

# Informe final publicable de proyecto

## Robustez mutacional de virus ARN

Código de proyecto ANII: FCE\_1\_2019\_1\_155930

Fecha de cierre de proyecto: 01/01/2024

**CRISTINA GHERALDI, Juan** (Responsable Técnico - Científico)

**FAJARDO ROSSI, Alvaro** (Investigador)

**FARIELLO RICO, Maria Ines** (Investigador)

**LECUMBERRY RUVERTONI, Federico** (Investigador)

**MEGRAN NÚÑEZ, Daniela** (Investigador)

**MORATORIO LINARES, Gonzalo Andrés** (Investigador)

**PEREIRA, Marianoel** (Investigador)

**SIMÓN, Diego** (Investigador)

---

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS (Institución Proponente) \\  
VIRAL POPULATIONS AND PATHOGENESIS UNIT, INSTITUT PASTEUR DE PARIS \\  
INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO \\  
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS

## Resumen del proyecto

Este estudio exhaustivo sobre la evolución de variantes de volatilidad del Coxsackievirus B3 (CVB3) ha revelado perspectivas cruciales aplicables a la comprensión de la dinámica evolutiva de virus ARN en general. Al observar el tamaño de las calvas, tanto el genotipo salvaje (WT) como el de volatilidad reducida (LessV) demostraron una menor variabilidad en comparación con sus ancestros. El genotipo LessV, en particular, destacó al presentar la menor variación en sus linajes evolucionados, sugiriendo su mayor robustez. El análisis del fitness relativo indicó que LessV, con su menor cantidad de mutaciones no sinónimas, se mantiene más fiel a su secuencia original. En contraste, los genotipos WT y MoreV mostraron una mayor variabilidad genética y no sinónima, destacando su susceptibilidad a cambios significativos.

A pesar de la ausencia de mutaciones en los codones modificados asociados a la volatilidad, se postula que este fenómeno podría ocurrir a nivel poblacional y de variantes minoritarias, instando a abordajes experimentales más extensos y al uso de técnicas avanzadas de secuenciado.

El genoma LessV, al actuar como un sustrato que amortigua la adquisición de mutaciones no sinónimas, promueve la formación de un enjambre genético más conectado y similar. En contraste, el genotipo MoreV, con su mayor capacidad de cambio aminoacídico, se muestra más vulnerable a la acumulación de mutaciones, sugiriendo una posible extinción prematura en escenarios evolutivos prolongados.

Estos hallazgos no solo proporcionan una visión profunda de la evolución de CVB3, sino que también ofrecen una perspectiva general sobre las dinámicas evolutivas de virus ARN. Este estudio destaca la importancia de futuras investigaciones que utilicen enfoques experimentales más extensos y tecnologías avanzadas para desentrañar aún más las complejidades de la evolución viral.

**Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Biología (teórica, matemática, térmica, criobiología, ritmos biológicos), Biología de la Evolución / Evolución experimental**

**Palabras clave: robustez / virus Coxsackie / evolución /**

### **Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.**

Un tema central en la biología evolutiva consiste en comprender cómo el genotipo (información genética) determina el fenotipo (función) que a su vez determina el éxito evolutivo o eficacia biológica de un organismo. Uno de los retos consiste en aunar los estudios teóricos y empíricos, que requiere un trabajo interdisciplinario para probar y refinar los modelos computacionales basados en trabajos experimentales que permitan validar los datos obtenidos en condiciones controladas de laboratorio. En biología evolutiva, el concepto de espacio de secuencia hace referencia a la representación matemática de todas las combinaciones posibles para una secuencia dada. Para un genoma de longitud  $n$ , el espacio de secuencia está formado por un hiper-volumen con  $d$  dimensiones ocupado teóricamente, dado que hay cuatro nucleótidos distintos, con hasta  $4^n$  genotipos posibles visualizados como coordenadas. Para un virus como Coxsackie, con un genoma de 7396 nucleótidos, supone 47441 combinaciones. En organismos más complejos, el número de combinaciones posibles es imposible de manejar. Es por ello que se han invertido muchos esfuerzos en reconstruir teóricamente el espacio de secuencia con organismos digitales (1). Sin embargo, el espacio de secuencia teórico es mucho mayor del que pueden ocupar los organismos, dado que la mayoría de las combinaciones de secuencia no tienen sentido biológico o no son viables. De hecho, los datos empíricos disponibles sugieren que el espacio de secuencia viable es significativamente pequeño comparado al espacio de secuencia teórico (2). Se presenta el desafío de si es posible definir el espacio viable ocupado por un organismo dentro del espacio de secuencia multidimensional matemático. Para comenzar a responder la pregunta de por qué un organismo no puede ocupar todas las regiones del espacio de secuencia, debemos considerar la viabilidad relativa y la eficacia biológica de cada genotipo. El resultado es el paisaje adaptativo, un concepto introducido por Wright (3), donde se atribuye a cada genotipo valores de eficacia positivos y negativos. Actualmente, no existen datos de paisajes adaptativos de genomas completos, sino que los diferentes genotipos se representan en una o dos dimensiones, y en otra dimensión (generalmente en el eje de ordenadas), la eficacia de cada genotipo como topografía vertical (altura del paisaje). Los distintos picos, separados por valles, presentan diferentes alturas dependiendo de la eficacia de cada genotipo, siendo los picos más altos los de mayor eficacia. Las trayectorias evolutivas se han estudiado utilizando organismos digitales (4), y experimentalmente se ha explorado utilizando unos pocos loci (5). Dado que las restricciones biológicas limitan el espacio de secuencia viable disponible para un organismo, la evolución puede haber seleccionado un genotipo que se localice en regiones óptimas donde: i) los genotipos vecinos tienen valores de eficacia similares (por ejemplo, por mutaciones silenciosas, redes neutrales, robustez genética), o ii) los genotipos vecinos exploran un

mayor rango de valores de eficacia (cambios en regiones codificantes no conservativas, adaptabilidad). La primera hipótesis asume que la mayoría de las mutaciones son deletéreas (6), de modo que los organismos desarrollaron secuencias que cuando mutan generarían mutaciones silenciosas. De hecho, la robustez genética o mutacional, definida como la capacidad de un genotipo para mantener su eficacia a pesar de la mutación, es decir, la capacidad de tolerar mutaciones, se propone como un carácter heredable, como indican estudios con sistemas digitales (7) y viroides (8). En el segundo escenario, una secuencia mutada puede dar lugar a cambios drásticos en la función, confiriendo ventajas selectivas si los cambios ambientales requieren una rápida evolución hacia picos de eficacia cercanos (adaptabilidad) (9). Sin embargo, son necesarios más esfuerzos para predecir desde la posición de inicio en el espacio de secuencia, la trayectoria evolutiva. Los datos empíricos disponibles sugieren que las trayectorias adaptativas son más limitadas que las teóricamente posibles porque los pasos intermedios deben conservar la viabilidad (10). Los picos de alta eficacia separados por grandes valles no pueden alcanzarse por mutaciones puntuales, reduciendo el número de trayectorias evolutivas disponibles. Además, los efectos de la epistasia y el grado de presión de selección también afectan al número de trayectorias adaptativas (11). Previamente, se ha demostrado que, bajo presión de selección, las trayectorias evolutivas de los virus de ARN son secuenciales, reproducibles, pocas en número y canalizadas por mutaciones presentes previamente en la población (12,13)

La evolución experimental es una aproximación muy útil para probar hipótesis evolutivas bajo condiciones controladas de laboratorio, que se basa en diseños experimentales relativamente sencillos. Se puede realizar utilizando distintos organismos modelo, sin embargo, los microorganismos, y especialmente los virus de ARN, muestran excelentes características para estudiar el proceso evolutivo en tiempo real porque presentan cortos tiempos de generación, grandes tamaños poblacionales y altas tasas de mutación (14). Además, sus genomas relativamente pequeños y simples, permiten manipularlos genéticamente de forma relativamente sencilla y secuenciar sus genomas completos (15,16). Recientemente, diferentes grupos de investigación desarrollaron métodos para alterar la población viral cambiando su tasa de mutación (17,18) y demostraron que las poblaciones virales pierden eficacia rápidamente luego de la mutación, evidenciando la naturaleza rugosa del paisaje adaptativo (19) y que la restricción de la capacidad del virus de explorar el espacio de secuencia lleva a una disminución de la capacidad adaptativa (20). Los avances en las tecnologías de secuenciación (2) y la bioinformática (21) permitieron identificar todas las mutaciones presentes en una población viral. Pero aún no se ha podido caracterizar globalmente la "constelación" de genotipos en el espacio de secuencia y sus valores relativos de eficacia. El objetivo de esta propuesta consiste en estudiar cómo la robustez genética influye en la evolución y adaptación de los organismos en el espacio de secuencia y los paisajes adaptativos. Para ello proponemos que la robustez genética de un virus de ARN puede afectarse sin alterar otros componentes de la eficacia biológica viral y que los cambios en la robustez genética pueden afectar a la evolución viral. Nuestro trabajo contribuirá con evidencia empírica a preguntas fundamentales de la teoría evolutiva. Además, al utilizar virus de ARN como modelo, el proyecto tiene implicaciones prácticas ya que la robustez puede determinar la susceptibilidad viral a acciones terapéuticas basadas en el aumento de su tasa de mutación y permitirá, potencialmente, desarrollar herramientas y métodos para predecir la evolución de patógenos a corto plazo y poder combatirlo.

A través de la investigación planteada en este proyecto nos propusimos poner a prueba, en primer lugar, la hipótesis de que la robustez genética puede alterarse por recodificación de los codones de una región del genoma viral sin alterar la identidad aminoacídica. Esta hipótesis está sustentada en que el espacio de secuencia viable es menor que el teórico y que la evidencia experimental muestra que las trayectorias evolutivas de los virus de ARN son secuenciales, reproducibles y dirigidas por mutaciones previamente presentes en la población (12,13). La segunda hipótesis de trabajo consistió en que es posible a partir de datos de secuencias y eficacias biológicas determinados experimentalmente, modelizar matemáticamente el espacio de secuencia y los paisajes adaptativos de poblaciones experimentales de CVB3 con diferentes grados de robustez genética. Por otro lado, la teoría de genética de poblaciones predice que la robustez solo se puede seleccionar de manera eficiente si la mutación es muy frecuente (34), de forma similar, el modelo de cuasiespecies predice que, en pequeños replicones, la robustez puede influir significativamente en la eficacia media de la población a altas tasas de mutación altas o con un tamaño poblacional bajo (22). Es por ello, que propusimos también contrastar la hipótesis de que los virus más robustos muestran, por un lado, mayor resistencia al tratamiento con mutágenos, y por otro, a la extinción como consecuencia de repetidos cuellos de botella, in vitro.

## **Metodología/Diseño del estudio**

En referencia a los aspectos metodológicos, a fin de generar cepas CVB3 con diferente capacidad de amortiguar mutaciones previamente, se calculó la robustez genética teórica en función del marco matemático diseñado por Archetti que se basa en la matriz de similitud físico-química de los aminoácidos de McLachlan y predice el efecto potencial de una mutación puntual sobre codones sinónimos (36,37). Basándonos en los codones de Leu y Ser, que son aquellos con mayor rango de exploración del espacio de secuencia al ser codificados por seis codones sinónimos, creamos diferentes mutantes de la región estructural P1

de CVB3 donde cada uno de estos codones en el genoma viral fueron reemplazados por uno sinónimo que se corresponde a una robustez genética teórica determinada. Los codones de Leu y Ser pueden ser clasificados en: i) MenosR (menos robusto) donde una única mutación puntual puede producir reemplazamientos aminoacídicos con propiedades físico-químicas diferentes al aminoácido original. Es el caso de los codones CUU y CUC que codifican para Leu y AGU y AGC que codifican para Ser. Estos codones tienen, teóricamente, la menor robustez genética y la mayor capacidad adaptativa teórica; ii) MásR (más robusto) donde es más probable que una mutación puntual produzca un cambio sinónimo o un reemplazamiento aminoacídico con propiedades físico-químicas similares al aminoácido original. Este grupo contiene los tripletes CUA y CUG que codifican para Leu y UCU y UCC que codifican para Ser. Estos codones presentan, teóricamente, la mayor robustez genética y la menor capacidad adaptativa; y iii) interR (robustez intermedia) que comprende los codones UUA y UUG para Leu y UCA y UCG para Ser. El virus silvestre presenta cada uno de los seis codones Leu/Ser en proporciones similares. Con el objetivo de comprobar que solamente se afectó a la robustez genética y no otras propiedades del virus relacionadas con la eficacia biológica en las poblaciones fundadoras, se realizaron los estudios de cinética de replicación y títulos virales, así como, la síntesis de ARN y los niveles de expresión de las proteínas virales. Para reconstruir el paisaje adaptativo empírico utilizamos las poblaciones del virus silvestre, MenosR y MásR para realizar pases seriados en células HeLa (tres linajes de evolución independientes o réplicas/virus), en diferentes condiciones: ausencia y presencia de baja o alta concentración de mutágenos (5-FU, ribavirina y AZC). Las poblaciones fundadoras, de pases intermedios y finales se secuenciaron por Illumina y se determinó sus valores de eficacia biológica por ensayos de competencia basados en RT-qPCR. Para realizar este tipo de ensayo uno de los virus ha de presentar un marcador fenotípico o genético, de manera que los virus competidores puedan diferenciarse. En este caso, usamos un virus de referencia, el cual está genéticamente marcado para ser detectado de forma específica por una sonda. La abundancia relativa de la población a competir contra la población referencia se determinó a las 48h post-infección en células HeLa a través del uso de sondas taqman acopladas a diferentes fluoróforos. Mediante el procesamiento y combinación de estos datos, se aplicará un modelo matemático para reconstruir el espacio de secuencia que utilizará como primera aproximación, la inferencia por máxima verosimilitud del espacio de secuencia de codones. Luego, se estimarán las dimensiones del espacio de secuencia de los datos empíricos y se reducirá dicha dimensionalidad por análisis de componentes principales, para identificar qué regiones del espacio de secuencia son exploradas por las poblaciones virales viables. Como resultado, se representará el espacio de secuencia en dos dimensiones y posteriormente se asignarán los valores de eficacia experimental. Finalmente, se validará la eficacia predicha por el modelo de paisaje adaptativo reconstruido matemáticamente, con poblaciones que serán construidas para ese fin, que se localicen en regiones intermedias a las de las poblaciones virales silvestre, MenosR y MásR. Para poner a prueba la hipótesis de que los virus más robustos muestran, por un lado, mayor resistencia al tratamiento con mutágenos, y por otro, a la extinción consecuencia de repetidos cuellos de botella, realizamos, en primer lugar, 50 pases seriados en células HeLa de cada una de las poblaciones virales silvestre, MenosR y MásR (tres linajes de evolución independientes o réplicas/virus) con bajas y altas concentraciones de mutágenos (5-FU, ribavirina y AZC). Las poblaciones evolucionadas a diferentes pases (P0, P10, P20, P30 y P50) fueron secuenciadas para determinar las bases moleculares de la evolución experimental. Posteriormente, se determinó su eficacia biológica por ensayos de competencia basados en RT-qPCR utilizando sondas taqman. A partir de esas poblaciones evolucionadas en condiciones de ausencia y presencia de bajas y altas condiciones mutagénicas, seleccionamos al azar un clon de cada población obtenida anteriormente y realizamos pases seriados placa a placa, en células HeLa (tres linajes de evolución independientes o réplicas/virus) para someter a las poblaciones virales silvestre, MenosR y MásR a sucesivos cuellos de botella en diferentes condiciones de ausencia y presencia de mutágenos. En estos experimentos se espera que las mutaciones que se fijen en las poblaciones virales prácticamente no esté sesgada, ya que la fuerza de la deriva genética será predominante comparado a la fuerza de la selección natural. Como consecuencia, todas las mutaciones viables pueden aumentar su frecuencia hasta la fijación con similar probabilidad, independientemente de su efecto sobre la eficacia del virus, o en otras palabras, independientemente de si son deletéreas, neutrales o beneficiosas (38). Sin embargo, como la mayoría de las mutaciones son deletéreas, los experimentos de acumulación de mutaciones por repetidos cuellos de botella tienden a disminuir la eficacia biológica llegando incluso a provocar la extinción viral (39). Como antes, las poblaciones evolucionadas fueron secuenciadas a diferentes pases para determinar las bases moleculares de la evolución experimental y se determinará su eficacia biológica por ensayos de competencia basados en RT-qPCR utilizando sondas taqman. De esta forma podremos estudiar de qué manera las diferencias en la robustez influyen en la evolución del virus

## Resultados, análisis y discusión

El análisis de diversas variantes de volatilidad del virus Coxsackievirus B3 (CVB3) desde una perspectiva evolutiva ha arrojado luz sobre distintas características de las poblaciones virales, proporcionando valiosos insights aplicables al entendimiento general de virus ARN. Al examinar el tamaño de las calvas, se observa que tanto el genotipo salvaje (WT) como el genotipo de volatilidad reducida (LessV) muestran una menor variabilidad en el área de las calvas en comparación con el área de las

calvas de sus poblaciones ancestrales. El linaje WT Li3, con la mutación N63H, exhibe un tamaño mayor, explicando su variación (Bou & Sanjuán, 2021).

El uso del fitness relativo como indicador revela que el genotipo LessV, en sus tres linajes evolucionados, presenta la menor variación con respecto a su ancestro. Esta coherencia se debe a que LessV adquirió la menor cantidad de mutaciones (n=17) después de 10 pasajes, sin afectar la secuencia proteica original. Importante destacar que, a pesar de que cuatro de estas mutaciones estaban en el 5'UTR, no parecen haber afectado el fitness de los linajes.

En contraste, los tres linajes WT experimentaron 19 mutaciones, de las cuales solo tres fueron no sinónimas. Este contraste se amplifica en los tres linajes MoreV, que sufrieron 21 mutaciones, siendo siete no sinónimas. Considerando la cantidad de mutaciones y la conservación del fitness, se puede inferir que el genotipo menos volátil (LessV) es más robusto, mientras que el más volátil (MoreV) es menos robusto, situando al WT en una posición intermedia.

Sin embargo, al analizar las mutaciones fijadas en todos los linajes, ninguna ocurrió en los codones modificados que otorgan diferentes grados de volatilidad. Se sugiere que este fenómeno podría darse a nivel poblacional y de variantes minoritarias, lo que subraya la importancia de abordajes basados en la evolución experimental con un mayor número de pasajes. Además, el uso de técnicas de secuenciado ultra-profundo se postula como esencial para examinar las frecuencias alélicas y comprender el papel de las variantes minoritarias en las secuencias consenso.

La ausencia de secuencias de pasajes intermedios limita el análisis en profundidad; sin embargo, su obtención permitiría una evaluación más exhaustiva. El genoma menos volátil, LessV, parece actuar como un sustrato que minimiza la adquisición de mutaciones no sinónimas, contribuyendo a la formación de un enjambre de mutantes conectados y similares, según los conceptos de espacio de secuencia y paisaje adaptativo.

En contraste, el genotipo MoreV, con su mayor capacidad de cambiar de aminoácido frente a mutaciones, se vuelve más vulnerable ante la acumulación de mutaciones. La evolución por deriva génica podría llevar al MoreV a una extinción más temprana, especialmente en un escenario de evolución de calva en calva con un mayor número de pasajes. Estos resultados proporcionan una visión valiosa para comprender las dinámicas evolutivas de virus ARN y sugieren caminos para futuras investigaciones en este campo.

## **Conclusiones y recomendaciones**

### **Conclusiones:**

En el estudio de fitness durante los 10 pasajes de calva en calva, se observó que el tamaño poblacional disminuyó en las variantes de volatilidad de CVB3, siguiendo patrones descritos en la bibliografía. Emergieron dos linajes con fenotipos de calvas grandes, y el fitness relativo se mantuvo o disminuyó en comparación con la población ancestral.

Después de la evolución por deriva génica, se determinó que el genotipo menos volátil, LessV, es el más robusto entre los tres genotipos estudiados.

### **Recomendaciones:**

Futuras investigaciones podrían explorar en detalle los mecanismos que subyacen a la disminución del tamaño poblacional durante los pasajes de calva en calva.

Considerando la robustez demostrada por el genotipo LessV, se recomienda evaluar su potencial aplicabilidad en contextos clínicos o de biotecnología, destacando su resistencia frente a la evolución por deriva génica.

## Referencias bibliográficas

1. Wilke, C. O., Wang, J. L., Ofria, C., Lenski, R. E. & Adami, C. Evolution of digital organisms at high mutation rates leads to survival of the flattest. *Nature* 412, 331–3 (2001).
2. Acevedo, A., Brodsky, L. & Andino, R. Mutational and fitness landscapes of an RNA virus revealed through population sequencing. *Nature* 505, 686–90 (2014).
3. Wright, S. Evolution in Mendelian Populations. *Genetics* 16, 97–159 (1931).
4. Clune, J. et al. Natural selection fails to optimize mutation rates for long-term adaptation on rugged fitness landscapes. *PLoS Comput. Biol.* 4, e1000187 (2008).
5. de Visser, J. A. G. M. & Krug, J. Empirical fitness landscapes and the predictability of evolution. *Nat. Rev. Genet.* 15, 480–490 (2014).
6. Sanjuán, R., Moya, A. & Elena, S. F. The distribution of fitness effects caused by single-nucleotide substitutions in an RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8396–401 (2004).
7. Azevedo, R. B. R., Lohaus, R., Srinivasan, S., Dang, K. K. & Burch, C. L. Sexual reproduction selects for robustness and negative epistasis in artificial gene networks. *Nature* 440, 87–90 (2006).
8. Codoñer, F. M., Darós, J.-A., Solé, R. V & Elena, S. F. The fittest versus the flattest: experimental confirmation of the quasispecies effect with subviral pathogens. *PLoS Pathog.* 2, e136 (2006).
9. Goldhill, D., Lee, A., Williams, E. S. C. P. & Turner, P. E. Evolvability and robustness in populations of RNA virus. *Front. Microbiol.* 5, 35 (2014).
10. Smith, J. M. Natural selection and the concept of a protein space. *Nature* 225, 563–4 (1970).
11. 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, 111–4 (2006).
12. 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).
13. Stapleford, K. A. et al. Emergence and transmission of arbovirus evolutionary intermediates with epidemic potential. *Cell Host Microbe* 15, 706–16 (2014).
14. Drake, J. W. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 4171–5 (1993).
15. Buckling, A., Craig Maclean, R., Brockhurst, M. a & Colegrave, N. The Beagle in a bottle. *Nature* 457, 824–9 (2009).
16. Elena, S. F. & Lenski, R. E. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nat. Rev. Genet.* 4, 457–69 (2003).
17. Perales, C., Martín, V. & Domingo, E. Lethal mutagenesis of viruses. *Curr. Opin. Virol.* 1, 419–22 (2011).
18. Beaucourt, S. et al. Isolation of fidelity variants of RNA viruses and characterization of virus mutation frequency. *J. Vis. Exp.* 1–9 (2011). doi:10.3791/2953
19. Crotty, S., Cameron, C. E. & Andino, R. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6895–900 (2001).
20. 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).
21. Isakov, O. et al. Deep sequencing analysis of viral infection and evolution allows rapid and detailed characterization of viral mutant spectrum. *Bioinformatics* 31, 2141–50 (2015).
22. Krakauer, D. C. & Plotkin, J. B. Redundancy, antiredundancy, and the robustness of genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 1405–9 (2002).
23. Tuller, T. et al. An evolutionarily conserved mechanism for controlling the efficiency of protein translation. *Cell* 141, 344–54 (2010).
24. Gustafsson, C., Govindarajan, S. & Minshull, J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol.* 22, 346–53 (2004).

25. Llaure, A. S., Acevedo, A., Cooper, S. B. & Andino, R. Codon usage determines the mutational robustness, evolutionary capacity, and virulence of an RNA virus. *Cell Host Microbe* 12, 623–32 (2012).
26. Kimura, M. Preponderance of synonymous changes as evidence for the neutral theory of molecular evolution. *Nature* 267, 275–6 (1977).
27. Kimura, M. Genetic variability maintained in a finite population due to mutational production of neutral and nearly neutral isoalleles. *Genet. Res.* 11, 247–69 (1968).
28. ARCHETTI, M. Genetic robustness and selection at the protein level for synonymous codons. *J. Evol. Biol.* 19, 353–365 (2006).
29. Duffy, S., Shackelton, L. A. & Holmes, E. C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat. Rev. Genet.* 9, 267–76 (2008).
30. Fares, M. A. The origins of mutational robustness. *Trends Genet.* 31, 373–381 (2015).
31. Wagner G.P. & Altenberg, L. Perspective: Complex adaptations and the evolution of evolvability. *Evolution (N. Y.)*. 50, 967–796 (1996).
32. Wagner, A. Robustness and evolvability: a paradox resolved. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 275, 91–100 (2008).
33. Sanjuán, R., Cuevas, J. M., Furió, V., Holmes, E. C. & Moya, A. Selection for Robustness in Mutagenized RNA Viruses. *PLoS Genet.* 3, e93 (2007).
34. Hermisson, J. & Wagner, G. P. The population genetic theory of hidden variation and genetic robustness. *Genetics* 168, 2271–84 (2004).
35. McLachlan, A. D. Tests for comparing related amino-acid sequences. Cytochrome c and cytochrome c 551. *J. Mol. Biol.* 61, 409–24 (1971).
36. Archetti, M. Genetic robustness at the codon level as a measure of selection. *Gene* 443, 64–69 (2009).
37. Archetti, M. Survival of the steepest: hypersensitivity to mutations as an adaptation to soft selection. *J. Evol. Biol.* 22, 740–50 (2009).
38. Chao, L. Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet. *Nature* 348, 454–455 (1990).
39. Lázaro, E., Escarmís, C., Pérez-Mercader, J., Manrubia, S. C. & Domingo, E. Resistance of virus to extinction on bottleneck passages: study of a decaying and fluctuating pattern of fitness loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10830–5 (2003)

## Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)