

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL

**Estudo do processo adaptativo em
populações de *Escherichia coli***



João Miguel Barroso Batista

MESTRADO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA E DO DESENVOLVIMENTO

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL

**Estudo do processo adaptativo em
populações de *Escherichia coli***



João Miguel Barroso Batista

Dissertação para obtenção do grau de Mestre orientada por
Doutora Isabel Gordo, Instituto Gulbenkian de Ciência
Doutor Francisco Dionísio, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

MESTRADO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA E DO DESENVOLVIMENTO

2009

AGRADECIMENTOS

À Doutora Isabel Gordo, pelo delineamento experimental dos trabalhos efectuados e pela orientação deste projecto. Pela oportunidade dada, por todos os conhecimentos transmitidos e explicações fornecidas.

Ao Doutor Francisco Dionísio, por ter aceite co-orientar este projecto a partir da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e pela sua ajuda nas questões burocráticas.

À Doutora Margarida de Sousa, pela sua constante disponibilidade, interesse e auxílio prestado. Pelas técnicas ensinadas e discussões oportunas.

Ao restante Grupo de Biologia Evolutiva do IGC, Joana Antunes, Migla Miskinyte, Patrícia Brito e Sandra Trindade, pela partilha de conhecimentos práticos e teóricos e ajuda prestada.

Aos pais e irmão, pela atenção e apoio.

À Ana Carina Marcelino, pela ajuda na revisão da dissertação.

RESUMO

Embora a ocorrência dos fenómenos evolutivos nas populações seja um facto conhecido, existem ainda aspectos deste processo que são importantes clarificar, nomeadamente em relação ao modo como a adaptação decorre. Uma possível abordagem consiste no seu estudo em tempo real, através de experiências de evolução experimental com a bactéria *Escherichia coli*, de modo a investigar a evolução da *fitness* e os factores importantes neste processo.

Um dos objectivos deste trabalho pretende esclarecer de que forma o tamanho populacional efectivo influencia a adaptação de populações bacterianas ao meio. Para isso mediu-se a *fitness* relativa em ensaios de competição de populações adaptadas durante 2000 gerações com tamanhos populacionais efectivos distintos ($N_e = 2 \times 10^4$ e $N_e = 10^7$). Através da comparação das medições de *fitness* às 1000 e 2000 gerações para os dois tipos de populações foi possível concluir que ambas estavam adaptadas e que as diferentes médias de *fitness* identificadas correspondiam ao nível máximo de adaptação atingido, que era significativamente maior nas populações grandes que nas pequenas.

Outro objectivo consiste em tentar perceber de que forma os aumentos de *fitness* medidos em populações de *Escherichia coli* são sensíveis à alteração da forma da distribuição dos efeitos das mutações benéficas na *fitness* que surgem durante o processo adaptativo. Com recurso a simulações Monte-Carlo de evolução adaptativa de populações testaram-se diferentes combinações de parâmetros como a taxa de mutação benéfica, os seus efeitos na *fitness* e a forma da distribuição desses efeitos, comparando-se os dados gerados com os aumentos de *fitness* medidos experimentalmente. Os resultados demonstraram uma robustez dos dados práticos face à distribuição dos efeitos das mutações existentes na população, uma vez que nas diferentes distribuições as mutações de maior efeito assumidas como raras é que acabam por se fixar.

Por outro lado procura-se estudar os estágios iniciais da compensação para o custo na *fitness* associado a uma mutação que confere resistência ao antibiótico estreptomicina, em condições de elevado tamanho populacional e num meio estruturado. Assim, populações mutantes foram propagadas em meio sólido e sem antibiótico durante 200 gerações e através de ensaios de competição determinou-se uma percentagem de compensação média de 50%. Também foram estimados os efeitos das mutações compensatórias, com um efeito médio de 4% e uma distribuição dos efeitos na *fitness* compatível com uma distribuição do tipo Gama. Não foram identificados revertentes, indicando assim que a compensação é um processo rápido e que ocorre frequentemente nas populações.

PALAVRAS-CHAVE – Adaptação, Bactérias, Efectivo Populacional, Mutações Benéficas, Compensação, Meio Estruturado

ABSTRACT

Although occurrence of evolution is a well known fact, there are still some points about this process that are important to understand, like the way adaptation proceeds. As an approach to study adaptation, experimental evolution using *Escherichia coli* allows its observation in real time, in such a way that one can study fitness alterations and the several factors that influence this process.

One main goal of this work is to understand the impact that population size has during bacterial adaptation. To investigate this, populations with two different effective sizes ($N_e = 2,3 \times 10^4$ and $N_e = 10^7$) were propagated in liquid medium during 2000 generations and their mean fitness was measured using competition assays. Through comparison of population mean fitness at 1000 and 2000 generations it could be concluded that, although both groups were adapted, the mean fitness value achieved by the small populations was statistically lower than the one obtained for the large populations.

Another aim of this study is to investigate if the fitness increase observed after 1000 generations of *E. coli* adaptation is sensitive to changes in the shape of the distribution of fitness effects among beneficial mutations arising in populations during the adaptive process. In order to access this, Monte-Carlo simulations of adaptive evolution were performed, testing different parameters such as mutation rate of beneficial mutations, its mean fitness effect and shape of distribution of fitness effects. Simulation data was compared with the mean fitness increase measured in real populations. These results showed robustness of mean fitness measured in real populations, despite of the different distribution of fitness effects assumed.

A last point intends to study the compensation for the fitness cost associated with a mutation conferring resistance to the antibiotic streptomycin, occurring in mutant populations growing in a structured medium with a high effective size. Independent mutant populations were propagated during 200 generations in solid medium in the absence of antibiotic and the relative fitness of individual clones was measured through competition assays. A mean compensation of 50% to the cost of the mutation was calculated and the fitness effects of the first compensatory mutations arising in the populations were investigated. A distribution compatible with a gamma was observed, with a mean fitness effect of 4%. No streptomycin sensitive revertants were identified during the course of the experiment, implying that compensation is a rapid process that commonly occurs in populations.

KEYWORDS – Adaptations, Bacteria, Population Size, Beneficial Mutations, Compensation, Structured Medium

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
I. INTRODUÇÃO	1
1. Estudo da Adaptação.....	2
1.1. Modelos Teóricos de Adaptação.....	2
1.2. Adaptação em Evolução Experimental.....	5
1.2.1. Mutações na Adaptação.....	6
1.2.2. Fixação de Mutações Benéficas.....	7
1.3. Factores que Influenciam a Adaptação.....	8
1.3.1 Taxa de Mutação, Interações Genéticas e Nível de Adaptação.....	8
1.3.2. Tamanho Efectivo da População.....	9
1.3.3. Variabilidade Ambiental.....	11
1.4. Resistência a Antibióticos e Compensação.....	13
II. OBJECTIVOS	16
III. MATERIAL E MÉTODOS	19
1. Adaptação de Populações com Diferentes Efectivos Populacionais.....	20
1.1. Evolução das Populações.....	20
2.2. Medição da <i>Fitness</i> Média das Populações.....	20
2. Modelação e Simulação de Evolução de Populações.....	22
3. Compensação em Meio Estruturado.....	23
3.1. Evolução das Populações.....	23
3.2. Medição da <i>Fitness</i>	24
3.3. Identificação de Revertentes.....	25
IV. RESULTADOS	26
1. Adaptação de Populações com Diferentes Efectivos Populacionais.....	27
2. Modelação e Simulação de Evolução de Populações.....	31
3. Compensação em Meio Estruturado.....	33

V. DISCUSSÃO	35
1. Adaptação de Populações com Diferentes Efectivos Populacionais	36
2. Modelação e Simulação de Evolução de Populações	40
3. Compensação em Meio Estruturado	42
VI. CONCLUSÃO	45
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo geométrico de Fisher⁵

Figura 2 – Localização do alelo selvagem e mutações benéficas numa distribuição de *fitness*¹

Figura 3 – Domínios de atracção da distribuição de valor extremo: (A) Gumbel e Fréchet; (B) Weibull³

Figura 4 – *Fitness landscapes* e dinâmicas adaptativas das populações⁷

Figura 5 – Fixação de mutações em populações de pequeno (A) e grande (B) efectivo populacional⁴

Figura 6 – Processo adaptativo em populações de elevado (A) e reduzido efectivo populacional (B)⁴

Figura 7 – Radiação adaptativa em *Pseudomonas fluorescens*⁶

Figura 8 – Resistência aos antibióticos em bactéria: interacções entre sensíveis (AbS), resistentes (AbR) e compensados (AbR⁺)²

Figura 9 – Evolução da *fitness* média das populações pequenas ($N_e=2,3 \times 10^4$) e grandes ($N_e=10^7$) até às 2000 gerações

Figura 10 - *Fitness* das populações S individuais até às 2000 gerações

Figura 11 - *Fitness* das populações L individuais até às 2000 gerações

Figura 12- Diferentes distribuições do tipo Gama obtidas por alteração do parâmetro α . A - forma de "L"; B - exponencial; C – normal muito enviesada e D – normal menos enviesada

Figura 13 - Combinações de valores de U_b e $E(s_b)$ compatíveis com os dados práticos, agrupadas segundo o parâmetro α da distribuição gama: 0,5 (A); 1 (B); 2 (C) e 5 (D)

Figura 14 – Conjunto de parâmetros que geram dados teóricos compatíveis com a *fitness* das populações S às 1000 gerações

Figura 15 – Coeficientes de selecção do ancestral e dos clones das 25 populações propagadas em meio sólido

Figura 16 – Percentagem de compensação para o custo associado à mutação que confere resistência à estreptomicina

Figura 17 – Distribuição dos efeitos das mutações compensatórias

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - *Fitness* médias das populações S ($N_e=2,3 \times 10^4$) às 1000 e às 2000 gerações

Tabela 2 – *Fitness* médias das populações L ($N_e=10^7$) às 1000 e às 2000 gerações

Tabela 3 - Teste U de Mann-Whitney para as diferenças de *fitness* entre as 1000 e 2000 gerações de adaptação de cada população pequena (S)

Tabela 4 - Teste U de Mann-Whitney para as diferenças de *fitness* entre as 1000 e 2000 gerações de adaptação de cada população grande (L)

Tabela 5 - Teste t de Student para comparar as médias das populações S e L em cada ponto temporal (1000 e 2000 gerações)

Tabela 6 – Teste t de Student para comparar as médias às 1000 e 2000 gerações em cada tamanho populacional (S e L)

Tabela 7 - ANOVA para testar o efeito dos factores tamanho e tempo na *fitness* média das populações

Tabela 8 – Estatísticas descritivas para as populações S e L às 1000 e 2000 gerações

I. INTRODUÇÃO

1 ESTUDO DA ADAPTAÇÃO

A adaptação pode ser definida como a modificação genética de uma população em direcção a um fenótipo que melhor se adequa ao ambiente presente¹, traduzindo-se assim num aumento de *fitness* de uma população até ao seu óptimo. Embora a *fitness* possa ser descrita de várias formas, o conceito essencial tem a ver com a capacidade de um organismo, população ou espécie sobreviver e se reproduzir no ambiente em que encontra⁸. Uma vez que as diferenças de *fitness* entre organismos são necessárias à actuação da selecção natural e conseqüente ocorrência de adaptação, o estudo da *fitness* e dos factores que a influenciam é importante no estudo do processo adaptativo. Assim, de modo a tentar responder às inúmeras questões existentes acerca deste processo têm sido seguidas abordagens teóricas e experimentais, cujas conclusões combinadas ajudam a compreender algumas partes destes fenómenos complexos.

1.1 MODELOS TEÓRICOS DE ADAPTAÇÃO

A fim de tentar perceber e prever os mecanismos genéticos da adaptação têm sido desenvolvidos e modificados modelos teóricos com diferentes graus de complexidade e assumindo vários pressupostos. Um dos primeiros e mais simples é o modelo geométrico de Fisher (Figura 1), no qual a adaptação se deve à fixação de mutações com efeitos variáveis no fenótipo do indivíduo⁹. Neste modelo as populações podem ser representadas como pontos num gráfico cartesiano, em que cada eixo corresponde a uma característica fenotípica e as mutações aparecem como vectores com diferentes magnitude e direcção no espaço fenotípico⁵. Assim, os organismos compreendem um conjunto de caracteres fenotípicos com um valor óptimo num dado ambiente, que quando é alterado leva ao deslocamento da população para um ponto não óptimo.

De modo a atingirem novamente um óptimo de *fitness*, as populações têm que se movimentar no espaço fenotípico, através de mutações estocásticas, assumindo que o óptimo se mantém fixo e que a variabilidade genética é introduzida apenas por mutações¹⁰. Uma vez que estas mutações são aleatórias, tanto podem levar a uma aproximação como a um afastamento do pico de *fitness*, caracterizando-se assim como benéficas ou deletérias, respectivamente. Por outro lado as mutações têm diferentes efeitos fenotípicos, pelo que levam a deslocamentos com diferentes magnitudes. Outro ponto defendido pelo modelo consiste na existência de pleiotropia, pelo

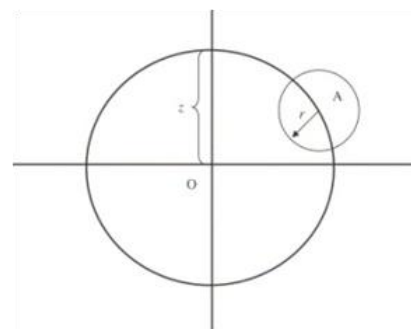


Figura 1 - Modelo geométrico de Fisher⁵

que uma mutação que melhorasse um carácter fenotípico podia ter um efeito deletério noutra¹. Algumas conclusões retiradas deste modelo relacionam-se com a maior probabilidade das mutações de menor efeito na *fitness* serem benéficas e com a distribuição quase exponencial dos efeitos das mutações fixadas durante um período de adaptação. Também se concluiu que o tamanho médio das mutações fixadas diminuía a cada passo do processo adaptativo e que esta diminuição seguia uma sequência geométrica (mutações de maior efeito tendem a ser substituídas primeiro)¹⁰.

Outros modelos mais complexos baseiam-se nas sequências nucleotídicas ou de proteínas em vez dos caracteres fenotípicos, em que a adaptação ocorre num espaço de sequências discreto, ou seja, através de séries de sequências relacionadas⁸. Exemplos deste tipo são o modelo de Maynard Smith e o modelo NK, em que as variações de *fitness* nos vários alelos são representadas numa *fitness landscape*, com vários óptimos locais. Uma variação do modelo de Smith, desenvolvida por Gillespie e denominado modelo da *mutational landscape* assume que ocorrem principalmente substituições de sequências já com *fitness* elevado (selvagem), pelo que a adaptação evolutiva se processa apenas entre os poucos alelos com elevado *fitness* num dado *locus* ou genoma, ou seja na cauda direita de uma distribuição da *fitness* nos vários alelos⁵ (Figura 2).

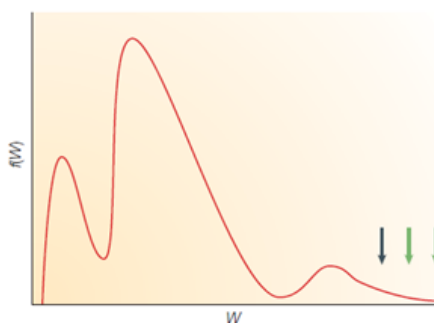


Figura 2 – Localização do alelo selvagem e mutações benéficas numa distribuição de *fitness*¹

Este facto permitiu a incorporação da Teoria de Valor Extremo no estudo da adaptação, uma vez que esta teoria se foca nas caudas de distribuição de probabilidades de modo a estudar eventos raros. Assim, embora a forma da distribuição da *fitness* num gene seja geralmente desconhecida, assume-se que tanto o alelo selvagem como as mutações benéficas se localizam na cauda direita dessa distribuição. Uma vez que diferentes tipos de distribuições possuem caudas com propriedades comuns, apresentando grande robustez relativamente aos detalhes da distribuição, é possível estabelecer previsões válidas acerca da adaptação, que são independentes da maioria dos detalhes biológicos³.

Existem três diferentes domínios de atracção de distribuição de valor extremo: a distribuição de Fréchet, de Weibull e de Gumbel (Figura 3). A distribuição do tipo Fréchet tem uma forma de L, estando presentes “caudas pesadas” e menor frequência de valores intermédios de *fitness* e a distribuição de Weibull apresenta a cauda direita truncada. Devido às suas características, os domínios de distribuição de Fréchet e Weibull são considerados biologicamente pouco naturais, pelo que se assume que a distribuição dos efeitos das mutações pertence ao domínio de Gumbel³.

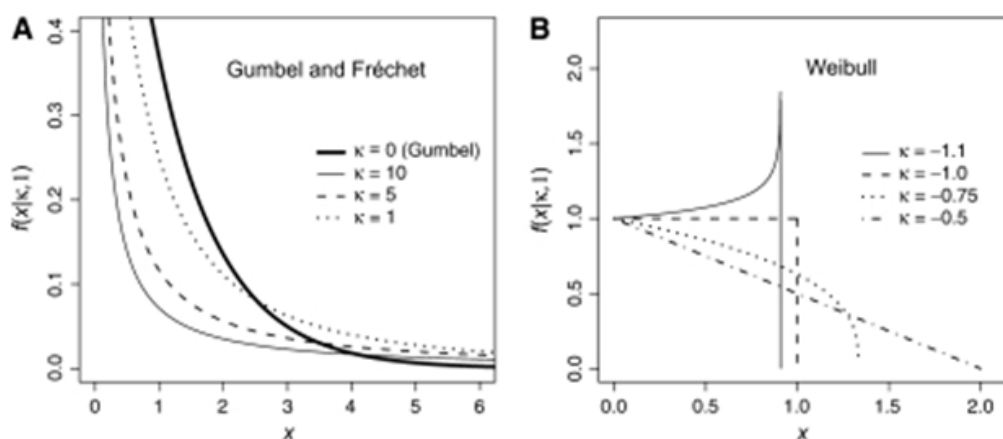


Figura 3 – Domínios de atracção da distribuição de valor extremo: (A) Gumbel e Fréchet; (B) Weibull³

Esta última é a mais regular e compreende várias outras distribuições comuns, tais como a normal, lognormal, exponencial e gama, entre outras. Assumindo uma distribuição do tipo Gumbel para os efeitos da *fitness*, espera-se que a distribuição dos efeitos das mutações benéficas seja aproximadamente exponencial, com grande ocorrência de mutações de pequeno efeito e mutações de grande efeito a aparecer em baixa frequência.

Curiosamente, apesar das diferenças entre os modelos de Gillespie e Fisher, foram já realizados trabalhos que forneceram algum suporte teórico de que em ambos os modelos se encontra uma distribuição do tipo Gumbel para os efeitos das mutações^{5,11,12}. No modelo de Gillespie assume-se uma distribuição exponencial para os efeitos das mutações na *fitness*¹³, pressuposto teórico que é suportado por alguns trabalhos práticos¹⁴⁻¹⁷. No entanto esta inferência não é sempre verificada, uma vez que num trabalho recente em que se estudou a evolução da resistência a um antibióticos em *Pseudomonas aeruginosa*, concluiu-se que a distribuição dos efeitos das mutações benéficas na *fitness* varia consoante a *fitness* dos indivíduos selvagens, estando de acordo com uma distribuição exponencial quando a *fitness* era moderada ou elevada e incompatível quando era reduzida¹⁸.

1.2 ADAPTAÇÃO EM EVOLUÇÃO EXPERIMENTAL

Para além de estudos teóricos nos modelos de adaptação têm sido desenvolvidos trabalhos práticos na área de evolução experimental que visam analisar o processo adaptativo à medida que este decorre, permitindo assim observar-se a evolução da *fitness* em tempo real.^{6,19-21} Contudo a medição das diferenças de *fitness* entre grupos de indivíduos nem sempre é fácil, já que muitas vezes não existe um carácter mensurável do organismo que seja representativo da *fitness* total.

Uma vez que nem todos os organismos são passíveis de ser utilizados em evolução experimental devido aos seus constrangimentos biológicos, a utilização de microrganismos representa uma ferramenta útil neste tipo de estudos. Nos microrganismos a taxa de crescimento é um bom indicador da *fitness* média de uma população, pelo que é possível medir facilmente as diferenças de *fitness* entre populações quer através da determinação das curvas de crescimento, quer através da competição com uma estirpe de referência, nos chamados ensaios de competição. Neste último caso, medem-se as taxas de crescimento enquanto ambos os grupos competem pelos mesmos recursos, recorrendo-se ao uso de marcadores neutrais para os distinguir⁷. No caso de experiências com bactérias, marcadores mais comuns incluem resistência a um determinado antibiótico²², resistência a bacteriófagos²³, coloração diferencial das colónias²⁴, emissão de fluorescência²⁵ ou marcação com uma sequência específica de DNA²⁶. Assim, a utilização de microrganismos em estudos de evolução experimental possui várias vantagens que provêm de características tais como a facilidade de manutenção e manipulação, o curto tempo de geração e a obtenção de grande número de populações, a possibilidade de guardar e recuperar populações em diferentes estádios de adaptação e a abundante informação genética e molecular existente⁷. Alguns exemplos da utilização de microrganismos em trabalhos de evolução experimental incluem o estudo da evolução do sexo em fungos²⁷ ou as dinâmicas adaptativas em vírus²⁸ e bactérias²⁴.

Nos estudos da adaptação em bactérias como a *Escherichia coli*, populações independentes de microrganismos são mantidas num ambiente controlado durante um número variável de gerações, realizando-se amostragens periódicas das populações ao longo do processo, de modo a monitorizar a sua evolução. Uma vez que estas populações derivam de uma única população ancestral geralmente clonal, é possível observar-se a adaptação em tempo real à medida que se procede à propagação das populações num ambiente ao qual não se encontram previamente adaptadas, quer identificando as mutações benéficas que vão surgindo, quer através do estudo dos aumentos de *fitness* associados⁷.

1.2.1 Mutações na Adaptação

Deste modo, a adaptação processa-se através da fixação de mutações vantajosas que surgem ao longo do tempo, aumentando a *fitness* dos indivíduos. Metaforicamente este percurso pode ser representado numa *fitness landscape* como uma escalada das populações de locais de menor *fitness* (vales) para locais em que a população se encontra adaptada (picos)²⁹ (Figura 4). No entanto o modo exacto como este processo ocorre ou os mecanismos envolvidos não são ainda totalmente

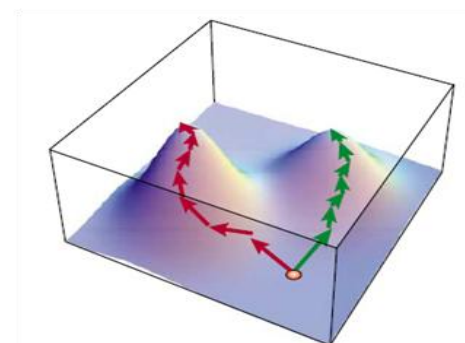


Figura 4 – *Fitness landscapes* e dinâmicas adaptativas das populações⁷

conhecidos. Assim, é possível colocar diversas questões relacionadas com a fonte de variação (novas mutações ou variabilidade existente), extensão dos efeitos das mutações e a sua distribuição, alterações de *fitness* ao longo da evolução e taxas de adaptação¹. Por conseguinte, uma das abordagens no estudo do processo adaptativo é a análise das mutações que surgem no decurso da evolução, principalmente o das mutações vantajosas, uma vez que desempenham um papel central na adaptação a novos ambientes³⁰.

Para o estudo das mutações deletérias têm sido realizadas experiências de acumulação de mutações, nas quais as populações são mantidas com um número muito reduzido de indivíduos recorrendo a *bottlenecks* severos (de um indivíduo)³¹. Para além deste tipo clássico de experiências, é também possível calcular a taxa de mutações deletérias através da análise comparativa de dados moleculares³². Embora sujeita a variações, dependendo das características ou espécies dos microrganismos estudados, dados conjuntos destas duas técnicas permitem estimar uma taxa de mutações deletérias em redor dos 10^{-3} mutações por genoma por geração para bactérias. Embora esta taxa estimada seja relativamente elevada, as mutações deletérias são geralmente eliminadas da população por efeito da selecção natural.

Por outro lado as mutações benéficas ocorrem a uma taxa menor e a maior parte possui uma vantagem muito pequena, sendo por isso difíceis de detectar, pelo que o seu estudo nem sempre é fácil¹². No entanto, utilizando um sistema em que se recorreu a um microssatélite como marcador em *E. coli* foi possível estimar uma taxa de mutações benéficas na ordem de 10^{-5} mutações por genoma por geração³⁰.

1.2.2 Fixação de Mutações Benéficas

No entanto nem todas as mutações benéficas que surgem se fixam, uma vez que há diversos factores que condicionam a sua fixação. Dado que a fixação de uma mutação benéfica depende directamente da amplitude do seu efeito na *fitness*, as mutações de pequeno efeito têm maior probabilidade de ser perdidas por vários fenómenos. Um deles é a deriva genética, em que flutuações aleatórias nas frequências levam à perda estocástica de mutações³³. Uma vez que o aumento de frequência das mutações na população é tanto mais rápido quanto maior a sua vantagem selectiva, mutações de pequeno efeito na *fitness* têm menor probabilidade de aumentar de frequência e por isso são mais facilmente extintas por acção da deriva genética⁷.

Outro mecanismo que leva à perda de mutações benéficas de pequeno efeito denomina-se interferência clonal e está relacionado com a competição entre diferentes mutações que ocorrem em diferentes linhagens (Figura 5). Neste processo, a ausência de recombinação leva a que duas mutações que surgem em duas células diferentes não possam ser combinadas, pelo que os seus portadores competem entre si²⁶, o que resulta num aumento de frequência na população das mutações de maior efeito na *fitness* e uma diminuição das de menor. Trabalhos teóricos com base no fenómeno da interferência clonal permitiram a construção de um modelo³⁴ que prevê várias consequências deste fenómeno na adaptação como: a remoção da população de pequenas mutações que escapam à deriva genética, ocorrendo fixação de mutações com maior efeito na *fitness*; o aumento do tempo de fixação das mutações benéficas; a substituição de mutações de forma ordenada (primeiro ocorre substituição de mutações de maior efeito na *fitness* e posteriormente de mutações de menor efeito); a ocorrência de adaptação (aumentos de *fitness*) até um máximo, com diminuição da taxa de adaptação à medida que se aproxima desse nível³⁵.

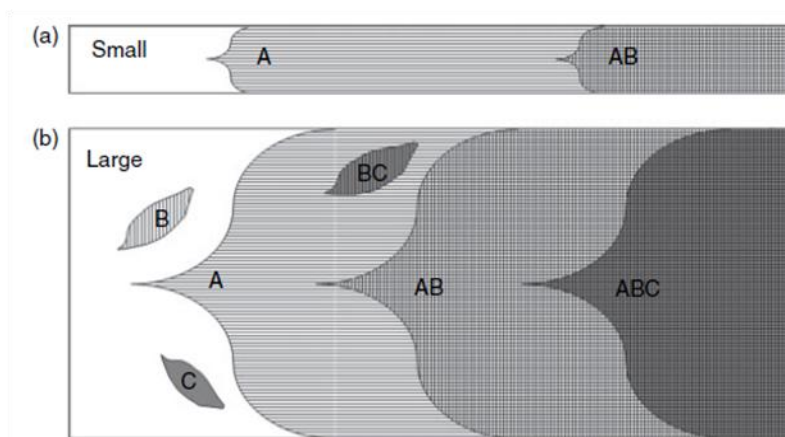


Figura 5 – Fixação de mutações em populações de pequeno (A) e grande (B) efectivo populacional⁴

Tanto a deriva genética como a interferência clonal têm diferentes pesos na extinção de mutações vantajosas de pequeno efeito consoante os efectivos populacionais considerados. Se por um lado a deriva genética é menos relevante em populações grandes, por outro a interferência clonal tem um papel mais preponderante neste tipo de populações³⁰.

Para além da deriva genética e da interferência clonal, também a ocorrência de múltiplas mutações influencia o tipo de mutações que se fixa numa população³⁶. Este fenómeno acontece principalmente em populações com elevado efectivo populacional e ocorre quando os efeitos somados de duas mutações que surjam no mesmo genótipo predominam sobre outra mutação de maior efeito, mesmo que individualmente as mutações tenham menor vantagem selectiva que esta última. Deste modo, uma mutação de pequeno efeito que surja primeiro pode não se extinguir face a outra de maior efeito que surja posteriormente se ocorrer outra mutação no mesmo *background* da primeira de tal forma que a soma dos seus efeitos na *fitness* seja maior que a mutação de maior efeito na *fitness*. Este efeito provoca assim um enviesamento na fixação das mutações benéficas, a favor das mutações de pequeno efeito na *fitness*, ao contrário do efectuado pela deriva genética e interferência clonal.

1.3 FACTORES QUE INFLUENCIAM A ADAPTAÇÃO

Em termos gerais os aumentos de *fitness* derivados da substituição de mutações benéficas são mais rápidos em estágios iniciais do processo adaptativo mas tendem a sofrer uma desaceleração à medida que a população se aproxima de um pico de *fitness*^{7,20,21,24}. No entanto a taxa a que a adaptação se processa bem como a dinâmica adaptativa da população são influenciadas por diversos factores que se inter-relacionam, como a taxa de mutação, a *fitness* inicial da população, as interacções genéticas entre organismos, o tamanho da população ou a variabilidade ambiental³⁷.

1.3.1 Taxa de Mutação, Interacções Genéticas e Nível de Adaptação

O aumento da taxa de mutação tanto implica uma maior disponibilidade de mutações benéficas como um aumento das mutações deletérias, pelo que apenas acelera a adaptação quando as mutações benéficas não surgem na população frequentemente, ocorrendo interferência clonal quando sucede o contrário (maior frequência de mutações benéficas)³⁸.

As interacções genéticas entre organismos consistem em relações pleiotrópicas ou epistáticas. Nas primeiras, a adaptação a um dado ambiente restringe o potencial adaptativo

(adaptabilidade) dos organismos, verificando-se assim um *trade-off* entre o aumento de *fitness* num nicho específico e a capacidade de diversificação³⁹. Por seu turno a epistasia, mais concretamente a epistasia antagónica, leva a que múltiplas mutações benéficas presentes no mesmo genótipo tenham um efeito combinado na *fitness* menor do que a soma dos efeitos das mesmas mutações em genótipos independentes, implicando assim uma menor taxa adaptativa⁴⁰.

Por seu turno o nível inicial de adaptação dos indivíduos também influencia a taxa de adaptação, na medida em que nas populações com baixa *fitness* inicial, as mutações que ocorrem têm maior probabilidade de aumentar a *fitness* comparando com populações já adaptadas. Adicionalmente, espera-se que por acção da interferência clonal, mutações de maior efeito na *fitness* sejam substituídas em estágios iniciais, pelo que populações adaptadas tendem a fixar mutações de pequeno efeito na *fitness*³⁸.

1.3.2 Tamanho Efectivo da População

O tamanho populacional é um factor importante no estudo do processo adaptativo, uma vez que promove o aumento tanto da frequência como do tamanho dos efeitos na *fitness* das mutações benéficas fixadas no decurso da evolução, pelo que é esperado que populações com diferentes efectivos populacionais possuam diferentes dinâmicas adaptativas. Por conseguinte, populações com um grande número de indivíduos têm maior disponibilidade de mutações benéficas por geração e devido ao efeito da interferência clonal, mutações de maior efeito na *fitness* são fixadas, levando a aumentos de *fitness* mais rápidos, reflectindo uma maior taxa de adaptação. Por outro lado, quando o tamanho efectivo da população é pequeno, as mutações benéficas são menos frequentes e mutações mais abundantes (de pequeno efeito) levam a que os aumentos de *fitness* sejam menores e a uma taxa adaptativa inferior à das populações grandes³⁷.

Existem já alguns trabalhos práticos em bactérias e vírus que reforçam estes pressupostos. Num estudo com o vírus de RNA da estomatite vesicular³⁵, populações com três efectivos populacionais diferentes ($N_e = 9 \times 10^2$, 6×10^5 e 3×10^7) foram evoluídas durante 500 gerações, obtendo-se resultados que revelaram um forte efeito do tamanho populacional na *fitness* dos organismos, verificando-se um aumento da taxa de adaptação com o aumento do tamanho populacional.

Noutro trabalho testou-se a recuperação da *fitness* previamente reduzida por acumulação de mutações deletérias, através da adaptação de populações virais sujeitas a *bottlenecks* de diferente amplitude (10, 33, 100, 333, 1000, 2500 e 10000 indivíduos)²⁸, encontrando-se uma correlação positiva entre o tamanho da população e a extensão dos incrementos de

fitness, implicando que em populações mais pequenas as mutações fixadas são maioritariamente de menor efeito.

Num estudo recente, populações de *E. coli* com pequeno ($N_e = 2,3 \times 10^4$) e grande (10^7) efectivo populacional foram propagadas independentemente e nas mesmas condições durante 1000 gerações em meio rico LB³⁰. Os resultados demonstraram uma diferença significativa entre os valores de *fitness* atingidos por estes dois tipos de populações, consistindo num aumento de *fitness* face ao ancestral de 17% para as pequenas populações e 40% para as grandes, verificando-se também uma maior variância nos valores de *fitness* atingidos pelas primeiras do que das últimas. Também estes resultados são consistentes com uma menor taxa adaptativa em populações com menor efectivo populacional, dado que nestas populações há incorporação principalmente de mutações benéficas de pequeno efeito, ao contrário das populações grandes em que as mutações incorporadas têm maior efeito na *fitness*.

No entanto um aspecto ainda pouco estudado em termos práticos é o limite da adaptação consoante o efectivo populacional, ou seja, o valor máximo de *fitness* alcançado pelas populações quando estas se encontram adaptadas (num pico). Uma vez que a *fitness* das populações não aumenta indefinidamente, espera-se que as populações de maior efectivo populacional atinjam um valor máximo de *fitness* mais rapidamente que as populações pequenas, dada a diferença a nível da extensão das mutações benéficas incorporadas. No entanto a ocorrência de relações epistáticas entre as diferentes mutações que afectam a *fitness* dos indivíduos é um factor que é importante considerar, pelo que é possível que populações com diferentes efectivos populacionais, como fixam mutações com efeitos diferentes, sigam trajectórias evolutivas suficientemente divergentes para atingirem níveis de *fitness* distintos. Segundo uma teoria⁴¹, como as populações grandes incorporam sempre as mutações de maior efeito de forma quase determinística, ascendem rapidamente a um pico de *fitness* embora este possa não ser o nível máximo possível. Por seu turno as populações pequenas, incorporam mutações benéficas de diferentes efeitos na *fitness*, seguindo assim trajectórias adaptativas mais estocásticas, pelo que é possível que atinjam picos de *fitness* diferentes das populações grandes (Figura 6).

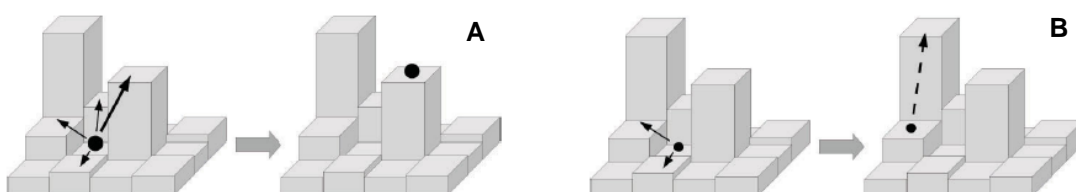


Figura 6 – Processo adaptativo em populações de elevado (A) e reduzido efectivo populacional (B)⁴

Num trabalho prático recente⁴¹ que parece suportar esta teoria, algumas populações de *E. coli* com baixo efectivo populacional ($N_e = 5 \times 10^5$) mostraram maior aumento de *fitness* ao fim de 500 gerações de adaptação em meio rico LB do que a totalidade das populações de elevado efectivo populacional ($N_e = 2,5 \times 10^7$), embora tenha sido verificada uma menor taxa adaptativa nos estágios iniciais. Também foi verificado maior variância nas populações pequenas que nas grandes, de acordo com o carácter mais aleatórias dos percursos evolutivos seguidos. No entanto este trabalho parece contradizer estudos realizados em vírus³⁵ e bactérias³⁰, em que os valores de *fitness* determinados para populações de elevado efectivo populacional são consistentemente superiores aos encontrados em populações mais pequenas. Dados os resultados diversos e nem sempre directamente comparáveis, parecem ser necessários mais estudos de adaptação a longo termo em populações com diferentes tamanhos populacionais de modo a clarificar o impacto do efectivo populacional na adaptação dos organismos ao meio.

1.3.3 Variabilidade Ambiental

Outro factor com peso no processo adaptativo é a variabilidade ambiental. Na maior parte das experiências de adaptação em evolução experimental tenta-se geralmente manter um ambiente controlado, cujas condições não sofram alterações durante o decurso da experiência, de modo a excluir variabilidade ambiental na adaptação dos organismos. Deste modo, os microrganismos são mantidos a uma temperatura específica (geralmente a óptima), num meio líquido, de composição conhecida ou pelo menos sempre idêntica, e com agitação. Este último elemento é importante na manutenção de um ambiente homogéneo, uma vez que minimiza as diferenças que poderiam existir no acesso dos indivíduos a nutrientes e oxigénio presentes no meio e promove a competição entre todos organismos de forma uniforme. Exemplos de meios líquidos correntemente utilizados são o meio mínimo de Davis (uma solução de sais suplementado com um açúcar, geralmente glucose)¹⁹ e o meio rico LB (cuja composição inclui péptidos, vitaminas, sais minerais e compostos orgânicos)⁴².

No entanto em condições naturais o meio ambiente é muitas vezes alterado tanto pela actividade dos próprios organismos como por características do meio ambiente, que podem também ser introduzidos em experiências de adaptação. Um exemplo é a coevolução antagónica de genótipos distintos que coexistem num dado ambiente alterado pela produção de metabolitos por um genótipo e subsequente utilização desses metabolitos por outro, num polimorfismo balanceado⁴³.

Também a ocorrência de estrutura no meio em que os organismos se encontram é um caso de variabilidade ambiental uma vez que introduz heterogeneidade espacial. Uma consequência deste tipo de heterogeneidade relaciona-se com a introdução de diferentes

nichos ecológicos que podem ser ocupados por genótipos especializados⁴⁴. Um exemplo clássico deste tipo de especialização consiste nas experiências de radiação adaptativa com *Pseudomonas fluorescens*, em que surgem na população diferentes morfologias com diferentes preferências de nichos⁶ (Figura 7).

Outra consequência da estrutura relaciona-se com a subdivisão da população, com formação de pequenas subpopulações mais ou menos independentes, o que tem consequências a nível da adaptação. Por um lado a

fragmentação da população traduz-se na formação de subpopulações com um efectivo populacional reduzido, mais afectadas pelo efeito da deriva genética e que incorporam de mutações benéficas de menor efeito na *fitness*, relativamente a uma população com maior efectivo populacional¹. Devido a estes elementos, espera-se assim que a fragmentação da população leve ao aparecimento e manutenção de maior diversidade, promovendo a ocorrência de radiação adaptativa. De acordo com esta teoria, num trabalho prático recente foi demonstrada a diversificação a nível do catabolismo de diferentes fontes de carbono dentro de uma mesma população adaptada durante 900 gerações a um meio estruturado (sólido)⁴⁴. Por outro lado, uma vez que a competição é feita a nível local, com interações entre indivíduos limitadas no espaço, a fixação de mutações benéficas a nível populacional é retardada, pelo que a taxa de fixação vai ser menor relativamente a populações sem estrutura⁴⁵. Como a expansão e invasão da população pelos indivíduos com mutações benéficas de maior efeito é feita mais lentamente, indivíduos portadores de mutações de pequeno efeito subsistem na população, podendo ocorrer a coexistência temporária de diferentes mutantes⁴⁶. Num trabalho prático recente, medições de *fitness* em populações propagadas em diferentes ambientes (meio estruturado, meio estruturado com destruição diária da estrutura e meio homogéneo) mostraram que as populações que eram misturadas antes de cada passagem em meio sólido apresentavam maiores taxas de adaptação comparativamente àquelas em que se mantinha a estrutura⁴⁴. No entanto estes resultados não são compatíveis com os dados obtidos em trabalhos práticos e teóricos^{47,48}, em que a menor taxa de adaptação verificada em populações com destruição periódica da estrutura podia ser explicada pela perda estocástica, por acção da deriva genética, de mutações benéficas colocadas em baixa frequência na população, quando dispersas devido à destruição da estrutura. Por outro lado, no caso do meio homogéneo ou do meio estruturado a deriva genética exercia um menor impacto, possibilitando o aumento de frequência na população das mutações benéficas. Com base nestes trabalhos prevê-se também um

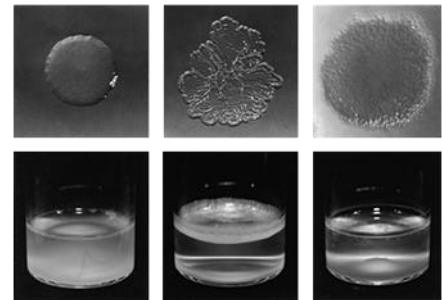


Figura 7 – Radiação adaptativa em *Pseudomonas fluorescens*⁶

aumento no efeito médio das mutações fixadas, decorrente do efeito da interferência clonal. Dado que o conjunto dos dados empíricos e teóricos disponíveis não parecem consistentes, mais estudos práticos são necessários de forma a clarificar o papel da estrutura na adaptação dos organismos.

1.4 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS E COMPENSAÇÃO

No estudo da adaptação em evolução experimental é comum propagarem-se microrganismos num meio ao qual não se encontravam anteriormente adaptados, por forma a seguir e medir os aumentos de *fitness*. No entanto outra abordagem corrente consiste na introdução de uma maladaptação em populações anteriormente adaptadas a um dado ambiente, diminuindo a sua *fitness* média, de modo a ser possível estudar a recuperação de *fitness* que ocorre durante a sua propagação nesse mesmo ambiente. Um exemplo desta abordagem relaciona-se com o estudo dos aumentos de *fitness* que ocorrem durante a compensação para a resistência a um antibiótico.

As resistências a antibióticos são devidas a diferentes tipos de mutações que ocorrem no genoma de bactérias anteriormente sensíveis. Estas mutações resultam geralmente em alterações a nível do ribossoma, DNA girase, RNA polimerase ou da parede celular, incorrendo num custo na *fitness* dos indivíduos, o que se reflecte numa taxa de crescimento e virulência reduzidas⁴⁹. Assim, embora obviamente vantajosas num meio onde está presente o antibiótico, na ausência deste as mutações têm um carácter deletério, levando a uma desvantagem dos indivíduos que as possuem face à restante população sensível.

No entanto, quando propagados em meio com ou sem o agente selectivo, as populações resistentes ao antibiótico tendem a acumular mutações que atenuam o custo na *fitness* provocado pela mutação, mantendo no entanto a resistência ao antibiótico, num processo denominado compensação⁵⁰. Estas mutações compensatórias caracterizam-se por terem um efeito benéfico no genoma em que está presente a mutação que confere a resistência ao antibiótico mas neutro ou deletério quando esta está ausente. Outra possibilidade é a ocorrência de uma mutação reversa, em que há recuperação do genótipo selvagem e consequentemente da *fitness* original dos indivíduos, retornando novamente ao fenótipo sensível² (Figura 8). O estudo da resistência

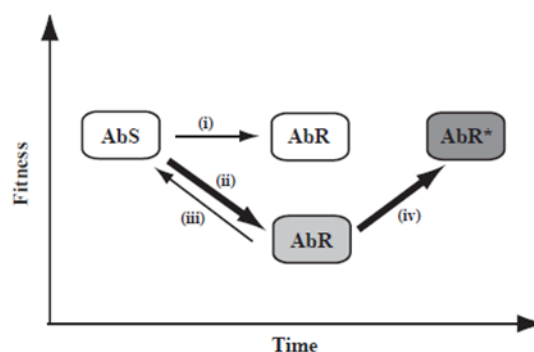


Figura 8 – Resistência aos antibióticos em bactéria: interações entre sensíveis (AbS), resistentes (AbR) e compensados (AbR⁺)²

aos antibióticos e da compensação genética para o custo da resistência apresenta-se assim relevante, uma vez que tem implicações a nível da saúde humana. Dados os problemas actuais relacionados com a ocorrência e persistência de estirpes multirresistentes é importante perceber quais os mecanismos genéticos envolvidos na resistência aos antibióticos e de que forma os microrganismos ultrapassam o custo derivado da resistência num contexto adaptativo.

Um dos mecanismos de resistência mais estudado é o da estreptomicina, um aminoglicósido inibidor da síntese protéica que se liga ao ribossoma. Efeitos descritos deste antibiótico incluem a inibição da síntese protéica durante a tradução e a indução de erros de leitura do código genético⁵¹. A resistência a este antibiótico pode ser causada por mutações a nível do gene *rpsL*, rRNA 16S ou por expressão de enzimas que modificam os aminoglicósidos. Mutações no gene *rpsL* levam a modificações da proteína S12 da subunidade 30S do ribossoma, impedindo a ligação da estreptomicina neste local⁴⁹. Estes mutantes dividem-se em dois tipos fenotípicos, consoante a capacidade de crescer ou não na ausência de estreptomicina, respectivamente estreptomicina resistente (Sm^r) ou dependente (Sm^d)⁵². Por outro lado os mutantes podem também ser classificados quanto à fidelidade de tradução apresentada, podendo ser normal (não restritivos) ou aumentada (restritivos). Alterações nas propriedades cinéticas da interacção entre tRNA e ribossoma dos mutantes restritivos levam a que estes possuam uma maior capacidade de detecção de erros, o que se reflecte numa maior fidelidade transducional e numa menor taxa de alongamento durante a tradução^{49,51}.

Uma das mutações restritivas que ocorre no gene *rpsL* é a K43N, uma mutação pontual que altera a sequência AAA do codão 43 para AAC, o que resulta numa mudança do aminoácido lisina para aspargina nessa posição. Esta mutação específica foi já identificada em *Escherichia coli*⁵³, *Mycobacterium tuberculosis*⁵⁴ e *Salmonella enterica*⁵⁵. Recentemente foi estimado um custo na *fitness* associado a esta mutação de aproximadamente 18% no genótipo selvagem MG1655 de *Escherichia coli*, medida em meio líquido LB⁵⁶.

Num trabalho com *Salmonella typhimurium*⁴⁹ foi estudada a compensação para o custo da resistência associado à mutação K43N, através da propagação em meio líquido sem estreptomicina de 81 populações. Os resultados mostram que a recuperação para o custo na *fitness* das populações ocorre maioritariamente por mutações compensatórias (35 diferentes mutações em 77 linhas) em vez de reversão (somente em 4 linhas), apesar da restauração da *fitness* por compensação poder ser apenas parcial, uma vez que a área alvo para compensação é 20 vezes maior que para a reversão. Como já tinha sido anteriormente postulado⁵⁰, uma vez que a propagação das populações ao longo do tempo consiste em passagens seriadas de uma amostra da população, mutantes em menor frequência, como

os revertentes, têm menor probabilidade de serem transferidos durante o *bottleneck*, pelo que embora surjam durante a expansão da população, raramente atingem uma fracção da população muito elevada, apesar da sua vantagem em termos de *fitness*. Mostrou-se também nesse trabalho a importância do tamanho populacional nos aumentos de *fitness*, dado que populações que sofreram *bottlenecks* menos severos durante a sua propagação atingiram valores de *fitness* mais elevados.

Num trabalho empírico (de Sousa *et al.*, dados não publicados) diferentes populações de *E. coli* nas quais foi introduzida a mutação K43N, foram propagadas sob um tamanho efectivo da população reduzido em meio líquido durante 200 gerações, de modo a estudar os efeitos das mutações benéficas com efeito na *fitness* que surgem durante o processo adaptativo. Com recurso a um microssatélite como marcador foi possível determinar a frequência e efeitos das mutações benéficas associados à compensação para o custo desta mutação, investigando assim os primeiros passos do processo adaptativo.

II. OBJETIVOS

Com o presente estudo pretende-se obter uma maior compreensão do processo adaptativo em *E. coli* e dos factores que o influenciam. Deste modo foram realizados trabalhos em evolução experimental que passam pela adaptação de populações de bactérias a um dado meio, manipulando factores importantes neste processo, de modo a atingir objectivos específicos:

- ❖ Investigar a importância do tamanho populacional efectivo na adaptação das populações a um novo ambiente. Populações evoluídas com diferentes efectivos populacionais ($N_e=2,3 \times 10^4$ e $N_e=10^7$) registaram aumentos de *fitness* estatisticamente diferentes ao fim de 1000 gerações (17% e 40% respectivamente)³⁰. Assim, através da propagação dessas mesmas populações durante 1000 gerações adicionais e da medição da *fitness* às 2000 gerações pretende-se averiguar se as populações grandes se encontram de facto num óptimo de *fitness*, correspondendo a um pico na *fitness landscape*. Por outro lado também se procura perceber se o tamanho efectivo da população condiciona apenas a taxa de aumento de *fitness* (dado a diferença a nível dos efeitos na *fitness* das mutações fixadas nos dois tipos de populações), ou se as populações com diferentes tamanhos efectivos seguiram diferentes trajectórias evolutivos, adaptando-se em picos de *fitness* distintos.
- ❖ Perceber de que forma a o aumento de *fitness* derivado da fixação de mutações benéficas estimado para as 1000 gerações de adaptação³⁰ das populações pequenas, é sensível à alteração da forma da distribuição dos efeitos das mutações benéficas que surgem durante o processo adaptativo. Assumindo que estes efeitos seguem uma distribuição gama, é possível investigar se a alteração da forma dessa distribuição pode explicar os resultados de *fitness* obtidos experimentalmente. Para isso recorre-se à simulação de evolução de populações com 23000 indivíduos durante 1000 gerações, testando-se diferentes valores de taxa de mutações benéficas (U_b - 10^{-8} a 10^{-4}), efeitos das mutações benéficas (s_b - 0,05 a 0,7) e formas da distribuição (α - 0,5, 1, 2 e 5).
- ❖ Estudar a compensação para o decréscimo de *fitness* associado a uma mutação que confere resistência a um antibiótico. Neste caso pretende-se perceber de que forma os microrganismos ultrapassam o custo da resistência ao antibiótico na ausência dessa pressão selectiva, estudando os primeiros passos da adaptação num meio estruturado (sólido) e com tamanho efectivo populacional elevado. Através da propagação durante 200 gerações de populações com uma mutação pontual que confere resistência à estreptomicina (K43N) mas incorre num custo de *fitness*, pretende-se estudar os estágios iniciais de compensação para o custo da *fitness*

associado à mutação. Assumindo que um aumento na *fitness* medida às 200 gerações se deve ao aparecimento de uma mutação benéfica, é possível estimar os efeitos das mutações benéficas num cenário de intensa interferência clonal. Também se pretende averiguar a presença de clones revertentes para a mutação, passíveis de surgirem e se expandirem num meio onde a estrutura e o elevado efectivo populacional favorecem o seu aumento de frequência. De um modo geral procura-se também comparar os resultados obtidos da compensação em meio sólido com a que ocorre em condições ambientais homogéneas e com um tamanho populacional inferior.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1 ADAPTAÇÃO DE POPULAÇÕES COM DIFERENTES EFECTIVOS POPULACIONAIS

1.1 EVOLUÇÃO DAS POPULAÇÕES

Na experiência de adaptação a longo termo foi utilizada uma estirpe de *Escherichia coli* transformada com o plasmídeo F (com um gene de resistência à tetraciclina) e o pBR322 (com um gene de resistência à ampicilina e o microssatélite constituído por dinucleótidos GA), a estirpe XL-blue MRF'. Num trabalho anterior³⁰ a partir de uma cultura derivada de um único clone, foram fundadas e propagadas durante 1000 gerações em meio líquido rico LB populações de pequeno (S) e grande (L) efectivo populacional. Neste trabalho, uma amostra de cada população congelada às 1000 gerações foi inoculada em meio líquido, de modo a continuar a sua propagação durante 1000 gerações adicionais. Para este prolongamento da adaptação das populações foi seguido o mesmo protocolo usado em³⁰, que inclui diluição num tampão salino (MgSO₄), inoculação diária em 10 mL de meio novo LB e crescimento durante 24 horas, com agitação a 37°C. O número de indivíduos transferido a cada passagem foi de 10³ para as populações S e 10⁷ para as populações L e ao fim de 24 horas ambos os tipos de população atingiam uma densidade máxima de aproximadamente 10⁹ indivíduos por mL, decorrendo cerca de 23 e 13 gerações respectivamente. Foi estimado um tamanho efectivo populacional (N_e) de $2,3 \times 10^4$ para as pequenas populações e 10⁷ para as grandes, segundo a fórmula $N_e = N_b \cdot G$, onde N_b é o número de indivíduos transferidos a cada diluição e G o número de gerações entre diluições. Assim, foram propagadas até às 2000 gerações de adaptação 7 populações com baixo tamanho efectivo populacional e 9 populações com elevado.

1.2 MEDIÇÃO DA FITNESS MÉDIA DAS POPULAÇÕES

De modo a determinar a *fitness* média das populações evoluídas durante 2000 gerações em meio rico LB realizaram-se ensaios de competição contra uma estirpe de referência. As populações L foram competidas contra estirpe de referência MG1655 $\Delta lacIZYA$ cm^R amp^R galK::YFP F'(tet^R), derivada da estirpe selvagem K12 MG1655. Esta estirpe possui o alelo amarelo (*yfp*) do gene GFP sob controlo do promotor *lac* e uma deleção a nível do operão *lac*, o que permite a expressão constitutiva da fluorescência. Estão também presentes no cromossoma da bactéria mutações que conferem resistência aos antibióticos ampicilina e cloranfenicol.

Por seu lado, nas competições das populações S utilizou-se a estirpe MC4100 str^R galK::YFP amp^R F'(tet^R)²⁵. Apesar desta estirpe também possuir expressão constitutiva do gene YFP sob controlo do promotor *lac* num *background* em que o operão *lac* foi eliminado

(MC4100), existem diferenças importantes relativamente ao genótipo selvagem da MG1655. Para além das mutações que conferem resistência à estreptomicina e à ampicilina, no genótipo específico da estirpe MC4100 estão presentes diversas mutações que levam a um crescimento ligeiramente mais lento face à estirpe MG1655, sendo por isso utilizada com vista a minimizar as diferenças verificadas a nível do crescimento entre as estirpes competidoras.

Para evitar a transferência do plasmídeo F durante a cultura conjunta com a estirpe XL-blue MRF', foi realizada uma conjugação entre esta estirpe e cada uma das estirpes de referência (MG1666-YFP e MC4100-YFP). Neste procedimento um tubo que continha 10 mL de meio rico LB foi inoculado com 100 µl de culturas frescas de cada uma das estirpes e incubado sem agitação a 37° C durante a noite. Posteriormente procedeu-se à sua diluição e plaqueamento em meio sólido LB suplementado com tetraciclina, ampicilina e cloranfenicol (no caso da MG1655) ou estreptomicina (no caso da MC4100), de modo a isolar os clones com o plasmídeo F (tetR). Por forma a garantir a fluorescência da estirpe de referência, escolheu-se uma única colónia que apresentava fluorescência quando observada numa lupa fluorescente (SteREO Lumar V12; Carl Zeiss) para iniciar uma cultura contra qual as populações evoluídas competiram.

Para os ensaios de competição seguiu-se um procedimento semelhante ao descrito em ³⁰. Assim, as estirpes competidoras foram inoculadas independentemente a partir do stock congelado em meio líquido suplementado com os antibióticos tetraciclina e ampicilina, onde cresceram durante 24 horas, a 37°C e com agitação. Para garantir que ambas as estirpes se encontravam nas mesmas condições fisiológicas realizou-se uma passagem adicional para cada estirpe competidora em LB líquido sem qualquer antibiótico, onde cresceram durante mais 24 horas. Após este tempo, uma diluição da mistura de ambas as estirpes foi inoculada em meio LB, decorrendo a competição por 24 horas, a 37°C e com agitação, nas mesmas condições em que foi realizada a evolução das populações. Uma vez que se verificou um crescimento muito mais rápido das estirpes de referência do que das populações evoluídas ou ancestral, as competições foram realizadas com diferentes proporções de cada estirpe competidora. Assim, nas competições das populações S foram misturadas 500 vezes mais bactérias deste tipo do que bactérias da estirpe de referência MC4100-YFP (proporção de 500 para 1), enquanto nas competições relativas às populações L misturaram-se 10 vezes mais bactérias deste tipo do que da estirpe de referência MG1655-YFP (proporção de 10 para 1). A população ancestral foi competida contra ambas as estirpes de referência independentemente, numa proporção de 500 da população ancestral para 1 de cada uma das estirpes de referência. Para o cálculo das frequências iniciais e finais de cada uma das estirpes competidoras, plaqueou-se a mistura em placas de LB agar e procedeu-se à

contagem das unidades formadoras de colónias (CFUs). Por forma a discriminar as estirpes competidoras foi efectuada a digitalização das placas com recurso a um scanner fluorescente (FLA-5100, Fujifilm), que permite distinguir as colónias de cada estirpe com base na emissão diferencial de fluorescência. Cada população evoluída foi medida 3 vezes independentemente e a população ancestral foi medida 3 vezes para cada uma das estirpes de referência usadas. O cálculo da *fitness* média (W_a) da população (a) contra a estirpe de referência (b) foi feito segundo o rácio dos parâmetros maltusianos para a estirpe evoluída (m_a) e de referência (m_b) segundo a fórmula

$$W_a = \frac{m_a}{m_b} = \frac{\text{Ln}\left(Nf_a/Ni_a\right)}{\text{Ln}\left(Nf_b/Ni_b\right)}^{19}, \text{ em que } Nf_a \text{ e } Nf_b \text{ são os números finais}$$

das estirpes bacterianas evoluída e de referência, enquanto Ni_a e Ni_b correspondem aos números iniciais das mesmas estirpes. Este valor de *fitness* é uma medida adimensional, representando a *fitness* relativa de uma população ao fim de um dia de competição. Para estimar os aumentos de *fitness* verificados nas populações evoluídas face ao ancestral, dividiu-se o valor de *fitness* das populações evoluídas medido contra a estirpe de referência (W_{ev}) pela *fitness* obtida da população ancestral contra a estirpe de referência (W_{anc}), obtendo-se assim a *fitness* das populações relativamente à população ancestral (W).

A análise estatística foi realizada com recurso ao programa SPSS Statistics v17.0.

2 MODELAÇÃO E SIMULAÇÃO DE EVOLUÇÃO DE POPULAÇÕES

De modo a modelar a evolução de populações bacterianas realizaram-se simulações Monte-Carlo com base num modelo teórico semelhante ao utilizado em ³⁰. Neste modelo, assumiram-se populações assexuadas, com gerações discretas e tamanho populacional constante de 23000 indivíduos, de modo a simular a adaptação realizada experimentalmente com populações de pequeno efectivo populacional ($N_e=2,3 \times 10^4$) da estirpe XL-blue MRF' de *Escherichia coli*. Também se considerou que as mutações deletérias surgiam no genoma segundo uma distribuição do tipo Poisson com média igual a 0,003 (U_d) e um efeito médio de cada mutação deletéria na *fitness* (s_d) de 0,012. Estes parâmetros baseiam-se na taxa de mutação e efeito médio de cada mutação na *fitness* estimados actualmente para bactérias^{9,31,32}. Para além destes parâmetros fixos, fizeram-se variar outros relacionados com as mutações benéficas, nomeadamente a taxa de mutação (U_b), os seus efeitos na *fitness* (s_b) e a forma da distribuição desses efeitos (α). A taxa de mutação corresponde à frequência a que mutações benéficas surgem em cada indivíduo e fizeram-se variar os seus valores entre 10^{-8} e 10^{-3} . Quanto ao efeito cada mutação na

fitness, considerou-se que este era retirado de uma distribuição do tipo gama cuja média $E(s_b)$ podia assumir valores entre 0,005 e 0,1. Escolheu-se este tipo de distribuição para os efeitos das mutações benéficas na *fitness* uma vez que tem a particularidade de originar distribuições muito diferentes consoante se modificam os seus parâmetros (α e β)⁵⁷. Assim, a alteração do parâmetro α modifica a forma da distribuição, permitindo obter distribuições tão distintas como a exponencial ($\alpha=1$), em forma de L ($\alpha=0,5$) ou semelhante a uma distribuição do tipo normal com um maior ($\alpha=2$) ou menor ($\alpha=5$) enviesamento.

No início das simulações todos os indivíduos têm *fitness* igual a 1, mas a cada geração surgem novas mutações em cada indivíduo, tanto deletérias como benéficas. Assim, a probabilidade do indivíduo passar à geração seguinte é proporcional à sua *fitness* (W_{ij}), calculada com base na fórmula

$$W_{ij} = (1 - s_d)^i \cdot \prod_{j=1}^k (1 + s_{a_j})^{30},$$

onde i e k correspondem, respectivamente, ao

número de mutações deletérias e benéficas acumulado por cada indivíduo.

Para cada conjunto de parâmetros (U_b , $E(s_b)$ e α) foram simuladas 10 populações independentes, medindo-se a *fitness* média ao fim de 1000 gerações de adaptação. Estes dados foram depois comparados, através de um teste t de Student, com o valor médio de *fitness* estimado anteriormente para as populações de pequeno efectivo populacional às 1000 gerações de adaptação ($w=1,17$; $2se=0,06$), identificando-se assim os parâmetros que produziam valores de *fitness* que não eram estatisticamente diferentes ($P>0,05$) deste valor.

3 COMPENSAÇÃO EM MEIO ESTRUTURADO

3.1 EVOLUÇÃO DAS POPULAÇÕES

Com vista a estudar a compensação para o custo da mutação K43N associada à resistência ao antibiótico estreptomicina, utilizou-se uma estirpe de *E. coli* na qual foi inserida esta mutação (MG1655 K43N str^R). A mutação K43N anteriormente identificada e isolada⁵⁶ foi transferida através da transdução pelo fago P1 para uma população de *E. coli* K12 MG1655 evoluída durante 1400 gerações em meio líquido LB. A partir desta população foram fundadas 25 populações independentes que foram propagadas em meio estruturado. Foram escolhidas placas de LB agar de 60mm para propagar as culturas, uma vez que a densidade de bactérias atingida ao fim de 24 horas de crescimento em placas desta dimensão equivale àquela verificada para *E. coli* num meio homogéneo, nomeadamente em 10 ml de LB líquido (10^{10} indivíduos). Deste modo 25 populações foram fundadas através do

plaqueamento em meio sólido de cerca de 10000 células, de modo a formar uma camada confluyente, transferindo-se diariamente uma amostra de cada população para uma nova placa com recurso à técnica de *replica plating*. Segundo este procedimento, uma amostra da população era transferida para uma nova caixa de meio sólido LB mediante o contacto com uma porção de veludo. As placas de Petri eram depois incubadas durante 24 horas numa estufa a 37°C, apresentando ao fim desse tempo um crescimento confluyente, com uma densidade de 6×10^{10} indivíduos. Aproximadamente $4,5 \times 10^9$ células eram transferidas diariamente através este processo, decorrendo menos de 4 gerações entre cada passagem. As populações foram propagadas nestas condições durante 200 gerações.

3.2 MEDIÇÃO DA FITNESS

De modo a calcular a *fitness* relativa das várias populações ao fim de 200 gerações de adaptação foram realizados ensaios de competição nos quais um clone de cada população competia contra a estirpe de referência MG1655-YFP. Esta estirpe é a mesma que foi anteriormente utilizada nas competições com a estirpe XLblue, excepto quanto à presença do plasmídeo F (ausente nesta estirpe).

Tanto a estirpe de referência como um clone individual de cada população foram crescidos separadamente em meio líquido LB durante 24 horas, com agitação e a 37°C. As culturas foram depois independentemente plaqueadas em placas de Petri de 60mm contendo LB agar, de modo a formar uma camada bacteriana confluyente após incubação a 37°C. As células foram raspadas do meio sólido, diluídas em tampão salino PBS e misturadas segundo uma proporção de 1:1. Procedeu-se depois à co-cultura das estirpes em meio sólido através do plaqueamento em LB agar e incubação desta mistura inicial. Após 24 horas de crescimento a 37°C as células foram novamente raspadas e diluídas, obtendo-se assim uma mistura final. De modo a determinar as frequências iniciais e finais de ambos os competidores, as misturas inicial e final foram medidas num citómetro de fluxo fluorescente (FACScan), que permite a contagem e distinção dos dois tipos de bactérias com base na emissão diferencial de fluorescência. Foi medida a *fitness* de um clone de cada população propagadas bem como 3 populações ancestrais, realizando-se cada medição em triplicado.

A *fitness* relativa (W_a) da população (a) contra a estirpe de referência (b) foi calculada com base na fórmula $W_a = 1 + s_a$, em que o s_a representa o coeficiente de selecção ou efeito da mutação por geração. Este elemento consiste na diferença entre os parâmetros maltusianos para a estirpe compensada (m_a) e de referência (m_b), segundo a fórmula

$$s_a = m_a - m_b = \left[\text{Ln} \left(\frac{Nf_a}{Ni_a} \right) - \text{Ln} \left(\frac{Nf_b}{Ni_b} \right) \right] / T \text{ Erro! Marcador não definido. }^{19},$$

em que Nf_a e Nf_b são os números finais das estirpes bacterianas compensadas e de referência, enquanto Ni_a e Ni_b correspondem aos números iniciais das mesmas estirpes.

Para calcular o coeficiente de selecção associado à mutação após compensação (s) subtraiu-se a *fitness* após compensação (W_c) à *fitness* do selvagem (W_{wt}). Por outro lado, para determinar a parte do custo que foi compensado (s_c), efectuou-se a diferença entre a *fitness* do compensado (W_c) e a do ancestral K43N (W_{anc}). Dividindo o valor de s_c pelo máximo que é possível compensar (correspondente ao simétrico do custo inicial da mutação ($-s_{anc}$) relativamente ao selvagem) é possível estimar a percentagem de compensação que ocorreu nas populações (% $_c$).

Os testes estatísticos foram realizados com base nos programas SPSS Statistics v17 e R v2.3.1.

3.3 IDENTIFICAÇÃO DE REVERTENTES

Com vista a identificar indivíduos revertentes para a mutação K43N (nos quais surgiu uma mutação no mesmo local e com sentido oposto) testou-se a sensibilidade de clones isolados à estreptomicina. Para isso recolheram-se as células que permaneceram no meio sólido após a passagem diária e procedeu-se à sua diluição em tampão salino PBS e plaqueamento em meio sólido (LB agar em placas de Petri de 92mm) de modo a serem obtidas colónias isoladas. Ao fim de um dia de incubação a 37°C realizou-se *replica plating* para meio sólido suplementado com o antibiótico (LB agar com estreptomicina) e incubaram-se as placas a 37°C durante 24h. As colónias crescidas em meio com ou sem antibiótico foram contabilizadas, identificando-se os mutantes revertentes como aqueles que só cresciam em meio sem antibiótico.

IV. RESULTADOS

1 ADAPTAÇÃO DE POPULAÇÕES COM DIFERENTES EFECTIVOS POPULACIONAIS

Com vista a determinar o nível de adaptação ao fim de um grande período de tempo, procedeu-se à medição da *fitness* relativa de populações propagadas durante 2000 gerações em meio rico LB. Para isso realizaram-se ensaios de competição contra uma estirpe de referência (MC4100-YFP ou MG1655-YFP) de 7 populações com reduzido tamanho efectivo ($2,3 \times 10^2$) e 9 populações com tamanho efectivo elevado (10^7).

Uma vez que na realização destas competições foi utilizada uma estirpe de referência diferente daquela usada anteriormente (K12 MG1655 str^R, F'(tet^R))³⁰, mediu-se a *fitness* relativa das populações de elevado efectivo populacional às 1000 gerações de adaptação, juntando-se os dados obtidos com aqueles anteriormente determinados. Por seu turno, para as populações pequenas usaram-se os dados da *fitness* populacional anteriormente recolhidos. Assim, como já tinha sido previamente constatado, tanto as populações de pequeno como de elevado efectivo populacional revelaram aumentos de *fitness* relativamente à população ancestral às 1000 gerações de adaptação em meio líquido rico (Figura 9).

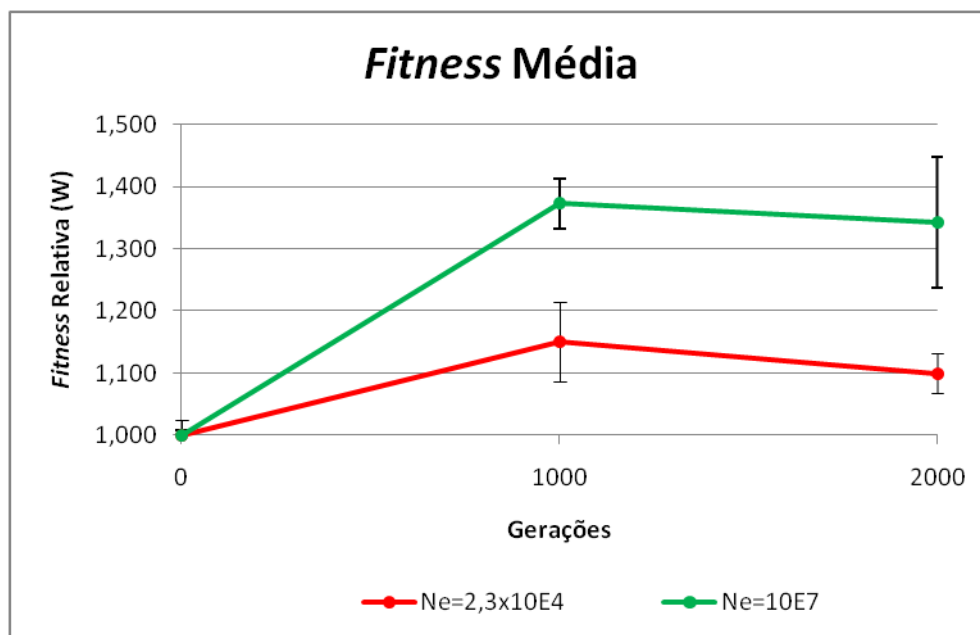


Figura 9 – Evolução da *fitness* média das populações pequenas ($N_e = 2,3 \times 10^4$) e grandes ($N_e = 10^7$) até às 2000 gerações

Nas 7 populações pequenas estimou-se um aumento médio de 15% ($2se = 0,06$) com aumentos a nível de cada população entre 3 e 29% (Tabela 1), ao passo que nas 9 populações grandes se verificou um aumento médio de 37%, com variações de *fitness* entre 28 e 44% (Tabela 2).

Por outro lado, às 2000 gerações, determinou-se para as populações pequenas um aumento na *fitness* de 10% relativamente ao ancestral, com valores a variar entre 3 e 16% (Tabela 1), enquanto para as populações grandes os valores fluuavam entre 8 e 63%, verificando-se um aumento médio de 34% (2se=0,03) (Tabela 2).

Tabela 1 - *Fitness* médias das populações S ($N_e=2,3 \times 10^4$) às 1000 e às 2000 gerações

Pop	1000g		2000g	
	W	2se	W	2se
S1	1,082	0,123	1,163	0,033
S2	1,031	0,058	1,075	0,021
S3	1,115	0,033	1,027	0,063
S4	1,145	0,031	1,095	0,054
S5	1,190	0,115	1,115	0,034
S6	1,289	0,045	1,130	0,068
S8	1,200	0,074	1,090	0,051
média	1,150	0,064	1,099	0,033

Tabela 2 - *Fitness* médias das populações L ($N_e=10^7$) às 1000 e às 2000 gerações

Pop	1000g		2000g	
	W	2se	W	2se
L2	1,322	0,028	1,357	0,050
L3	1,442	0,130	1,458	0,105
L4	1,402	0,106	1,295	0,047
L5	1,415	0,049	1,320	0,011
L6	1,422	0,093	1,446	0,076
L7	1,278	0,051	1,191	0,017
L8	1,365	0,027	1,304	0,078
L9	1,294	0,027	1,080	0,041
L10	1,415	0,053	1,626	0,050
média	1,373	0,040	1,342	0,106

Analisando cada população independentemente entre as 1000 e as 2000 gerações (Figuras 10 e 11), verifica-se que embora se observem algumas diferenças na *fitness* entre os dois períodos de tempo não há uma tendência consistente em nenhum dos dois grupos de populações para uma subida ou descida dos valores. Comparando as medições de *fitness* para cada população às 1000 e 2000 gerações de adaptação através de um teste U de Mann-Whitney, é possível constatar que a grande maioria não apresenta diferenças significativas (Tabelas 3 e 4; $P > 0,05$). Uma exceção é o caso da população L10, onde se verificou um aumento significativo de *fitness* das 1000 às 2000 gerações.

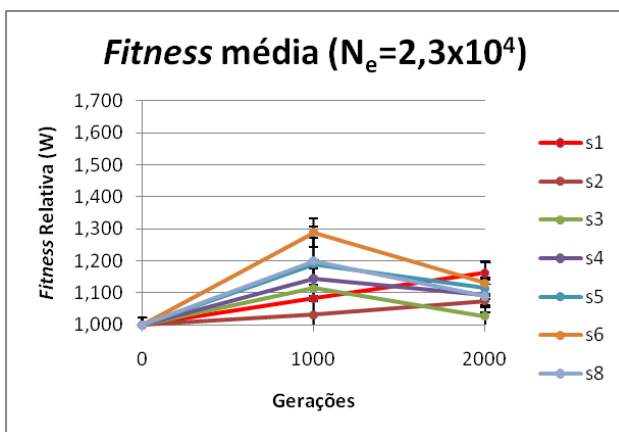


Figura 10 - *Fitness* das populações S individuais até às 2000 gerações

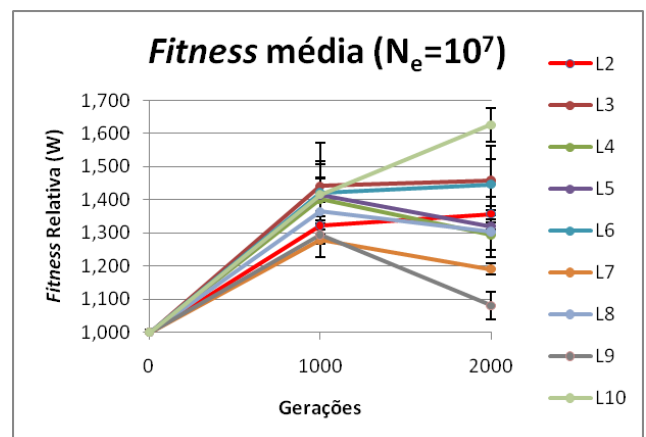


Figura 11 - *Fitness* das populações L individuais até às 2000 gerações

Tabela 3 - Teste U de Mann-Whitney para as diferenças de *fitness* entre as 1000 e 2000 gerações de adaptação de cada população pequena (S)

Dependent Variables=w

	pop							
	s1	s2	s3	s4	s5	s6	s8	
Mann-Whitney U	8,000	6,000	1,000	3,000	9,000	,000	2,000	
Wilcoxon W	29,000	27,000	7,000	9,000	15,000	6,000	8,000	
Z	-,258	-,775	-2,066	-1,549	,000	-2,324	-1,807	
Asymp. Sig. (2-tailed)	,796	,439	,039	,121	1,000	,020	,071	
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,905 ^a	,548 ^a	,048 ^a	,167 ^a	1,000 ^a	,024 ^a	,095 ^a	

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: time

Tabela 4 - Teste U de Mann-Whitney para as diferenças de *fitness* entre as 1000 e 2000 gerações de adaptação de cada população grande (L)

Dependent Variables=W

	pop									
	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	
Mann-Whitney U	6,000	10,000	8,000	1,000	9,000	5,000	6,000	,000	1,000	
Wilcoxon W	51,000	55,000	14,000	7,000	54,000	11,000	12,000	6,000	46,000	
Z	-1,387	-,647	-1,017	-2,311	-,835	-1,572	-1,387	-2,496	-2,311	
Asymp. Sig. (2-tailed)	,166	,518	,309	,021	,404	,116	,166	,013	,021	
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,209 ^a	,600 ^a	,373 ^a	,018 ^a	,482 ^a	,145 ^a	,209 ^a	,009 ^a	,018 ^a	

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: time

Comparando a *fitness* média para as pequenas e grandes populações nos dois períodos de tempo é possível verificar que embora o valor correspondente às populações pequenas seja significativamente menor que a das grandes (Tabela 5; $P < 0,05$), tanto às 1000 como às 2000 gerações, não ocorrem aumentos significativos de *fitness* média entre os 2 períodos de tempo (Tabela 6; $P > 0,05$).

Tabela 5 - Teste t de Student para comparar as médias das populações S e L em cada ponto temporal (1000 e 2000 gerações)

Dependent variables=mean W

		Equal variances assumed	
		time	
		1000	2000
Levene's Test for Equality of Variances	F	,543	4,582
	Sig.	,473	,050
t-test for Equality of Means	t	-6,129	-3,913
	df	14	14
	Sig. (2-tailed)	,000	,002
	Mean Difference	-,222613	-,242630
	Std. Error Difference	,036323	,062008
	95% Confidence Interval of the Difference	Lower	-,300519
	Upper	-,144708	-,109637

Tabela 6 – Teste t de Student para comparar as médias às 1000 e 2000 gerações em cada tamanho populacional (S e L)

Dependent variables mean W		Equal variances assumed		
		size		
		1	2	
Levene's Test for Equality of Variances	F	2,704	3,408	
	Sig.	,126	,083	
t-test for Equality of Means	t	1,414	,546	
	df	12	16	
	Sig. (2-tailed)	,183	,592	
	Mean Difference	,050913	,030896	
	Std. Error Difference	,036015	,056545	
	95% Confidence Interval of the Difference	Lower	-,027556	-,088974
		Upper	,129383	,150766

Com vista a estudar o efeito de cada um dos factores (tamanho da população e tempo) na *fitness* média observada nas várias populações, realizou-se uma análise de variância factorial. Foi observado um efeito significativo do tamanho populacional (Tabela 7; $P < 0,001$) na variância para a *fitness* entre populações, não se encontrando no entanto nenhum efeito significativo ligado ao tempo.

Tabela 7 - ANOVA para testar o efeito dos factores tamanho e tempo na *fitness* média das populações

Dependent Variable: mean W					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,440 ^a	3	,147	14,409	,000
Intercept	48,518	1	48,518	4772,017	,000
size	,426	1	,426	41,913	,000
time	,013	1	,013	1,296	,265
size * time	,001	1	,001	,078	,783
Error	,285	28	,010		
Total	51,174	32			
Corrected Total	,724	31			

a. R Squared = ,607 (Adjusted R Squared = ,565)

De modo a investigar a heterogeneidade dentro de cada grupo de populações, comparou-se a variância entre as populações pequenas e entre as grandes, quer às 1000 quer às 2000 gerações. Às 1000 gerações detectou-se uma variância na *fitness* aproximada entre as populações pequenas (0,07) e grandes (0,04), embora às 2000 gerações as

populações de maior efectivo populacional apresentem variância muito maior (0,025) que aquela determinada para as populações de menor efectivo populacional (0,002) (Tabela 8).

Tabela 8 – Estatísticas descritivas para as populações S e L às 1000 e 2000 **gerações**

Variables=mean W

time	size	Statistic				Std. Error
		N	Mean	Std. Deviation	Variance	Mean
1000	small	7	1,15022	,085030	,007	,032138
	large	9	1,37283	,060570	,004	,020190
2000	small	7	1,09931	,043003	,002	,016253
	large	9	1,34194	,158452	,025	,052817

Através da análise comparativa dos valores de fitness das populações de pequeno e elevado efectivo populacional é possível concluir que não ocorreu um aumento significativo da fitness entre as 1000 e 2000 gerações, mostrando assim que as populações evoluíram para um óptimo de fitness

2 MODELAÇÃO E SIMULAÇÃO DE EVOLUÇÃO DE POPULAÇÕES

Com o intuito de testar a robustez dos valores de *fitness* medidos nas pequenas populações às 1000 gerações relativamente à distribuição dos efeitos na *fitness* das mutações benéficas assumida, realizaram-se simulações Monte-Carlo de evolução de populações. Assim, foram obtidos dados teóricos de *fitness*, cuja compatibilidade com os dados obtidos das populações reais foi averiguada através de um teste *t* de Student. Nessas simulações foram fixados valores correspondentes às mutações deletérias, de acordo com estimativas da literatura³², fazendo-se variar os parâmetros correspondentes às mutações benéficas (taxa, efeito médio e forma da distribuição). Das mais de 1700 combinações de parâmetros testadas nas simulações, 147 originavam populações cujos valores de *fitness* médios, não eram estatisticamente diferentes ($P > 0,05$) do valor de *fitness* médio obtido experimentalmente ($W=1,17$; $2se=0,06$), sendo por isso compatíveis com estes dados. Na Figura 12 estão representados os diferentes tipos de distribuição obtidos consoante a alteração do parâmetro α (A: $\alpha=0,5$; B: $\alpha=1$; C: $\alpha=2$ e D: $\alpha=5$) da distribuição gama.

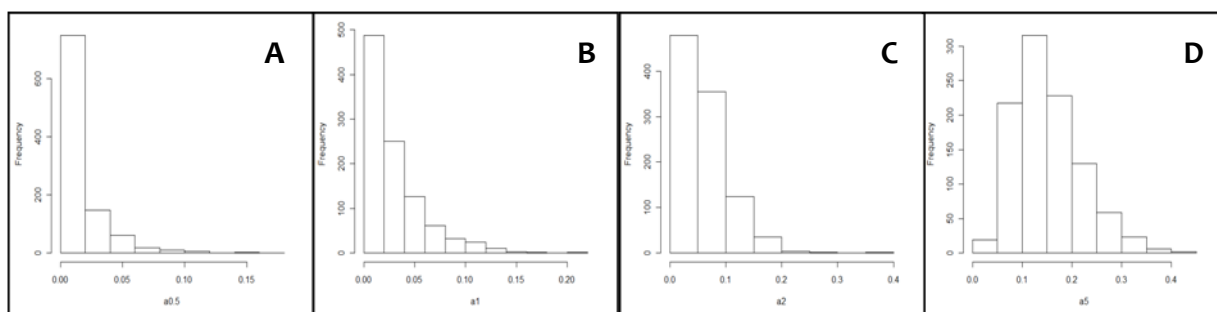


Figura 12- Diferentes distribuições do tipo Gama obtidas por alteração do parâmetro α . **A** - forma de "L"; **B** - exponencial; **C** – normal muito enviesada e **D** – normal menos enviesada

Agrupando as combinações de taxa de mutação (U_b) e efeito médio na *fitness* ($E(s_b)$) das mutações benéficas compatíveis com os dados práticos por formas de distribuição ($\alpha=0,5$; 1; 2 ou 5) observa-se que qualquer que seja a forma da distribuição dos efeitos das mutações benéficas na *fitness* (exponencial, em forma de L ou semelhante a uma normal enviesada) utilizada na simulação de evolução de populações, são sempre produzidos dados teóricos compatíveis com a *fitness* média das pequenas populações (Figura 13: A, B, C e D).

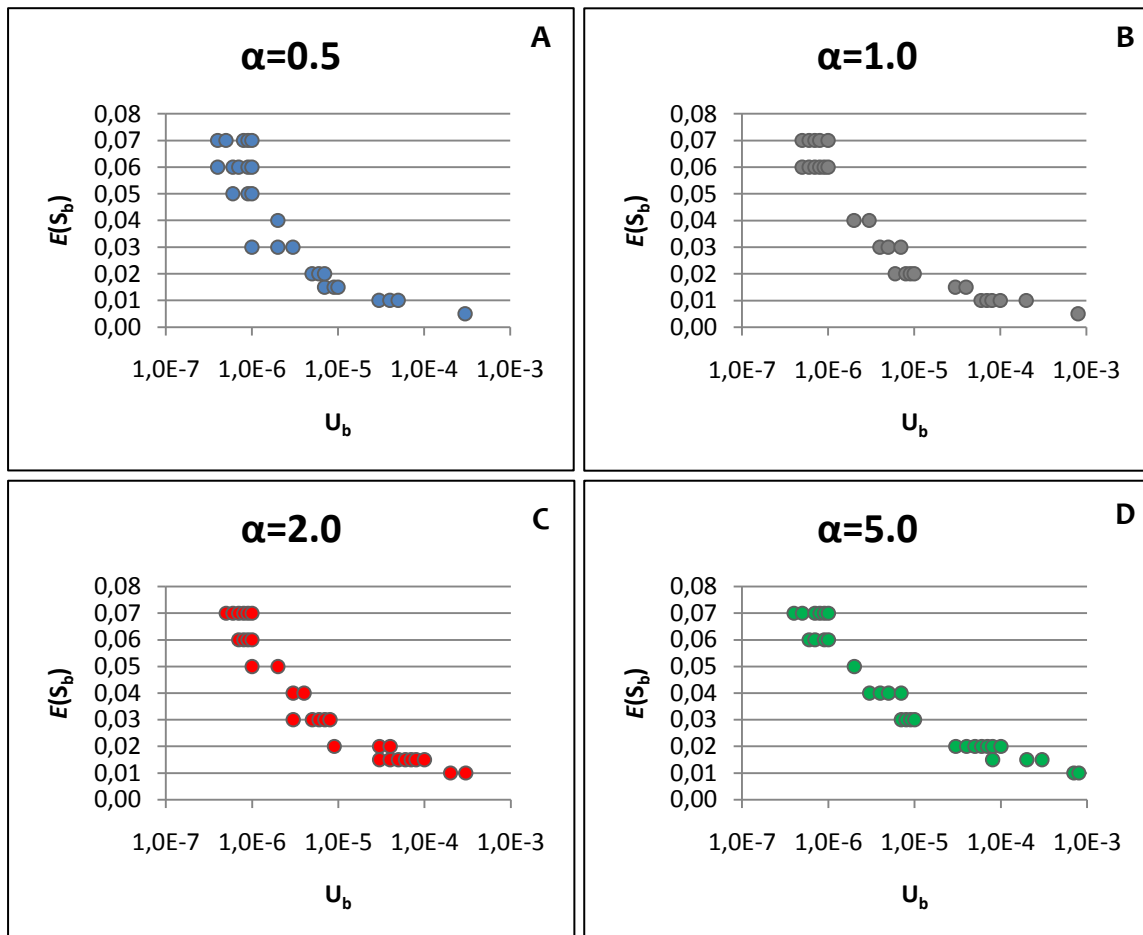


Figura 13 - Combinações de valores de U_b e $E(s_b)$ compatíveis com os dados práticos, agrupadas segundo o parâmetro α da distribuição gama: 0,5 (A); 1 (B); 2 (C) e 5 (D)

Combinando a totalidade dos parâmetros passíveis de explicarem os valores medidos de *fitness* das populações pequenas ao fim de 1000 gerações de adaptação, verifica-se que apesar de diferentes distribuições dos efeitos das mutações serem assumidas, os dados teóricos compatíveis com a *fitness* observada têm origem em valores de parâmetros semelhantes, não se observando grandes diferenças entre eles (Figura 14). Deste modo conclui-se assim que a fixação de mutações benéficas que leva ao aumento médio de *fitness* verificado nas populações de reduzido efectivo populacional não é muito sensível à distribuição dos efeitos na *fitness* das mutações que surgem durante o processo adaptativo.

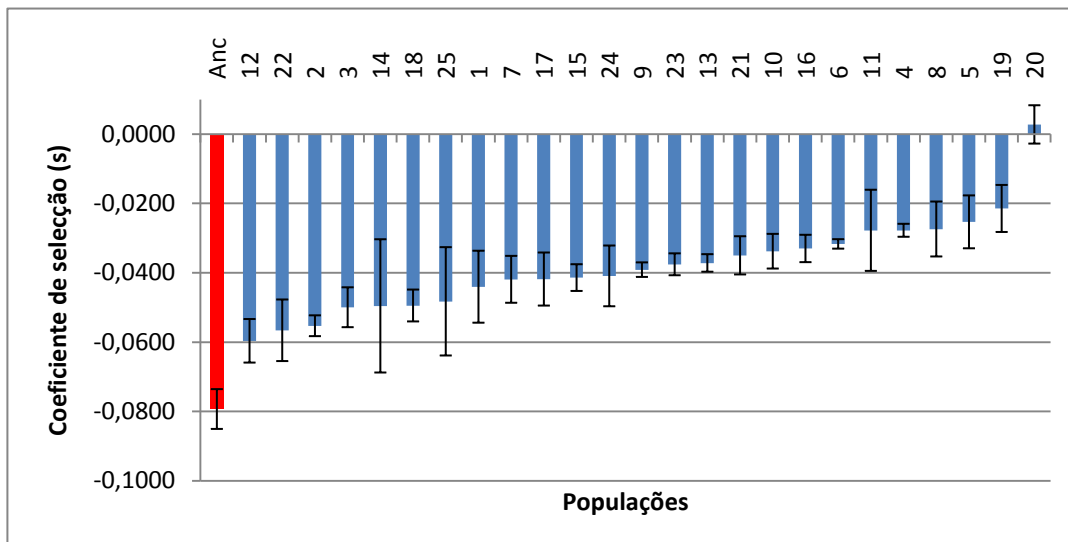


Figura 15 – Coeficientes de selecção do ancestral e dos clones das 25 populações propagadas em meio sólido

Foi também calculada a percentagem de compensação que ocorreu nas várias populações, comparando-se assim o custo inicial da mutação com o custo determinado ao fim de 200 gerações de adaptação (Figura 16). De acordo com os outros resultados, verificou-se uma média de compensação na ordem dos 52%, com a maioria dos valores a variar entre 25 e 73%, tendo sido identificado um único clone a compensar o custo total da resistência. Deste modo é possível concluir que em média, 200 gerações foram suficientes para atingir metade da compensação para o custo da resistência à estreptomicina.

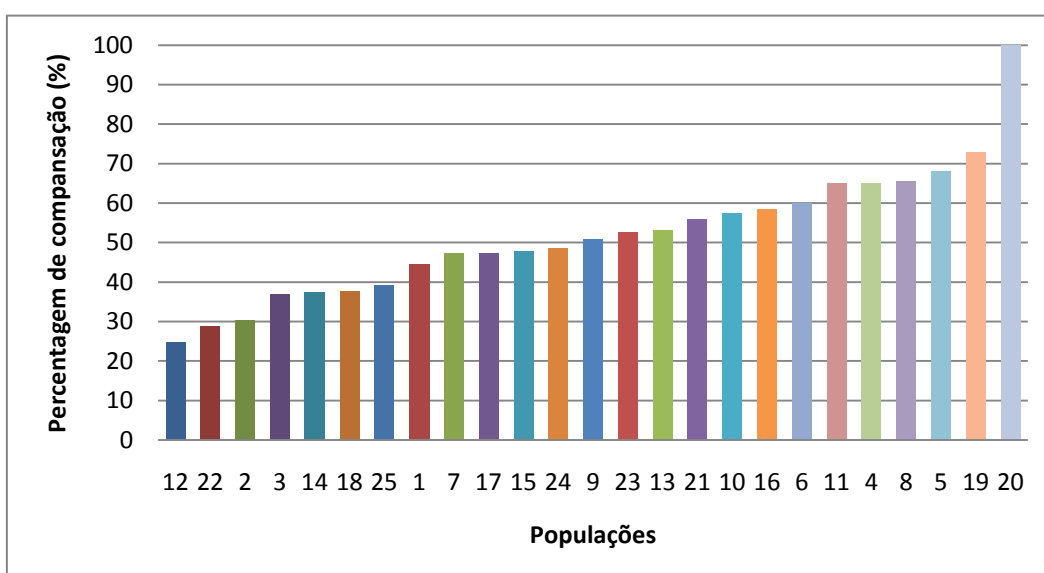


Figura 16 – Percentagem de compensação para o custo associado à mutação que confere resistência à estreptomicina

Para além de determinar os coeficientes de selecção e a percentagem de compensação ocorrida nos diferentes clones, foram também calculados os efeitos das mutações compensatórias na *fitness* dos indivíduos (s_c). Admitindo-se que o aumento de *fitness* medido para cada clone corresponde apenas ao aparecimento de uma mutação benéfica, foi possível inferirem-se os efeitos médios na *fitness* associados às mutações que surgem nas populações (Figura 17). Apesar de ter sido identificado um clone com um efeito na *fitness* elevado (0,078), a maior parte dos efeitos situa-se entre os 0,02 e 0,060, estimando-se um efeito médio (s_c) de 0,041 (2se=0,005).

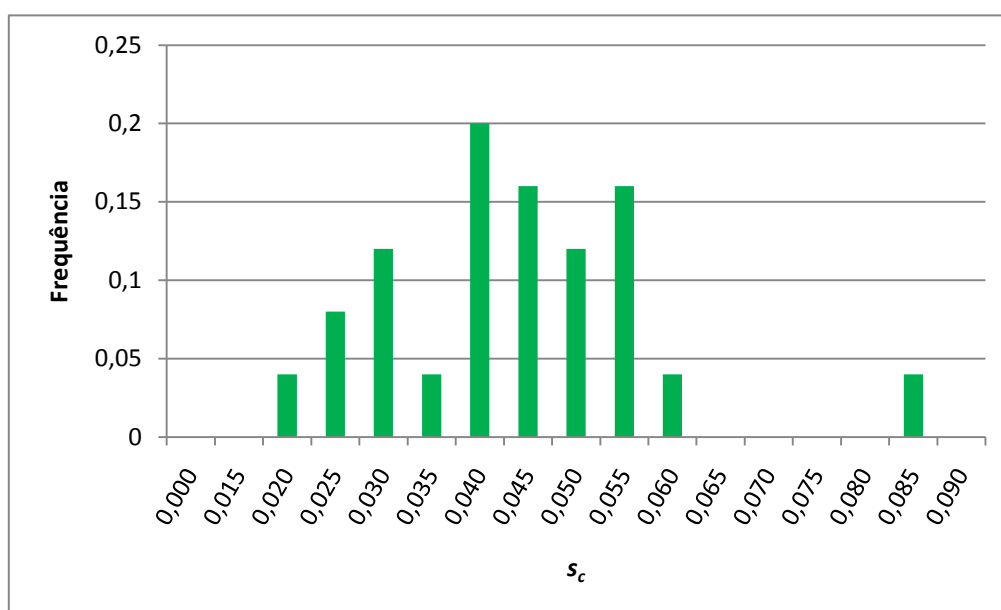


Figura 17 – Distribuição dos efeitos das mutações compensatórias

Com vista a identificar um tipo de distribuição compatível com os dados dos efeitos na *fitness* medidos, foram comparados vários tipos de distribuição através de um *Likelihood ratio test*. Com base nos resultados verifica-se que uma distribuição do tipo gama é mais consistente com os dados recolhidos do que uma distribuição do tipo exponencial ($P < 0,001$). Por outro lado não se conseguiram distinguir diferenças entre uma distribuição gama ou beta ($P > 0,05$).

Testes à sensibilidade dos clones analisados mostraram que todos os 25 clones continuavam resistentes à estreptomicina, pelo que as mutações que levaram ao aumento de *fitness* só podem ser do tipo compensatório, não ocorrendo reversões. Durante a propagação das populações no meio estruturado foi também investigada a presença de revertentes para a mutação, incapazes de se desenvolverem em meio contendo estreptomicina, contudo não foram identificados clones sensíveis na população, ou pelo menos numa frequência suficientemente alta para serem detectados por amostragem.

V. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

1 ADAPTAÇÃO DE POPULAÇÕES COM DIFERENTES EFECTIVOS POPULACIONAIS

Uma vez que a adaptação de processa por mutações benéficas geralmente raras, um aumento do número de indivíduos reflecte-se num aumento do número de mutações disponíveis numa população, pelo que potencia a adaptação. Por outro lado um excesso de mutações benéficas leva à ocorrência de competição entre elas (interferência clonal) o que diminui a taxa de adaptação. Deste modo, o papel do efectivo populacional na adaptação é um assunto largamente debatido, dado o seu efeito no surgimento e fixação de mutações benéficas e a sua relação com outros factores^{29,35,37,38,58}. De modo a investigar a influência do tamanho populacional na adaptação das bactérias ao meio foram propagadas durante 2000 gerações populações independentes com dois diferentes tamanhos efectivos distintos: um tamanho elevado ($N_e=10^7$), onde se prevê uma forte acção da interferência clonal, com mutações de maior efeito a serem fixadas e um tamanho reduzido ($N_e=2,3 \times 10^4$) onde por um lado se espera que o papel da deriva genética não seja preponderante mas que por outro a interferência clonal tenha um efeito reduzido. Este trabalho vem assim no seguimento de um trabalho anterior³⁰, onde populações destes dois tipos tinham sido evoluídas durante 1000 gerações num meio ao qual não se encontravam previamente adaptadas (meio líquido rico) e a sua *fitness* relativa determinada com recurso a competições contra uma estirpe de referência. Nesse estudo, tinha sido verificado um aumento na *fitness* média das populações pequenas significativamente inferior ao verificado nas populações grandes, com um efeito médio de cada mutação na *fitness* superior nestas últimas que nas primeiras, demonstrando assim o maior efeito da interferência clonal que ocorre nas populações de elevado efectivo populacional.

Visto que para determinar a *fitness* às 2000 gerações se optou por um marcador diferente do anteriormente utilizado nas competições às 1000 gerações (distinção das estirpes competidoras através da emissão de fluorescência em vez de resistência a diferentes antibióticos), mediu-se novamente a *fitness* relativa de algumas populações, bem como a do ancestral XL-blue MRF'. Estas medições foram feitas para as populações de elevado efectivo populacional, pelo que para estas os novos dados foram usados com os anteriormente determinados. Para as populações de reduzido efectivo populacional foram apenas usados os dados previamente recolhidos. Para as 2000 gerações foi determinada a *fitness* das populações pequenas e grandes.

Assim, no presente trabalho foram estudadas 7 populações (S1, S2, S3, S4, S5, S5, S6, S8) com um N_e reduzido ($2,3 \times 10^4$ indivíduos) e 9 populações (L2 a L10) com um N_e elevado (10^7 indivíduos) bem como a evolução da *fitness* populacional entre as 1000 e as 2000 gerações. Dadas as informações anteriores a respeito da diferença de *fitness* média

verificada entre as populações pequenas e grandes, é possível postular duas hipóteses para explicar esta ocorrência. Por um lado sabe-se que as populações pequenas apresentam uma taxa de adaptação menor face às populações grandes, onde devido à alta densidade populacional e acção da interferência clonal, estão disponíveis na população mais mutações benéficas e com maior efeito na *fitness*. Deste modo, para as populações pequenas atingirem níveis de *fitness* semelhantes aos verificados nas populações grandes, pode ser preciso decorrer mais tempo. Numa *fitness landscape* de Fisher esta hipótese poderia ser representada como a subida a um único pico de *fitness* por parte das populações com os dois diferentes tamanhos. Outra explicação alternativa para as diferenças de *fitness* verificadas entre as pequenas e grandes populações está relacionada com a maior estocasticidade de trajectórias evolutivas presente nas populações com menos indivíduos. Ao contrário das populações grandes, que geralmente fixam mutações com maior efeito na *fitness*, a adaptação das populações pequenas decorre por fixação de mutações benéficas com efeitos na *fitness* mais variados. Este facto, em conjunto com a possível presença de interacções epistáticas entre as diferentes mutações, pode pelo menos potencialmente proporcionar soluções adaptativas tão diversificadas que levem ao alcance de diferentes níveis de *fitness*. Este cenário pode ser representado numa *fitness landscape* rugosa como a subida a picos distintos de *fitness* de populações com diferentes efectivos populacionais⁴¹.

O teste empírico destas hipóteses envolve a propagação nas mesmas condições que as anteriores durante 1000 gerações adicionais (de modo a perfazer 2000 gerações de adaptação) e a determinação do *fitness* relativo de populações com pequeno e com grande efectivo populacional. Dado que às 1000 gerações se verificaram aumentos de *fitness* significativos face ao ancestral e estatisticamente diferentes entre os dois efectivos populacionais, espera-se que o facto de decorrer o dobro do tempo (2000 gerações), seja suficiente para os dois tipos de populações realizarem o seu potencial adaptativo.

Os dados práticos disponíveis para as várias populações mostram uma tendência da manutenção dos valores médios de *fitness* para ambos os tipos de população entre os dois períodos de tempo considerados (Tabela 6, $P > 0,05$), indicando assim uma ausência de evolução adaptativa das 1000 para as 2000 gerações, ou pelo menos de adaptação que se reflecta em termos de aumentos de *fitness* relativamente ao ancestral. Esta estabilização parece assim indicar que ambos os tipos de populações se encontram adaptados mas em níveis (picos) de *fitness* diferentes, dada a diferença estatisticamente significativa verificada entre eles (Tabela 5 $P < 0,001$). Adicionalmente, foi também realizada uma análise da variância (ANOVA) de modo a testar os efeitos dos factores tempo e tamanho na *fitness* média das populações. Através dos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov (para a normalidade) e de Levene (para a homoscedasticidade dos dados) foram confirmados os

pressupostos da ANOVA ($P > 0,05$). Os resultados desta análise (Tabela 7), tal como esperado, revelam um efeito significativo do factor tamanho ($P < 0,001$), embora tanto o tempo como a intersecção entre os dois factores não tenham efeitos significativos ($P > 0,05$).

Comparando cada uma das populações individuais relativamente aos dois períodos de tempo, segundo um teste não paramétrico (teste U de Mann-Whitney) verifica-se que a grande maioria não mostra diferenças significativas (Tabelas 3 e 4), assumindo-se assim que as duas amostras provêm da mesma distribuição. Dentro das excepções encontradas, apenas uma corresponde a um aumento de *fitness* significativa das 1000 para as 2000 gerações (L10). Noutra população (S3), embora o valor de p esteja no limite do nível de significância, as diferenças a nível das medições parecem ser cobertas pelo erro. Os restantes casos (S6, L5 e L9) embora mostrem diminuições na *fitness* média das populações, é provável que sejam artefactos produzidos devido à amostragem insuficiente da população ou degradação das amostras decorrente das condições de acondicionamento.

A análise da variância da *fitness* (Tabela 8) revelou que às 1000 gerações os valores apresentavam uma pequena diferença, com as populações pequenas a apresentarem maior variabilidade (0,07) que as grandes (0,04). No entanto às 2000 gerações os resultados invertem-se, uma vez que foi estimada uma variância muito superior (0,025) nas populações grandes do que nas pequenas (0,003), nesse mesmo ponto temporal. Se por um lado a variância ligeiramente maior das populações pequenas seja expectável, a sua diminuição drástica ao longo do tempo não o é, uma vez que apenas é compatível com uma convergência da *fitness* das várias populações, cenário inesperado face à maior estocasticidade associada à adaptação das pequenas populações. Também o aumento de variância nas populações grandes é inesperado, uma vez que num estágio mais avançado de adaptação espera-se fixação principalmente de mutações com efeito na *fitness* muito reduzido³⁸, pouco susceptíveis de introduzir uma grande variabilidade entre as linhas.

O conjunto destes dados parece assim apoiar a hipótese de que como as populações pequenas têm dinâmicas adaptativas mais diversas (devido à variabilidade das mutações benéficas fixadas e potenciado pelo grande número de relações epistáticas que ocorrem entre as várias mutações com efeito na *fitness*), podem atingir níveis finais de *fitness* muito diferentes das populações de elevado tamanho populacional. À semelhança deste trabalho, num estudo recente⁴¹ foi verificado este mesmo fenómeno, com populações pequenas a atingirem níveis de *fitness* diferentes das populações grandes. No entanto, nesse caso os autores verificaram aumentos de *fitness* em algumas populações pequenas superiores aos da maioria das populações grandes, apoiando assim a teoria de que a aleatoriedade associada à fixação de mutações benéficas se traduz num maior potencial adaptativo nas populações de reduzido tamanho populacional em detrimento de uma taxa de adaptação

mais rápida (verificada nas populações grandes). Apesar destes dados parecerem contrastar com os obtidos no presente trabalho (níveis de *fitness* inferiores nas populações mais pequenas) é preciso notar que as diferenças a nível das estirpes utilizadas em cada um dos trabalhos podem ter tido um efeito relevante nos resultados alcançados em cada um dos estudos. Em particular o genótipo da estirpe XL-blue MRF' ((*mcrA*)183 (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZ.M15 Tn10*]) difere substancialmente do genótipo da estirpe REL606 (B Bc251 T6^R Str^R rmlIII Ara^r) relativamente ao número e tipo de mutações inicialmente presentes, pelo que é possível que para condições ambientais e tamanhos populacionais semelhantes as soluções evolutivas adoptadas pelas duas estirpes sejam distintas.

2 MODELAÇÃO E SIMULAÇÃO DE EVOLUÇÃO DE POPULAÇÕES

A distribuição dos efeitos das mutações que surgem durante o processo adaptativo tem sido alvo de estudos experimentais e teóricos⁵⁹ que visam perceber por um lado a disponibilidade das mutações na população e por outro a distribuição daquelas que efectivamente se fixam. Com vista a investigar a dependência da fixação de mutações que levam ao aumento de *fitness* das populações face à distribuição das mutações que surgem na população, podem-se testar várias distribuições dos efeitos das mutações benéficas na *fitness* passíveis de ocorrerem, de modo a determinar uma que melhor se adequasse aos dados empíricos existentes. Num trabalho anterior³⁰, foram realizadas simulações de evolução de populações de elevado e reduzido efectivo populacional, com fixação dos parâmetros relacionados com as mutações deletérias e variação daqueles respectivos às mutações benéficas: taxa de ocorrência (U_b) e efeito médio na *fitness* (s_b), assumindo-se um modelo exponencial de distribuição das mutações benéficas. Embora com fundamento teórico⁵⁵ e prático, este modelo é apenas um dos vários que podem ocorrer biologicamente, pelo que a comparação de vários destes modelos pode trazer informações importantes à compreensão dos fenómenos adaptativos.

Assim, no presente trabalho experimental, recorreram-se a simulações de Monte-Carlo de modo a reproduzir o processo adaptativo ocorrido até às 1000 gerações em populações de pequeno efectivo populacional ($N_e=2,3 \times 10^4$). Algumas alterações relativamente ao modelo anteriormente utilizado prendem-se com uma taxa de mutações deletérias superior (decorrente de novos dados genómicos³²) e com a utilização de uma distribuição do tipo gama para os efeitos das mutações na *fitness*. Esta distribuição apresenta-se como um bom ponto de partida para o estudo de sistemas biológicos, uma vez que é uma distribuição

flexível cuja alteração do parâmetro α (que condiciona a forma da distribuição) permite obter distribuições muito diferentes⁵⁷. Deste modo quando o alfa é menor que 1 a distribuição assume uma em forma de L, quando é igual a 1 transforma-se numa exponencial, e quando é maior que 1 lembra uma distribuição normal enviesada (menos enviesada à medida que o alfa aumenta) (Figura 12). Concretamente estas distribuições implicam que mutações com diferentes efeitos ocorrem em proporções distintas, consoante a distribuição, esperando-se assim uma consistência variável dos dados teóricos em relação aos práticos.

Embora seja a combinação dos dados das pequenas e grandes populações que permite identificar os conjuntos de parâmetros que melhor explicam a *fitness* observada, unicamente a partir das simulações feitas para as populações de pequeno efectivo populacional observou-se que qualquer que fosse a distribuição assumida, encontravam-se sempre combinações semelhantes de valores da taxa de mutação e efeito na *fitness* compatíveis com os dados práticos existentes para as populações pequenas.

Esta robustez verificada face à alteração da distribuição dos efeitos das mutações benéficas que surgem na população está relacionada com o facto da distribuição das mutações que se fixam estar truncada para valores mais baixos. Uma vez que a probabilidade de uma mutação subir em frequência e se fixar depende directamente do seu efeito na *fitness*, mutações de menor efeito têm menor probabilidade de se fixarem, pois são mais sensíveis aos efeitos da interferência clonal e deriva genética, acabando por serem perdidas ao longo do processo adaptativo⁷. Assim, embora as várias distribuições dos efeitos das mutações que surgem durante o processo adaptativo assumam formas distintas, estas diferenças são principalmente a nível da frequência das mutações de menor efeito, mantendo-se as mutações de maior efeito a uma frequência muito reduzida (Figura 12). Deste modo, apenas quando o parâmetro α aumenta e a distribuição se aproxima do tipo normal (Figura 13 D), é que se verifica um aumento ligeiro do efeito médio das mutações para a mesma taxa de mutação, face a uma distribuição com um α menor, uma vez que uma distribuição mais normal assume maior frequência de mutações com maiores efeitos na *fitness* que uma distribuição em forma de L (Figura 13 A). Assim, é possível concluir que as mutações que se fixam durante o processo adaptativo são pouco sensíveis à distribuição dos efeitos das mutações que surgem na população.

Por outro lado, de modo a identificar uma distribuição que melhor se adaptasse aos dados empíricos seria preciso ter informação sobre a dinâmica adaptativa das populações ao longo do tempo, nomeadamente sobre os incrementos de *fitness* que ocorrem durante a adaptação, inferindo assim os efeitos das mutações que se fixam. Com os dados existentes não é possível excluir-se nenhuma das distribuições testadas, uma vez que todas parecem ser compatíveis com o valor médio de *fitness* observado para as populações de pequeno

tamanho efectivo ao fim de 1000 gerações de adaptação. Mas se por um lado os dados não nos permitem tirar conclusões acerca de um modelo que mais se aproxime da realidade, por outro conclui-se assim que também não se incorre num erro grave se se assumir um dado tipo de distribuição relativamente a outro.

3 COMPENSAÇÃO EM MEIO ESTRUTURADO

O estudo da compensação para o custo na *fitness* de uma mutação que confere resistência a antibióticos é de especial importância dado a ligação às infecções bacterianas que atingem os seres humanos⁵⁵. Assim, a análise do processo de compensação é relevante para perceber como é que as bactérias conseguem atenuar o custo subjacente à mutação, mantendo a resistência.

Com vista a investigar os estágios iniciais do processo adaptativo em meio sólido foram analisados os incrementos de *fitness* associados à compensação para o custo da mutação K43N em meio sólido. Esta mutação pontual no gene *rpsL* altera a conformação de uma proteína ribossomal, impedindo a ligação do antibiótico estreptomicina ao ribossoma⁴⁹ mas incorrendo num custo a nível da síntese proteica, o que se reflecte numa diminuição da *fitness* dos resistentes face aos indivíduos sensíveis. Uma vez que este custo tende a diminuir (mantendo-se a resistência) por acumulação de mutações compensatórias que ocorrem durante a propagação de populações resistentes, este fenómeno pode assim ser utilizado para investigar a adaptação, numa abordagem alternativa ao estudo da adaptação de populações a num novo ambiente ao qual não estavam adaptadas.

Concretamente, focando-se nos estágios iniciais do processo adaptativo, podem-se estudar os efeitos das primeiras mutações benéficas que surgem nas populações, determinando a extensão dos seus efeitos, a frequência e a forma da distribuição. Num trabalho recente (Sousa *et al.*, dados não publicados), através da propagação durante 200 gerações de linhagens independentes de *E. coli* portadoras da mutação K43N em meio líquido (LB) sem antibiótico, foi possível identificar as mutações compensatórias presentes nas populações, cuja distribuição dos seus efeitos na *fitness* era compatível com uma distribuição do tipo gama, com efeito médio de cada mutação na *fitness* de 2,7%. Embora estes resultados tenham sido obtidos para condições ambientais homogéneas (meio líquido) e com populações de tamanho efectivo reduzido, em populações naturais de microrganismos verifica-se geralmente algum tipo de estrutura, bem como números elevados de indivíduos. Deste modo, pretendeu-se com o presente trabalho estudar os primeiros passos da compensação num meio estruturado e com um elevado efectivo

populacional. O meio usado neste trabalho experimental foi o LB agar (um meio sólido rico cuja composição é a mesma que o LB líquido, excepto quanto à presença de agar), transferindo-se diariamente um elevado número de indivíduos (na ordem dos 10^9). Nestas condições foram propagadas durante 200 gerações 25 populações independentes derivadas de uma população ancestral contendo a mutação K43N, procedendo-se depois à medição da *fitness* para as várias populações em questão (evoluídas, ancestral com mutação e selvagem sem mutação). A *fitness* foi determinada recorrendo ao coeficiente selectivo, uma medida da diferença de crescimento entre as estirpes competidoras durante um dia de competição, de modo a ter em conta a variabilidade introduzida pelo meio utilizado.

A medição do coeficiente selectivo da população ancestral com a mutação revelou um custo relativamente à população selvagem, estimando-se assim um peso da mutação K43N (s_{anc}) de aproximadamente 8% ($2se=0,007$), inferior ao anteriormente medido (18%, $2se=0,013$)⁵⁶. No entanto, uma vez que a estirpe para a qual se transferiu a mutação (wt) tinha sido previamente adaptada durante 1400 gerações em meio líquido, é possível que tenham ocorrido alterações no *background* genético através da acumulação de algumas mutações cuja interacção com a mutação K43N tenha um efeito positivo na *fitness*.

Para investigar a distribuição dos efeitos das mutações compensatórias presentes nas populações às 200 gerações escolheu-se um clone de cada uma das 25 populações e determinou-se a sua *fitness* relativa em competição com a estirpe de referência. Em todos os clones foram verificados aumentos de *fitness* relativamente ao ancestral com a mutação, evidenciados pela diminuição do coeficiente selectivo (s), indicando uma atenuação do custo na *fitness* associado à resistência à estreptomicina (Figura 15). Tendo em conta o custo inicial da mutação, verifica-se assim uma percentagem de compensação média de 50%.

Assumindo que o clone escolhido é aquele que está em maior proporção na população e sabendo que os aumentos de *fitness* se devem à ocorrência de mutações benéficas (compensatórias) mas raras nos vários indivíduos, pode supor-se que o aumento de *fitness* verificado naquele clone corresponde ao surgimento de uma única mutação benéfica, com um efeito na *fitness* semelhante ao aumento verificado (s_c). Considerando as 25 populações, inferem-se efeitos de cada mutação na *fitness* entre 2 e 6%, com uma média de aproximadamente 4%, superior ao verificado para compensação em meio homogéneo (de Sousa *et al.*, dados não publicados) de acordo com previsões teóricas existentes⁴⁵.

Um caso excepcional é o clone da população 20, onde para além de ocorrer compensação total para o custo da mutação ainda se verifica um aumento adicional na *fitness*, ultrapassando até os indivíduos selvagens sem mutação. Neste clone específico parece provável que tenha aparecido pelo menos mais uma mutação, embora seja possível que este aumento se deva apenas a uma mutação benéfica.

Dado que o tempo de fixação de uma mutação benéfica depende tanto do seu efeito na *fitness* como do tamanho efectivo da população ($T_{fix} = \ln(N_e)/s$), nas condições em que foi efectuada a experiência e tendo em conta o efeito da estrutura, estimam-se tempos de fixação muito superiores às 200 gerações durante as quais a experiência decorreu. Deste modo é possível assumir que a mutação benéfica detectada em cada clone investigado é a primeira (ou das primeiras) a ocorrer, encontrando-se em expansão na população.

Tendo em conta a totalidade dos efeitos estimados pode-se investigar a distribuição associada às primeiras mutações que ocorrem durante o processo adaptativo (Figura 17). Através do *Likelihood ratio test* verificou-se que uma distribuição do tipo gama ou beta era estatisticamente mais compatível com os dados existentes, relativamente a outro do tipo exponencial ($P < 0,001$). No entanto, com os dados disponíveis não é possível distinguir entre as distribuições gama ou beta em termos da que melhor se adequa aos dados ($P > 0,05$). Com este trabalho experimental pretendia-se também investigar a presença de reversões (mutações com sentido oposto que restauram o genótipo para selvagem) dentro das populações propagadas em meio estruturado. Embora a propagação em meio onde o agente selectivo está ausente possibilite a ocorrência de reversões para o estado sensível com restauração da *fitness* inicial, esta situação embora mais vantajosa do ponto de vista da bactéria, ocorre menos frequentemente. As razões para este acontecimento consistem não só na menor área alvo para as reversões relativamente às mutações compensatórias mas também ao facto de quanto mais mutações compensatórias surgem, menor é a probabilidade das reversões ocorrerem, devido às interacções epistáticas entre mutações. Dado esta menor frequência a nível da população e visto que as populações de microrganismos sofrem muitas vezes *bottlenecks*, os indivíduos revertentes têm menor probabilidade de se expandir na população, mantendo-se assim a níveis reduzidos. No entanto num meio estruturado e com elevado efectivo populacional, os clones revertentes têm maior probabilidade de surgirem e se manterem na população, não só devido à menor severidade do *bottleneck* efectuado como também do ritmo mais lento de invasão das mutações compensatórias. No entanto no presente trabalho experimental não foram encontrados clones sensíveis à estreptomicina, nem durante a amostragem periódica efectuada durante a propagação das populações, nem entre os clones finais analisados. De facto, a recuperação de *fitness* total para o custo da mutação encontrada num dos clones (Figuras 15 e 16, clone 20) não se deve a uma reversão como seria expectável, visto que o clone manteve a resistência para a estreptomicina. Os dados parecem assim suportar uma ocorrência muito maior de mutações compensatórias relativamente às reversões, e em estágios iniciais do processo adaptativo, de modo a tornar menos provável o aparecimento posterior de revertentes.

VI. CONCLUSÃO

Com este trabalho experimental pretendeu-se obter um conhecimento mais aprofundado do processo adaptativo, relativamente à forma como ocorre e como é influenciado por diversos factores, tais como o tamanho populacional e as condições ambientais em que a adaptação ocorre. Deste modo seguiram-se três diferentes abordagens no estudo deste fenómeno complexo e relevante que é a adaptação dos organismos ao meio.

Por um lado foi demonstrada a importância do efectivo populacional na evolução das populações, não só em relação à velocidade com que a adaptação se processa mas também ao nível máximo que pode atingir. A comparação das populações de pequeno e grande efectivo populacional mostrou que as diferenças detectadas entre os valores de *fitness* média às 1000 gerações se mantinha às 2000 gerações, sem se verificarem alterações significativas ao longo deste tempo. Deste modo é possível concluir que os dois tipos de populações com diferenças no tamanho populacional seguiram trajectórias evolutivas distintas, condicionadas não só pelo diferente tipo de mutações fixadas mas também provavelmente pelas interacções genéticas passíveis de ocorrerem entre si. O processo adaptativo assume assim um carácter mais complexo e com mais interacções do que a visão simplista de acumulação passiva de mutações benéficas ao longo do tempo.

Outra abordagem visava testar robustez dos aumentos de *fitness* medidos face à distribuição das mutações benéficas que surgem na população. Com este trabalho concluiu-se que não havia uma grande dependência da *fitness* medida em relação ao tipo de distribuição assumido para as mutações benéficas, uma vez que qualquer uma das distribuições utilizadas permitia obter dados teóricos compatíveis com as medições efectuadas. Dado que as diferenças a nível das distribuições assentam principalmente nas proporções de mutações de muito pequeno efeito, assumindo-se sempre uma frequência baixa para as de maior efeito, o tipo de distribuição usado parece não ter muita importância visto que as mutações de pequeno efeito se perdem facilmente por deriva genética ou interferência clonal antes de se fixarem.

Por fim foi também estudada a compensação para o custo da *fitness* da mutação K43N responsável pela resistência à estreptomicina, num ambiente estruturado e com um elevado tamanho populacional. Os resultados obtidos demonstraram um atenuamento do custo para a mutação em apenas 200 gerações, com cerca de 50% de compensação, ficando assim patente a rapidez do processo adaptativo. Foram também estimados os efeitos associados às primeiras mutações que surgem nas populações, compatíveis com uma distribuição do tipo gama com um valor de médio de 4%. Por outro lado não foram encontrados clones revertentes, cuja expansão na população é expectável em situações de estrutura espacial e elevado efectivo populacional. O conjunto dos dados demonstra assim que a compensação é um fenómeno que ocorre frequentemente e de forma rápida nas populações.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Orr, H. A. The genetic theory of adaptation: A brief history. *Nature Reviews Genetics* **6**, 119-127, doi:10.1038/nrg1523 (2005).
- 2 Bjorkman, J. & Andersson, D. I. The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective. *Drug Resistance Updates* **3**, 237-245 (2000).
- 3 Joyce, P., Rokyta, D. R., Beisel, C. J. & Orr, H. A. A General Extreme Value Theory Model for the Adaptation of DNA Sequences Under Strong Selection and Weak Mutation. *Genetics* **180**, 1627-1643, doi:10.1534/genetics.108.088716 (2008).
- 4 Handel, A. & Rozen, D. E. The impact of population size on the evolution of asexual microbes on smooth versus rugged fitness landscapes. *BMC Evol Biol* **9**, 236, doi:1471-2148-9-236 [pii] 10.1186/1471-2148-9-236 [doi] (2009).
- 5 Orr, H. A. The distribution of fitness effects among beneficial mutations in Fisher's geometric model of adaptation. *Journal of Theoretical Biology* **238**, 279-285, doi:10.1016/j.jtbi.2005.05.001 (2006).
- 6 Rainey, P. B. & Travisano, M. Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature* **394**, 69-72, doi:10.1038/27900 [doi] (1998).
- 7 Elena, S. F. & Lenski, R. E. Evolution experiments with microorganisms: The dynamics and genetic bases of adaptation. *Nature Reviews Genetics* **4**, 457-469, doi:10.1038/nrg1088 (2003).
- 8 Orr, H. A. Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nature Reviews Genetics* **10**, 531-539, doi:10.1038/nrg2603 (2009).
- 9 FISHER, R. A. (Oxford University Press, Oxford, The Genetical Theory of Natural Selection).
- 10 Orr, H. Theories of adaptation: what they do and don't say. *Genetica* **123**, 3-13, doi:citeulike-article-id:126282 (2005).
- 11 Orr, H. A. The population genetics of adaptation: the adaptation of DNA sequences. *Evolution* **56**, 1317-1330 (2002).
- 12 Orr, H. A. The distribution of fitness effects among beneficial mutations. *Genetics* **163**, 1519-1526 (2003).
- 13 Gillespie, J. H. A simple stochastic gene substitution model. *Theor Popul Biol* **23**, 202-215, doi:0040-5809(83)90014-X [pii] (1983).
- 14 Kassen, R. & Bataillon, T. Distribution of fitness effects among beneficial mutations before selection in experimental populations of bacteria. *Nat Genet* **38**, 484-488, doi:ng1751 [pii] 10.1038/ng1751 [doi] (2006).
- 15 Betancourt, A. J. & Bollback, J. P. Fitness effects of beneficial mutations: the mutational landscape model in experimental evolution. *Current Opinion in Genetics & Development* **16**, 618-623, doi:10.1016/j.gde.2006.10.006 (2006).
- 16 Sanjuan, 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**, 8396-8401, doi:10.1073/pnas.0400146101 [doi] 0400146101 [pii] (2004).
- 17 Rokyta, D. R., Joyce, P., Caudle, S. B. & Wichman, H. A. An empirical test of the mutational landscape model of adaptation using a single-stranded DNA virus. *Nat Genet* **37**, 441-444, doi:ng1535 [pii] 10.1038/ng1535 [doi] (2005).
- 18 MacLean, R. C. & Buckling, A. The distribution of fitness effects of beneficial mutations in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet* **5**, e1000406, doi:10.1371/journal.pgen.1000406 [doi] (2009).
- 19 Lenski, R. E., Rose, M. R., Simpson, S. C. & Tadler, S. C. LONG-TERM EXPERIMENTAL EVOLUTION IN *ESCHERICHIA-COLI* .1. ADAPTATION AND DIVERGENCE DURING 2,000 GENERATIONS. *American Naturalist* **138**, 1315-1341 (1991).
- 20 Bull, J. J., Badgett, M. R. & Wichman, H. A. Big-benefit mutations in a bacteriophage inhibited with heat. *Molecular Biology and Evolution* **17**, 942-950 (2000).
- 21 Silander, O. K., Tenailon, O. & Chao, L. Understanding the evolutionary fate of finite populations: The dynamics of mutational effects. *Plos Biology* **5**, 922-931, doi:10.1371/journal.pbio.0050094 (2007).
- 22 Finkel, S. E. & Kolter, R. Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4023-4027 (1999).
- 23 Maharjan, R., Seeto, S., Notley-McRobb, L. & Ferenci, T. Clonal adaptive radiation in a constant environment. *Science* **313**, 514-517, doi:1129865 [pii] 10.1126/science.1129865 [doi] (2006).

- 24 Lenski, R. E. & Travisano, M. DYNAMICS OF ADAPTATION AND DIVERSIFICATION - A
10,000-GENERATION EXPERIMENT WITH BACTERIAL-POPULATIONS. *Proceedings of
the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 6808-6814 (1994).
- 25 Hegreness, M., Shoresh, N., Hartl, D. & Kishony, R. An equivalence principle for the
incorporation of favorable mutations in asexual populations. *Science* **311**, 1615-1617,
doi:10.1126/science.1122469 (2006).
- 26 Imhof, M. & Schlotterer, C. Fitness effects of advantageous mutations in evolving *Escherichia
coli* populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of
America* **98**, 1113-1117 (2001).
- 27 Zeyl, C. Experimental evolution with yeast. *Fems Yeast Research* **6**, 685-691,
doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00061.x (2006).
- 28 Burch, C. L. & Chao, L. Evolution by small steps and rugged landscapes in the RNA virus phi
6. *Genetics* **151**, 921-927 (1999).
- 29 Wright, S. The roles of mutation, inbreeding, crossbreeding, and selection in evolution.
Proceedings of the Sixth International Congress on Genetics, doi:citeulike-article-id:2704922
(1932).
- 30 Perfeito, L., Fernandes, L., Mota, C. & Gordo, I. Adaptive mutations in bacteria: High rate and
small effects. *Science* **317**, 813-815, doi:10.1126/science.1142284 (2007).
- 31 Kibota, T. T. & Lynch, M. Estimate of the genomic mutation rate deleterious to overall fitness
in *E. coli*. *Nature* **381**, 694-696 (1996).
- 32 Maisnier-Patin, S. *et al.* Genomic buffering mitigates the effects of deleterious mutations in
bacteria. *Nat Genet* **37**, 1376-1379, (2005).
- 33 Rozen, D. E., de Visser, J. & Gerrish, P. J. Fitness effects of fixed beneficial mutations in
microbial populations. *Current Biology* **12**, 1040-1045 (2002).
- 34 Gerrish, P. J. & Lenski, R. E. The fate of competing beneficial mutations in an asexual
population. *Genetica* **102-103**, 127-144 (1998).
- 35 Miralles, R., Moya, A. & Elena, S. F. Diminishing returns of population size in the rate of RNA
virus adaptation. *Journal of Virology* **74**, 3566-3571 (2000).
- 36 Fogle, C. A., Nagle, J. L. & Desai, M. M. Clonal Interference, Multiple Mutations and
Adaptation in Large Asexual Populations. *Genetics* **180**, 2163-2173,
doi:10.1534/genetics.108.090019 (2008).
- 37 De Visser, J. & Rozen, D. E. Limits to adaptation in asexual populations. *Journal of
Evolutionary Biology* **18**, 779-788, doi:10.1111/j.1420-9101.2005.00879.x (2005).
- 38 Arjan, J. A. *et al.* Diminishing returns from mutation supply rate in asexual populations.
Science **283**, 404-406 (1999).
- 39 Buckling, A., Wills, M. A. & Colegrave, N. Adaptation Limits Diversification of Experimental
Bacterial Populations. *Science* **302**, 2107-2109, doi:10.1126/science.1088848 (2003).
- 40 Sanjuan, R., Moya, A. & Elena, S. F. The contribution of epistasis to the architecture of fitness
in an RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15376-15379, doi:0404125101 [pii]
10.1073/pnas.0404125101 [doi] (2004).
- 41 Rozen, D. E., Habets, M. G., Handel, A. & de Visser, J. A. Heterogeneous adaptive
trajectories of small populations on complex fitness landscapes. *PLoS One* **3**, e1715,
doi:10.1371/journal.pone.0001715 [doi] (2008).
- 42 Bertani, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia
coli*. *J Bacteriol* **62**, 293-300 (1951).
- 43 Rozen, D. E. & Lenski, R. E. Long-Term Experimental Evolution in *Escherichia coli*. VIII.
Dynamics of a Balanced Polymorphism. *Am Nat* **155**, 24-35, doi:AN980435 [pii]
10.1086/303299 [doi] (2000).
- 44 Habets, M., Rozen, D. E., Hoekstra, R. F. & de Visser, J. The effect of population structure on
the adaptive radiation of microbial populations evolving in spatially structured environments.
Ecology Letters **9**, 1041-1048, doi:10.1111/j.1461-0248.2006.00955.x (2006).
- 45 Gordo, I. & Campos, P. R. Adaptive evolution in a spatially structured asexual population.
Genetica **127**, 217-229, doi:10.1007/s10709-005-4012-9 [doi] (2006).
- 46 Habets, M., Czarán, T., Hoekstra, R. F. & de Visser, J. Spatial structure inhibits the rate of
invasion of beneficial mutations in asexual populations. *Proceedings of the Royal Society B-
Biological Sciences* **274**, 2139-2143, doi:10.1098/rspb.2007.0529 (2007).
- 47 Perfeito, L., Pereira, M. I., Campos, P. R. & Gordo, I. The effect of spatial structure on
adaptation in *Escherichia coli*. *Biol Lett* **4**, 57-59, doi:JJP610588840U347
[pii]10.1098/rsbl.2007.0481 [doi] (2008).

- 48 Perfeito, L., Gordo, I. & Campos, P. R. A. The effect of spatial structure in adaptive evolution. *European Physical Journal B* **51**, 301-306, doi:10.1140/epjb/e2006-00222-x (2006).
- 49 Maisnier-Patin, S., Berg, O. G., Liljas, L. & Andersson, D. I. Compensatory adaptation to the deleterious effect of antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology* **46**, 355-366 (2002).
- 50 Levin, B. R., Perrot, V. & Walker, N. Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics* **154**, 985-997 (2000).
- 51 Hosaka, T. *et al.* The novel mutation K87E in ribosomal protein S12 enhances protein synthesis activity during the late growth phase in *Escherichia coli*. *Molecular Genetics and Genomics* **271**, 317-324, doi:10.1007/s00438-004-0982-z (2004).
- 52 Timms, A. R., Steingrimsdottir, H., Lehmann, A. R. & Bridges, B. A. MUTANT SEQUENCES IN THE RPSL GENE OF ESCHERICHIA-COLI B/R - MECHANISTIC IMPLICATIONS FOR SPONTANEOUS AND ULTRAVIOLET-LIGHT MUTAGENESIS. *Molecular & General Genetics* **232**, 89-96 (1992).
- 53 Schrag, S. J., Perrot, V. & Levin, B. R. Adaptation to the fitness costs of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **264**, 1287-1291 (1997).
- 54 Sander, P. *et al.* Fitness cost of chromosomal drug resistance-conferring mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 1204-1211, doi:10.1128/aac.46.5.1204-1211.2002 (2002).
- 55 Bjorkman, J., Hughes, D. & Andersson, D. I. Virulence of antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 3949-3953 (1998).
- 56 Trindade, S. *et al.* Positive Epistasis Drives the Acquisition of Multidrug Resistance. *Plos Genetics* **5**, doi:10.1371/journal.pgen.1000578 (2009).
- 57 Eyre-Walker, A. & Keightley, P. D. The distribution of fitness effects of new mutations. *Nat Rev Genet* **8**, 610-618 (2007).
- 58 Gillespie, J. H. Molecular Evolution Over the Mutational Landscape. *Evolution* **38**, 1116-1129 (1984).
- 59 Bataillon, T. Estimation of spontaneous genome-wide mutation rate parameters: whither beneficial mutations? *Heredity* **84**, 497-501 (2000).