



Universidad Autónoma de San Luis Potosí



Instituto de Física

**Simulación de los efectos de la duplicación en la dinámica
de redes de genes**

TESIS QUE PRESENTA

L. en Biofísica Yuridia Selene Posadas García

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS INTERDISCIPLINARIAS**



Posgrado en Ciencias Interdisciplinarias

DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS ARTURO ESPINOSA SOTO

San Luis Potosí, S.L.P.

AGOSTO 2018

Créditos institucionales

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Carlos A. Espinosa Soto en el Instituto de Física “Manuel Sandoval Vallarta” de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Se agradece el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología quien otorgó la beca no. 448068 a Yuridia Selene Posadas García. Para la realización de este trabajo se contó con la aportación del Proyecto de Ciencia Básica Conacyt no. 223311 otorgado a C. Espinosa.

Tesis que presenta:

L. EN BIOFÍSICA YURIDIA SELENE POSADAS GARCÍA

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA
EN CIENCIAS INTERDISCIPLINARIAS**

JURADO

Director de tesis: Dr. Carlos Arturo Espinosa Soto

Tutor académico: Dra. Mónica Raquel Calera Medina

Sinodal: Dr. Edgardo Ugalde Saldaña

Sinodal: Dr. José Alfredo Méndez Cabañas

AGOSTO 2018

Agradecimientos

Agradezco a mi familia por su apoyo incondicional para lograr mis sueños. A mis padres, Homero Posadas Camargo y Doraciana García Rodríguez, por ser mis guías e impulsarme a ser mejor. A mis hermanas, Odalys Grisell Posadas García y Diane Paulina Posadas García por sus cariños y juegos. A mi pareja, Víctor Miguel Banda Guzmán, por estar conmigo en este escabroso camino de la academia. A mi hijo, Isaac Banda Posadas, por iluminar todos mis días. A los abuelos de Isaac, sus atenciones y sus cuidados también hicieron posible finalizar esta meta.

A mi asesor, el Dr. Carlos A. Espinosa Soto por enseñarme, orientarme, aconsejarme y asistirme a cada paso en todo el proceso de la elaboración de mi tesis y en mi formación profesional. Además por haberme aceptado nuevamente como alumna en el doctorado. Si tengo suerte, algún día podré ser la mitad de buena investigadora.

A los profesores del Posgrado en Ciencias Interdisciplinarias, por poner día a día su corazón en la enseñanza y por preocuparse por hacer de nosotros grandes investigadores.

A Maricela Cano Colunga, secretaria del PCI, por su genuino interés en nosotros y su apoyo en todos los procedimientos administrativos.

A mis amigos y compañeros que estuvieron conmigo de una u otra forma. A los que están lejos y a los que están cerca. Su apoyo y su amistad han enriquecido mi vida.

Índice

1. Introducción	2
1.1. Duplicación de genes	2
1.2. Duplicación como fuente de innovación	2
1.3. Redes de regulación genética	4
1.4. Robustez a mutaciones	4
1.5. Duplicación y su importancia en la robustez a mutaciones	6
1.6. Consideraciones de la tesis	6
2. Objetivo General	7
3. Objetivos específicos	7
4. Metodología	8
4.1. Simulación	8
4.2. Modelo	8
4.3. Diseño del experimento	10
4.3.1. Selección de la muestra	10
4.4. Muestreo aleatorio de redes de regulación genética	10
4.5. Perturbación de los especímenes	12
4.5.1. Adición de un gen	12
4.5.2. Mutaciones	13
5. Resultados	14
5.1. La tolerancia a duplicaciones está asociada a la robustez a mutaciones	14
5.2. La robustez a duplicaciones favorece la resistencia a mutaciones . . .	14
5.3. Los efectos de las duplicaciones no son iguales a los de añadir cualquier gen	16
5.4. Las redes de regulación genética toleran más fácilmente el crecimiento por duplicación de genes que por inclusión de genes ajenos a la red .	18
5.5. Conclusiones y perspectivas	19
Referencias	23

Resumen

La duplicación de genes, un evento por el cual se generan dos copias idénticas de un mismo gen, es un mecanismo por el cual los organismos pueden disminuir su susceptibilidad a mutaciones y acceder a nuevas funciones. El hecho de que una tercera parte del genoma de eucariotas corresponde a genes duplicados nos hace preguntarnos qué sucede con una red de genes después de un evento de duplicación y cómo esto podría influir en el fenotipo y en la robustez. En esta investigación se simuló la dinámica de redes de regulación de genes y se estudió la capacidad de dichas redes de producir un perfil de expresión genética. Para ello se usó un modelo de red de regulación de genes que incluye dos clases de genes: genes de factores de transcripción y genes de proteínas estructurales que definen un fenotipo. Se observó qué sucedía con la robustez a mutaciones de las redes después de inducir crecimiento de la red en un gen vía duplicación encontrando que las redes son tolerantes a los efectos de la duplicación, muestran una fuerte asociación entre los efectos de la duplicación y la robustez a mutaciones, y disminuye la susceptibilidad a mutaciones. En este trabajo se establece un modelo con el cual sería interesante explorar en un futuro la capacidad de la duplicación de generar nuevos fenotipos y su efecto en relación con otros tipos de perturbaciones.

1. Introducción

1.1. Duplicación de genes

La duplicación es el proceso por medio del cual se producen dos copias idénticas de un gen. Se estima que cada millón de años la probabilidad de que la copia de un gen duplicado se fije es del 1% (Lynch y Conery, 2000). ¿Por qué es importante estudiar a la duplicación genética?

A través del trabajo de Rubin *et al.* (2000) se sabe que una tercera parte del genoma de los organismos eucariotas son copias de otros genes, es decir, producto de duplicaciones. La existencia de una gran cantidad de genes duplicados nos motiva a preguntarnos cuál podría ser el papel de la duplicación en la evolución. Se considera que la evolución de nuevas funciones requiere muchas veces de nuevos genes. Además, actualmente se reconoce a la duplicación de genes como la principal fuente de innovación fenotípica (Ohno, 1970). La innovación fenotípica, a diferencia de la adaptación por optimización que se basa en la mejora de una función pre-existente (Meyer *et al.*, 2012), consiste en el surgimiento de nuevas funciones y estructuras, o cambios en el lugar y el momento de la expresión de proteínas (Wagner, 2008). La relación entre duplicación e innovación se basa en que la duplicación favorece la acumulación de variación genética a través de mutaciones con la que puede trabajar la selección natural (Zhang, 2003). A la capacidad de un sistema de mantener el mismo fenotipo ante perturbaciones, como lo son las mutaciones, se le conoce como robustez. La duplicación de genes también ha demostrado tener una gran relevancia ya que está fuertemente relacionada con la robustez al disminuir la susceptibilidad de los organismos y sus características fenotípicas a mutaciones (Blank *et al.*, 2005; Gu *et al.*, 2003).

Actualmente se conocen distintos mecanismos moleculares por los que se llevan a cabo los eventos de duplicación en líneas germinales y somáticas. Algunos de ellos son el entrecruzamiento desigual de cromosomas, deslizamiento de la DNA polimerasa, retrotransposición y errores en el reparto de cromosomas durante mitosis o meiosis. Asimismo se ha estudiado a profundidad cuál es el destino de las copias de genes, o parálogos, generadas después de la duplicación. Se sabe que los genes duplicados pueden ser retenidos o perdidos después de acumular mutaciones (Airoldi y Davies, 2012; Innan y Kondrashov, 2010; Seoighe y Wolfe, 1999). En la gran mayoría de las veces una de las dos copias se pierde (Figura 1a) (Airoldi y Davies, 2012; Innan y Kondrashov, 2010).

1.2. Duplicación como fuente de innovación

¿Cómo se crea una innovación en el fenotipo por medio de la duplicación de genes? De acuerdo con la tesis de Susumu Ohno, la duplicación de genes también permite que una de las copias retenga la función ancestral y la otra acumule mutaciones para descubrir nuevas funciones. De esta forma, según Ohno la duplicación permite innovar disminuyendo el riesgo de perder funciones que han evolucionado previamente (Airoldi y Davies, 2012; Innan y Kondrashov, 2010). Las copias, liberadas de las restricciones que imponía la selección natural al gen original pueden evolucionar

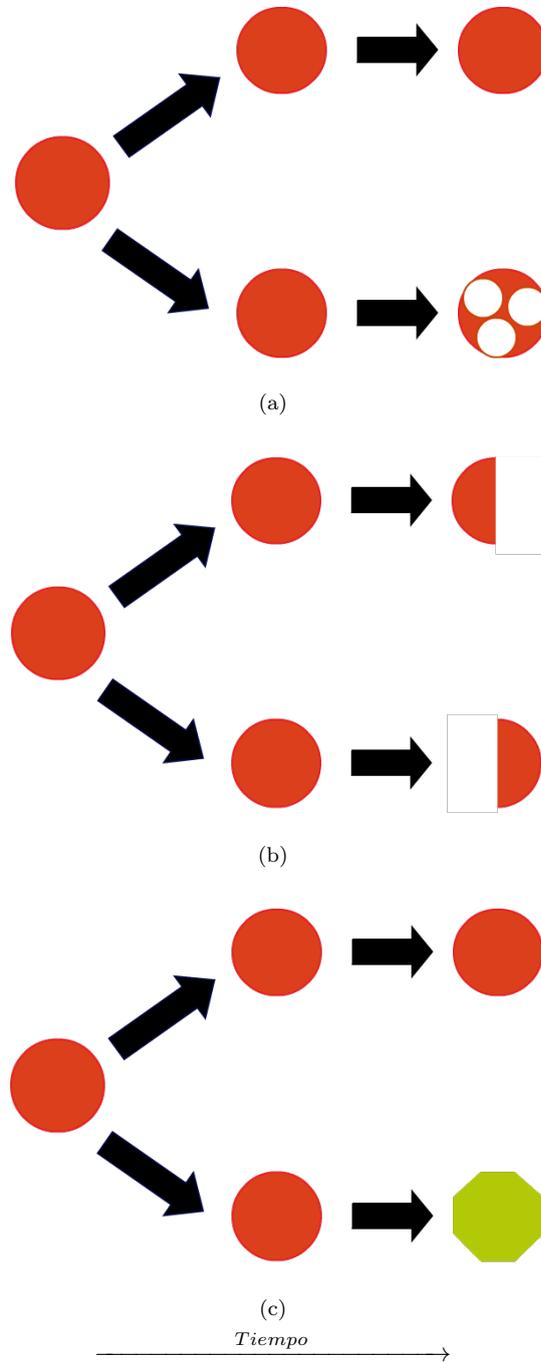


Figura 1: Esquemas se muestran los posibles destinos de la copia de un gen generada por duplicación. En cada figura a la izquierda se representa con un círculo naranja el gen único y original del cual surgen dos copias, la duplicación se simboliza con las dos flechas que salen del gen original y conducen a dos círculos naranja que representan a las dos copias del gen resultantes de la duplicación y por último a la derecha de muestra cada posible destino de una de las copias: (a) pérdida de la función original, (b) subfuncionalización y (c) neofuncionalización.

debido a mutaciones que se van acumulando en su secuencia codificante y/o en sus secuencias regulatorias. Cuando las funciones del gen original se reparten entre las distintas copias se le denomina subfuncionalización (Figura 1b), y cuando una copia retiene la función original y la otra acumula mutaciones que causan la aparición de una nueva función se le llama neofuncionalización (Figura 1c) (Airoldi y Davies, 2012; Force *et al.*, 1999; He y Zhang, 2005; Ohno, 1970; Smith *et al.*, 2006).

1.3. Redes de regulación genética

En organismos vivos las redes de regulación genética son una colección de genes, incluyendo a los factores de transcripción, que responden a estímulos y cuyos productos interactúan entre sí y con otros elementos a través de lo cual se consolida la expresión de un fenotipo. Comparar propiedades de sistemas genéticos como su densidad de conexiones, su respuesta a condiciones exteriores y su tolerancia a diferentes perturbaciones genéticas sería útil para resolver preguntas sobre sus implicaciones en la evolución. Este puede ser un problema muy difícil de abordar en organismos vivos. No obstante, distintos algoritmos computacionales han facilitado el estudio de problemas que son difíciles de abordar con enfoques experimentales en el laboratorio (Wagner, 1996). Al simplificar las interacciones entre los genes de la red se pueden observar los efectos de los patrones de expresión resultantes de dichas interacciones (Hecker M, Lambeck S, Töpfer S, van Someren E, 2009) y posibilitan el modelado de comportamientos de los procesos biológicos como la dinámica de redes de regulación desde un estímulo inicial hasta la expresión de un patrón de actividad maduro.

En el modelo la red de regulación genética está formada por dos clases de genes: genes que codifican para factores de transcripción que pueden autorregularse y regular a otros genes como a aquellos que codifican para proteínas estructurales. Los genes de factores de transcripción, así en la red como lo observamos en la naturaleza, son genes que interactúan entre sí y regulan a los genes que codifican para proteínas estructurales. Estos últimos se encargan de establecer un fenotipo resultante del estímulo inicial y las interacciones en la red. Ejemplos de fenotipos que pueden producirse en la naturaleza son flujos de rutas metabólicas, inicio/fin de etapas del desarrollo, adecuación, expresión de proteínas, adhesión o migración celular, resistencia a antibióticos, etc.

1.4. Robustez a mutaciones

Las mutaciones puntuales en un gen o en sus secuencias regulatorias pueden producir cambios en la estructura final de la proteína o en la cantidad, lugar y momento en que es expresada. Estas mutaciones suelen producir errores provocando que la proteína pierda sus funciones y eventualmente sea desechada por la selección natural (Figura 1a). Desde el punto de vista de la robustez a mutaciones existe otra motivación para el estudio de la duplicación de genes y de sus efectos. Esto es así principalmente porque las copias de genes permiten mantener funciones redundantes

que brindan protección al organismo ya que da acceso a una copia de respaldo (Conant y Wagner, 2004; Wagner, 2001). Estos genes de respaldo ayudan, por ejemplo, a mantener activas rutas metabólicas que no tienen vías alternas (Blank *et al.*, 2005).

Sanjuán *et al.* (2007) mostraron que la preferencia de la selección natural por la robustez a mutaciones al encontrar que al exponer a dos poblaciones de virus RNA, una se replicaba más rápidamente pero la otra era intrínsecamente más robusta a mutaciones, a altas tasas de mutación las tasas de replicación de ambas poblaciones se equipararon. Encontrar las causas y las consecuencias de la robustez a perturbaciones genéticas, como la robustez a mutaciones, ha sido un tema de gran interés por su prevalencia entre los organismos vivos debido a la necesidad de patrones de expresión específicos y por ser favorecida por la selección natural (de Visser *et al.*, 2003; Espinosa-Soto, 2016). Se ha propuesto que las redes de genes pueden ser inherentemente robustas a mutaciones. Alternativamente, también se ha propuesto que la robustez a mutaciones ha sido favorecida por la selección natural por ser indispensable para mantener intactas las características especialmente benéficas para la adaptación de los organismos (Fisher, 1928; Waddington, 1957). Wagner demostró en 1996, a través de un modelo de redes de regulación genética, que poblaciones de redes con fenotipos muy variables al exponerlas a mutaciones tienden a mostrar fenotipos estables después de un periodo de evolución donde las redes sobrevivientes eran elegidas por su nivel de adecuación. (Espinosa-Soto, 2016) reafirmó estos mismos resultados bajo el mismo modelo. Además observó el resultado en la robustez cuando la selección estabilizadora trabaja con otros aspectos de los fenotipos de actividad genética como la producción de fenotipos de actividad genética no estacionarios y el grado de actividad de la red con genes reguladores de la transcripción. A través de su investigación se concluye que la selección favorece la evolución a redes genéticas robustas en diferentes escenarios de la selección siempre y cuando el tamaño de la población o la tasa de mutación sea alta.

También se ha encontrado una correlación entre la robustez a mutaciones y otros tipos de robustezes como la ambiental (Sur y Taipale, 2016) y la robustez a la recombinación (Azevedo *et al.*, 2006). Por lo tanto, también se ha propuesto un mecanismo donde la tolerancia a mutaciones evoluciona como una consecuencia indirecta de otras perturbaciones más comunes que la mutación.

Recientemente se ha encontrado una relación poco intuitiva entre robustez y la capacidad de los organismos a evolucionar a través de variación genética obtenida por la acumulación de cambios en el código genético que no alteran el fenotipo (Wagner, 2008). Al no ser dañinos estos cambios, denominados mutaciones neutrales, son libres de acumularse proporcionando la oportunidad de encontrar un nuevo fenotipo que por otros medios habría sido imposible acceder. A nivel experimental se ha encontrado evidencia al someter enzimas a mutaciones neutrales y encontrando que éstas pueden evolucionar nuevas funciones sin que durante etapas intermedias se vea afectada su estructura y su función (Aharoni *et al.*, 2005; Bloom *et al.*, 2006).

1.5. Duplicación y su importancia en la robustez a mutaciones

Mediante experimentos en genes de rutas metabólicas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en donde deliberadamente eran eliminados genes, Gu *et al.* (2003) cuestionaron el efecto de suprimir una de las copias en dichas rutas metabólicas. Compararon el fenotipo resultante de suprimir genes con y sin copias, y con copias que ya no eran fieles. Encontraron que el cambio en el fenotipo fue poco severo cuando estos contaban con copias que permanecían fieles al gen original, y que fue muy severo o letal cuando no se contaba con copias o éstas ya no se parecían. Lo anterior provee evidencia de que la duplicación de genes proporciona robustez ante eventos que estropean genes. Un ejemplo de ello son las mutaciones. Mutaciones en genes de rutas metabólicas pueden comprometer la función de una proteína a tal nivel que puede llegar a equivaler a la supresión del gen.

1.6. Consideraciones de la tesis

Hasta ahora la mayoría de los estudios se han basado en explorar y describir los efectos de las duplicaciones en los genes originales y en sus duplicados, y el destino de las copias después de un prolongado tiempo de exposición a mutaciones y a la selección natural. En cambio muy pocos estudios se han enfocado en qué es lo que pasa con las características fenotípicas que dependen de la interacción de varios genes cuando uno de ellos se duplica. ¿La duplicación hace a estas características más frágiles o más resistentes a distintas perturbaciones? ¿Qué tan fácil es producir nuevas variantes fenotípicas después de la duplicación?

En esta tesis se trabajó con una variante del modelo matemático creado por Wagner (1994) que describe redes de regulación genética. En la versión del modelo que se utilizó se introdujeron dos clases de genes: genes que codifican para factores de transcripción que se encargan de regularse a sí mismos y a otros genes, y genes que codifican para proteínas estructurales que determinan el fenotipo como por ejemplo proteínas que producen pigmentos o que conforman constituyentes de la piel, hueso y pelo, o que forman parte del citoesqueleto celular que les proporcionan forma y movilidad. Posteriormente se seleccionó una muestra de redes aleatorias que compartían un mismo fenotipo empleando una caminata de Monte Carlo propuesta anteriormente por Ciliberti *et al.* (2007). A través de la simulación se estudió la relación que existe entre la duplicación y la robustez a mutaciones, así como el efecto de la duplicación en la capacidad de redes de regulación genética de amortiguar mutaciones. Con esto se espera contribuir al conocimiento del papel de la duplicación de genes en la evolución.

2. Objetivo General

Estudiar el efecto de la duplicación de genes en la robustez a mutaciones de las redes de regulación genética.

3. Objetivos específicos

1. Analizar la capacidad de los genes duplicados de compensar perturbaciones en el genotipo y mutaciones en el estado del sistema.
2. Determinar si el efecto de la duplicación en la robustez de redes de regulación genética depende del origen del gen agregado.
3. Determinar si existe una asociación entre la capacidad del genotipo de tolerar un incremento en la cantidad de genes que codifican para factores de transcripción y la de compensar mutaciones en el estado del sistema.

4. Metodología

4.1. Simulación

Se estudió la dinámica de un conjunto de redes de regulación genética a través de un modelo con dinámica discreta. Se usó para dicho modelo para obtener un patrón de actividad genética estable a partir de una condición inicial dada. La condición inicial desde la que se inicia la dinámica de una red refleja el patrón de actividad genética que resulta de la exposición de la red a distintas señales moleculares en el desarrollo de un organismo como lo son hormonas, péptidos, temperatura, frecuencias electromagnéticas, etc. Al integrar una condición inicial se imita el efecto de las señales recibidas por una célula que definen el estado inicial de los genes. Asimismo un patrón de actividad genética define las propiedades fenotípicas de una parte de un organismo.

Una clara ventaja del estudio *in silico* de las propiedades de las redes de regulación genética es que permite examinar de forma sistemática las variaciones genotípicas y fenotípicas a las que tiene acceso un conjunto de genes. De esta forma se puede estudiar la forma en que distintos procesos afectan la producción de esta variación latente y sus posibles efectos en la evolución de los organismos.

El código se escribió en C++ (Stoustrup, 1986), un lenguaje que permite crear programas basados en instrucciones que se construyen con un lenguaje que se parece al escrito (Bronson, 2000). Se hizo uso de la biblioteca científica GSL (GNU Scientific Library)(Galassi, 2010) y del entorno y lenguaje de programación con un enfoque al análisis estadístico R (R Core Team, 2018). En particular, de la biblioteca GSL se usaron funciones que permiten generar números aleatorios a partir de diferentes distribuciones de probabilidad y computar los coeficientes de correlación de Pearson utilizados para el análisis estadístico. También se utilizó el ambiente de programación R para generar las gráficas que facilitaron el análisis visual de los datos y se hizo uso de la función de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon (Zar, 1996) para el análisis comparativo de los datos.

Dentro de los resultados, para el manejo de los datos, cada correlación realizada corresponde a la que otorga el coeficiente de correlación de Pearson y cada comparación a la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon.

4.2. Modelo

Este modelo considera dos clases de genes: N_f genes que codifican para factores de transcripción [FT] y N_s genes que codifican para proteínas estructurales [ST]. Si bien todos los genes son susceptibles de ser regulados, sólo los FT pueden regular a otros.

El modelo trabaja a pasos discretos, donde a cada paso se define un estado del sistema de tamaño N_f y que puede tomar valores ± 1 . El primer estado del sistema S^0 cuando $t = 0$ es la condición inicial, indica cuales de los genes de la red se encuentran activos y cuales no. El sistema cambia de estado a cada paso de una trayectoria dinámica, En esta trayectoria, el último estado muestra

los genes que quedaron encendidos y apagados al final de la interacción de los genes, cuando se ha llegado a un estado estable del sistema S^∞ al cual le llamamos atractor.

Un atractor puede clasificarse por el comportamiento del estado estable: se le llama de punto fijo si el último estado es igual al inmediato anterior, o ciclo límite si incluye una secuencia de estados que se repiten en el mismo orden indefinidamente.

Ya que los genes FT se regulan entre sí, los estados subsecuentes al inicial son dependientes de cómo es esa regulación. El estado de expresión final de los ST representa el fenotipo de la red.

La interacción entre estos genes se define en una matriz con entradas reales \mathbf{M} de $N_f + N_s$ hileras y N_f columnas. Donde los valores de las entradas m_{ij} indican la regulación que el gen j ejerce sobre el gen i . Cada entrada de la matriz define a una posible interacción entre dos genes de la red. La intensidad de la regulación se encuentra dada por el valor de la celda y el tipo de regulación por su signo, donde un valor positivo indica activación y uno negativo, inhibición.

La actividad de los genes en la red de regulación en el siguiente estado del sistema S^{t+1} , es decir, qué genes estarán encendidos o apagados en la siguiente iteración de la simulación, se obtiene a partir de la ecuación 1. Debido a que los FT son las únicas proteínas de la red que pueden regular y los ST solo pueden ser regulados; a pesar de que la actividad de los ST también cambia, para calcular cada estado sólo se toman en cuenta los FT. Esta ecuación realiza el cálculo de la i -ésima entrada del siguiente vector estado S^{t+1} , el cual depende de las interacciones de regulación entre los FT de la matriz \mathbf{M} y del estado de actividad actual de dichos FT.

$$s_i^{t+1} = \sigma_i \left[\sum_{j=1}^{N_f} m_{ij} s_j^t \right] \quad (1)$$

El siguiente estado de actividad de cada gen también depende del signo que resulta de las interacciones descritas previamente, el cual es asignado por la función escalón (ec. 2). En la ec. 1 σ_i es una función escalón que asigna valores de la siguiente forma:

$$\sigma_i(x) = \begin{cases} 1, & \text{if } x > 0 \\ s_i^t, & \text{if } x = 0 \\ -1, & \text{if } x < 0 \end{cases} \quad (2)$$

Por último, el fenotipo P de la red resultante de la actividad de los genes depende directamente del estado de los genes ST en el atractor. El estado de los genes ST a su vez dependen exclusivamente del estado de los genes FT en el atractor, independientemente del estado que hayan tenido los genes ST anteriormente.

4.3. Diseño del experimento

4.3.1. Selección de la muestra

En este trabajo se considera al conjunto de redes especificado en la sección sobre el modelo que producen un fenotipo específico P . P se refiere al estado de los genes ST en el atractor al que se llega en la dinámica de una red de regulación genética. Debido a que los genes FT son los únicos que pueden regular a otros genes y los genes ST solo pueden ser regulados, a continuación consideraremos esta diferencia de comportamientos separando su análisis para mayor simplicidad. Con la finalidad de contar con una muestra representativa se generó una muestra de 1,000 redes, a las que nos referiremos como especímenes, al azar con 12 genes FT y 6 genes ST, con una densidad de conexiones de 0.25 y que compartían un mismo fenotipo.

Los criterios de inclusión para escoger una red son el número de relaciones posibles, un estado estacionario y un fenotipo deseado en ausencia de perturbaciones.

Para asegurar que todos los especímenes tuvieran el mismo fenotipo P primero se estableció arbitrariamente un fenotipo deseado y se procedió a buscar una red inicial, llamada red original, de 12 FT que cumplieran como condiciones una densidad de conexiones pre-establecida y que produjeran un atractor de punto fijo. Posteriormente se obtuvo, para esta red de FT y para cada red obtenida en la caminata, una segunda red de 6 genes ST a la cual de ser necesario se le modificaban los signos para obtener el fenotipo deseado.

La red inicial* se representó por una matriz, anteriormente mencionada en el modelo, \mathbf{M} de $N_f + N_s$ hileras y N_f columnas donde los valores de las entradas m_{ij} , las cuales indican la regulación que el gen j ejerce sobre el gen i . Dichas entradas se establecieron con una probabilidad de p donde la intensidad y el signo de esta interacción se obtuvieron a partir de los valores de una distribución normal con media en 0 y desviación estándar de 1.

Para corroborar que dichos especímenes se comportaban de forma esperada, se estudió el comportamiento de su robustez a mutaciones a diferentes densidades de conexiones y se comparó el resultado con la literatura.

Los especímenes generados por el código utilizado en este estudio muestran una tendencia a disminuir la robustez a mutaciones conforme aumenta el número de conexiones (Figura 2). Este resultado también ha sido observado y reportado por Wagner (1996) y se observa a pesar de las diferencias en los modelos donde las más importantes son la inclusión de dos clases de genes y la definición del fenotipo a partir de una sola de estas clases.

4.4. Muestreo aleatorio de redes de regulación genética

Previamente Ciliberti *et. al* (2007) descubrieron que es fácil encontrar secuencias de mutaciones, cada una de las cuales cambia en una interacción entre genes, que permiten visitar la vasta mayoría de las redes que producen un fenotipo determinado P sin necesidad de pasar por especímenes que

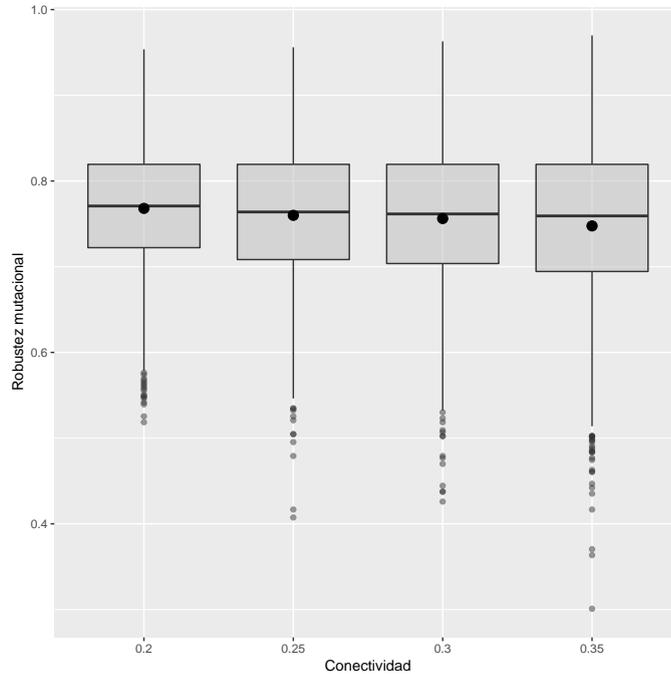


Figura 2: Las redes de regulación genética tienen una menor robustez a mutaciones conforme aumentan las conexiones de la red. En el eje horizontal se muestran las diferentes densidades de conexiones y en el eje vertical la robustez a mutaciones, que son la fracción de mutantes que mantuvieron el fenotipo original.

no producen el fenotipo P , a través de una caminata de Monte Carlo.

En la Figura 3 se ilustra la caminata de n pasos para tomar la muestra a partir de la red original. En esta caminata cada paso equivale a una mutación, que implica adquirir, perder o cambiar la magnitud de una interacción de regulación.

La k -ésima red obtenida para la muestra $G(k)$, procede de la red anterior $G(k-1)$ y difieren entre sí por un número concreto de pasos, es decir, de mutaciones.

El número de pasos que se da en cada caminata entre un espécimen actual $G(K)$ y el siguiente $G(k+1)$ equivale a veinte veces el número de interacciones de regulación de la red, por lo que corresponden 4.320 pasos para una red de 12 FT y 6 ST. Esto evita correlaciones entre especímenes muestreadas sucesivamente.

A partir de la red original $G(0)$ se realizó una caminata para tomar 1,000 muestras. La red original $G(0)$ no se tomó en cuenta en la muestra, solo fue el punto de partida de la simulación.

Para cada paso de la caminata hay dos tipos de situaciones, que la siguiente red conserve el fenotipo P de los especímenes anteriores o no. Si la red del siguiente paso no conserva el fenotipo original entonces se regresa a la red anterior que sí conservaba el fenotipo y se procede a dar un paso en otra dirección. En este proceso, todos los especímenes que mantienen el mismo fenotipo y que son accesibles por mutaciones sencillas tienen la misma probabilidad de ser incluidas en la muestra

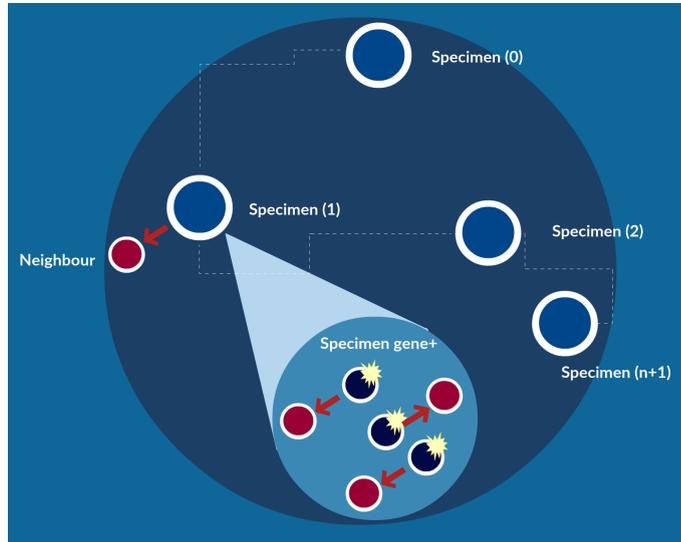


Figura 3: Caminata, la imagen ilustra la obtención de la muestra descrita en la sección de metodología a partir de una caminata y la generación de especímenes vecinas y con un incremento en la cantidad de FT.

(Ciliberti *et al.*, 2007; van Nimwegen *et al.*, 1999).

Se permitió una holgura en cuanto a la densidad de conexiones de ± 2 interacciones de regulación, es decir que se podían agregar o eliminar hasta dos conexiones.

Para llegar a la red siguiente se contaron todos los pasos, sin importar las veces que se regresó de una red a otra en busca de una que conservara el fenotipo original. Esta estrategia garantiza que todas las redes que producen el fenotipo P y que están conectadas por mutaciones tengan la misma probabilidad de ser incluidas como especímenes en la muestra (van Nimwegen *et al.*, 1999).

4.5. Perturbación de los especímenes

4.5.1. Adición de un gen

Una duplicación se refiere a hacer crecer al espécimen añadiendo un gen que tiene exactamente las mismas interacciones de regulación que otro gen ya presente en la red. Por cada espécimen se forman 12 especímenes con un gen duplicado, uno por cada gen FT. Lo anterior da un resultado un total de 12,000 especímenes con un gen duplicado a estudiar.

Como se espera diferenciar entre los efectos de la duplicación y los de añadir un gen se establecieron otros dos tipos de controles para esta investigación. El primer control [CI] permite observar lo que pasa con una red después de la adición de un gen nuevo que mantiene la densidad de conexiones de la red. En cambio, el segundo control [CII] permite observar lo que pasa con una red después de la adición de un gen nuevo que mantiene la misma densidad de conexiones que un gen del espécimen. Para realizar una mejor comparación por cada red con un duplicado se generó un CI y un CII, es decir, 12,000 especímenes para CI y 12,000 para CII.

4.5.2. Mutaciones

La forma en que se estudiaron los efectos de la duplicación fue a través de la comparación de la robustez a mutaciones del espécimen seleccionado para la muestra y de los especímenes formados con un gen añadido. Las mutaciones generan un cambio en la magnitud de una interacción de regulación entre una red y otra. Se llama red vecina a aquella que contiene una diferencia en una interacción en comparación con una espécimen.

A partir de la red $G(K)$ se exploraron los fenotipos de 432 (dos veces el número de interacciones de regulación) vecinos de un espécimen.

También se exploraron los fenotipos resultantes de hacer crecer la red vía duplicación, CI y CII.

5. Resultados

5.1. La tolerancia a duplicaciones está asociada a la robustez a mutaciones

Uno de los objetivos más importantes de esta investigación ha sido estudiar la capacidad de los genes duplicados de compensar perturbaciones en el genotipo. Para abordar este tema se utilizó el modelo dinámico de una red de regulación genética descrito en la metodología. Se generó una muestra de 1,000 redes elegidas al azar, a las que llamamos especímenes, entre aquellas que producen un fenotipo P predeterminado y tienen un número de conexiones en un intervalo elegido de antemano.

Se observó la capacidad de los especímenes de mantener su fenotipo ante mutaciones y ante la adición de un gen, ya sea por duplicación o por inclusión de genes nuevos que no son copias de genes pre-existentes. Finalmente se sometió también a mutaciones a aquellos especímenes que habían incluido un gen adicional.

En la Figura 4a se muestra que existe una fuerte correlación entre la robustez a mutaciones y la robustez a duplicaciones de acuerdo con el coeficiente de Pearson ($r = 0,63$ $p = 1,5 \times 10^{-112}$). Esta correlación indica que los especímenes robustos a mutaciones también tienden a serlo con respecto a cambios drásticos en su estructura generadas por la duplicación de un gen.

También se observó que los especímenes tienden a ser más robustos a mutaciones que a la duplicación de alguno de sus genes de acuerdo con la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon ($V = 478,190$; $p = 1,0 \times 10^{-139}$). La media de la robustez a mutaciones de las especímenes fue de 0,76 con una desviación estándar de $\pm 0,08$; mientras que la robustez a duplicaciones presentó una media de 0,60 con una desviación estándar de $\pm 0,17$.

Anteriormente se ha estudiado la relación entre la robustez a mutaciones y otros tipos de robusteces como al medio ambiente Ancel y Fontana (2000); Sur y Taipale (2016), a perturbaciones estocásticas (Ciliberti *et al.*, 2007; Lehner, 2010), y a la recombinación (Lehner, 2010), por mencionar algunos ejemplos. En resumen, dichos estudios han demostrado que aquellos especímenes que tienen una alta resistencia a alguna de estas clases perturbaciones tenderán a tolerar también otras perturbaciones muy distintas. En este trabajo de tesis de maestría se añade a la duplicación de genes de redes de regulación genética a la lista de perturbaciones asociadas a una robustez con alta correlación.

5.2. La robustez a duplicaciones favorece la resistencia a mutaciones

En la Figura 4b se compara la robustez a mutaciones antes y después de que se presenten duplicaciones de genes en los especímenes. Se observó una fuerte asociación ($r = 0,75$; $p = 4,9 \times 10^{-180}$) que implica que aquellos especímenes que tienen una alta robustez a mutaciones tienden también a mantener esta condición incluso después de una duplicación de genes.

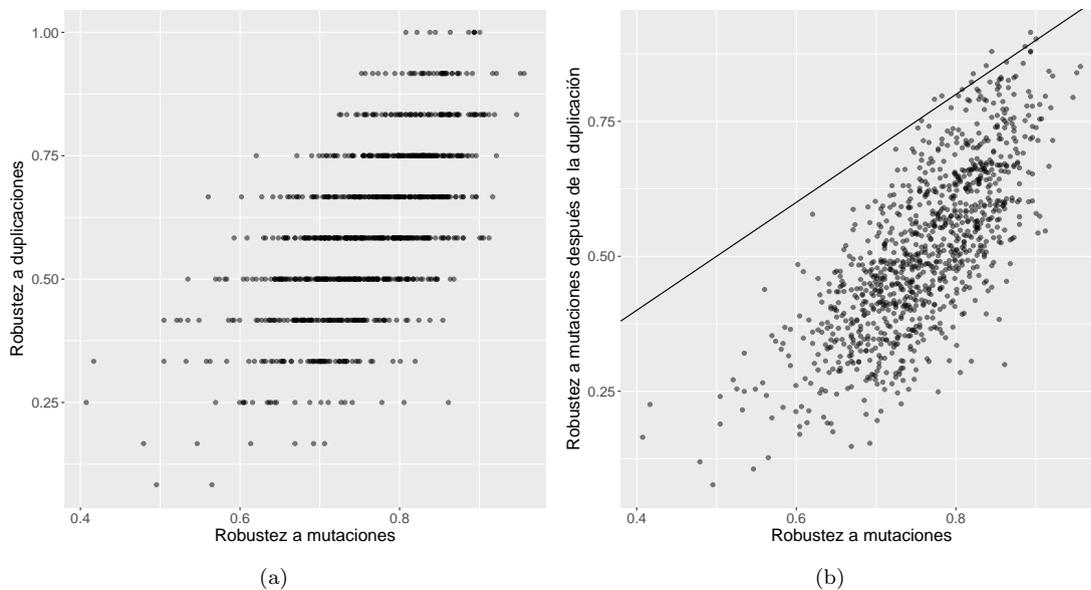


Figura 4: Asociación estadística entre la robustez a mutaciones con la robustez a duplicación y con la robustez a mutaciones después de la duplicación. En (a) se muestra la robustez a mutaciones contra la robustez a duplicaciones de cada espécimen. En (b) se muestra la robustez a mutaciones del total de los especímenes antes y después de la duplicación. La diagonal en (b) es la línea de identidad, los puntos por debajo de ella corresponden a aquellos especímenes en los que la robustez a mutaciones disminuyó después de la duplicación.

Un punto central en este trabajo de investigación es determinar si existe un efecto importante en la variación que producen las mutaciones en las redes de regulación genética después de una duplicación. En general, los especímenes disminuyeron su capacidad de amortiguar mutaciones después de la duplicación. Como ya se había mencionado, la robustez media a mutaciones de los especímenes era igual a 0.76 (desviación estándar de $\pm 0,08$). En cambio la robustez a mutaciones media después de la duplicación es de 0,51 con una desviación estándar de $\pm 0,15$. Además, la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon ($V = 500, 390$; $p = 2,3 \times 10^{-165}$) de la Figura 4b indicó que la robustez a mutaciones disminuye significativamente después de la duplicación.

Para comprender mejor este fenómeno que desafía la tesis de esta investigación, se separaron los especímenes con un gen duplicado en dos grupos dependiendo de si mantuvieron el fenotipo original o expresaron un fenotipo nuevo. Se encontró que la respuesta a mutaciones por parte de ambos grupos fue claramente contrastante.

Primero se consideró a las combinaciones de espécimen y gen duplicado en que se mantenía el fenotipo original. Posteriormente, se comparó la robustez a mutaciones antes y después de la duplicación. Tomando únicamente a las duplicaciones en que se conservaba el fenotipo original, la media de robustez a mutaciones después de la duplicación fue de 0,89 con una desviación estándar de $\pm 0,03$, la cual es mayor en comparación con la media de la robustez a mutaciones de las especíme-

nes (0,76 con una desviación estándar de $\pm 0,08$). Lo anterior indica que las redes de regulación genética que tienen una duplicación que no alteró al fenotipo original tienden a ser más robustas a mutaciones que aquellas sin duplicación ($V = 349,5$; $p = 9,5 \times 10^{-165}$). Esto se observa claramente en la Figura 5a, ya que la magnitud en el eje horizontal (que corresponde a la robustez a mutaciones antes de la duplicación) tiende a ser menor que la magnitud en el eje vertical (correspondiente a la robustez a mutaciones después de la duplicación).

Asimismo, se observó que la robustez a mutaciones de los especímenes mantiene una débil correlación positiva aunque significativa ($r = 0,36$; $p = 3,1 \times 10^{-31}$) con las redes de regulación genética que tienen una duplicación que no alteró al fenotipo original.

Posteriormente se tomó al grupo de especímenes que no conservaron el fenotipo después de la duplicación, se les indujo mutaciones y se obtuvo su robustez a mutaciones con relación al fenotipo nuevo que apareció después de la duplicación, y no al fenotipo original. Finalmente se comparó la robustez a mutaciones de estos especímenes antes y después de la duplicación.

En contraste con los especímenes que mantuvieron el fenotipo después de la duplicación, los que no lo mantuvieron son significativamente menos robustos a mutaciones, como se observa en la ubicación de los puntos en relación con la línea de identidad de la Figura 5b. Después de la duplicación, estas redes mostraron una media de la robustez a mutaciones de 0,25 con una desviación estándar de $\pm 0,10$. Además, al contrario de los especímenes que sí mantuvieron el fenotipo después de la duplicación, mantienen una débil correlación negativa pero significativa ($r = -0,45$; $p < 5,2 \times 10^{-242}$) con la robustez a mutaciones antes de la duplicación.

Existe una gran ventaja de mantener el fenotipo original después de una duplicación, ya que la robustez a mutaciones para esta fracción de especímenes se eleva considerablemente.

5.3. Los efectos de las duplicaciones no son iguales a los de añadir cualquier gen

Para revisar si el efecto de la duplicación es diferente al del aumento de tamaño de la red por otras causas, se comparó el efecto de la duplicación contra el efecto de incrementar la red de regulación genética del espécimen en un gen de acuerdo con los controles CI y CII. En el caso del control CI, en lugar de un duplicado se agrega un gen que mantiene la densidad de conexiones en la red y, en el caso del control CII, un gen que conserva el número de conexiones que uno de los genes de la red.

Se encontró una correlación débil pero significativa entre la robustez a mutaciones y la robustez a CI ($r = 0,41$; $p = 5,7 \times 10^{-41}$; Figura 6a). La robustez media a CI fue de 0,43 con desviación estándar $\pm 0,04$.

Para CII (Figura 6b) se obtuvo también una correlación débil pero significativa ($r = 0,31$; $p = 1,3 \times 10^{-23}$) y una robustez media de 0,32 con desviación estándar $\pm 0,03$.

Tanto la correlación encontrada con la robustez a mutaciones de los especímenes como la robustez

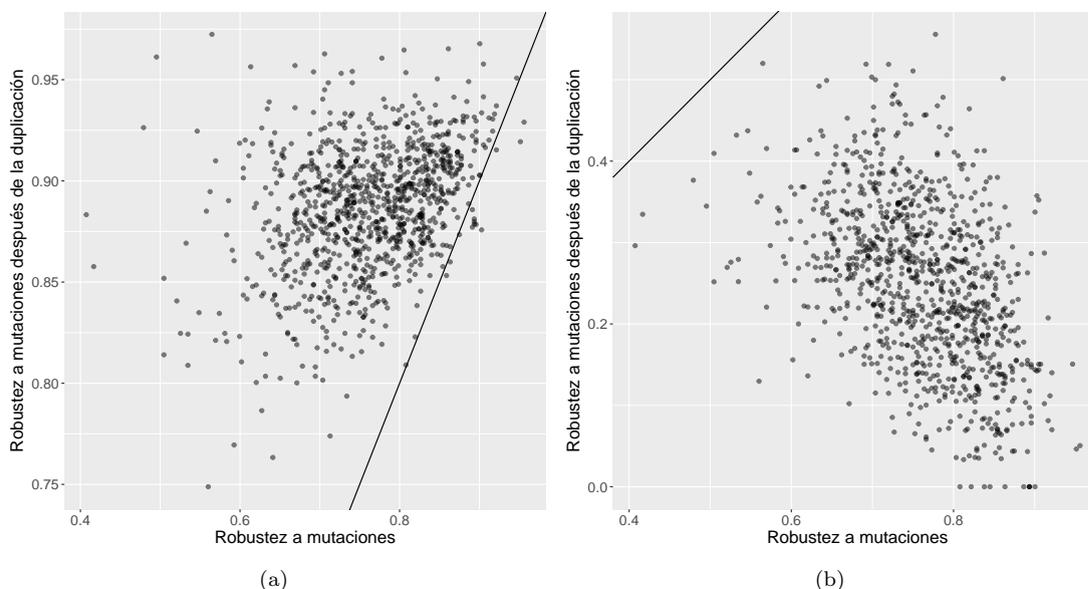


Figura 5: Correlación entre la robustez a mutaciones antes y después de la duplicación. En (a) se compara la robustez a mutaciones antes y después de la duplicación de los especímenes que mantuvieron el fenotipo. La diagonal es la línea de identidad donde los puntos por arriba de ella corresponden a aquellos especímenes en los que la robustez a mutaciones aumentó después de la duplicación. En (b) se compara la robustez a mutaciones antes y después de la duplicación de los especímenes que no mantuvieron el fenotipo. La diagonal es la línea de identidad.

media de CI y CII son mucho menores en comparación con la expresada por los especímenes con un gen duplicado. Esto último implica que los especímenes toleran mejor una duplicación que la adición de un gen por otro medios.

De manera análoga a lo descrito en secciones previas, se tomó en cuenta para el siguiente análisis únicamente a los especímenes que después de añadirseles un gen sin relación a genes pre-existentes (CI o CII) mantuvieron el fenotipo. Se indujeron mutaciones y se comparó la robustez a mutaciones de estos especímenes antes y después del crecimiento de la red genética.

Posteriormente se consideró únicamente a los especímenes que no mantenían el fenotipo después de expandirse vía CI o CII. Se indujeron mutaciones y se obtuvo su robustez a mutaciones con relación al fenotipo nuevo de la red, y no al fenotipo original. Finalmente se comparó la robustez a mutaciones de estos especímenes antes y después del crecimiento de la red genética.

Se encontró que se preserva el mismo fenómeno que en el caso de la duplicación, donde se observa un aumento en la robustez a mutaciones en especímenes que mantuvieron el fenotipo después de la adición de genes y una disminución en los que no (Figura 7).

Los especímenes de los controles CI y CII que mantienen el fenotipo original con mayor facilidad, son significativamente mejores resistiendo mutaciones en comparación con aquellas tolerantes a la duplicación. Esto se puede observar a partir de sus respectivas medias ($0,91 \pm 0,04$ para CI ,

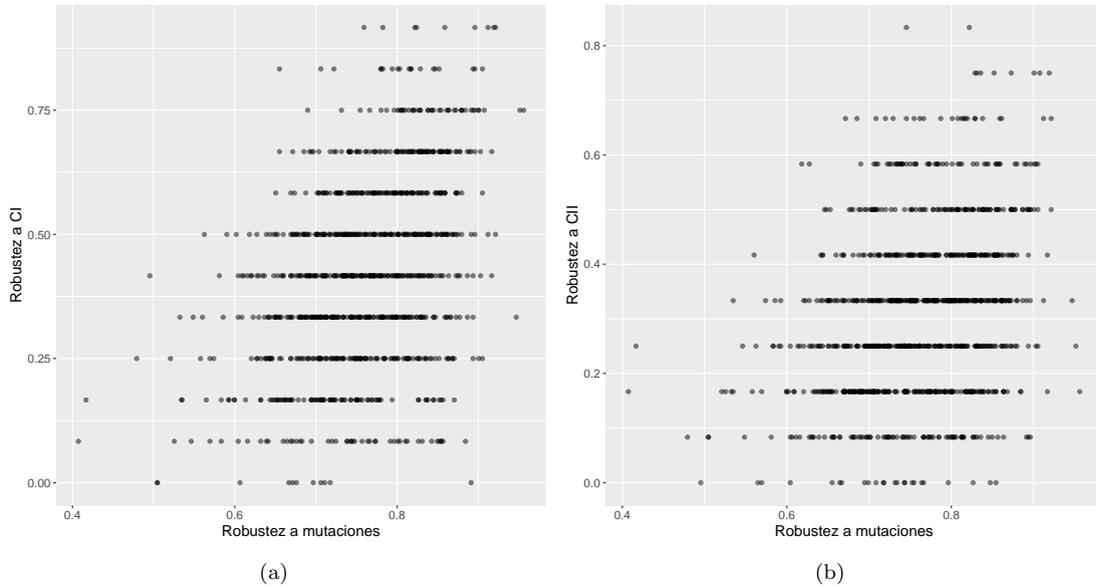


Figura 6: Asociación estadística entre la robustez a mutaciones de las especímenes y la robustez a CI y a CII. Se compara la robustez a mutaciones de los especímenes antes del crecimiento de la red con la robustez a CI (a) y con la robustez a CII (b).

$0,93 \pm 0,03$ para CII y $0,89 \pm 0,03$ para duplicación) y en los resultados de la Figura 7a.

Existe una gran ventaja de mantener el fenotipo original después de crecer la red de regulación genética, ya que la robustez a mutaciones para esta fracción de especímenes se eleva. Sin embargo, a diferencia del crecimiento por duplicación, la robustez a mutaciones antes y después del crecimiento (por CI o por CII) mantienen una muy débil correlación para mostrar una tendencia (Figura 7b arriba y abajo para CI y CII, respectivamente).

5.4. Las redes de regulación genética toleran más fácilmente el crecimiento por duplicación de genes que por inclusión de genes ajenos a la red

En cada uno de los 1,000 especímenes se probó añadir un gen 12 veces, una vez por cada gen FT, y se revisó si esto cambiaba el fenotipo. Resultó haber más especímenes robustos a duplicaciones que a CI y a CII, como se muestra en la Figura 8a.

Se observó que todos los especímenes mantuvieron el fenotipo al menos una de las 12 veces en que se les hizo crecer la red vía duplicación. Incluso hubieron especímenes que mantuvieron el fenotipo en las 12 veces en que se les realizó una duplicación. Por el contrario, al hacer crecer las redes vía CI y CII, hubieron especímenes que no pudieron mantener el fenotipo ninguna vez (Figura 8b).

Al someter a mutaciones a las redes con un gen FT adicional se observó que su media de la robustez a mutaciones disminuye a medida que aumenta su robustez a la inclusión de nuevos genes

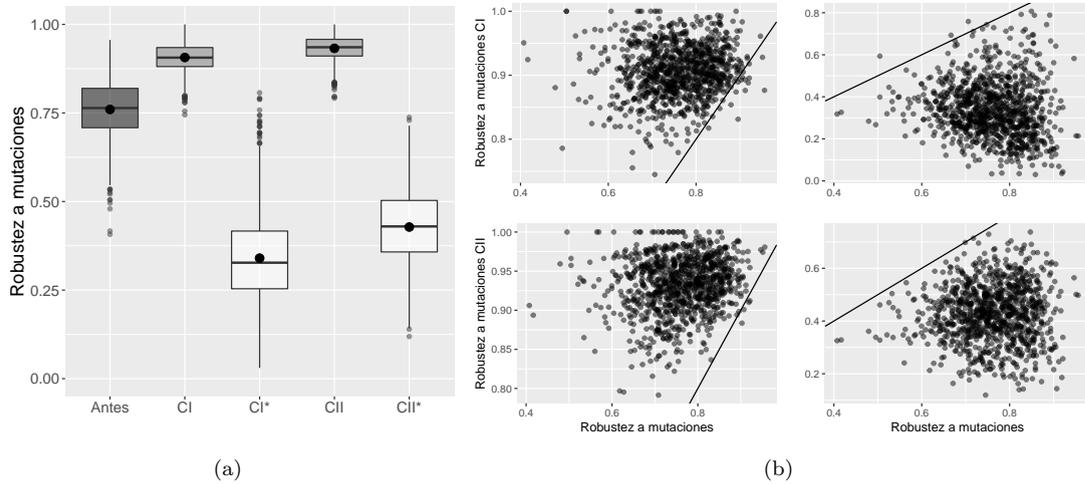


Figura 7: Los especímenes que mantienen el fenotipo después de crecer por CI o por CII incrementan su robustez por mutaciones. (a) Gráficas de caja de la robustez a mutaciones de los especímenes antes de crecer (gris oscuro), de aquellos que mantuvieron el fenotipo después de crecer la red (gris claro) y de aquellos que no mantuvieron el fenotipo (blanco). En (b) arriba se muestra la robustez a mutaciones de cada espécimen después de crecer de acuerdo con el control CI. A la izquierda se encuentran los datos que corresponden a los que mantuvieron el fenotipo ($r = 0,09$; $p = 4,5 \times 10^{-3}$) y a la derecha aquellos que no lo mantuvieron ($r = -0,11$; $p = 2,8 \times 10^{-4}$). En (b) abajo se muestra la robustez a mutaciones de cada espécimen después de crecer de acuerdo con el control CII. a la izquierda se encuentran los datos que corresponden a los que mantuvieron el fenotipo ($r = 0,15$; $p = 3,6 \times 10^{-6}$) y a la derecha aquellos que no lo mantuvieron ($r = 0,04$; $p = 0,17$).

(Figura 9). Es decir que conforme más veces el espécimen mantuvo el fenotipo original, menor es su robustez a mutaciones. Además la robustez a mutaciones de especímenes con duplicaciones tienden estabilizarse en redes que toleran todas o casi todas las duplicaciones, mientras que los especímenes con un gen de CI y CII tienden a seguir disminuyendo.

En el Cuadro 1 se resume la media y la desviación estándar de la robustez ante el crecimiento de un gen, en la red de regulación genética, de los especímenes. Y de la robustez a mutaciones después del crecimiento. Aquí se observa claramente que los especímenes que mantienen el fenotipo después del crecimiento mejoran su robustez a mutaciones. Sin embargo los especímenes toleran mejor agregar una copia de un gen pre-existente que uno *de novo*.

5.5. Conclusiones y perspectivas

A diferencia de anteriores investigaciones donde se ha estudiado el destino del gen duplicado y de sus interacciones después de periodos prolongados, en esta investigación se buscó observar en una red de regulación genética cómo la duplicación de un gen afecta a su fenotipo y a su capacidad de amortiguar mutaciones en el momento en el que la duplicación se lleva a cabo, antes de cualquier

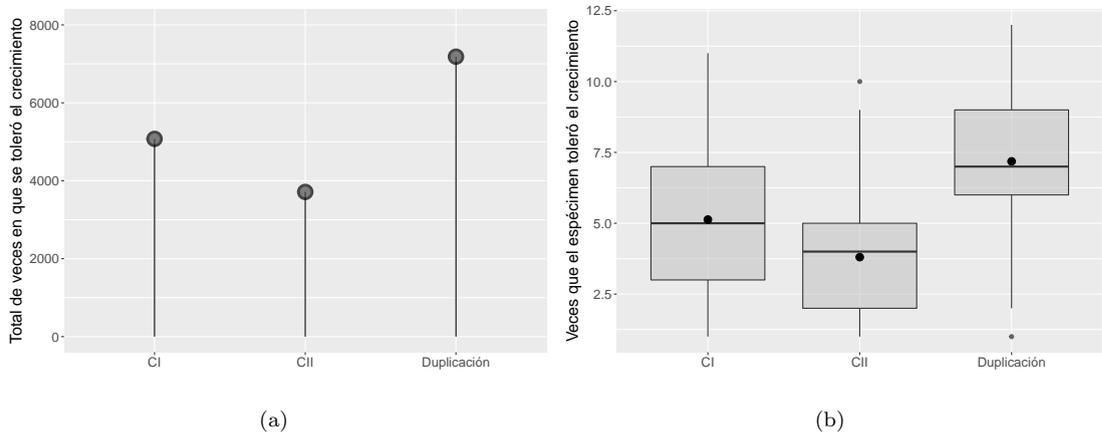


Figura 8: Más especímenes con duplicaciones mantienen el fenotipo que con CI o CII. En (a) se muestra la cantidad de especímenes que mantuvieron el fenotipo al agregar un gen. Estos se encuentran clasificados dependiendo del tipo del gen añadido: CI, CII y duplicación. En (b) se muestra la distribución del número de veces por espécimen que suele tolerar la inclusión de un nuevo gen sin cambiar el fenotipo.

proceso evolutivo.

En lo general se encontró que los especímenes toleran mejor agregar a su red de regulación genética una copia de un gen pre-existente que a uno ajeno, ya que la adición de genes ajenos conduce con mayor facilidad a la pérdida del fenotipo original. Aunque todavía no se ha descrito la causa de esta relación, resultó evidente que los especímenes que originalmente mitigan mejor a las mutaciones también son mejores manteniendo el fenotipo después de una duplicación genética.

En este trabajo confirmamos que un efecto importante de la duplicación es disminuir la susceptibilidad de los especímenes a mutaciones. Y además encontramos el efecto contrario en aquellos especímenes que no lograron mantener el fenotipo después de la duplicación, los cuales fueron mucho más sensibles a las mutaciones en comparación con los especímenes sin un gen añadido.

Un buen porcentaje de las veces en que se sometió a los especímenes a un crecimiento a través de un gen ajeno a la red vía CI o CII, estos especímenes no toleraron el cambio estructural. Los especímenes que mantuvieron el fenotipo aumentaron su robustez a mutaciones significativamente mejor que al someterlos a crecimiento a través de la duplicación. No se sabe de qué depende el aumento en la robustez a mutaciones para estos especímenes ya que no puede ser por redundancia debido a que se el gen agregado tiene una función diferente.

En este estudio se caracterizan algunas propiedades nuevas y ya conocidas sobre la robustez, sin embargo también establece un punto de partida para buscar nuevas propiedades y relaciones. La variación fenotípica es una de las formas en que se pueden encontrar nuevas funciones que representen una ventaja competitiva ante ambientes variantes. ¿Puede la duplicación producir cambios relevantes en el acceso a nuevos fenotipos? A través de este mismo modelo se puede observar la

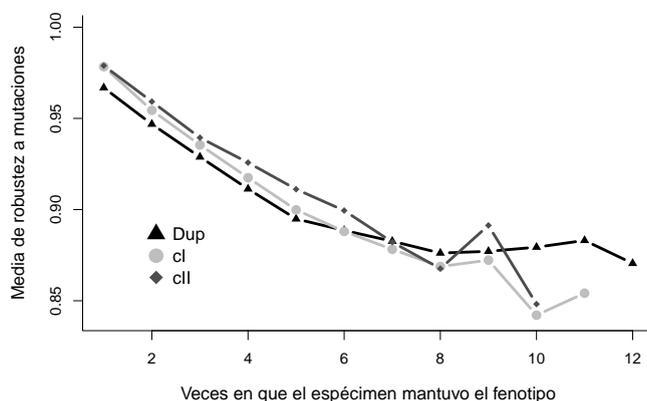


Figura 9: Los especímenes con un gen *de novo* que conservaron el fenotipo son más robustos a mutaciones que los especímenes con un gen duplicado, pero resisten menos veces la adición de un gen. Observamos en el eje vertical la robustez a mutaciones después de agregar un gen, y en el eje horizontal la fracción de especímenes que mantuvieron el fenotipo después de agregar un gen por espécimen.

capacidad de generar variación al comparar la diversidad fenotípica a la que un genotipo puede tener acceso a través de las mutaciones y de la adición de genes.

Además de las mutaciones existen otro tipo de perturbaciones de interés como los cambios en las condiciones ambientales. ¿Puede la duplicación mitigar los cambios ambientales? Otra competencia del modelo es que a través de él se puede encontrar el efecto en el fenotipo de las duplicaciones en redes de regulación genética cuando la condición inicial se desestabiliza.

A partir de un modelo matemático de Wagner (1994), se ha postulado que el tamaño de la fracción que se duplica de un genoma afecta la posibilidad de que un organismo sobreviva y tenga la capacidad de transmitir a sus descendientes esas duplicaciones. Wagner encuentra que el efecto de un evento de duplicación genética completa (de todo el genoma) es mínimo al mantener la proporción de genes intacta, mientras que un evento a pequeña escala genera perturbaciones en la red al alterar las proporciones de los genes. Esta hipótesis también podría estudiarse revisando si existen cambios en los efectos ya observados de la duplicación con el aumento de la cantidad de genes duplicados en la red.

Toll-Riera *et al.* (2016) publicaron un trabajo experimental realizado con la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. En el cual observaron que al dejar evolucionar cultivos de bacterias en diferentes medios que contenían dos clases de nutrientes, una que podían digerir pero en concentración limitada y una que no podían digerir pero en alta concentración. Se observó que para adaptarse y prosperar en sus medios estos organismos siguieron uno de dos caminos diferentes: a través de la mejora de funciones pre-existentes que permitiera un mayor aprovechamiento de los nutrientes

Cuadro 1: Robustez ante algún tipo de crecimiento y de la robustez a mutaciones después de agregar un gen.

Robustez a ...	Media	Desviación estándar
Duplicación	0.60	0.17
CI	0.43	0.19
CII	0.32	0.15
Robustez a mutaciones	Media	Desviación estándar
Antes	0.76	0.08
Robustez a mutaciones después de ...	Media	Desviación estándar
Duplicación	0.89	0.03
CI	0.91	0.04
CII	0.93	0.03

que ya digerían, o de la invención de nuevas funciones que permitieran hacer uso de los nutrientes que no podían digerir. Al secuenciar y estudiar el genoma de las bacterias que resultaron de estos procesos de evolución, encontraron que aquellas que se adaptaron a través de la innovación tenían un porcentaje de mutaciones en genes duplicados más alto de lo esperado por azar que aquellas que se adaptaron por el mejoramiento de funciones. Una de las perspectivas más importantes de este trabajo es simular este mismo experimento en el modelo que ya se tiene concretado. Esto podría ayudar a profundizar en los mecanismos gracias a los que las duplicaciones contribuyen a la evolución adaptativa, completar la idea de que los duplicados aumentan la resistencia a mutaciones y además son material para la generación de funciones nuevas.

Referencias

- Aharoni, A., Gaidukov, L., Khersonsky, O., Gould, S. M., Roodveldt, C., y Tawfik, D. S. (2005). The ‘evolvability’ of promiscuous protein functions. *Nature Genetics*, 37(1):73–76.
- Airoldi, C. A. y Davies, B. (2012). Gene duplication and the evolution of plant MADS-box transcription factors. *Journal of Genetics and Genomics*, 39(4):157–165.
- Ancel, L. W. y Fontana, W. (2000). Plasticity, evolvability and modularity in RNA. *Journal of Experimental Zoology*, 288(3):242–283.
- Azevedo, R. B. R., Lohaus, R., Srinivasan, S., Dang, K. K., y Burch, C. L. (2006). Sexual reproduction selects for robustness and negative epistasis in artificial gene networks. *Nature*, 440(7080):87–90.
- Blank, L. M., Kuepfer, L., y Sauer, U. (2005). Large-scale 13 C-flux analysis reveals mechanistic principles of metabolic network robustness to null mutations in yeast. *Genome Biology*, 6(6):R49.
- Bloom, J. D., Labthavikul, S. T., Otey, C. R., y Arnold, F. H. (2006). Protein stability promotes evolvability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(15):5869–5874.
- Bronson, G. J. (2000). *C++ para ingeniería y ciencias*. International Thomson,.
- Ciliberti, S., Martin, O. C., y Wagner, A. (2007). Robustness can evolve gradually in complex regulatory gene networks with varying topology. *PLoS Computational Biology*, 3(2):0164–0173.
- Conant, G. C. y Wagner, A. (2004). Duplicate genes and robustness to transient gene knock-downs in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271(1534):89–96.
- de Visser, J. A. G. M., Hermisson, J., Wagner, G. P., Meyers, L. A., Bagheri-Chaichian, H., Blanchard, J. L., Chao, L., Cheverud, J. M., Elena, S. F., Fontana, W., Gibson, G., Hansen, T. F., Krakauer, D., Lewontin, R. C., Ofria, C., Rice, S. H., von Dassow, G., Wagner, A., y Whitlock, M. C. (2003). Perspective: evolution and detection of genetic robustness. *Evolution*, 57(9):1959.
- Espinosa-Soto, C. (2016). Selection for distinct gene expression properties favours the evolution of mutational robustness in gene regulatory networks. *Journal of Evolutionary Biology*, 29(11):2321–2333.
- Fisher, R. a. (1928). The possible modification of the response of the wild type to recurrent mutations. *The American Naturalist*, 62(679):115.
- Force, A., Force, A., Lynch, M., Lynch, M., Postlethwait, J., y Postlethwait, J. (1999). Preservation of duplicate genes by subfunctionalization. *Genetics*, 151:1531–1545.

- Galassi, M. (2010). *GNU scientific library reference manual*. 3rd ed.^a edición.
- Gu, Z., Steinmetz, L. M., Gu, X., Scharfe, C., Davis, R. W., y Li, W. H. (2003). Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature*, 421(6918):60–63.
- He, X. y Zhang, J. (2005). Rapid subfunctionalization accompanied by prolonged and substantial neofunctionalization in duplicate gene evolution. *Genetics*, 169(2):1157–1164.
- Hecker M, Lambeck S, Töpfer S, van Someren E, G. R. (2009). Gene regulatory network inference: data integration in dynamic models—A review. *Biosystems*, 96(1):86–103.
- Innan, H. y Kondrashov, F. (2010). The evolution of gene duplications: Classifying and distinguishing between models. *Nature Reviews Genetics*, 11(2):97–108.
- Lehner, B. (2010). Genes confer similar robustness to environmental, stochastic, and genetic perturbations in yeast. *PLoS ONE*, 5(2):1–5.
- Lynch, M. y Conery, J. S. (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*, 290(5494):1151–1155.
- Meyer, J. R., Dobias, D. T., Weitz, J. S., Barrick, J. E., Quick, R. T., y Lenski, R. E. (2012). Repeatability and contingency in the evolution of a key innovation in phage lambda. *Science*, 335(6067):428–432.
- Ohno, S. (1970). *Evolution by gene duplication*. Springer Berlin Heidelberg, New York.
- R Core Team (2018). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rubin, G., Yandell, M., Wortman, J., Gabor, G., Nelson, C., y Hariharan, I. (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*, 287(5461):2204–2215.
- Sanjuán, R., Cuevas, J. M., Furió, V., Holmes, E. C., y Moya, A. (2007). Selection for robustness in mutagenized RNA viruses. *PLoS Genetics*, 3(6):0939–0946.
- Seoighe, C. y Wolfe, K. H. (1999). Yeast genome evolution in the post-genome era. *Current Opinion in Microbiology*, 2(5):548–554.
- Smith, A. A., Wyatt, K., Vacha, J., Vihtelic, T. S., Zigler, J. S., Wistow, G. J., y Posner, M. (2006). Gene duplication and separation of functions in α B-crystallin from zebrafish (*Danio rerio*). *FEBS Journal*, 273(3):481–490.
- Stoustrup, B. (1986). The C++ programming language. *Addison-Wesley, Reading, MA*.
- Sur, I. y Taipale, J. (2016). A computational genomics approach to the identification of gene networks. *Nat Reviews Cancer*, 25(18):3594–3604.

- Toll-Riera, M., San Millan, A., Wagner, A., y MacLean, R. C. (2016). The genomic basis of evolutionary innovation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genetics*, 12(5):1–21.
- van Nimwegen, E., Crutchfield, J. P., y Huynen, M. (1999). Neutral evolution of mutational robustness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(17):9716–9720.
- Waddington, C. H. (1957). *The strategy of the genes: a discussion of some aspects of theoretical Biology*. Macmillan, New York.
- Wagner, A. (1996). Does evolutionary plasticity evolve? *Evolution*, 50(3):1008.
- Wagner, A. (2001). The yeast protein interaction network evolves rapidly and contains few redundant duplicate genes. *Mol. Biol. Evol*, 18(7):1283–1292.
- Wagner, A. (2008). Neutralism and selectionism: A network-based reconciliation. *Nature Reviews Genetics*, 9(12):965–974.
- Zar, J. H. (1996). *Biostatistical analysis*. New Jersey, 4^a edición.
- Zhang, J. (2003). Evolution by gene duplication: an update. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(6):292–298.