ventaja en competencia directa.

### ***Efecto de la super-infección.***

La super-infección, el proceso por el cual dos virus infectan la misma célula u hospedador de forma secuencial, es especialmente importante en el dilema de la prudencia en virus. Desde hace años, los modelos matemáticos estudiados apuntan a que es un factor clave en la evolución de la virulencia. Tanto en (Nowak and May, 1994) como en (Gandon et al., 2002) los autores concluyen que, en ausencia de co-infección y superinfección, los parásitos pueden evolucionar a ser menos virulentos si hay un alto grado de parentesco en la población. Sin embargo, si se

permiten ambos procesos, o sólo uno de ellos, la alta virulencia se vuelve la estrategia óptima.

La mayoría de fagos lisogénicos presentan mecanismos para inhibir la super-infección, proceso conocido habitualmente como SIE (del inglés *Superinfection Exclusion*). Para comprobar que nuestro modelo reproduce estos resultados, y estudiar si nuestra evolución de variantes sobreprudentes se ve afectada, modificamos el sistema 3.2 para incluir la capacidad de los virus de infectar las bacterias infectadas por otro virus. Tenemos una nueva variable,  $L_S$ , que representa a las bacterias super-infectadas, y que surge de las infecciones de los virus  $V_1$  y  $V_2$  en los lisógenos  $L_2$  y  $L_1$ , respectivamente. Por simplicidad, asumimos que las células super-infectadas producen la misma cantidad de ambas variantes cuando ocurre la lisis, y que su tasa de lisis ( $\kappa_S$ ) corresponde a la mayor de las dos variantes, con lo que asumimos que la tendencia a lisar será dominante intracelularmente.

$$\frac{dS}{dt} = \mu + rS(1 - S - L_1 - L_2 - L_S) - \alpha S(V_1 + V_2)$$

$$\frac{dL_1}{dt} = \alpha S V_1 + r L_1 (1 - S - L_1 - L_2 - L_S) - \kappa_1 L_1 - \alpha L_1 V_2$$

$$\frac{dL_2}{dt} = \alpha S V_2 + r L_2 (1 - S - L_1 - L_2 - L_S) - \kappa_2 L_2 - \alpha L_2 V_1$$

(3.3)

$$\frac{dL_S}{dt} = \alpha L_1 V_2 + \alpha L_2 V_1 + r L_S (1 - S - L_1 - L_2 - L_S) - \kappa_S L_S$$

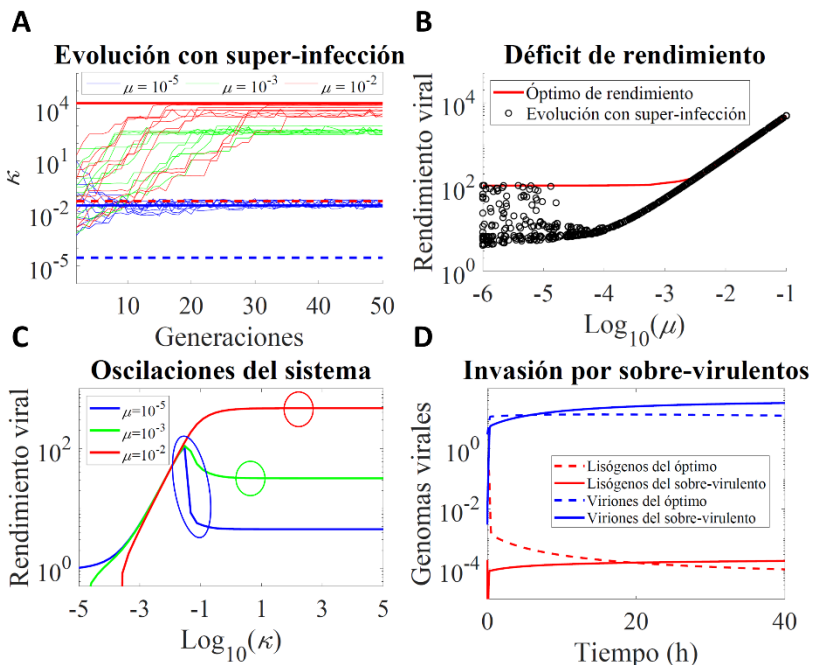
$$\frac{dV_1}{dt} = \beta \kappa_1 L_1 + \beta \kappa_S L_S / 2 - \delta_v V_1 - \alpha (S + L_1 + L_2 + L_S) V_1$$



$$\frac{dV_2}{dt} = \beta\kappa_2L_2 + \beta\kappa_S L_S/2 - \delta_v V_2 - \alpha(S + L_1 + L_2 + L_S)V_2$$

Realizamos nuevamente las simulaciones de evolución, con el nuevo modelo que permite la super-infección, y encontramos que ahora las variantes seleccionadas son más virulentas. Como vemos en la Figura 3.4A, la evolución en este contexto empuja al sistema a valores de  $\kappa$  muy superiores a los que presenta el sistema sin super-infección (con SIE). La segunda característica distintiva es que este sistema no tiende a unos puntos fijos, sino que oscila en torno a una serie de valores. Esto se evidencia cuando estudiamos la optimización en función de la entrada de bacterias ( $\mu$ ), comparando el óptimo de rendimiento con el resultado de la evolución (Figura 3.4B). En este nuevo sistema se aprecian tres escenarios diferentes: para valores muy bajos de  $\mu$ , esta oscilación lleva al sistema a saltar desde el óptimo de rendimiento, a puntos sub-óptimos, presentando una gran variabilidad de eficacia; con valores intermedios de  $\mu$  (mayores, pero sin llegar al umbral lítico), el sistema tiende siempre a puntos sub-óptimos; y finalmente, con  $\mu$  por encima del umbral lítico, la evolución con super-infección lleva al sistema al óptimo de rendimiento. Cuando representamos el abanico de oscilaciones en la función de rendimiento frente a virulencia (Figura 3.4C), podemos entender estos tres escenarios. Observamos que a baja  $\mu$  ( $\mu = 10^{-5}$ ) el sistema oscila entre el valor de  $\kappa$  óptimo de rendimiento, y punto ligeramente superior, que ya está por encima de  $r$ , haciendo que el virus sea sobre-virulento, y por tanto con un rendimiento mucho menor. En la zona intermedia ( $\mu = 10^{-3}$ ) tenemos que el sistema oscila siempre en valores sobre-virulentos de  $\kappa$ , y por tanto siempre con un rendimiento similar. Por encima del umbral lítico ( $\mu = 10^{-2}$ ), como hemos dicho, la evolución con super-infección optimiza el rendimiento, ya que, en este contexto, ser puramente lítico es la mejor estrategia, tanto para optimizar

la competencia como el rendimiento. Lo que sí es común en todos los casos es que las variantes que se imponen en la evolución, ya sean sobre- virulentas o estén justo en el óptimo, presentan muchos más viriones en equilibrio que lisógenos, siendo el caso opuesto al modelo sin super- infección (Figura 3.4D).



**Figura 3.4. Evolución de la sobre-virulencia con super-infección.** **A.** Réplicas evolutivas en las que representamos los valores seleccionados de  $\kappa$  a lo largo de las 50 generaciones, en el sistema con super-infección. En azul y rojo punteado representamos los puntos a los que tiende la evolución sin super-infección, y en continuo, los valores óptimos de rendimiento. **B.** Rendimiento obtenido con las tasas de lisis que optimizan el rendimiento frente a los valores a los que tiende el sistema durante la simulación de evolución, para cada valor de  $\mu$ . **C.** Mostramos los valores de rendimiento en función de  $\kappa$ , con los tres valores diferentes de  $\mu$  usados en la evolución en (A). Encerramos en círculos la región de valores en torno a la que oscila el estado final de la evolución con super-infección. **D.** Simulación en la que una variante sobre-virulenta ( $\kappa = 3 \times 10^1$ ) invade una población de fagos con los valores óptimos de rendimiento ( $\kappa = 3 \times 10^2$ ), en un sistema con super-

infección. **Parámetros:**  $r = 0,04$ ;  $\alpha = 10^{-2}$ ;  $\delta_V = 10^{-3}$ ;  $\beta = 50$ , en **D:**  $\mu = 10^{-3}$ .

### *Modelo complejo con regulación de la lisogenia*

Continuamos el estudio teórico analizando el efecto de la regulación de la lisogenia por el sistema arbitrium, un sistema molecular presente en fagos de la familia SPBeta, como explicamos en la Introducción. Este modelo lo diseñamos de forma que reprodujera fielmente el crecimiento de este tipo de fagos, que sabemos que presentan regulación de la lisis en dos puntos de su ciclo vital. Al comenzar las infecciones ocurre una primera decisión entre lisis o lisogenia, y posteriormente, los lisógenos pueden reactivar o no el ciclo lítico. Para simular este ciclo de vida, nuestro sistema está compuesto una vez más por una población de bacterias hospedadoras ( $S$ ) que se introducen en el sistema a una tasa constante  $\mu$ , se reproducen con el modelo logístico ( $r$ ), y son infectadas por viriones ( $\alpha$ ). Una fracción  $1 - \phi$  de estas infecciones producen lisógenos ( $L$ ) que se reproducen siguiendo el mismo modelo logístico que los hospedadores, y reactivan el ciclo lítico a una tasa lineal  $\lambda$ . Los viriones libres ( $V$ ) se producen por lisis directa de la fracción restante de infecciones ( $\phi$ ), o por reactivación del ciclo lítico en los lisógenos, produciendo ambos procesos la misma cantidad  $\beta$  de viriones; y se eliminan del sistema por adhesiones a todo tipo de bacterias (hospedadoras o lisógenos) y por degradación espontánea a una tasa  $\delta_V$ . Tal y como se describe en la Introducción, el arbitrium regula tanto la lisogenización como la reactivación del ciclo lítico de los lisógenos por medio de un péptido sintetizado por las bacterias infectadas, el cual es producido en nuestro sistema por los lisógenos a una tasa  $\alpha_P$  y se degrada con una tasa lineal  $\delta_P$ . La Figura 3.5 muestra un esquema de este nuevo modelo, que se rige por el sistema de ecuaciones diferenciales:

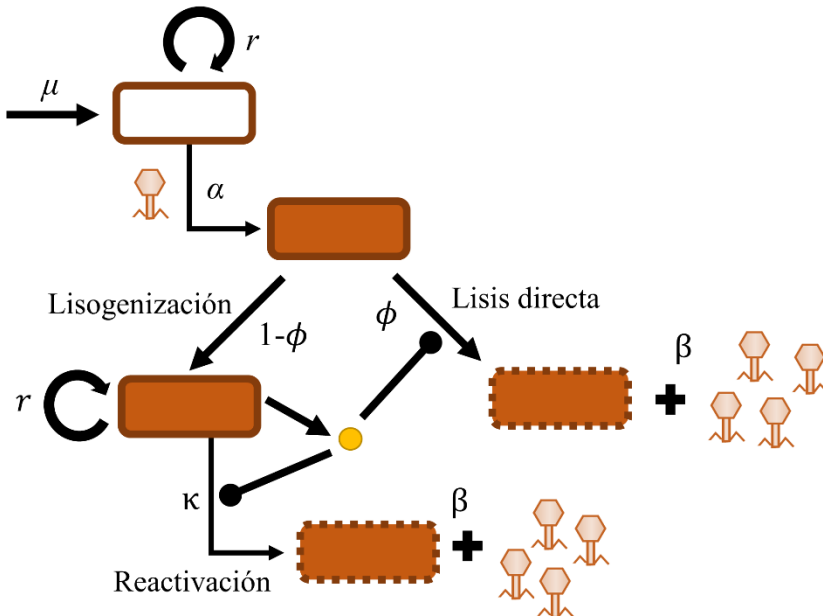
$$\frac{dS}{dt} = \mu + rS(1 - S - L) - \alpha SV$$

$$\frac{dL}{dt} = (1 - \phi)\alpha SV + rL(1 - S - L) - \lambda L$$

(3.3)

$$\frac{dV}{dt} = \beta(\phi\alpha SV + \lambda L) - \delta_v V - \alpha(S + L)V$$

$$\frac{dP}{dt} = \alpha_p L - \delta_p P$$



**Figura 3.5. Modelo de crecimiento de bacterias y fagos lisogénicos con sistema arbitrium.**

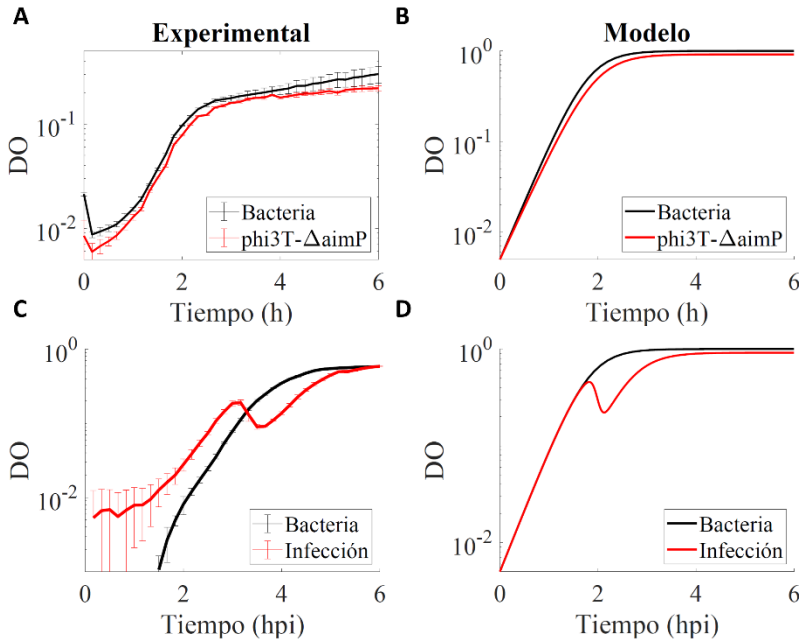
La regulación por arbitrium la modelamos haciendo que tanto la fracción de lisis ( $\phi$ ) como la tasa de reactivación de los lisógenos ( $\lambda$ ) dependan de la concentración del péptido, mediante las funciones:

$$\phi = \frac{\phi_c}{1 + P/K_L}$$
(3.4)

$$\lambda = \frac{\lambda_c}{1 + P/K_R}$$

Siendo  $\phi_c$  y  $\lambda_c$  la fracción de lisis y tasa reactivación en ausencia de péptido (respectivamente), y  $K_L$  y  $K_R$  las concentraciones de péptido en las que  $\phi = \phi_c/2$  y  $\lambda = \lambda_c/2$ , respectivamente. La tasa de crecimiento exponencial de las bacterias ( $r$ ) la podemos ajustar de curvas de crecimiento de la bacteria *B. subtilis* en solitario, utilizando un lector de DO en tiempo real, como se describe en el apartado de Metodología. Con esto, asumiendo que la inserción del genoma del fago tiene un efecto despreciable en el crecimiento de la bacteria, la tasa de reactivación basal ( $\lambda_c$ ) la medimos comparando el crecimiento de lisógenos y bacterias no infectadas, en ausencia total de péptido. Esto lo conseguimos con una variante mutante de phi3T con una delección en el gen correspondiente al péptido arbitrium, phi3T- $\Delta$ aimP (Figura 3.6A-B). En este contexto, el crecimiento de los lisógenos sigue la ecuación diferencial  $dL/dt = rL(1 - S - L) - \lambda_c L = (r - \lambda_c)L(1 - L - S)$ , por lo cual la tasa de crecimiento exponencial observada para los lisógenos coincide con  $r - \lambda_c$ . Observamos que estos lisógenos de phi3T- $\Delta$ aimP presentan una tasa de crecimiento sensiblemente menor que las bacterias no infectadas, lo que nos indica que

la tasa de reactivación espontánea medida ( $\lambda_C = 4,1 \times 10^{-3}$ ) se encuentra por encima de la mayoría de fagos lisogénicos estudiados, que oscilan en una horquilla de  $10^{-5}$  a  $10^{-3}$  (Berngruber et al., 2013; Zong et al., 2010; Little and Michalowski, 2010).



**Figura 3.6 Ajuste de parámetros del modelo.** **A:** Medida de la tasa basal de reactivación de la lisis comparando el crecimiento de lisógenos de una variante mutante de phi3T sin el sistema arbitrium. Crecemos las bacterias a partir de una DO inicial de 0,01, aproximadamente, y tras 5 horas y media de crecimiento, medimos el título de viriones. **C:** Crecimiento de bacterias e infección. Mostramos el crecimiento de bacterias sin infectar (*B. subtilis* Δ6), y de infecciones de fagos, a partir de una DO de 0,01 y 10<sup>5</sup> PFUs de fagos. En **B** y **D** mostramos las correspondientes simulaciones del modelo. **Parámetros:**  $r = 0,049$ ;  $\alpha = 2,59 \times 10^{-2}$ ;  $\lambda_C = 4,1 \times 10^{-3}$ ;  $\phi_C = 0,78$ ;  $\delta_V = 10^{-3}$ ;  $\beta = 28,66$ .

La adhesividad/infectividad de los viriones la medimos incubando viriones libres con un cultivo saturante (DO ~ 2) de bacterias no infectadas.

Partiendo de un título conocido de viriones, medimos la pérdida de título tras 30 minutos de incubación. Pasado este tiempo, centrifugamos el cultivo para retirar las bacterias y medimos nuevamente el título de viriones. En la Tabla 3.1 podemos ver los datos de título antes y después de la incubación. Como en estos 30 minutos podemos asumir que las bacterias no producen viriones debido a la infección, ya que no ha dado tiempo suficiente a completar un ciclo infectivo, el único proceso que ocurre es la adhesión de viriones a las bacterias, por lo que podemos asumir que el título de viriones evoluciona según la ecuación diferencial:  $dV/dt = -\alpha VS$ . Asumiendo una cantidad saturante de bacterias ( $S = 1$  en nuestro modelo), podemos resolver la ecuación como  $V(t) = V_0 e^{-\alpha t}$ , por lo que podemos calcular la infectividad como:  $\alpha = -\ln(V/V_0)/t$ . De forma similar, intentamos medir la tasa de degradación espontánea de los viriones, incubándolos en medio líquido LB. Sin embargo, al no encontrar diferencias significativas en el título tras incubaciones de hasta 6 horas, decidimos usar los valores estándar que se usan en la literatura (el mismo que usamos con el modelo simple de  $\delta_V = 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ).

Réplica	Título inicial (PFUs/mL)	Título final (CFUs/mL)	Ratio
1	$1,88 \times 10^4$	$1,42 \times 10^4$	0,755
2	$1,64 \times 10^4$	$1,40 \times 10^4$	0,854
3	$2,02 \times 10^4$	$1,16 \times 10^4$	0,574

**Tabla 3.1. Título de viriones antes y después de una incubación de 30 minutos con un cultivo saturante de bacterias (DO ~ 2).**

El resto de parámetros los medimos ajustando por mínimos cuadrados el resultado del modelo con un par de observaciones experimentales. La cantidad de viriones producidos por ciclo lítico ( $\beta$ ) la ajustamos midiendo la ratio entre lisógenos y viriones producidos de forma espontánea por los lisógenos, tras unas 5 horas y media de crecimiento. En este contexto,

cuando sólo existen lisógenos en el medio, estos se replicarán hasta ocupar todo el nicho, y algunos reactivarán el ciclo lítico, produciendo viriones. Estos viriones no pueden infectar ninguna bacteria, pero sí se adherirán a ellas. De esta forma, el cociente entre viriones y lisógenos, tras el tiempo de medición, dependerá de la tasa de crecimiento de los lisógenos, la tasa de reactivación y la adhesividad, que ya las hemos medido antes, y también de los viriones producidos por ciclo. Ajustamos por mínimos cuadrados el resultado del modelo en este contexto, con los datos experimentales mostrados en la Tabla 3.2.

Réplica	Título de viriones (PFUs/mL)	Título de lisógenos (CFUs/mL)	Ratio
1	$1,62 \times 10^8$	$3,8 \times 10^7$	4,26
2	$1,96 \times 10^8$	$4,36 \times 10^7$	4,5
3	$2,43 \times 10^8$	$4,32 \times 10^7$	5,63

**Tabla 3.2. Título de viriones y lisógenos producidos por el crecimiento de los lisógenos tras 5 horas y media, en medio LB, con una DO inicial de 0,005.**

Finalmente, el parámetro restante del modelo que no está relacionado con el arbitrium, fracción inicial de lisis ( $\phi_C$ ), la ajustamos usando curvas de infectividad. Como vemos en la (Figura 3.6C-D), tras unas 3-4 horas tras incubar viriones libres con bacterias no infectadas, ocurre un evento de lisis seguido de una recuperación de la DO. Esto se debe a la lisis inicial producida por las infecciones, y el posterior crecimiento de los lisógenos. Para este punto, todos los parámetros del modelo tienen cierta influencia, pero en la magnitud del evento de lisis (diferencia de DO entre el máximo y el mínimo local observados, Figura 3.6C-D), el más importante es la fracción basal de infecciones líticas. Usando los parámetros ya medidos, dejamos únicamente la variable  $\phi_C$  como parámetro libre y ajustamos por mínimos cuadrados el resultado del modelo (Figura 3.6D) con la curva de



DO observada experimentalmente (Figura 3.6C). En la Tabla 3.3 podemos ver un resumen de todos los parámetros y sus valores.

Parámetro	Valor	Unidades	Definición
$\mu$	variable	$S \text{ min}^{-1}$	Tasa de entrada de bacterias
$r$	$4,88 \times 10^{-2}$	$\text{min}^{-1}$	Tasa de crecimiento exponencial de las bacterias y lisógenos <sup>1</sup>
$\alpha$	$1.12 \times 10^{-2}$	$L V^{-1} S^{-1} \text{ min}^{-1}$	Infectividad de los viriones <sup>4</sup>
$\phi_c$	0,78	adimensional	Fracción de infecciones líticas en ausencia de péptido <sup>2</sup>
$\lambda_c$	$4,1 \times 10^{-3}$	$L^{-1} \text{ min}^{-1}$	Tasa de reactivación de los lisógenos en ausencia de péptido <sup>3</sup>
$\beta$	15	$V \text{ min}^{-1}$	Viriones producidos por cada ciclo lítico <sup>4</sup>
$\delta_v$	$10^{-3}$	$\text{min}^{-1}$	Tasa de degradación de viriones
$\alpha_p$	100	$UA \text{ min}^{-1}$	Tasa de producción del péptido arbitrium
$\delta_p$	0,01	$\text{min}^{-1}$	Tasa de degradación del péptido arbitrium
$K_{L/R}$	variable	UA	Sensibilidad al péptido que controla los procesos de lisis y lisogenia

**Tabla 3.3. Significado, unidades y valores de los parámetros del modelo.**

<sup>1</sup>Ajustada de las curvas de crecimiento de *Bacillus subtilis*.

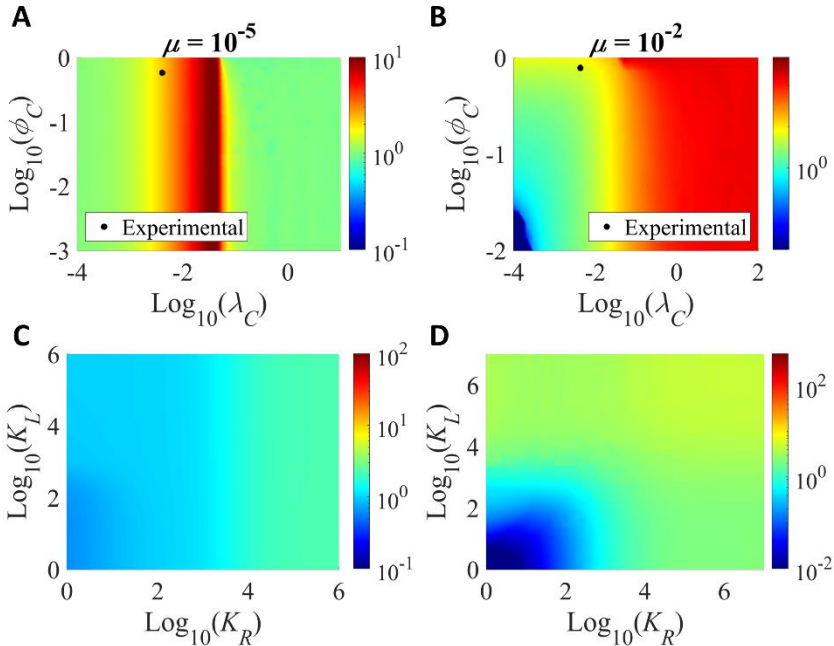
<sup>2</sup>Ajustadas del experimento de infectividad.

<sup>3</sup>Ajustada de las curvas de crecimiento de los lisógenos.

<sup>4</sup>Ajustada de la ratio PFUs/CFUs tras la reactivación de los lisógenos.

Una vez ajustados todos los parámetros no relacionados con arbitrium, iniciamos el estudio observando el comportamiento del sistema en función de la cantidad de bacterias disponibles, como hicimos con el sistema simple. En este caso, al haber dos procesos involucrados en la decisión lisis/lisogenia (lisogenización inicial y reactivación del ciclo lítico en los lisógenos), estudiamos el peso de ambos en dos estados diferentes de entrada de bacterias, que estén por encima o por debajo del umbral lítico, y analizamos el efecto de variar las tasas basales ( $\phi_C$  y  $\lambda_C$ ) y sus correspondientes constantes de regulación por arbitrium ( $K_L$  y  $K_R$ ). El efecto de las tasas basales lo estudiamos simulando un sistema sin arbitrium, para el cual simplemente usamos  $\alpha_P = 0$ , y, por tanto, con  $P$  siendo siempre 0, tendremos  $\phi = \phi_C$  y  $\lambda = \lambda_C$ . La Figura 3.7A-B muestra que, por debajo del umbral lítico, el rendimiento viral es insensible a  $\phi$ , ya que la mayor contribución a los genomas virales proviene de la replicación y reactivación de lisógenos, y no de las infecciones, que son escasas. En este caso, nuestro sistema responde a  $\lambda$  exactamente igual que a  $\kappa$  en el modelo simple, existiendo un valor óptimo muy cercano a la tasa de replicación de las bacterias ( $r$ ). Con valores altos de  $\mu$ , la lisis inicial gana peso, pero la reactivación no deja de ser importante. Como se aprecia en la Figura 3.7A-B, ambos valores experimentales se encuentran cerca de su óptimo teórico de rendimiento. Esto es especialmente importante en el caso de  $\lambda_C$ , ya que, como hemos mencionado, se trata de un valor sensiblemente mayor al de otros fagos lisogénicos.

### Rendimiento viral



**Figura 3.7. Rendimiento viral del sistema complejo. A-B.** Rendimiento viral del sistema sin arbitrium (usando  $\alpha_P = 0$ ) en función de la fracción de infecciones líticas ( $\phi_C$ ) y la tasa de reactivación de los lisógenos ( $\lambda_C$ ). Sobreimpresionamos en un punto negro los valores medidos experimentalmente. **C-D.** Rendimiento viral del sistema con arbitrium, en función de los valores de las constantes que regulan la lisis ( $K_L$ ) y la reactivación ( $K_R$ ). Los parámetros usados son los mostrados en la Tabla 3.3, teniendo en **A** y **C**,  $\mu = 10^{-5}$ , y en **B** y **D**,  $\mu = 10^{-2}$ .

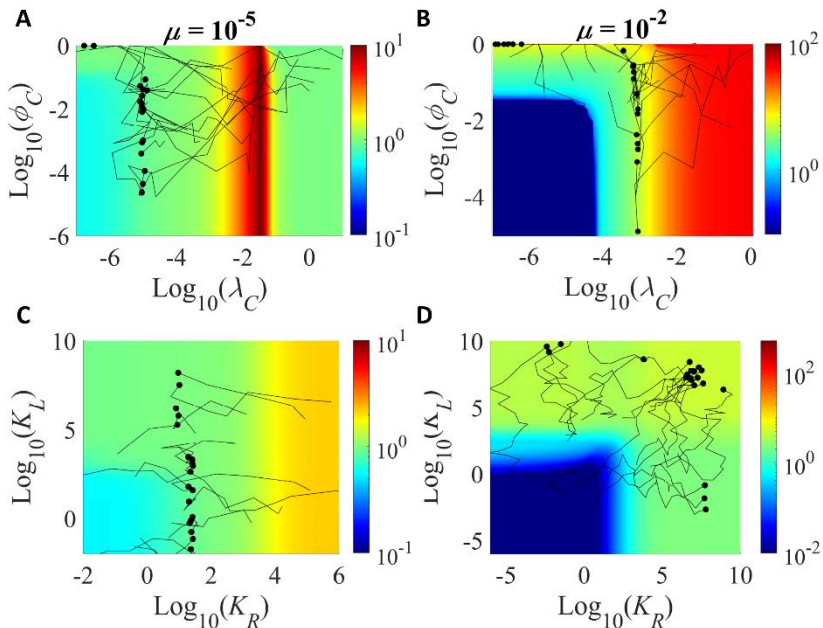
A continuación, introducimos en el sistema la regulación de la decisión lisis/lisogenia mediante el sistema arbitrium, tal y como lo mostramos en los modelos anteriores. En la Figura 3.7C-D representamos el análisis a nivel de población de los parámetros del arbitrium, observando un comportamiento similar al de las tasas basales de sus respectivos procesos: por debajo del umbral lítico, la regulación de la lisis ( $K_L$ ) apenas tiene efecto, siendo más importante la de la reactivación ( $K_R$ ). Por encima del umbral lítico,  $K_L$  gana peso en el rendimiento. Con un valor

suficientemente alto de estas constantes es como si el sistema arbitrium no actuara, y el rendimiento se vuelve insensible (con los parámetros usados en el modelo, el valor crítico está en torno a  $10^6$ ). Como es intuitivo, la capacidad del sistema arbitrium para aumentar el rendimiento viene condicionada por los valores de las tasas basales, es decir, el máximo de rendimiento alcanzado es el que permiten  $\phi_C$  y  $\lambda_C$  (para los que usamos los valores medidos experimentalmente). En ambos procesos se observa que la regulación por arbitrium es siempre perjudicial para el rendimiento viral, el cual se maximiza cuando ambas constantes están por encima de  $10^6$ , independientemente del valor de  $\mu$ . Esto nos indica que el sistema arbitrium no es capaz de optimizar de ninguna forma el rendimiento viral, siendo en cambio perjudicial.

A continuación, realizamos las simulaciones de evolución, tanto de los parámetros basales, como de las constantes arbitrium. En la Figura 3.8 podemos ver las trayectorias evolutivas de estos sistemas, que concuerdan con lo esperado: por debajo del umbral lítico, la selección actúa fundamentalmente sobre el proceso de reactivación, siendo casi irrelevante el efecto sobre los de lisis; mientras que por encima del umbral lítico hay un efecto sobre ambos procesos. Observamos en la Figura 3.8A-B que la selección siempre empuja al sistema a estados sub-óptimos de reactivación, incluso por encima del umbral lítico. Esto nos indica que, similar a lo que ocurría con  $\kappa$  en el modelo simple, existirá un óptimo de competencia que siempre estará por debajo del óptimo de rendimiento (en cuanto a  $\lambda_C$ ). Para la tasa basal de lisogenización ( $\phi_C$ ), cuando el sistema llega a los óptimos de  $\lambda_C$ , su valor se vuelve aparentemente irrelevante, ya que puede adoptar un abanico muy amplio. Sin embargo, encontramos que existe un segundo estado al que tiende el sistema, ya que hay casos en los que se alcanza un valor de  $\phi_C = 1$ , y en los cuales  $\lambda_C$  llega a puntos incluso menores, algo que ocurre más veces cuando el sistema está por encima del umbral lítico. Esto

significa que los fagos lisogénicos pueden tener un valor muy bajo de lisis inicial ( $\phi_C$ ), para los cuales existe un óptimo de competencia estricto de ( $\lambda_C$ ), o un valor de  $\phi_C = 1$ , para los cuales la reactivación debe ser mucho menor. Con estos resultados, nuestro modelo apunta a que la reactivación basal de fagos lisogénicos tendería sistemáticamente a valores bajos, sobreprudentes, lo cual concuerda con lo observado en la naturaleza (Cortes et al., 2019; Berngruber et al., 2013; Zong et al., 2010; Little and Michalowski, 2010).

### Trayectorias evolutivas



**Figura 3.8. Trayectorias evolutivas del sistema complejo.** A-B. Simulaciones de evolución en las que permitimos la variación conjunta de la fracción de infecciones líticas ( $\phi_C$ ) y la tasa de reactivación basal ( $\lambda_C$ ), en un sistema sin arbitrium. Sobre impresionamos las trayectorias evolutivas de las variantes seleccionadas sobre el mapa de rendimiento generado por dichos parámetros (ampliado respecto a la Figura 3.7A-B), mostrando con líneas negras la trayectoria, y con un punto más grueso el estado final. C-D: Simulaciones de evolución en las que permitimos la

variación conjunta de ambas constantes arbitrium ( $K_L$  y  $K_R$ ), sobrepresionando las trayectorias sobre el mapa de eficacia correspondiente (ampliado respecto a la Figura 3.7C-D). Los parámetros usados son los mostrados en la Tabla 3.3, teniendo en **A** y **C**,  $\mu = 10^{-5}$ , y en **B** y **D**,  $\mu = 10^{-2}$ .

En cuanto a la evolución de la regulación por arbitrium, el sistema se comporta igual con baja  $\mu$ , evolucionando a estados sobre-prudentes de regulación de la reactivación ( $K_R$ ), siendo irrelevante la de la lisis ( $K_L$ ). Con alta entrada de bacterias, el sistema tiende a valores altos de ambas constantes, indicando que el arbitrium no podría evolucionar en fagos que tuvieran, de forma sistemática, una gran cantidad de hospedadores disponibles. En cambio, el arbitrium sí sería una herramienta útil en competencia directa en un estado de poca disponibilidad de hospedadores.

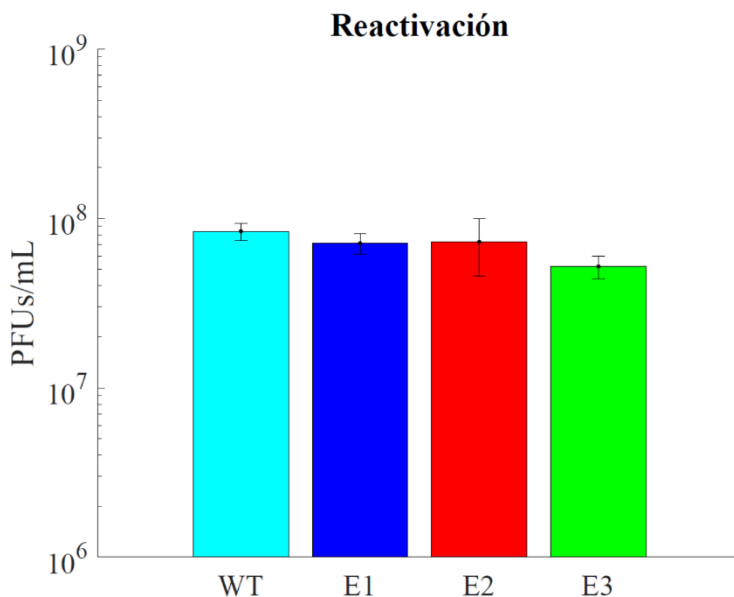
Nuestros resultados muestran que la paradoja del rendimiento vs la tasa representa la evolución de la lisogenia en fagos, esté o no regulada: la evolución favorece variantes sobre-prudentes, que presentan un menor rendimiento en cuanto al número total de genomas producidos, pero que tienen una ventaja en competencia directa con otras más óptimas, lo que conduce a una reducción general de la eficacia de la población. El modelo complejo que desglosa la lisis en los dos procesos (lisogenización inicial y reactivación), indica que este dilema es importante en el proceso de inducción de la lisis en los lisógenos, la cual tiende sistemáticamente a estados sobre-prudentes, ya sea en su tendencia basal o con la regulación del arbitrium. Por otro lado, el modelo simple también nos indica que, en poblaciones con super-infección, los resultados se revertirían, llegando a triunfar variantes sobre-virulentas. Sin embargo, la SIE es un proceso muy extendido en fagos lisogénicos, lo que explica que la mayoría presenten tasas de inducción de la lisis que son bajas a comparación del ciclo de replicación de las bacterias que infectan (Cortes et al., 2019; Berngruber et

al., 2013; Zong et al., 2010; Little and Michalowski, 2010). En el caso del fago phi3T, observamos que su tasa de reactivación basal es especialmente alta a comparación de otros fagos lisogénicos estudiados. Aunque el sistema arbitrium puede contribuir a paliar este efecto, una tasa de reactivación más alta de la media nos puede indicar que el fago phi3T ha evolucionado en un ambiente de alta disponibilidad de hospedadores, o bien que, con estructura poblacional, las variantes que optimizan el rendimiento han podido aislarse y crecer en ausencia de los sobreprudentes. En conjunto, nuestro modelo predice que la SIE prevendría la aparición de variantes virulentas en fagos, haciendo que triunfen variantes que son, desde un punto de vista poblacional, sub-óptimas, ya que no explotan a sus hospedadores tanto como podrían.

### **Evolución de variantes prudentes.**

Para estudiar experimentalmente las predicciones de nuestro modelo, realizamos una evolución experimental con el fago phi3T. Como el parámetro clave que determina la estrategia óptima es el flujo de entrada de bacterias susceptibles, diseñamos una evolución experimental que maximizara la estrategia prudente. Para ello, realizamos pases de evolución de los lisógenos de phi3T en ausencia total de bacterias susceptibles. Con esto, si el sistema fuera capaz de acumular suficiente variación en torno a genes relacionados con estos procesos, el modelo predice que se deberían imponer las variantes que reduzcan la reactivación del ciclo lítico. Tras 20 pases de evolución, evaluamos el sistema, midiendo la reactivación del ciclo lítico en los lisógenos. Para ello, dejamos crecer los lisógenos tanto del ancestro como de las tres réplicas de evolución. Tras unas 5 horas y media, en las que la DO alcanza un punto de equilibrio en torno a 2,

medimos el título de viriones generados. En la Figura 3.9 podemos ver que las líneas evolucionadas producen un título de viriones similar al del ancestro, revelando que no se ha acumulado ningún tipo de variación que afecte a este proceso.

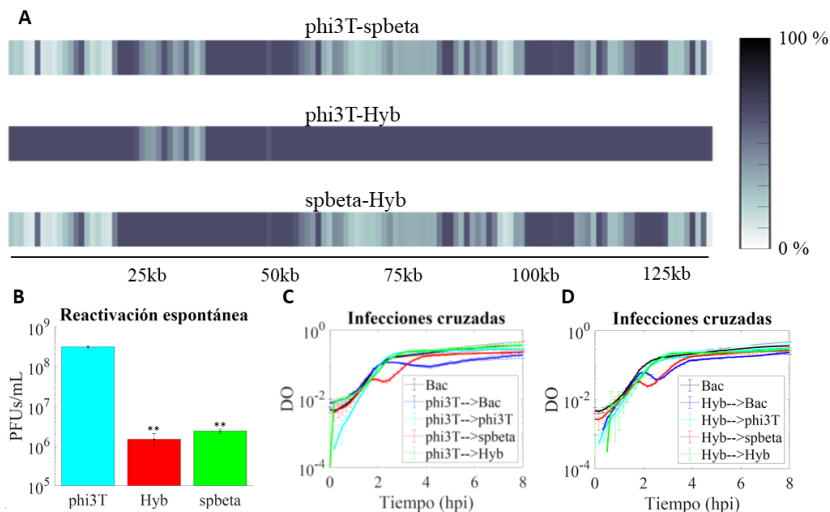


**Figura 3.9. Reactivación del ciclo lítico de los lisógenos de phi3T.** A partir de un cultivo ON de lisógenos, retiramos el medio por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos, resuspendemos las bacterias y las diluimos hasta una DO de 0,01. A continuación, las dejamos crecer durante unas 5 horas y media, y medimos el título de viriones generados (PFUs/mL).

Dado que la evolución experimental no generó variantes interesantes, decidimos estudiar fagos que presentaran fenotipos diferentes. El fago spbeta, como vemos en la Figura 3.10B, presenta una reactivación espontánea sustancialmente inferior al phi3T. Sin embargo, como ya se ha publicado anteriormente (Dragos et al., 2021), los fagos phi3T y spbeta presentan una característica poco habitual en esta familia, y es que no



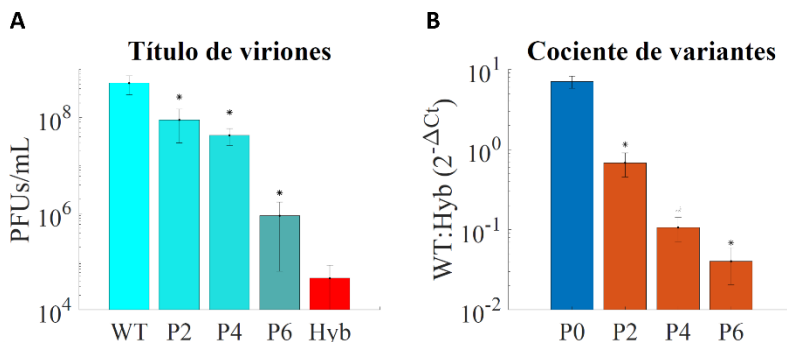
tienen inmunidad cruzada. Es decir, los fagos de uno pueden infectar los lisógenos del otro, y viceversa. Esto, sumado a la gran homología que presentan en varias zonas de su genoma, a menudo acaba generando fagos híbridos, como describen los autores en (Dragos et al., 2021). En el laboratorio disponíamos de una variante híbrida phi3T-spbeta, la cual presentaba una tasa de reactivación espontánea mucho más parecida a la de spbeta que a la phi3T, pero que, sin embargo, presentaba inmunidad frente a phi3T, debido a que el resto de su genoma era mayoritariamente similar al phi3T-WT (Figura 3.10A-B). La región recombinante incluía los genes que van del gen *phi3T\_20* al *phi3T\_27*, correspondientes a los genes *yomE-K* de spbeta. Este fago híbrido representa una excelente herramienta experimental para nuestro estudio, ya que presentaba un fenotipo más prudente que el phi3T, y además se podían realizar experimentos de competencia, ya que presentaba una inmunidad cruzada total con el WT (Figura 3.10C-D).



**Figura 3.10. Fago híbrido phi3T-spbeta.** A. Homología entre los genomas de phi3T y spbeta (arriba), phi3T y la variante híbrida (medio) y spbeta y la variante híbrida (abajo). B. Reactivación espontánea de las

variantes, midiendo el título de viriones tras una incubación de 5 horas y media de los lisógenos. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a phi3T-WT (test t-student, \*\* indicando p-valor < 0,01). **C-D. Ensayos de inmunidad cruzada.** Utilizamos stock de viriones libres para infectar bacterias, tanto no infectadas, como lisógenos de las diversas variantes. Mostramos en negro el control de bacterias sin infectar (*B. subtilis* Δ6), en azul infecciones de bacterias susceptibles, y en cian, rojo y verde, infecciones de lisógenos de phi3T, spbeta, y la variante híbrida, respectivamente. En **C**, los viriones libres corresponden a phi3T-WT, mientras que, en **D**, a la variante híbrida. En todos los casos comenzamos las infecciones con una DO de 0,01 de bacterias, y 10<sup>5</sup> PFUs totales de viriones. Las bacterias son previamente centrifugadas y resuspendidas en medio fresco para eliminar todo el péptido inhibidor que quedara del crecimiento anterior.

Para comprobar la predicción de nuestro modelo, realizamos una evolución por competencia directa entre phi3T-WT y la variante híbrida. Para ello, partimos de una mezcla 1:1 de un cultivo de lisógenos de ambos fagos, en la que tenemos la cantidad de lisógenos y fagos a la que ambos llegan en equilibrio. Ambos generan unos  $(1 \pm 2) \times 10^8$  CFUs/mL de lisógenos tras un cultivo de 6 horas, pero el WT genera unos  $(5 \pm 2) \times 10^8$  PFUs/mL de viriones libres, mientras que el híbrido,  $(2 \pm 3) \times 10^5$ , por lo que podemos considerar que el phi3T-WT tiene un rendimiento mayor, en términos de genomas virales totales. Realizamos la competencia mezclando 1:1 estos cultivos, diluyendo el resultado 1/100, y mezclando con otra dilución 1/100 de bacterias susceptibles, en un volumen final 2 mL. Realizamos sucesivas rondas de competencia diluyendo 1/100 el resultado de cada pase de competencia, y añadiendo la misma cantidad de bacterias. Podemos ver en la Figura 3.11A que, tras sólo 6 pases de competencia, el título de fagos se reduce sustancialmente hasta un punto cercano al producido por los fagos híbridos.



**Figura 3.11. Competencia entre el phi3T WT y el híbrido phi3T-spbeta.** Realizamos una competencia entre la variante WT de phi3T y la variante híbrida con spbeta. El punto de partida es una mezcla 1:1 del resultado de crecer los lisógenos de ambas variantes (el WT genera más título de viriones y el mismo de lisógenos tras cultivo de 6 horas). El paso inicial de competencia se realizó añadiendo a esta mezcla una dilución 1/100 de bacterias susceptibles, en un volumen final de 2 mL. Los pasos sucesivos se realizaron mezclando 1/100 del paso anterior con 1/100 de un cultivo de bacterias, en un volumen final de 2 mL. **A: Título de viriones durante la competencia.** Mostramos en los extremos los títulos de viriones generados por el WT y el Hyb-phi3T-spbeta, y en medio, los títulos de viriones tras 2, 4 y 6 pasajes de competencia. **B: Cociente de genomas del WT.** Mediante qPCR, medimos la frecuencia relativa de genomas de ambas variantes, tanto en el mix inicial como a lo largo de los pasajes de competencia. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al paso anterior, o al phi3T-WT (**A**) o al mix inicial (**B**) en el caso de P2 (test t-student, \* indicando p-valor < 0,05).

Para analizar la frecuencia de cada variante durante la evolución, diseñamos parejas de cebadores que sólo hibridan con el phi3T-WT o con el phi3T-Hyb, ya que se encuentran en la zona de recombinación. Como mencionamos en el apartado de Metodología, diseñamos los cebadores de tal forma que ambas parejas presentaran una eficiencia de amplificación similar, cercana al 100%, lo cual nos permite asumir que la ratio entre genomas presentes (WT:Hyb) en la muestra coincide con  $2^{-\Delta C_t}$ . Realizamos una qPCR de un extracto crudo de las competencias, en los que tenemos DNA tanto de bacterias como de viriones, para cuantificar así genomas

totales. Observamos en la Figura 3.11B que, inicialmente, la gran mayoría de genomas corresponden al phi3T-WT, pero que progresivamente se impone la variante híbrida. Este resultado encaja con las predicciones de nuestro modelo, ya que muestra fagos que reducen el rendimiento global de la población, pero que presenta una clara ventaja en términos de competencia directa, ya que se imponen frente al WT en pocas generaciones de competencia.

---

# **DISCUSIÓN**

---



## **La complementación genética aumenta la frecuencia de mutaciones letales.**

El primer resultado obtenido en nuestro estudio teórico de los efectos de la diversidad en co-transmisión, es que la complementación genética de mutaciones letales es incapaz de incrementar la eficacia de la población a largo plazo, algo que coincide con otros estudios similares (Sardanyes and Elena, 2010; Gao and Feldman, 2009). Observando la Figura 1.2, lo que vemos es que, en las primeras generaciones, la complementación sí aumenta la eficacia media de la población. Dicho aumento se debe a la relajación del efecto de la selección en contra de las mutaciones letales. En un sistema de un único *locus*, cuya frecuencia de emergencia de mutaciones letales por generación sea  $\alpha$ , la frecuencia en equilibrio de alelos funcionales será  $p = 1 - \alpha$ , y la eficacia media de la población, en ausencia de interacciones, coincidirá con la propia frecuencia de alelos funcionales, es decir,  $\bar{w} = p = 1 - \alpha$ . Si esa misma población se agrupara en unidades de infección de tamaño  $m$ , en la siguiente generación la eficacia media sería la probabilidad de tener al menos un alelo funcional en cada grupo, es decir, de no tener todos los alelos no funcionales, lo que lleva a  $\bar{w} = 1 - (1 - p)^m = 1 - \alpha^m$ . Sin embargo, según avanzan las generaciones, la eficacia media del sistema con co-transmisión va disminuyendo debido a la acumulación de variantes letales que no son purgadas por la selección. Es decir, el sistema tiende a un punto de equilibrio de igual eficacia media con mayor frecuencia de mutantes, en vez de a uno de mayor eficacia con la misma frecuencia de mutantes. Así, la nueva frecuencia de mutantes en equilibrio del sistema con complementación ( $p'$ ) se alcanzaría cuando  $1 - (1 - p')^m = p = 1 - \alpha$ , lo que lleva a  $p' = (1 - \alpha)^{1/m}$ , un valor que será siempre menor que  $p$  teniendo  $m > 1$  y  $0 < \alpha < 1$ . Con las simulaciones realizadas en el primer

capítulo de la tesis vemos que el resultado en un sistema multi-*loci* sigue la misma dinámica.

Existe evidencia experimental en virus de la acumulación de diversidad durante la co-transmisión. Sabemos que, cuando se realiza una evolución experimental a una MOI superior a uno, se obtienen secuencias defectivas (Andreu-Moreno and Sanjuán, 2020). Como explicamos en la introducción, una de las evidencias de la existencia de co-infección abundante, en infecciones *in vivo*, es precisamente que se observa la presencia de estas secuencias, que se han detectado en VSV (Holland and Villarreal, 1975), el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV, del inglés *Lymphocytic Choriomeningitis Virus*) (Ziegler and Botten, 2020), o en infecciones en humanos por parte de MeV (Cattaneo et al., 1987), IAV (Vasilijevic et al., 2017; Saira et al., 2013; Lui et al., 2019) y el virus respiratorio sincitial (RSV, del inglés *Respiratory Syncytial Virus*) (Sun et al., 2015).

Existen también casos de evolución de secuencias defectivas que no son interferentes para la población. En (Charpentier et al., 1996) los autores describen cómo, tras realizar 100 pases de evolución experimental a alta MOI del virus de la fiebre aftosa del ganado (FMDV, del inglés *Foot-and-Mouth Disease Virus*), infectando células BHK, obtienen dos secuencias defectivas en la población. Dichas variantes contienen deleciones que afectan a la región de la proteinasa L, la primera proteína del virus en ser traducida. Al igual que cualquier DIP, estas variantes eran incapaces de infectar células por sí solas, pero si se las complementaba con un virus WT, eran capaces de replicar y encapsidar su genoma. La gran diferencia con las DIPs radica en que estas secuencias no eran interferentes, no afectaban a la replicación del virus WT, sino que sencillamente replicaban junto a él. En (García-Arriaza et al., 2004) los autores llevan más allá el estudio, llegando a los 260 pases de evolución, en las mismas condiciones, y



obteniendo una población de tres variantes mutantes ( $\Delta 417$ ,  $\Delta 999$  y  $\Delta 1017$ ). Lo más interesante de este estudio es que dichas variantes eran complementarias entre sí. Concretamente, la variante  $\Delta 417$  afectaba una vez más a la proteinasa L, mientras que las otras dos, que eran solapantes, afectaban a genes de la cápside. Infecciones iniciadas con la variante  $\Delta 417$  y cualquiera de las otras dos eran totalmente funcionales, sin necesidad de la presencia del virus WT. Se trata por tanto de la generación de una población de variantes mutantes complementarias, en la que se pierde la secuencia ancestral (la cual se encontraba a una frecuencia menor que 1/10000 tras la evolución), tal y como describe nuestro modelo que puede ocurrir tras una evolución continuada a alta MOI.

El ejemplo de la evolución de FMDV generando mutantes de delección complementarios se puede interpretar como una transición desde un virus no segmentado a uno multi-partito (Elena, 2016), ya que la secuencia ancestral de la evolución contenía el genoma completo, mientras que la población mutante resultante consistía en dos familias de secuencias con deleciones complementarias, que necesariamente requerían de co-transmitirse para generar una infección. Este experimento evidencia la principal consecuencia de la transmisión continuada bajo régimen de co-infección y complementación: la reducción de la selección en contra de los mutantes deletéreos conlleva a la coexistencia de secuencias mutantes y, a largo plazo, a la pérdida de las secuencias WT.

Desde su descubrimiento, la mera existencia de los virus multi-partitos ha supuesto un misterio, ya que se trata de virus que necesariamente requieren de la co-infección para sobrevivir, y se ha buscado explicar qué tipo de ventaja podía ofrecer tener el genoma fragmentado en diferentes ‘cromosomas virales’ (Lucía-Sanz and Manrubia, 2017). Siguiendo el experimento de FMDV, en (Ojosnegros et al., 2011) los autores someten a la población bipartita a un régimen de baja MOI, obteniendo una población

de molécula única (un nuevo virus no segmentado), en la que se ha revertido la partición del genoma, como resultado de la recombinación entre dos variantes. Al comparar ambas poblaciones (la bipartita y la recombinada), los autores encuentran que la variante bipartita presenta una mayor estabilidad de sus partículas infectivas.

Los experimentos de FMDV suponen en conjunto una prueba de concepto de la generación de virus multi-partitos: un régimen de transmisión a alta MOI constante que, mediante complementación genética, anula el efecto de la selección en contra de deleciones. Al surgir estos mutantes y presentar una ventaja (por la mayor estabilidad de sus viriones), se imponen en la población frente a la secuencia completa. No tenemos evidencia de que esta ventaja de mayor estabilidad de las partículas sea extrapolable a todos los virus con genomas más cortos, sin embargo, reducir el tamaño del genoma suele traer una ventaja replicativa en co-infección, la cual es la base de la ventaja de las DIPs. Incluso en ausencia de ningún tipo de ganancia de eficacia, tanto nuestras simulaciones como los otros trabajos teóricos publicados (Sardanyés and Elena, 2010; Gao and Feldman, 2009) indican que las mutaciones deletéreas o letales se acumularán en la población si existe complementación genética que reduzca la selección en su contra. Es decir, no es necesaria una ventaja adaptativa que compense el efecto negativo de las mutaciones para explicar su emergencia, únicamente un régimen de neutralidad como el que supone la co-transmisión y complementación. El reto de explicar el origen de los virus multi-partitos estaría, por tanto, en explicar el origen de dicho régimen de transmisión a alta MOI, siendo la complementación genética una consecuencia, y no causa, de dicha transmisión.

Como explicamos en la Introducción, la co-transmisión se puede deber sencillamente a una alta ratio entre partículas y células susceptibles (alta MOI general), o a mecanismos específicos. En el caso de virus animales,

ya explicamos que muchos obtienen una alta MOI local debido a la producción de grandes cantidades de viriones en entornos de difusión limitada como son los tejidos animales. Esta alta MOI local puede ser la norma en infecciones naturales, como se evidencia por la presencia DIPs. Otros casos como los virus que se transmiten mediante transmisión directa célula-célula también tienen, potencialmente, la capacidad de co-transmitir múltiples variantes. Estos casos generarían por sí solos ambientes propicios para la abundante complementación entre variantes, pero su origen es independiente a la propia complementación. En el primer caso, la co-infección es un efecto secundario de la acumulación local de muchas partículas infecciosas, y en el segundo caso, de la vía de transmisión. Se necesitan más estudios en el campo para saber si este fenómeno de la complementación de mutaciones como efecto secundario de las vías de transmisión es extrapolable o no a la mayoría de los virus. Estudios poblacionales de detección de DIPs en infecciones *in vivo* pueden servir de orientación para detectar hasta qué punto existe co-infección y complementación en infecciones naturales.

**La complementación genética fomenta la adaptabilidad en mapas de eficacia epistáticos.**

En la segunda parte de nuestro estudio de la co-transmisión sí encontramos un efecto directamente beneficioso de la complementación genética: el incremento de la adaptabilidad debido a la acumulación de variación genética. Demostramos, mediante nuevas simulaciones, que esta acumulación de variación, debido a la reducción de la selección en contra de mutantes deletéreos, fomenta la adaptabilidad, ya que aumenta la capacidad de la población para explorar paisajes adaptativos epistáticos.

Mientras que los factores poblacionales y genéticos que determinan la estabilidad evolutiva de la cooperación han sido ampliamente investigados (Bourke, 2011; Lehtonen, 2016; Nowak and Sigmund, 2004; Nowak, 2006; West et al., 2007b; Fletcher and Doebeli, 2009), cómo la cooperación retroalimenta la adaptabilidad es un tema menos explorado. También existen estudios previos que han analizado cómo evolucionan las poblaciones en paisajes adaptativos epistáticos (Payne and Wagner, 2019; Fragata et al., 2019; Kondrashov and Kondrashov, 2015; Weinreich et al., 2006; da Silva et al., 2010; Schenk et al., 2013), pero en ellos no se ha abordado cómo afecta la cooperación entre variantes genéticas distintas a la adaptabilidad. Hasta donde sabemos, sólo en (Obolski et al., 2017) se explora esta conexión, donde los autores determinan que la cooperación por bienes comunes incrementa la adaptabilidad al facilitar los saltos entre picos en paisajes adaptativos rugosos. Nuestros resultados continúan esta línea, mostrando una clara conexión entre complementación genética, que es una forma de cooperación entre variantes, y adaptabilidad.

Un aspecto fundamental que debe tener cualquier población de cooperadores es la capacidad para aislar a los tramposos, lo cual se consigue, por diferentes mecanismos, aumentando el parentesco genético entre los individuos actores y receptores de la cooperación. Para nuestro modelo de complementación, esto supone una reducción de la capacidad de adaptabilidad, ya que esta se basa en la interacción entre diferentes secuencias. No en vano, cuando comparamos la adaptabilidad del sistema de grupos aleatorios con el de grupos emparentados, los primeros llevan ventaja. Sin embargo, en presencia de tramposos, los grupos aleatorios son invadidos, mientras que los grupos emparentados son prácticamente insensibles, manteniendo un grado de adaptabilidad superior a la del sistema sin interacciones. Nuestras simulaciones desvelan que existe

margen para evitar a los tramposos a la par que se aumenta la adaptabilidad mediante la complementación de variantes genéticas distintas.

Aunque nuestro modelo está creado para simular la evolución de virus que se co-transmiten, puede haber otros sistemas biológicos que presenten interacciones similares. Por ejemplo, al compartir productos génicos codificados en cromosomas homólogos, los organismos diploides o poliploides tienden a amortiguar los efectos de los alelos deletéreos o letales, como demuestra el hecho de que la mayoría de ellos son recesivos (Bagheri, 2006; Agrawal and Whitlock, 2011; Huber et al., 2018). Las posibles ventajas y desventajas evolutivas de la poliploidía se han estudiado ampliamente, a pesar de lo cual no existe un consenso al respecto (Madlung, 2013). En (Maherali et al., 2009) los autores comparan la resistencia y adaptabilidad de poblaciones diploides y tetraploides de *Chamerion angustifolium* a diferentes relaciones hídricas, concluyendo que las poblaciones tetraploides tenían mayor capacidad de resistencia, pero que esta capacidad no se explicaba directamente por la duplicación genómica, sino que había surgido como un fenómeno adaptativo posterior. Sin embargo, no determinan si esta adaptación la explica directamente el incremento de la ploidía, o es un efecto secundario. En un estudio similar en (Ramsey, 2011), el autor describe que las semillas de *Achillea borealis* que son hexaploides presentan mayor supervivencia en dunas, al ser trasplantadas desde invernaderos. En este caso, utilizando hexaploides artificiales, concluye que el 70% de la ganancia de eficacia se debe directamente al incremento de la ploidía, lo que deja un 30% de efecto que se gana posteriormente al incremento de la ploidía.

También se han hecho estudios similares en *Saccharomyces cerevisiae* con resultados opuestos. Varios autores han reportado que esta levadura presenta una mayor ganancia de eficacia mientras la población es haploide, aunque las duplicaciones auto-inducidas confieran en sí una mayor eficacia

(Fisher et al., 2018; Gerstein et al., 2010). Sin embargo, es importante recalcar que en estos estudios observan que la mayoría de las mutaciones beneficiosas son recesivas (Marad et al., 2018), las cuales requieren su presencia en homocigosis para la expresión del fenotipo, reduciendo la adaptabilidad en organismos poliploides. En concreto, en los datos de (Gerstein et al., 2010) se observa que las poblaciones con mayor coeficiente de dominancia reducen esa deficiencia de adaptabilidad de los diploides frente a los haploides, incluso con tamaños poblacionales efectivos menores. Estos resultados de *Saccharomyces* concuerdan con la predicción de nuestro modelo de que la complementación genética debe ser total y no parcial para que el sistema presente el incremento de adaptabilidad. Como explicamos en el capítulo 1, nuestros modelos de complementación completa simulan genes dominantes, en los que un solo alelo es suficiente para recuperar el fenotipo de mayor eficacia, mientras que los modelos de complementación media representan caracteres para los cuales la dosis génica determina el fenotipo. En estos casos, la complementación genética tiene un efecto pobre, cuando no perjudicial, en términos de adaptabilidad (como se ve en la Figura 1.11).

El papel de las duplicaciones génicas o genómicas en el desarrollo de nuevos genes o sub-funciones es un fenómeno más estudiado. Siempre que la función del gen original se conserve en al menos una copia, los genes duplicados pueden acumular variación críptica que puede conducir a la sub-funcionalización o a la evolución de nuevas funciones, aunque en muchos casos son sencillamente silenciados (Magadum et al., 2013; Otto, 2007; Freeling and Thomas, 2006), ya que las mutaciones beneficiosas o de ganancia de función son, en proporción, menores a las neutras o deletéreas. La sub-funcionalización consiste en el mantenimiento de la misma función, pero en contextos ligeramente diferentes. Entre muchos ejemplos, tenemos el caso del gen *engrailed-1* y *engrailed-1b* del pez

cebra, que provienen de una duplicación de un segmento de cromosoma, y su principal diferencia es el tejido en el que se expresan. En otros mamíferos como el ratón existe únicamente un *locus*, que se expresa en todos los tejidos necesarios. El principal factor para el mantenimiento de las duplicaciones es, sin duda, el desarrollo de nuevas funciones, y tenemos ejemplos de todo tipo. Sin ir más lejos, se estima que más del 60% de los genes de plantas son parálogos (Panchy et al., 2016), y datos similares se obtienen para otros eucariotas (Kuzmin et al., 2022; Otto, 2007).

Nuestro modelo de cis-complementación es un reflejo de este tipo de adaptación de genes duplicados, ya que podemos interpretar el desarrollo de una función nueva como una evolución a lo largo de un paisaje adaptativo, en el que la secuencia original supone un pico sub-óptimo. Manteniendo una copia funcional que no comprometa la eficacia del individuo, la otra copia (o copias) del gen pueden explorar libremente el paisaje adaptativo hasta encontrar configuraciones de mayor eficacia. La condición para evolución de la nueva función es, una vez más, la neutralidad a la selección negativa que ofrece la complementación genética por parte de la copia que mantiene la función original.

La neutralidad como elemento fundamental en la adaptabilidad se ha considerado desde hace muchos años (Kimura, 1991; Ohta, 1992), pero ha ganado importancia recientemente con estudios que apuntan al papel de la robustez a mutaciones como elemento fundamental, que favorecería la exploración de los mapas genotipo-fenotipo (Payne and Wagner, 2019; Zheng et al., 2019; Zheng et al., 2020). En (Greenbury et al., 2022) los autores estudian mediante asignaciones aleatorias de eficacia, la capacidad de exploración de 3 mapas de secuencias realistas, basados en la estructura secundaria del ARN, la estructura terciaria de proteínas, y la formación de complejos proteicos, encontrando que en los 3 casos siempre se abren caminos neutrales desde cualquier secuencia hacia el óptimo global. Esto

se debe al enorme número de configuraciones diferentes que presentan dichas secuencias. Se requieren más estudios experimentales en el campo para determinar si dicha neutralidad es la norma o la excepción en la mayoría de sistemas biológicos. Los virus, que presentan genomas muy constreñidos, y a menudo proteínas multifuncionales, es presumible que presenten menos neutralidad a la mayoría de las mutaciones. En un contexto como ese, la complementación genética durante la co-transmisión sería una herramienta ventajosa para generar dicha neutralidad.

### **Papel de la complementación genética en la eficacia de la co-transmisión.**

Por último, cabe preguntarse si esta ventaja en términos de variabilidad y adaptabilidad, en el caso de darse en la mayoría de virus que se co-transmiten, sería suficiente como para explicar la presencia de estructuras de transmisión colectiva. Como explicamos en la Introducción, los virus son los sistemas genéticos que presentan las mayores tasas de mutación, en especial los virus de ARN. A diferencia de los bacteriófagos, los virus eucariotas a menudo presentan un rango amplio de hospedadores a los que infectar y una gran capacidad adaptativa para infectar nuevos hospedadores (Shi et al., 2016; Elena, 2016; Parrish and Kawaoka, 2005; Hillung et al., 2014). Dentro de éstos, los virus segmentados y multi-partitos presentan, de media, un rango más amplio de hospedadores (Lucía-Sanz and Manrubia, 2017). Incluso de un mismo hospedador, los virus requieren a menudo de infectar diferentes tipos celulares, para lo cual mantener un cierto grado de diversidad es fundamental. Cuando se fuerza a algunos virus a infectar células diferentes, el resultado más común es generar fenotipos generalistas (Morley et al., 2016; Smith-Tsurkan et al., 2010). La



transmisión colectiva ofrece una alternativa, y es la convivencia de haplotipos que, por separado, podrían ser especialistas de un tipo celular u hospedador concreto, pero que mantendrían una alta eficacia en varios ambientes debido a la co-transmisión.

Este fenómeno se ha observado en los baculovirus, cuyos cuerpos de oclusión (OB) transportan múltiples partículas infecciosas y son esenciales para la transmisión entre hospedadores. Se ha observado que los OB que contienen una mezcla de variantes WT y defectuosas para el gen de la poliedrina se transmiten más eficazmente que los que contienen únicamente secuencias WT, generando infecciones más productivas y con sintomatología más grave (Simón et al., 2006). Esta observación se explicaría debido a que las variantes deficientes en poliedrina se transmiten mejor dentro del hospedador, pero requieren a las WT para dar el salto entre hospedadores. Sin embargo, para demostrar que esta transmisión colectiva puede generar una interacción estable, habría que estudiar si la mayor severidad de las infecciones causada por la presencia de las variantes mutantes conlleva un beneficio directo en la transmisión entre hospedadores, algo que no queda demostrado en el trabajo. En cualquier caso, los autores encuentran poblaciones naturales de baculovirus en las que coexisten ambas variantes, demostrando la presencia de una convivencia estable entre mutantes en poblaciones con CIUs como son los cuerpos de oclusión.

Nuestros resultados, en global, apuntan a la importancia de la transmisión colectiva en el mantenimiento de la variabilidad y la adaptabilidad de los virus. Aunque el papel de la complementación genética no sea suficiente por sí solo para explicar la amplia existencia de CIUs en la virosfera, sin duda es un factor importante que, junto a otros mecanismos como la elevada tasa de mutación, recombinación, o la transferencia horizontal de

genes, contribuye a hacer de los virus los organismos más adaptables del planeta.

### **Los virus presentan interacciones sociales sin co-infectar la misma célula.**

Como ya mencionamos en la Introducción, los virus pueden interactuar sin necesidad de co-infectar las mismas células. En los capítulos 2 y 3 de la tesis estudiamos dos ejemplos de interacciones entre variantes virales que se explican utilizando modelos de evolución social. En ambos casos, la interacción sucede entre virus que infectan diferentes células, pero siendo parte de la misma población, y a través de sustancias que difunden entre células (IFN o el péptido arbitrium). La principal diferencia radica en que, en el caso de la evasión de la inmunidad, el factor principal de la interacción es el IFN y la inmunidad innata, activados por genes del hospedador, mientras que, en el caso los fagos, el sistema arbitrium y toda la regulación de la lisis/lisogenia es parte del genoma del virus. Otra similitud entre estos dos sistemas es que ambos se pueden entender desde la paradoja del rendimiento vs la tasa. En el capítulo 3 ya explicamos detalladamente que las variantes conservadoras del fago siguen perfectamente esta lógica, ya que reducen la cantidad total de genomas virales, pero se imponen en competencia directa en un cultivo líquido, en el que no hay estructura poblacional (Figura 3.11). El mutante  $\Delta 51$  de VSV sigue una dinámica similar, ya que su eficacia en solitario es mucho menor a la de VSV-WT, y su presencia reduce la eficacia global de las poblaciones mixtas. Sin embargo, en competencia directa en ausencia de estructura, la variante  $\Delta 51$  se impone al WT, como vemos en las Figuras 2.5 y 2.6.

## **Influencia de los parámetros moleculares/mecanísticos del sistema virus/hospedador en la naturaleza social de los caracteres cooperadores.**

La principal ventaja de nuestro modelo de difusión-reacción es que permite un estudio directo de cómo afectan los elementos mecanísticos del carácter (evasión del IFN) en su naturaleza social, algo que se ha estudiado muy poco en el campo de la evolución social (West et al., 2007b). La mayoría de estudios teóricos que analizan la evolución de la cooperación se realizan con modelos abstractos, que muchas veces tienen poco valor predictivo directo en sistemas experimentales (Nowak et al., 1994; Lieberman et al., 2005; Nowak, 2006; Traulsen and Nowak, 2006; Lehmann, 2007; Marshall 2014; Smith et al., 2010). Por otro lado, la mayoría de estudios experimentales sobre cooperación, especialmente en microorganismos, se han centrado en la descripción mecanística/molecular del sistema de cooperación (Rumbaugh et al., 2012; Diggle et al., 2007; Pollak et al., 2015; Even-Tov et al., 2016; Asfahl and Schuster, 2017), incluso aquellos que utilizan modelos matemáticos (Pai et al., 2012). En el mejor de los casos, los modelos sociales adaptados a sistemas experimentales buscan una forma de calcular el parentesco genético en las interacciones ( $r$ ), como elemento fundamental para determinar la evolución por parentesco. Sin embargo, no se suele explorar la influencia de los elementos mecanísticos en los valores de beneficio ( $b$ ) y coste ( $c$ ) en términos de evolución social, tan importantes como  $r$  para la regla de Hamilton ( $rb - c > 0$ ). En este sentido, la conjunción entre nuestro análisis experimental y modelo de difusión nos permiten estudiar la relación directa entre parámetros específicos del sistema virus/hospedador, como son el coste de bloquear el IFN, la viscosidad del medio, o la velocidad relativa de replicación y

producción de IFN; y los parámetros sociales del sistema (Figuras 2.11 y 2.12).

Con nuestro sistema experimental de VSV demostramos que la evasión de la inmunidad es carácter cooperador, ya que el beneficio de bloquear el IFN no lo recibe en su mayoría el individuo que lo bloquea, sino otros de la población, algo similar a los fagos altruistas que debilitan el sistema CRISPR, o los productores de depolimerasas que difunden. Gracias a nuestro modelo de difusión-reacción, comprobamos que el factor clave que convierte el carácter en altruista es la velocidad de producción de viriones e IFN. El ciclo viral de VSV acaba con la producción de viriones por gemación tras unas 6-8 horas post infección, un tiempo mucho menor que el que requiere el IFN para ser producido, secretado al medio extracelular, y posteriormente activar, en la célula infectada, la apoptosis (Voigt et al., 2016). Con nuestro modelo éramos capaces de explorar diferentes situaciones, y comprobamos que, efectivamente, si el IFN actuaba antes de que se liberaran viriones en las células infectadas, el carácter pasaba de ser altruista a mutualista. En las condiciones normales del sistema, la parte indirecta de la eficacia era la más importante ( $|rb| > |c|$ ), mientras que, si el IFN precedía a los viriones, ocurría justo lo contrario ( $|rb| < |c|$ ), y se reducía el carácter social de la evasión de la inmunidad innata (Figura 2.12). La viscosidad del medio tenía el efecto contrario, ya que, al aumentarla, se disminuía el radio de acción del IFN, y por tanto se potenciaban las interacciones con individuos del mismo fenotipo. El caso extremo de viscosidad consistiría en focos fundados por un solo individuo, en el que la interacción se limitara sólo a individuos de dicho foco y, por tanto, con parentesco genético total, en el cual tendríamos  $r = 1$ . Como sabemos que en nuestro sistema  $|b| > |c|$ , una vez más tendríamos que la parte social es la más importante.

Por último, también estudiamos el efecto del coste de bloquear el IFN. Si dicho coste aumenta, el sistema requerirá mayores niveles de estructura poblacional ( $r$ ), o de beneficios de la cooperación ( $b$ ), para que sea evolutivamente estable por selección por parentesco. Con los parámetros de VSV, nuestro modelo predice que un virus tramposo que sea capaz de producir el doble de progenie que uno WT, en un sistema con la viscosidad del agua, alcanzaría una eficacia similar, y por tanto comprometería la evolución del carácter (Figura 2.11). En nuestros experimentos de competencia, a tiempos cortos, la variante tramposa no obtiene más del 50% de ventaja sobre el WT ( $f_D/f_W = 1,5$ ), y además, los tejidos animales habitualmente tienen una viscosidad mayor, por lo que es poco probable que dichas variantes sobrevivan mucho en la naturaleza. Sin embargo, como bien podemos observar en nuestros ensayos y en el modelo, la eficacia de las variantes varía a lo largo del progreso de las infecciones. Si el virus es forzado a realizar infecciones de un solo ciclo, por ejemplo, en regímenes de MOI superior a 1, las variantes tramposas podrían surgir y dominar la población. Por otro lado, en una población dominada por virus no bloqueantes, un virus bloqueante que sea capaz de formar un foco aislado tendría la capacidad de generar una gran población de cooperadores que sobrepase a los tramposos, como evidencia nuestro análisis de los cuellos de botella. Esto es especialmente importante en el caso de la variante  $\Delta 51$  de VSV, ya que es un virus del cual se ha estudiado su potencial como tratamiento oncolítico (Barber 2004, Lichty et al. 2004). La ventaja de esta variante radica en que muchos tumores no son capaces de producir IFN, y por tanto serían infectados por VSV- $\Delta 51$ , a diferencia de los tejidos sanos, que sí presentan una respuesta inmune innata. Al tratarse de una delección de 3 bases, la reversión de la mutación de  $\Delta 51$  al WT es prácticamente imposible, pero esto no quita que VSV- $\Delta 51$  pueda ser capaz de desarrollar una evasión rudimentaria al IFN durante la infección de los tumores. Nuestro estudio predice que una variante

inhibidora de IFN que surja en estas condiciones tendría que encontrar una región de tejido sano y completamente aislado de los no bloqueadores para que tenga éxito. A la vista de nuestros resultados, esto parece improbable, sin embargo, los cuellos de botella poblacionales que ocurren en la transmisión entre tejidos y órganos pueden abrir la puerta a este escenario.

### **Los virus prudentes también pueden ser tramposos.**

En la tercera parte de la tesis estudiamos la naturaleza social de la prudencia en fagos lisogénicos. En concordancia con resultados teóricos previos, nuestro modelo predice que los fagos más prudentes, es decir, con mayor tendencia a mantenerse como profagos y menos a lisar las bacterias, tendrían una ventaja evolutiva en sistemas con poco o nulo recambio de las bacterias hospedadoras. Sin embargo, en términos poblacionales, estos fagos prudentes presentan cantidades de genomas totales producidos (sumando viriones libres y profagos) menores a las que podrían producir sin extinguir la población de hospedadores. Consideramos a estas variantes como fagos sobre-prudentes, ya que no explotan a sus hospedadores todo lo que podrían. Se trata de una situación paradójica, ya que, en el juego social de rendimiento frente a tasa, las variantes prudentes son las que obtienen el mayor rendimiento del medio en el que crecen, mientras que las rapaces aumentan su eficacia a corto plazo a coste comprometer el rendimiento a largo plazo. Traducido a virus, o parásitos en general, las variantes prudentes son aquellas que infectan y matan menos a su hospedador, a cambio de obtener mayor rendimiento a largo plazo, mientras que las rapaces incrementan la infectividad y la virulencia para obtener ventaja a corto plazo, hasta el punto de poder llegar a colapsar la población de hospedadores.

En el caso de fagos lisogénicos ocurre un cambio de paradigma que altera esta situación, y es que éstos son capaces de replicarse sin comprometer la viabilidad de sus hospedadores, ya que replican junto al cromosoma de las bacterias en forma de profagos. Esto cambia significativamente la dinámica típica de la virulencia, ya que ahora que estos virus no requieren de matar a su hospedador, sólo infectarlo, para asegurarse un nicho de crecimiento. En este escenario, una mayor infectividad seguiría correlacionando con mayor eficacia biológica, pero ahora esta infectividad no tiene por qué tener un límite, ya que infectar al hospedador no acaba necesariamente en su muerte. Así, los fagos con mayor infectividad, pero poca o nula tendencia a lisis, tendrán mucha ventaja en escenarios con poca entrada de bacteria, ya que ‘ocuparán’ el nicho de bacterias disponibles, y replicarán junto a éstas, sin necesidad de generar muchos viriones. Como hemos demostrado, estos profagos podrían aumentar su tendencia a lisar y generar más genomas virales totales, pero esto no les proporcionaría una ventaja competitiva, ya que la mayor fuente de replicación de su genoma es la replicación de los lisógenos.

Podemos analizar si este fenotipo de fago sobre-prudente encaja en la definición de tramposo o desertor en un sistema de cooperación. Los tramposos sociales son individuos que obtienen los beneficios de la cooperación, pero no pagan los costes (o los pagan en menor medida). La virulencia o agresividad de un patógeno se define como el efecto dañino que causa en la eficacia de un hospedador, y en la mayoría de parásitos existe un compromiso entre virulencia, que causa una mayor eficacia a corto plazo, y rendimiento, que aumentará la eficacia a largo plazo (Mosquera and Adler, 1998; Gleichsner and Minchella, 2014; Barrett et al., 2011). En este contexto de virulencia, los cooperadores son los individuos menos virulentos, que explotan de forma prudente a sus hospedadores, y el beneficio de la cooperación es la existencia a largo plazo de una población

de hospedadores disponibles para ser infectados. Por contraparte, el coste es la cantidad de infecciones que se dejan de hacer para obtener este beneficio a largo plazo. Los tramposos son los individuos más virulentos, que sí realizan todas las infecciones que pueden, con el peligro de colapso de la población de hospedadores.

Sin embargo, como mencionamos anteriormente, los fagos lisogénicos presentan una característica distintiva, y es que no requieren de la muerte de su hospedador para su replicación. Si los lisógenos presentaran una tasa de crecimiento sensiblemente menor a la de las bacterias no infectadas, este compromiso podría existir, ya que disminuir las infecciones podría traducirse en un aumento del tamaño total de bacterias que producirían nuevos fagos al ser infectadas. Sin embargo, esto no se cumple para el caso de los lisógenos de  $\phi$ 3T o  $\phi$ beta en *B. subtilis* (al igual que muchos otros fagos lisogénicos), que llegan a saturar los cultivos al igual que las bacterias no infectadas. De hecho, la cepa estándar de laboratorio de *B. subtilis*, *B. subtilis* 168, presenta 2 profagos silentes (PBSX y el propio  $\phi$ beta), y 4 zonas ‘*profago-like*’ (Kohm and Hertel, 2021) a lo largo de su genoma, y no le suponen un coste en términos de replicación. Debido a esto, el concepto de virulencia clásico no es el más adecuado para nuestro sistema, ya que infectar o no infectar a las bacterias no afectará a su población si todas las infecciones se mantuvieran como profagos.

En cambio, podemos analizar, como presentamos en el capítulo 3, el efecto poblacional y en competencia directa. Desde este punto de vista, los tramposos deberían ser individuos con una menor eficacia que los individuos cooperadores cuando están aislados (ya que con  $r = 1$  tenemos que  $f_W - f_D = b - c > 0$ ), pero que en competencia directa, estos tramposos tendrían ventaja en un medio sin estructura poblacional, y serían capaces de desplazar a los cooperadores ( $r = 0$ , y por tanto  $f_W - f_D = -c < 0$ ), reduciendo la eficacia global de la población. Nuestro sistema



cumple ambas condiciones, tanto el modelo simple de virulencia, como el de fagos lisogénicos con arbitrium. Según la teoría de la evolución por parentesco, el carácter *tramposo* debe ser aquel que conlleve: (1) beneficio hacia el tramposo en detrimento del cooperador y (2) que los beneficios y costes emerjan de la propia cooperación (Ghoul et al., 2014). En nuestro sistema hay claramente un beneficio hacia las variantes sobre-prudentes, ya que éstas desplazan a las variantes más líticas en competencia directa. Además, los beneficios y costes se obtienen directamente de la disminución de la lisis, que es lo que reduce la eficacia global de la población. Así pues, consideramos que los fagos sobre-prudentes encajan en la definición evolutiva de tramposos.

### **La importancia de la exclusión de la superinfección en el dilema de la prudencia.**

Un aspecto fundamental para la eficacia de los virus prudentes es la exclusión de la superinfección. Como hemos mencionado anteriormente, los lisógenos son, por lo general, inmunes a sucesivas infecciones por parte de otros fagos de la misma población, y también por fagos similares. En el caso de los fagos de la familia de SPBeta, como es el phi3T, la exclusión de la superinfección ocurre preferentemente entre fagos de la misma especie, y también de otros estrechamente relacionados, por medio del gen *yomJ* (McLaughlin et al., 1986; Kohn and Hertel, 2021). La inmunidad cruzada con otros fagos más alejados filogenéticamente ocurre a través de una proteína transmembrana llamada NonA, la cual se ha demostrado que genera infecciones abortivas en fagos de la familia SP10 (Yamamoto et al., 2014). Sin embargo, es curioso que el fago spbeta y el phi3T no generen inmunidad cruzada. Se trata de fagos muy cercanos filogenéticamente,

hasta el punto de tener grandes zonas de alta homología (Figura 3.10), lo que conlleva que se generen fagos híbridos que son biológicamente estables. Estos fagos presentan una dinámica de lisis/lisogenia similar, regulada en ambos casos por el sistema *arbitrium*, aunque con péptidos diferentes (Erez et al., 2017). Sin embargo, el hecho de que ambos presenten tasas de reactivación espontánea sustancialmente diferentes nos facilitó estudiar este proceso, ya que el híbrido, aunque poseía sólo unos pocos genes de *spbeta*, presentaba un fenotipo similar, pero seguía manteniendo la exclusión de la super-infección con el  $\phi$ 3T. La exclusión de la superinfección se ha demostrado también en fagos lisogénicos de *Pseudomonas* (Bondy-Denomy et al., 2016), *Streptococcus* (Sun et al., 2006) y *Salmonella* (Owen et al., 2020).

Como indica nuestro modelo (Figura 3.4), además de otros similares estudiados anteriormente (Nowak and May, 1994; Gandon et al., 2002), si se permite super-infección o co-infección, la sobre-virulencia se vuelve la estrategia óptima, a menos que existan mecanismos de evolución de la cooperación, como es la estructura poblacional. Varios estudios experimentales corroboran esta predicción, como el de (Smith, 2011), que analiza el crecimiento de plásmidos en *E. coli*. El autor describe que el factor determinante para el éxito de los plásmidos residía en la competencia intra-hospedador, aumentando la virulencia cuando esta competencia es intensa. Algo similar encuentran en (Leggett et al., 2013), donde se realiza una evolución experimental del fago  $\phi$ 2 de *Pseudomonas fluorescens*, encontrando que, cuando esta evolución se realiza a alta MOI, los fagos desarrollan una plasticidad fenotípica que les permitía ser más virulentos en co-infección. Sin embargo, otros estudios *in vivo* en los que también existe competencia intra-hospedador han encontrado condiciones en las que las variantes menos virulentas se imponen, como con *Pseudomonas syringae* infectando *Arabidopsis thaliana* (Barrett et al., 2011), o con

diferentes patógenos fúngicos de insectos (Staves and Knell, 2010). Se necesitan más estudios, y con condiciones más controladas de parentesco y grado de competencia intracelular, para determinar los factores clave que determinan la evolución de la virulencia y la prudencia en virus con la capacidad de lisogenización.

### **Perspectivas futuras.**

Con la evidencia a día de hoy, se puede afirmar que los virus presentan interacciones sociales como cualquier otra población de organismos, incluso en ausencia de co-infección directa de las mismas células, como demostramos en los capítulos 2 y 3. Dentro del campo, una de las preguntas más relevantes que quedaría por responder es si las unidades colectivas confieren una ventaja evolutiva a los virus que es común a todos ellos, o si su evolución se explica por convergencia, y por tanto, cada una de las CIUs diferentes tendrá una explicación evolutiva particular, centrada en el tipo de virus en el que surge. Nuestro estudio sobre la complementación genética durante la co-transmisión es un intento de explicar un efecto común a todos los virus. Al demostrar que la transmisión colectiva puede incrementar la diversidad genética, y que esto se puede traducir, en determinadas circunstancias, en un incremento en la adaptabilidad, establecemos el que puede ser un efecto transversal de la co-transmisión en todos los virus. Que el aumento de la diversidad confiere una ventaja evolutiva es algo que está demostrado con estudios experimentales (García-Arriaza et al., 2004; Andreu-Moreno and Sanjuán, 2020), pero el efecto de la transmisión colectiva en la adaptabilidad aún es un campo por explorar. Por desgracia, nuestro estudio experimental no consiguió arrojar luz sobre este aspecto, debido a la acumulación de mutantes defectivos. En

un estudio sobre el salto zoonótico de IAV, los autores encontraron que las variantes responsables de la epidemia de la gripe aviar se encontraban en pequeñas proporciones en cerdos (Murcia et al., 2012). Estas variantes presentaban una eficacia baja en los cerdos, pero se mantenían en la población gracias a co-infecciones con otras variantes. Aunque no sea una prueba directa de que la complementación en co-infección sea la responsable última de la emergencia de estas variantes, este tipo de estudios poblacionales pueden servir de orientación sobre si este efecto de la complementación es transversal en la virosfera, y en caso contrario, en qué tipo de virus es más interesante estudiarlo.

Otro factor determinante es la capacidad de co-transmitir variantes que presentan cada una de las diferentes CIUs. Sabemos que los agregados de VSV sí son capaces de generar infecciones de variantes diferentes (Cuevas et al., 2017; Andreu-Moreno and Sanjuán, 2018), pero que las vesículas de CVB3, aunque se generen en células co-infectadas por diversos mutantes, son altamente ineficientes para transmitir dicha diversidad (Bou et al., 2019). Sin embargo, en dicho estudio no se encontraron beneficios directos netos derivados de esa co-transmisión, cosa que sí ocurre con otros enterovirus que se transmitían mediante vesículas (Santiana et al., 2018). Este último estudio, al ser *in vivo*, no era capaz de determinar qué tipo de ventaja intracelular específica proporcionaba la transmisión colectiva por vesículas, o si éstas eran o no eficaces a la hora de co-transmitir diversas variantes. En los cuerpos de oclusión de baculovirus, en cambio, sí existe evidencia de que se co-transmiten secuencias distintas, y de que esta co-transmisión conlleva una ventaja debido a la especialización (Simón et al., 2006). Determinar, como se hace en (Bou et al., 2019), la capacidad de co-transmitir, es fundamental para determinar el papel de la complementación genética, y de otros mecanismos como la recombinación, en la evolución de la transmisión colectiva. De igual forma, es también importante

determinar la cantidad de genomas virales que se transportan, y que inician las infecciones, ya que es otro elemento clave en la complementación genética, y de la cual se ha explorado poco en los estudios de unidades colectivas de virus.

Como discutimos antes, otro aspecto a determinar es si la complementación genética se debe entender como causa o consecuencia de la transmisión colectiva. La complementación genética existirá siempre que haya co-infección entre variantes, y que éstas sean capaces de compartir sus productos génicos. Sin embargo, esto puede tener efectos potencialmente beneficiosos que expliquen por sí solos la existencia de dicha co-transmisión, o ser neutros o perjudiciales, lo que significa que el origen de la co-transmisión deben explicarse por otros mecanismos. Este sería el caso de la emergencia de virus multi-partitos, los cuales emergerían como consecuencia de la complementación genética, pero la ventaja evolutiva que ofrecen no vendría directamente de dicha complementación.

Respecto a las interacciones indirectas, como ya mencionamos antes, uno de los factores menos estudiados es la relación entre los aspectos mecanísticos y los parámetros sociales. Los modelos de evolución social son habitualmente muy abstractos, y los estudios experimentales suelen centrarse fundamentalmente en la descripción molecular de los procesos que generan el carácter cooperador, habiendo poca o nula comunicación entre ellos. Nuestro modelo de difusión-reacción nos permitía generar resultados homólogos a los obtenidos con el sistema experimental de VSV, lo cual nos permitía inferir la influencia de los parámetros del modelo en el aspecto social de la interacción. El siguiente paso sería generar diferentes variantes de VSV, con fenotipos diferenciales sobre dichos parámetros clave del ciclo viral, como el tiempo global del ciclo o la capacidad de difusión, para estudiar cómo afectan éstos parámetros a la cooperación en la inhibición de la inmunidad innata.

Otro aspecto relevante de los estudios de evolución social en virus es que permiten predecir el resultado de infecciones. Al saber que una variante de VSV se comporta como un tramposo frente a otra (como VSV- $\Delta$ 51 con el WT), sabemos que estos tramposos podrán imponerse a menos que exista una marcada estructura poblacional. Con modelos matemáticos precisos podemos incluso predecir el grado de estructura necesario para que se impongan tramposos o cooperadores, si se disponen de los datos necesarios de virus y hospedadores. Como mencionamos en la discusión, esto es especialmente importante en el caso de VSV- $\Delta$ 51, ya que se ha planteado su uso como tratamiento oncolítico, con lo que determinar con precisión la probabilidad de triunfo de variantes bloqueantes es fundamental para la bioseguridad de dichos tratamientos. De la misma forma, al tener conocimiento de los aspectos del virus que serán cruciales para su naturaleza social, podemos diseñar nuevas dianas terapéuticas, no basadas en atacar el crecimiento del virus, sino quizás propiciar la evolución de variantes que sean menos virulentas, como es el caso de VSV- $\Delta$ 51 con tejidos sanos.

Nuestro modelo determinista de fagos lisogénicos nos permitió estudiar la naturaleza social de la prudencia/virulencia, y demostrar que una variante prudente, menos virulenta, puede comportarse como un tramposo, y nuestro estudio experimental corrobora que así puede suceder. Como ya hemos discutido, esto representa un choque en el paradigma del dilema de rendimiento frente a tasa, lo que puede indicar que, sencillamente, no debe asociarse siempre mayor virulencia con tramposos, y mayor prudencia con cooperadores. Por otro lado, como hemos discutido, la diferencia fundamental radica en que los fagos lisogénicos integran su genoma en el cromosoma de sus hospedadores y replican con ellos. Los modelos de evolución social que estudian este dilema no han tenido esto en cuenta, y es posible que al hacerlo cambien algunas de sus conclusiones generales.

Un elemento central no abordado en nuestro estudio de la lisogenia es la estructura espacial. Los fagos pueden infectar a las bacterias en cultivos líquidos, pero también a colonias de bacterias en superficies. En este último caso, el factor espacial podría generar un mayor grado de parentesco que, según comprobamos con VSV y el IFN, era fundamental en la evolución de la cooperación. En el caso de fagos lisogénicos, el aislamiento de variantes menos prudentes puede hacerlas evolucionar escapando de los tramposos sobre-prudentes. El hecho de que existan especies como phi3T y spbeta, de la misma familia, y con un sistema de control molecular de la lisogenia tan parecido, pero con características sensiblemente diferentes en cuanto su reactivación espontánea, indica diferentes condiciones ambientales en su historia evolutiva. Por un lado, podría explicarse sencillamente por vivir en ambientes con diferente disponibilidad de hospedadores, pero también, siguiendo la teoría de evolución social, un mayor grado de parentesco debido a la estructura espacial podría haber favorecido a variantes que optimizan más el rendimiento. Para dilucidar entre ambas sería fundamental tener información sobre su historia evolutiva y ambientes de crecimiento, aunque estudios de evolución experimental en cultivos con y sin estructura podrían indicar qué factor sería determinante.

Con sólo unos pocos genes de spbeta, nuestra variante híbrida de phi3T cambiaba sustancialmente su fenotipo de reactivación espontánea de la lisis. Ningún estudio ha descrito la función de estos genes, ni se sospecha que estén relacionados con el sistema arbitrium (a pesar de que ambos fagos lo utilizan), lo que nos indica que la regulación de la reactivación puede ser muy compleja, implicando genes de diversos operones del fago, que aún están por determinar. Durante el desarrollo de la tesis no nos alcanzó el tiempo, pero en el futuro nos gustaría estudiar por separado

todos los genes que encontramos en la variante Hyb, ya que presumiblemente tendrán un efecto importante en este proceso.

Por último, nuestro modelo da una explicación al hecho de que, por lo general, los fagos lisogénicos tengan poca tendencia basal a reactivar el ciclo lítico, algo que es sensible al contexto de la disponibilidad de hospedadores, y la capacidad de replicación de los mismos. Con diversas aproximaciones ómicas, estudiando la cantidad media de bacterias y fagos en poblaciones naturales, se puede predecir en cuáles es más probable que un ciclo lisogénico tenga éxito, para buscar en ellos más sistemas moleculares de decisión colectiva similares al arbitrium, ya que sabemos que estos sólo triunfarán en ambientes con poca disponibilidad de hospedadores.



---

# CONCLUSIONES

---



- La complementación genética de mutaciones letales no es capaz de incrementar la eficacia a largo plazo de poblaciones virales con co-transmisión. Durante unas pocas generaciones, la complementación sí puede mantener una eficacia mayor, pero la acumulación de mutaciones deletéreas lleva al sistema a un punto de eficacia igual, o incluso menor.
- Un alto grado de complementación puede provocar una acumulación tan alta de mutaciones que incluso lleve a la extinción de las secuencias WT, disminuyendo el umbral de mutación necesario para que el sistema entre en la dinámica de catástrofe de error.
- La complementación genética de mutaciones deletéreas sí es capaz de aumentar la diversidad genética, manteniendo la misma eficacia media de las poblaciones.
- Este aumento de diversidad puede traducirse en una mayor adaptabilidad en mapas genotipo-fenotipo epistáticos, en los que el efecto de varias mutaciones individuales es perjudicial, pero en conjunto son beneficiosas. La transmisión colectiva, si conlleva complementación genética, fomenta la adaptabilidad en mapas de eficacia epistáticos, pero deja el sistema vulnerable a la invasión de tramposos.
- La invasión de tramposos ocurre cuando la agrupación de las secuencias es al azar (CIUs aleatorias). Si las CIUs contienen secuencias que proceden únicamente de la misma célula infectada (CIUs emparentadas), el parentesco genético entre las secuencias que se complementan aumenta y los tramposos no proliferan.
- El aumento del parentesco genético, debido a la transmisión por CIUs emparentadas, disminuye la capacidad de adaptación de los grupos de transmisión en relación a las CIUs aleatorias, pero

siguen manteniendo ventaja frente al sistema de mono-infección, lo que indica que existe la posibilidad de evitar a los tramposos y mantener una adaptabilidad incrementada debido a la co-transmisión.

- El incremento de adaptabilidad no se debe, en gran medida, a la complementación de alelos de secuencias diferentes. El factor determinante es la capacidad de mantener la neutralidad respecto a las mutaciones deletéreas, a la vez que se permite expresar un fenotipo beneficioso.
- La evasión de la respuesta inmune innata por parte de VSV es un carácter altruista, que evoluciona fundamentalmente debido al beneficio que tiene sobre otros virus que no son el individuo que ejerce dicha inhibición, para el cual es perjudicial.
- Los mutantes de VSV que no bloquean la producción de IFN se comportan como tramposos sociales, que pueden invadir y colapsar la población de las variantes cooperadoras (bloqueantes) en ausencia de estructura poblacional.
- En ambientes de alto grado de parentesco, debido a la naturaleza focal de las infecciones, las variantes cooperadoras presentan ventaja y se imponen en la población.
- Las variantes no bloqueantes obtienen poco o nulo beneficio de estar en presencia de los cooperadores, pero los cooperadores sí se ven fuertemente inhibidos por la presencia de individuos no bloqueantes. Esto conlleva que los cuellos de botella poblacionales sean un factor determinante para la evolución de la inhibición del IFN, ya que traen la oportunidad de generar infecciones de WT totalmente aisladas de variantes no bloqueantes.

- La naturaleza social de esta inhibición depende de muchos factores del virus y del hospedador, como son la viscosidad del medio o el coste de la inhibición. Si la liberación de IFN, y su efecto sobre las células infectadas, ocurriera antes que la producción de viriones, el bloquear su producción se convertiría en un carácter beneficioso para el que lo realiza, perdiéndose su naturaleza altruista.
- Los virus lisogénicos presentan interacciones sociales que siguen la paradoja del rendimiento frente a la tasa, pero de forma inversa a como ocurre con los parásitos líticos obligados. En este caso, las variantes más prudentes, las menos virulentas, reducen la eficacia global de la población, pero presentan una ventaja en competencia directa.
- Esta ventaja se puede dar tanto en virus lisogénicos no regulados, como en los que la decisión lisis/lisogenia está regulada por sistemas moleculares colectivos, como el sistema arbitrium de la familia de fagos SPBeta.
- La super-infección elimina la ventaja de las variantes sobre-prudentes, favoreciendo a las más virulentas.
- La recombinación del fago phi3T con el spbeta genera variantes del primero que presentan un fenotipo más prudente, con una tasa de reactivación de la lisis sustancialmente menor. Esta recombinación debe afectar, al menos, a alguno de los genes comprendidos entre el *phi3T\_20* y el *phi3T\_27*, que corresponden a los genes *yomE-I* de spbeta.
- Estas variantes híbridas se comportan como predice el modelo: ganan en competencia directa al phi3T-WT, aunque el rendimiento global, en término de genomas virales totales, sea menor.

---

# **BIBLIOGRAFÍA**

---



1. Agrawal, A. F. & Whitlock, M. C. Inferences about the distribution of dominance drawn from yeast gene knockout data. *Genetics* 187, 553–566 (2011).
2. Ahmed, M. et al. Ability of the Matrix Protein of Vesicular Stomatitis Virus to Suppress Beta Interferon Gene Expression Is Genetically Correlated with the Inhibition of Host RNA and Protein Synthesis. *J Virol* 77, 4646–4657 (2003).
3. Altan-Bonnet, N. Extracellular vesicles are the Trojan horses of viral infection. *Curr Opin Microbiol* 32, 77–81 (2016).
4. Altan-Bonnet, N. Lipid Tales of Viral Replication and Transmission. *Trends Cell Biol* 27, 201–213 (2017).
5. Altan-Bonnet, N. & Chen, Y.-H. Intercellular Transmission of Viral Populations with Vesicles. *J Virol* 89, 12242–12244 (2015).
6. Alvarez, R. A., Barría, M. I. & Chen, B. K. Unique Features of HIV-1 Spread through T Cell Virological Synapses. *PLOS Pathog* 10, e1004513 (2014).
7. Andino, R. & Domingo, E. Viral quasispecies. *Virology* 479–480, 46–51 (2015).
8. Andreu-Moreno, I., Bou, J.-V. & Sanjuán, R. Cooperative nature of viral replication. *Sci Adv* 6, eabd4942 (2020).
9. Andreu-Moreno, I. & Sanjuán, R. Collective Infection of Cells by Viral Aggregates Promotes Early Viral Proliferation and Reveals a Cellular-Level Allee Effect. *Curr Biol* 28, 3212–3219.e4 (2018).
10. Andreu-Moreno, I. & Sanjuán, R. Collective Viral Spread Mediated by Virion Aggregates Promotes the Evolution of Defective Interfering Particles. *mBio* 11, e02156-19 (2020).
11. Anschau, V. & Sanjuán, R. Fibrinogen Gamma Chain Promotes Aggregation of Vesicular Stomatitis Virus in Saliva. *Viruses* 12, 282 (2020).



12. Appel, N., Herian, U. & Bartenschlager, R. Efficient rescue of hepatitis C virus RNA replication by trans-complementation with nonstructural protein 5A. *J Virol* 79, 896–909 (2005).
13. Arantes, T. S. et al. The Large Marseillevirus Explores Different Entry Pathways by Forming Giant Infectious Vesicles. *J Virol* 90, 5246–5255 (2016).
14. Asfahl, K. L. & Schuster, M. Social interactions in bacterial cell-cell signaling. *FEMS Microbiol Rev* 41, 92–107 (2017).
15. Bagheri, H. C. Unresolved boundaries of evolutionary theory and the question of how inheritance systems evolve: 75 years of debate on the evolution of dominance. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 306, 329–359 (2006).
16. Bangham, C. R. & Kirkwood, T. B. Defective interfering particles: effects in modulating virus growth and persistence. *Virology* 179, 821–826 (1990).
17. Barber, G. N. Vesicular stomatitis virus as an oncolytic vector. *Viral Immunol* 17, 516–527 (2004).
18. Barrett, L. G., Bell, T., Dwyer, G. & Bergelson, J. Cheating, trade-offs and the evolution of aggressiveness in a natural pathogen population. *Ecol Lett* 14, 1149–1157 (2011).
19. Barton, N. H. Sewall Wright on Evolution in Mendelian Populations and the ‘Shifting Balance’. *Genetics* 202, 3–4 (2016).
20. Belov, G. A. Dynamic lipid landscape of picornavirus replication organelles. *Curr Opin Virol* 19, 1–6 (2016).
21. Beniac, D. R. et al. The Organisation of Ebola Virus Reveals a Capacity for Extensive, Modular Polyploidy. *PLOS ONE* 7, e29608 (2012).
22. Berngruber, T. W., Froissart, R., Choisy, M. & Gandon, S. Evolution of Virulence in Emerging Epidemics. *PLOS Pathog* 9, e1003209 (2013).
23. Biancotto, A. et al. Upregulation of Human Cytomegalovirus by HIV Type 1 in Human Lymphoid Tissue ex Vivo. *AIDS Res* 24, 453–462 (2008).

24. Bondy-Denomy, J., Pawluk, A., Maxwell, K. L. & Davidson, A. R. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature* 493, 429–432 (2013).
25. Bondy-Denomy, J. et al. Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. *ISME J* 10, 2854–2866 (2016).
26. Bordería, A. V. et al. Group Selection and Contribution of Minority Variants during Virus Adaptation Determines Virus Fitness and Phenotype. *PLOS Pathog* 11, e1004838 (2015).
27. Borges, A. L. et al. Bacteriophage Cooperation Suppresses CRISPR-Cas3 and Cas9 Immunity. *Cell* 174, 917-925.e10 (2018).
28. Bou, J.-V., Geller, R. & Sanjuán, R. Membrane-associated enteroviruses undergo intercellular transmission as pools of sibling viral genomes. (2019).
29. Bourke, A. F. G. The validity and value of inclusive fitness theory. *Proc Royal Soc B P ROY SOC B-BIOL SCI* 278, 3313–3320 (2011).
30. Bourke, A. F. G. Hamilton’s rule and the causes of social evolution. *Philos Trans R Soc B* 369, 20130362 (2014).
31. Brady, A. et al. The arbitrium system controls prophage induction. *Curr Biol* 31, 5037-5045.e3 (2021).
32. Brouns, S. J. J. et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321, 960–964 (2008).
33. Bruce, J. B., Lion, S., Buckling, A., Westra, E. R. & Gandon, S. Regulation of prophage induction and lysogenization by phage communication systems. *Curr Biol* 31, 5046 (2021).
34. Buckling, A. & Brockhurst, M. A. Kin selection and the evolution of virulence. *Heredity (Edinb)* 100, 484–488 (2008).
35. Burrell, C. J., Howard, C. R. & Murphy, F. A. Virion Structure and Composition. *Fenner and White’s Medical Virology* 27–37 (2017).

36. Cattaneo, R. et al. Altered transcription of a defective measles virus genome derived from a diseased human brain. *EMBO J* 6, 681–688 (1987).
37. Chao, L. & Elena, S. F. Nonlinear trade-offs allow the cooperation game to evolve from Prisoner's Dilemma to Snowdrift. *Proc Biol Sci* 284, 20170228 (2017).
38. Charpentier, N., Dávila, M., Domingo, E. & Escarmís, C. Long-Term, Large-Population Passage of Aphthovirus Can Generate and Amplify Defective Noninterfering Particles Deleted in the Leader Protease Gene. *Virology* 223, 10–18 (1996).
39. Chen, H. Y., Di Mascio, M., Perelson, A. S., Ho, D. D. & Zhang, L. Determination of virus burst size in vivo using a single-cycle SIV in rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 19079–19084 (2007).
40. Chen, Y.-H. et al. Phosphatidylserine vesicles enable efficient en bloc transmission of enteroviruses. *Cell* 160, 619–630 (2015).
41. Cingolani, P. et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)* 6, 80–92 (2012).
42. Coccia, E. M. et al. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 34, 796–805 (2004).
43. Cohen, E. M. & Kobiler, O. Gene Expression Correlates with the Number of Herpes Viral Genomes Initiating Infection in Single Cells. *PLOS Pathog* 12, e1006082 (2016).
44. Cole, N. L. & Grose, C. Membrane fusion mediated by herpesvirus glycoproteins: the paradigm of varicella-zoster virus. *Rev Med Virol* 13, 207–222 (2003).
45. Corey, L., Wald, A., Celum, C. L. & Quinn, T. C. The effects of herpes simplex virus-2 on HIV-1 acquisition and transmission: a review of two overlapping epidemics. *J Acquir Immune Defic Syndr* 35, 435–445 (2004).

46. Cornelissen, A. et al. Identification of EPS-degrading activity within the tail spikes of the novel *Pseudomonas putida* phage AF. *Virology* 434, 251–256 (2012).
47. Cornelissen, A. et al. The T7-related *Pseudomonas putida* phage  $\phi$ 15 displays virion-associated biofilm degradation properties. *PLOS One* 6, e18597 (2011).
48. Cortes, M. G., Krog, J. & Balázsi, G. Optimality of the spontaneous prophage induction rate. *J Theor Biol* 483, 110005 (2019).
49. Cressler, C. E., McLeod, D. V., Rozins, C., van den Hoogen, J. & Day, T. The adaptive evolution of virulence: a review of theoretical predictions and empirical tests. *Parasitology* 143, 915–930 (2016).
50. Cudmore, S., Cossart, P., Griffiths, G. & Way, M. Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature* 378, 636–638 (1995).
51. Cuevas, J. M., Durán-Moreno, M. & Sanjuán, R. Multi-virion infectious units arise from free viral particles in an enveloped virus. *Nat Microbiol* 2, 17078 (2017).
52. Cureton, D. K., Massol, R. H., Whelan, S. P. J. & Kirchhausen, T. The length of vesicular stomatitis virus particles dictates a need for actin assembly during clathrin-dependent endocytosis. *PLoS Pathog* 6, e1001127 (2010).
53. da Silva, J., Coetzer, M., Nedellec, R., Pastore, C. & Mosier, D. E. Fitness Epistasis and Constraints on Adaptation in a Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protein Region. *Genetics* 185, 293–303 (2010).
54. DaPalma, T., Doonan, B. P., Trager, N. M. & Kasman, L. M. A systematic approach to virus-virus interactions. *Virus Res* 149, 1–9 (2010).
55. de Castro Martin, I. F. et al. Influenza virus genome reaches the plasma membrane via a modified endoplasmic reticulum and Rab11-dependent vesicles. *Nat Commun* 8, 1396 (2017).

56. Diggle, S. P., Griffin, A. S., Campbell, G. S. & West, S. A. Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature* 450, 411–414 (2007).
57. Doebeli, M. & Hauert, C. Models of cooperation based on the Prisoner's Dilemma and the Snowdrift game. *Ecol Lett* 8, 748–766 (2005).
58. Domingo, E. & Perales, C. Quasispecies and virus. *Eur Biophys J* 47, 443–457 (2018).
59. Dragoš, A. et al. Pervasive prophage recombination occurs during evolution of spore-forming Bacilli. *ISME J* 15, 1344–1358 (2021).
60. Dupont, M. & Sattentau, Q. J. Macrophage Cell-Cell Interactions Promoting HIV-1 Infection. *Viruses* 12, 492 (2020).
61. Elena, S. F. Evolutionary transitions during RNA virus experimental evolution. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 371, 20150441 (2016).
62. Erez, Z. et al. Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions. *Nature* 541, 488–493 (2017).
63. Even-Tov, E. et al. Social Evolution Selects for Redundancy in Bacterial Quorum Sensing. *PLOS Biol* 14, e1002386 (2016).
64. Felt, S. A. et al. Detection of respiratory syncytial virus defective genomes in nasal secretions is associated with distinct clinical outcomes. *Nat Microbiol* 6, 672–681 (2021).
65. Fensterl, V. & Sen, G. C. Interferon-induced Ifit proteins: their role in viral pathogenesis. *J Virol* 89, 2462–2468 (2015).
66. Fisher, K. J., Buskirk, S. W., Vignogna, R. C., Marad, D. A. & Lang, G. I. Adaptive genome duplication affects patterns of molecular evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS Genet* 14, e1007396 (2018).
67. Fletcher, J. A. & Doebeli, M. A Simple and General Explanation for the Evolution of Altruism. *Proc Biol Sci* 276, 13–19 (2009).

68. Fragata, I., Blanckaert, A., Dias Louro, M. A., Liberles, D. A. & Bank, C. Evolution in the light of fitness landscape theory. *Trends Ecol Evol* 34, 69–82 (2019).
69. Freeling, M. & Thomas, B. C. Gene-balanced duplications, like tetraploidy, provide predictable drive to increase morphological complexity. *Genome Res* 16, 805–814 (2006).
70. Gaddy, D. F. & Lyles, D. S. Vesicular Stomatitis Viruses Expressing Wild-Type or Mutant M Proteins Activate Apoptosis through Distinct Pathways. *J Virol* 79, 4170–4179 (2005).
71. Gaddy, D. F. & Lyles, D. S. Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus Induces Apoptosis via Signaling through PKR, Fas, and Daxx. *J Virol* 81, 2792–2804 (2007).
72. Gama, J. A. et al. Temperate Bacterial Viruses as Double-Edged Swords in Bacterial Warfare. *PLOS ONE* 8, e59043 (2013).
73. Gandon, S., van Baalen, M. & Jansen, V. A. A. The evolution of parasite virulence, superinfection, and host resistance. *Am Nat* 159, 658–669 (2002).
74. Gao, H. & Feldman, M. W. Complementation and epistasis in viral coinfection dynamics. *Genetics* 182, 251–263 (2009).
75. García-Arriaza, J., Manrubia, S. C., Toja, M., Domingo, E. & Escarmís, C. Evolutionary transition toward defective RNAs that are infectious by complementation. *J Virol* 78, 11678–11685 (2004).
76. García-Sastre, A. Ten Strategies of Interferon Evasion by Viruses. *Cell Host Microbe* 22, 176–184 (2017).
77. Gardner, A., West, S. A. & Wild, G. The genetical theory of kin selection. *J Evol Biol* 24, 1020–1043 (2011).
78. Gelderblom, H. C. et al. Viral complementation allows HIV-1 replication without integration. *Retrovirology* 5, 60 (2008).
79. Gerstein, A. C., McBride, R. M. & Otto, S. P. Ploidy reduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Lett* 4, 91–94 (2008).

80. Ghoul, M., Griffin, A. S. & West, S. A. Toward an Evolutionary Definition of Cheating. *Evolution* 68, 318–331 (2014).
81. Gleichsner, A. M. & Minchella, D. J. Can host ecology and kin selection predict parasite virulence? *Parasitology* 141, 1018–1030 (2014).
82. Glonti, T., Chanishvili, N. & Taylor, P. W. Bacteriophage-derived enzyme that depolymerizes the alginic acid capsule associated with cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol* 108, 695–702 (2010).
83. Grafen, A. An inclusive fitness analysis of altruism on a cyclical network. *J Evol Biol* 20, 2278–2283 (2007).
84. Greenbury, S. F., Louis, A. A. & Ahnert, S. E. The structure of genotype-phenotype maps makes fitness landscapes navigable. *Nat Ecol Evol* 6, 1742–1752 (2022).
85. Gutiérrez, S. et al. The Multiplicity of Cellular Infection Changes Depending on the Route of Cell Infection in a Plant Virus. *J Virol* 89, 9665–9675 (2015).
86. Gutiérrez, S. et al. Circulating virus load determines the size of bottlenecks in viral populations progressing within a host. *PLOS Pathog* 8, e1003009 (2012).
87. Gutiérrez, S. et al. Dynamics of the Multiplicity of Cellular Infection in a Plant Virus. *PLOS Pathog* 6, e1001113 (2010).
88. Hein, M. D. et al. Cell culture-based production and in vivo characterization of purely clonal defective interfering influenza virus particles. *BMC Biology* 19, 91 (2021).
89. Heldt, F. S., Kupke, S. Y., Dorl, S., Reichl, U. & Frensing, T. Single-cell analysis and stochastic modelling unveil large cell-to-cell variability in influenza A virus infection. *Nat Commun* 6, 8938 (2015).
90. Hillung, J., Cuevas, J. M., Valverde, S. & Elena, S. F. Experimental evolution of an emerging plant virus in host genotypes that differ in their susceptibility to infection. *Evolution* 68, 2467–2480 (2014).

91. Holland, J. J. & Villarreal, L. P. Purification of defective interfering T particles of vesicular stomatitis and rabies viruses generated in vivo in brains of newborn mice. *Virology* 67, 438–449 (1975).
92. Howat, T. J., Barreca, C., O'Hare, P., Gog, J. R. & Grenfell, B. T. Modelling dynamics of the type I interferon response to in vitro viral infection. *J R Soc Interface* 3, 699–709 (2006).
93. Hsu, N.-Y. et al. Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell* 141, 799–811 (2010).
94. Huber, C. D., Durvasula, A., Hancock, A. M. & Lohmueller, K. E. Gene expression drives the evolution of dominance. *Nat Commun* 9, 2750 (2018).
95. Iglesias-Sanchez, M. J. & Lopez-Galindez, C. Each genomic RNA in HIV-1 heterozygous virus generate new virions. *Virology* 333, 316–323 (2005).
96. Ivashkiv, L. B. & Donlin, L. T. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* 14, 36–49 (2014).
97. Iwasa, Y., Michor, F. & Nowak, M. A. Stochastic tunnels in evolutionary dynamics. *Genetics* 166, 1571–1579 (2004).
98. Jacobs, N. T. et al. Incomplete influenza A virus genomes occur frequently but are readily complemented during localized viral spread. *Nat Commun* 10, 3526 (2019).
99. Jakobsson, E. et al. Identification of amino acid residues at the active site of endosialidase that dissociate the polysialic acid binding and cleaving activities in *Escherichia coli* K1 bacteriophages. *Biochem J* 405, 465–472 (2007).
100. Kassa, T. & Chhibber, S. Thermal treatment of the bacteriophage lysate of *Klebsiella pneumoniae* B5055 as a step for the purification of capsular depolymerase enzyme. *J Virol Methods* 179, 135–141 (2012).



101. Kauffman, S. A. & Weinberger, E. D. The NK model of rugged fitness landscapes and its application to maturation of the immune response. *J Theor Biol* 141, 211–245 (1989).
102. Kawakami, S., Watanabe, Y. & Beachy, R. N. Tobacco mosaic virus infection spreads cell to cell as intact replication complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 6291–6296 (2004).
103. Kerr, B., Neuhauser, C., Bohannan, B. J. M. & Dean, A. M. Local migration promotes competitive restraint in a host-pathogen ‘tragedy of the commons’. *Nature* 442, 75–78 (2006).
104. Kim, K.-A. et al. Semen-mediated enhancement of HIV infection is donor-dependent and correlates with the levels of SEVI. *Retrovirology* 7, 55 (2010).
105. Kimura, M. The neutral theory of molecular evolution: a review of recent evidence. *Jpn J Genet* 66, 367–386 (1991).
106. Kirkwood, T. B. & Bangham, C. R. Cycles, chaos, and evolution in virus cultures: a model of defective interfering particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 8685–8689 (1994).
107. Klasse, P. J. Molecular determinants of the ratio of inert to infectious virus particles. *Prog Mol Biol Transl Sci* 129, 285–326 (2015).
108. Kohm, K. & Hertel, R. The life cycle of SP $\beta$  and related phages. *Arch Virol* 166, 2119–2130 (2021).
109. Kondrashov, D. A. & Kondrashov, F. A. Topological features of rugged fitness landscapes in sequence space. *Trends Genet* 31, 24–33 (2015).
110. Kopecky, S. A. & Lyles, D. S. Contrasting Effects of Matrix Protein on Apoptosis in HeLa and BHK Cells Infected with Vesicular Stomatitis Virus Are due to Inhibition of Host Gene Expression. *J Virol* 77, 4658–4669 (2003).
111. Kreuz, L. E. & Levy, A. H. PHYSICAL PROPERTIES OF CHICK INTERFERON. *J Bacteriol* 89, 462–469 (1965).

112. Kumar, D., Kumar, R., Hyun, T. K. & Kim, J.-Y. Cell-to-cell movement of viruses via plasmodesmata. *J Plant Res* 128, 37–47 (2015).
113. Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *Int Rev Immunol* 30, 16–34 (2011).
114. Kuzmin, E., Taylor, J. S. & Boone, C. Retention of duplicated genes in evolution. *Trends Genet* 38, 59–72 (2022).
115. Kwiatkowski, B., Boschek, B., Thiele, H. & Stirm, S. Substrate specificity of two bacteriophage-associated endo-N-acetylneuraminidases. *J Virol* 45, 367–374 (1983).
116. Lago, M., Rodríguez, J. F., Bandín, I. & Dopazo, C. P. Aquabirnavirus polyploidy: a new strategy to modulate virulence? *J Gen Virol* 97, 1168–1177 (2016).
117. Landsberger, M. et al. Anti-CRISPR Phages Cooperate to Overcome CRISPR-Cas Immunity. *Cell* 174, 908-916.e12 (2018).
118. Luring, A. S. & Andino, R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLOS Pathog* 6, e1001005 (2010).
119. Leeks, A., Segredo-Otero, E. A., Sanjuán, R. & West, S. A. Beneficial coinfection can promote within-host viral diversity. *Virus Evol* 4, vey028 (2018).
120. Leggett, H. C., Buckling, A., Long, G. H. & Boots, M. Generalism and the evolution of parasite virulence. *Trends Ecol Evol* 28, 592–596 (2013).
121. Lehmann, L., Keller, L., West, S. & Roze, D. Group selection and kin selection: Two concepts but one process. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 6736–6739 (2007).
122. Lehmann, M. J., Sherer, N. M., Marks, C. B., Pypaert, M. & Mothes, W. Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells. *J Cell Biol* 170, 317–325 (2005).
123. Lehtonen, J. Multilevel Selection in Kin Selection Language. *Trends Ecol Evol* 31, 752–762 (2016).

124. Levy, D. E., Marié, I., Smith, E. & Prakash, A. Enhancement and diversification of IFN induction by IRF-7-mediated positive feedback. *J Interferon Cytokine Res* 22, 87–93 (2002).
125. Li, G., Cortez, M. H., Dushoff, J. & Weitz, J. S. When to be temperate: on the fitness benefits of lysis vs. lysogeny. *Virus Evol* 6, veaa042 (2020).
126. Li, H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. Preprint at arXiv <https://arxiv.org/abs/1303.3997> (2013).
127. Lichty, B. D., Power, A. T., Stojdl, D. F. & Bell, J. C. Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends Mol Med* 10, 210–216 (2004).
128. Lieberman, E., Hauert, C. & Nowak, M. A. Evolutionary dynamics on graphs. *Nature* 433, 312–316 (2005).
129. Lin, T.-L. et al. Isolation of a bacteriophage and its depolymerase specific for K1 capsule of *Klebsiella pneumoniae*: implication in typing and treatment. *J Infect Dis* 210, 1734–1744 (2014).
130. Lipson, D. A. The complex relationship between microbial growth rate and yield and its implications for ecosystem processes. *Front Microbiol* 6, 615 (2015).
131. Little, J. W. & Michalowski, C. B. Stability and instability in the lysogenic state of phage lambda. *J Bacteriol* 192, 6064–6076 (2010).
132. Liu, Y. et al. Properties of *Klebsiella* phage P13 and associated exopolysaccharide depolymerase. *J. Ocean Univ. China* 13, 163–168 (2014).
133. Lucía-Sanz, A. & Manrubia, S. Multipartite viruses: adaptive trick or evolutionary treat? *Syst Biol Appl* 3, 1–11 (2017).
134. Lui, W.-Y. et al. SMRT sequencing revealed the diversity and characteristics of defective interfering RNAs in influenza A (H7N9) virus infection. *Emerg Microbes Infect* 8, 662–674 (2019).

135. Luque, D. et al. Infectious bursal disease virus is an icosahedral polyploid dsRNA virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 2148–2152 (2009).
136. Madlung, A. Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools. *Heredity (Edinb)* 110, 99–104 (2013).
137. Magadum, S., Banerjee, U., Murugan, P., Gangapur, D. & Ravikesavan, R. Gene duplication as a major force in evolution. *J Genet* 92, 155–161 (2013).
138. Maherali, H., Walden, A. E. & Husband, B. C. Genome duplication and the evolution of physiological responses to water stress. *New Phytol* 184, 721–731 (2009).
139. Marad, D. A., Buskirk, S. W. & Lang, G. I. Altered access to beneficial mutations slows adaptation and biases fixed mutations in diploids. *Nat Ecol Evol* 2, 882–889 (2018).
140. Marshall, J. A. R. Group selection and kin selection: formally equivalent approaches. *Trends Ecol Evol* 26, 325–332 (2011).
141. Martin, B. E., Harris, J. D., Sun, J., Koelle, K. & Brooke, C. B. Cellular co-infection can modulate the efficiency of influenza A virus production and shape the interferon response. *PLOS Pathogens* 16, e1008974 (2020).
142. McCormick, W. & Mermel, L. A. The basic reproductive number and particle-to-plaque ratio: comparison of these two parameters of viral infectivity. *J Virol* 18, 92 (2021).
143. McCrone, J. T. et al. Stochastic processes constrain the within and between host evolution of influenza virus. *eLife* 7, e35962 (2018).
144. McLaughlin, J. R., Wong, H. C., Ting, Y. E., Van Arsdell, J. N. & Chang, S. Control of lysogeny and immunity of *Bacillus subtilis* temperate bacteriophage SP beta by its *d* gene. *J Bacteriol* 167, 952–959 (1986).
145. Morley, V. J., Sistro, M., Usme-Ciro, J. A., Remold, S. K. & Turner, P. E. Evolution in spatially mixed host environments increases divergence

for evolved fitness and intrapopulation genetic diversity in RNA viruses. *Virus Evol* 2, vev022 (2016).

146. Mosquera, J. & Adler, F. R. Evolution of virulence: a unified framework for coinfection and superinfection. *J Theor Biol* 195, 293–313 (1998).

147. Mühlenhoff, M., Stummeyer, K., Grove, M., Sauerborn, M. & Gerardy-Schahn, R. Proteolytic processing and oligomerization of bacteriophage-derived endosialidases. *J Biol Chem* 278, 12634–12644 (2003).

148. Münch, J. et al. Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell* 131, 1059–1071 (2007).

149. Murcia, P. R. et al. Evolution of an Eurasian Avian-like Influenza Virus in Naïve and Vaccinated Pigs. *PLOS Pathogens* 8, e1002730 (2012).

150. Novella, I. S., Ball, L. A. & Wertz, G. W. Fitness Analyses of Vesicular Stomatitis Strains with Rearranged Genomes Reveal Replicative Disadvantages. *J Virol* 78, 9837–9841 (2004).

151. Nowak, M. A., Bonhoeffer, S. & May, R. M. Spatial games and the maintenance of cooperation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 4877–4881 (1994).

152. Nowak, M. A. & May, R. M. Superinfection and the evolution of parasite virulence. *Proc Biol Sci* 255, 81–89 (1994).

153. Nowak, M. A. Five Rules for the Evolution of Cooperation. *Science* 314, 1560–1563 (2006).

154. Nowak, M. A. & Sigmund, K. Evolutionary Dynamics of Biological Games. *Science* 303, 793–799 (2004).

155. Obolski, U., Lewin-Epstein, O., Even-Tov, E., Ram, Y. & Hadany, L. With a little help from my friends: cooperation can accelerate the rate of adaptive valley crossing. *BMC Evol Biol* 17, 143 (2017).

156. Ohta, T. The Nearly Neutral Theory of Molecular Evolution. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 23, 263–286 (1992).

157. Ojosnegros, S. et al. Viral genome segmentation can result from a trade-off between genetic content and particle stability. *PLOS Genet* 7, e1001344 (2011).
158. Oppenheim, A. B., Kobiler, O., Stavans, J., Court, D. L. & Adhya, S. Switches in bacteriophage lambda development. *Annu Rev Genet* 39, 409–429 (2005).
159. Ortlund, E. A., Bridgham, J. T., Redinbo, M. R. & Thornton, J. W. Crystal structure of an ancient protein: evolution by conformational epistasis. *Science* 317, 1544–1548 (2007).
160. Otto, S. P. The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell* 131, 452–462 (2007).
161. Owen, S. V. et al. A window into lysogeny: revealing temperate phage biology with transcriptomics. *Microb Genom* 6, e000330 (2020).
162. Paaby, A. B. & Rockman, M. V. Cryptic genetic variation: evolution's hidden substrate. *Nat Rev Genet* 15, 247–258 (2014).
163. Pai, A., Tanouchi, Y. & You, L. Optimality and robustness in quorum sensing (QS)-mediated regulation of a costly public good enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 19810–19815 (2012).
164. Panchy, N., Lehti-Shiu, M. & Shiu, S.-H. Evolution of Gene Duplication in Plants. *Plant Physiol* 171, 2294–2316 (2016).
165. Parrish, C. R. & Kawaoka, Y. The origins of new pandemic viruses: the acquisition of new host ranges by canine parvovirus and influenza A viruses. *Annu Rev Microbiol* 59, 553–586 (2005).
166. Payne, J. L. & Wagner, A. The causes of evolvability and their evolution. *Nat Rev Genet* 20, 24–38 (2019).
167. Pearce, A. F. & Lyles, D. S. Vesicular Stomatitis Virus Induces Apoptosis Primarily through Bak Rather than Bax by Inactivating Mcl-1 and Bcl-XL. *J Virol* 83, 9102–9112 (2009).

168. Pfeiffer, T., Schuster, S. & Bonhoeffer, S. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* 292, 504–507 (2001).
169. Pfeiffer, T. & Bonhoeffer, S. Evolutionary Consequences of Tradeoffs between Yield and Rate of ATP Production. *PLoS Biol* 21, 51 (2002).
170. Phipps, K. L. et al. Collective interactions augment influenza A virus replication in a host-dependent manner. *Nat Microbiol* 5, 1158–1169 (2020).
171. Pollak, S. et al. Facultative cheating supports the coexistence of diverse quorum-sensing alleles. *Proc Natl Acad Sci USA* 113, 2152–2157 (2016).
172. Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A. & Korobeynikov, A. Using SPAdes De Novo Assembler. *Curr Protoc Bioinform* 70, e102 (2020).
173. Rager, M., Vongpunsawad, S., Duprex, W. P. & Cattaneo, R. Polyploid measles virus with hexameric genome length. *EMBO J* 21, 2364–2372 (2002).
174. Rajani, K. R. et al. Complexes of Vesicular Stomatitis Virus Matrix Protein with Host Rae1 and Nup98 Involved in Inhibition of Host Transcription. *PLOS Pathog* 8, e1002929 (2012).
175. Ramakrishnaiah, V. & van der Laan, L. J. W. Hepatitis virus hijacks shuttle: exosome-like vesicles provide protection against neutralizing antibodies. *Hepatology* 59, 2416–2418 (2014).
176. Ramsey, J. Polyploidy and ecological adaptation in wild yarrow *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 7096–7101 (2011).
177. Ravindran, M. S., Bagchi, P., Cunningham, C. N. & Tsai, B. Opportunistic intruders: how viruses orchestrate ER functions to infect cells. *Nat Rev Microbiol* 14, 407–420 (2016).

178. Redondo, N., Madan, V., Alvarez, E. & Carrasco, L. Impact of Vesicular Stomatitis Virus M Proteins on Different Cellular Functions. *PLOS One* 10, e0131137 (2015).
179. Richard, M., Herfst, S., Tao, H., Jacobs, N. T. & Lowen, A. C. Influenza A Virus Reassortment Is Limited by Anatomical Compartmentalization following Coinfection via Distinct Routes. *J Virol* 92, e02063-17 (2018).
180. Romero-Brey, I. & Bartenschlager, R. Endoplasmic Reticulum: The Favorite Intracellular Niche for Viral Replication and Assembly. *Viruses* 8, 160 (2016).
181. Roychoudhury, P., Shrestha, N., Wiss, V. R. & Krone, S. M. Fitness benefits of low infectivity in a spatially structured population of bacteriophages. *Proc R Soc B Biol Sci* 281, 20132563 (2014).
182. Rumbaugh, K. P. et al. Kin selection, quorum sensing and virulence in pathogenic bacteria. *Proc R Soc B Biol Sci* 279, 3584–3588 (2012).
183. Saira, K. et al. Sequence analysis of in vivo defective interfering-like RNA of influenza A H1N1 pandemic virus. *J Virol* 87, 8064–8074 (2013).
184. Sajjan, D. B. & Hinchigeri, S. B. Structural Organization of Baculovirus Occlusion Bodies and Protective Role of Multilayered Polyhedron Envelope Protein. *Food Environ Virol* 8, 86–100 (2016).
185. Salemi, M. & Rife, B. Phylogenetics and Phyloanatomy of HIV/SIV Intra-Host Compartments and Reservoirs: The Key Role of the Central Nervous System. *Curr HIV Res* 14, 110–120 (2016).
186. Sanjuán, R. Collective Infectious Units in Viruses. *Trends Microbiol* 25, 402–412 (2017).
187. Sanjuán, R. The Social Life of Viruses. *Annu Rev Virol* 8, 183–199 (2021).
188. Sanjuán, R. & Domingo-Calap, P. Mechanisms of viral mutation. *Cell Mol Life Sci* 73, 4433–4448 (2016).



189. Sanjuán, R., Nebot, M. R., Chirico, N., Mansky, L. M. & Belshaw, R. Viral mutation rates. *J Virol* 84, 9733–9748 (2010).
190. Sanjuán, R. & Thoulouze, M.-I. Why viruses sometimes disperse in groups†. *Virus Evol* 5, vez014 (2019).
191. Santiana, M. et al. Vesicle-Cloaked Virus Clusters Are Optimal Units for Inter-organismal Viral Transmission. *Cell Host Microbe* 24, 208–220, e8 (2018).
192. Sardanyés, J. & Elena, S. F. Error threshold in RNA quasispecies models with complementation. *J Theor Biol* 265, 278–286 (2010).
193. Schenk, M. F., Szendro, I. G., Salverda, M. L. M., Krug, J. & de Visser, J. A. G. M. Patterns of Epistasis between Beneficial Mutations in an Antibiotic Resistance Gene. *Mol Biol Evol* 30, 1779–1787 (2013).
194. Schmerer, M., Molineux, I. J. & Bull, J. J. Synergy as a rationale for phage therapy using phage cocktails. *PeerJ* 2, e590 (2014).
195. Schwarzer, D. et al. A multivalent adsorption apparatus explains the broad host range of phage phi92: a comprehensive genomic and structural analysis. *J Virol* 86, 10384–10398 (2012).
196. Shang, A. et al. Complete nucleotide sequence of Klebsiella phage P13 and prediction of an EPS depolymerase gene. *Virus Genes* 50, 118–128 (2015).
197. Shao, Y. & Wang, I.-N. Bacteriophage Adsorption Rate and Optimal Lysis Time. *Genetics* 180, 471–482 (2008).
198. Sheffield, J. S., Wendel, G. D., McIntire, D. D. & Norgard, M. V. Effect of Genital Ulcer Disease on HIV-1 Coreceptor Expression in the Female Genital Tract. *The Journal of Infectious Diseases* 196, 1509–1516 (2007).
199. Shi, M. et al. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature* 540, 539–543 (2016).

200. Shulla, A. & Randall, G. (+) RNA virus replication compartments: a safe home for (most) viral replication. *Curr Opin Microbiol* 32, 82–88 (2016).
201. Simón, O., Williams, T., Caballero, P. & López-Ferber, M. Dynamics of deletion genotypes in an experimental insect virus population. *Proc Biol Sci* 273, 783–790 (2006).
202. smith, jeff. Superinfection drives virulence evolution in experimental populations of bacteria and plasmids. *Evolution* 65, 831–841 (2011).
203. smith, jeff, Van Dyken, J. D. & Zee, P. C. A Generalization of Hamilton’s Rule for the Evolution of Microbial Cooperation. *Science* 328, 1700–1703 (2010).
204. Smith-Tsurkan, S. D., Wilke, C. O. & Novella, I. S. Incongruent fitness landscapes, not tradeoffs, dominate the adaptation of vesicular stomatitis virus to novel host types. *J Gen Virol* 91, 1484–1493 (2010).
205. Sowinski, S. et al. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat Cell Biol* 10, 211–219 (2008).
206. Staves, P. A. & Knell, R. J. Virulence and competitiveness: testing the relationship during inter- and intraspecific mixed infections. *Evolution* 64, 2643–2652 (2010).
207. Stiefel, P. et al. Cooperative Vaccinia Infection Demonstrated at the Single-Cell Level Using FluidFM. *Nano Lett.* 12, 4219–4227 (2012).
208. Stirbat, T. V. et al. Fine tuning of tissues’ viscosity and surface tension through contractility suggests a new role for  $\alpha$ -catenin. *PLOS One* 8, e52554 (2013).
209. Storms, Z. J., Arsenault, E., Sauvageau, D. & Cooper, D. G. Bacteriophage adsorption efficiency and its effect on amplification. *Bioprocess Biosyst Eng* 33, 823–831 (2010).
210. Storms, Z. J. & Sauvageau, D. Modeling tailed bacteriophage adsorption: Insight into mechanisms. *Virology* 485, 355–362 (2015).

211. Stray, S. J. & Air, G. M. Apoptosis by influenza viruses correlates with efficiency of viral mRNA synthesis. *Virus Res* 77, 3–17 (2001).
212. Sun, X., Göhler, A., Heller, K. J. & Neve, H. The *ltp* gene of temperate *Streptococcus thermophilus* phage TP-J34 confers superinfection exclusion to *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis*. *Virology* 350, 146–157 (2006).
213. Sun, Y. et al. Immunostimulatory Defective Viral Genomes from Respiratory Syncytial Virus Promote a Strong Innate Antiviral Response during Infection in Mice and Humans. *PLOS Pathog* 11, e1005122 (2015).
214. Szathmáry, E. Natural selection and dynamical coexistence of defective and complementing virus segments. *J Theor Biol* 157, 383–406 (1992).
215. Takeuchi, K., Miyajima, N., Nagata, N., Takeda, M. & Tashiro, M. Wild-type measles virus induces large syncytium formation in primary human small airway epithelial cells by a SLAM(CD150)-independent mechanism. *Virus Res* 94, 11–16 (2003).
216. Thompson, J. E. et al. The K5 Lyase KflA Combines a Viral Tail Spike Structure with a Bacterial Polysaccharide Lyase Mechanism. *J Biol Chem* 285, 23963–23969 (2010).
217. Traulsen, A. & Nowak, M. A. Evolution of cooperation by multilevel selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 10952–10955 (2006).
218. Turner, P. E. & Chao, L. Prisoner's dilemma in an RNA virus. *Nature* 398, 441–443 (1999).
219. Vasilijevic, J. et al. Reduced accumulation of defective viral genomes contributes to severe outcome in influenza virus infected patients. *PLOS Pathog* 13, e1006650 (2017).
220. Vignuzzi, M., Stone, J. K., Arnold, J. J., Cameron, C. E. & Andino, R. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 439, 344–348 (2006).

221. Villarreal, L. P. & Witzany, G. When Competing Viruses Unify: Evolution, Conservation, and Plasticity of Genetic Identities. *J Mol Evol* 80, 305–318 (2015).
222. Voigt, E. A., Swick, A. & Yin, J. Rapid induction and persistence of paracrine-induced cellular antiviral states arrest viral infection spread in A549 cells. *Virology* 496, 59–66 (2016).
223. Voigt, E. A. & Yin, J. Kinetic Differences and Synergistic Antiviral Effects Between Type I and Type III Interferon Signaling Indicate Pathway Independence. *J Interferon Cytokine Res* 35, 734–747 (2015).
224. Wahl, L. M., Betti, M. I., Dick, D. W., Pattenden, T. & Puccini, A. J. Evolutionary stability of the lysis-lysogeny decision: Why be virulent? *Evolution* 73, 92–98 (2019).
225. Wang, I.-N. Lysis Timing and Bacteriophage Fitness. *Genetics* 172, 17–26 (2006).
226. Weinreich, D. M., Delaney, N. F., Depristo, M. A. & Hartl, D. L. Darwinian evolution can follow only very few mutational paths to fitter proteins. *Science* 312, 111–114 (2006).
227. West, S. A. & Buckling, A. Cooperation, virulence and siderophore production in bacterial parasites. *Proc Biol Sci* 270, 37–44 (2003).
228. West, S. A., Diggle, S. P., Buckling, A., Gardner, A. & Griffin, A. S. The Social Lives of Microbes. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 38, 53–77 (2007).
229. West, S. A., Griffin, A. S. & Gardner, A. Evolutionary Explanations for Cooperation. *Curr Biol* 17, R661–R672 (2007).
230. Yamamoto, T. et al. SP10 infectivity is aborted after bacteriophage SP10 infection induces nonA transcription on the prophage SP $\beta$  region of the *Bacillus subtilis* genome. *J Bacteriol* 196, 693–706 (2014).
231. Yang, S. et al. Improving Baculovirus Infectivity by Efficiently Embedding Enhancing Factors into Occlusion Bodies. *Appl Environ Microbiol* 83, e00595-17 (2017).

232. Zeng, L. et al. Decision making at a subcellular level determines the outcome of bacteriophage infection. *Cell* 141, 682–691 (2010).
233. Zheng, J., Guo, N. & Wagner, A. Selection enhances protein evolvability by increasing mutational robustness and foldability. *Science* 370, eabb5962 (2020).
234. Zheng, J., Payne, J. L. & Wagner, A. Cryptic genetic variation accelerates evolution by opening access to diverse adaptive peaks. *Science* 365, 347–353 (2019).
235. Ziegler, C. M. & Botten, J. W. Defective Interfering Particles of Negative-Strand RNA Viruses. *Trends Microbiol* 28, 554–565 (2020).
236. Zimmer, B., Summermatter, K. & Zimmer, G. Stability and inactivation of vesicular stomatitis virus, a prototype rhabdovirus. *Vet Microbiol* 162, 78–84 (2013).
237. Zwart, M. P. & Elena, S. F. Matters of Size: Genetic Bottlenecks in Virus Infection and Their Potential Impact on Evolution. *Ann Rev Virol* 2, 161–179 (2015).