



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”
Multidisciplinario
10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México
ISBN: 978-607-95635

Análisis evolutivo de la adhesión: Evidencia de selección positiva operante sobre el locus AlpAB y el gen horB de *Helicobacter pylori*.

Andrés Julián Gutiérrez-Escobar¹

¹Biólogo, Maestría en Ciencias Básicas Médicas. Investigador-Docente Facultad de Medicina U.D.C.A, Coordinador Laboratorio de Biología Molecular, Grupo de Ciencias Básicas y Genética Humana Aplicada (GIBGA). Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales-U.D.C.A, Bogotá, Colombia. E-mail: andresgutierrez@colombia.com

Resumen

La adherencia es un proceso clave para la infección por *Helicobacter pylori*. Las adhesinas, AlpA, AlpB y HorB han llamado la atención debido a: i) Su papel en la adherencia, ii) La activación diferencial de vías de señalización en la célula hospedera entre cepas asiáticas y europeas y iii) Su papel en la supervivencia de la bacteria según estudios de delección. Se descargaron las secuencias para AlpA, AlpB y HorB desde Uniprot y fueron alineadas en Muscle. Se usó Mega 5.1, PhyML 3.0.1, DNAsp 5.0 y PAML 4.5 para la reconstrucción filogenética, la identificación de eventos de selección positiva, purificadora y neutral y análisis genéticos poblacionales. Los genes *alpA*, *alpB* y *horB* siguen un modelo evolutivo de nacimiento y muerte de genes bajo selección purificadora. Se detectaron patrones de diferenciación genética significativos para *alpA* entre las cepas de América-Europa (FsT 0,51395) y de Europa-Asia (FsT 0,46030) y para *alpB* entre poblaciones de América-Europa (FsT 0,43711); datos soportados por la prueba McDonald y Kreitman. Seguidamente, mediante la herramienta PAML 4.5 se detectó que un 9,51% de la proteína AlpA, un 8,5% de la proteína AlpB y un 5% de

1 | “Congreso Internacional de Investigación e Innovación 2014” Multidisciplinario, 10 y 11 de abril de 2014. México



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

la proteína HorB están bajo selección positiva determinando la presencia de linajes selectivos de *H. pylori* para zonas geográficas específicas que posiblemente favorecen diferencialmente la adherencia al hospedero. Se concluye que los genes codificantes para las adhesinas AlpAB y HorB tienen procesos de adaptación locales correlacionados con los orígenes filogeográficos de las cepas analizadas.

Abstract

The adherence to the epithelial gastric cell is a key step in the physiopathology of *Helicobacter pylori* infection. There are several outer membrane proteins involved in the adherence that are expressed in a sequential fashion, meanwhile the attachment to the host cell takes place. Currently, the adhesins AlpA, AlpB and HorB have attracted the attention because of i) its role in the adherence, ii) The differential activation of intracellular pathways in the gastric host epithelial cell between Asian and European strains and iii) in its role in the fitness according to gene deletion studies. It is largely known that *H. pylori* have a global distribution with regional divergent populations that have evolved following host conditions. Here, it was identified that the evolutionary history of alpA, alpB and HorB adhesins followed a birth and death evolution model under purifying selection in which the deleterious mutations have been actively purged from the population allowing the fixation of beneficial changes for the fitness. It was detected based on



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

permutation tests that *H. pylori*'s populations from America-Europe (FsT0.51395.) and Asia-Europe (FsT 0.46030) for alpA and the populations from America-Europe (FsT 0.43711) for alpB present a significant genetic differentiation mediated by positive selection as suggest by the MKT test results. Finally, it was found using PAML that a 9.51% of alpA, a 8.5% of alpB and a 5% of HorB proteins evolved under strong specific positive selection following lineage specific geographic patterns.

Palabras clave: Adhesión, locus AlpAB, selección positiva, hipótesis de la reina roja, coevolución.

Introducción

Helicobacter pylori es una bacteria Gram-negativa de la microbiota normal del estómago humano (Bik *et al.* 2006; Mbulaiteye *et al.* 2009). Su infección activa se asocia con úlcera, gastritis y cáncer gástrico (Blaser *et al.* 1995); la bacteria ha logrado adaptarse a la mucosa gástrica del hospedero (Algood & Cover, 2006; Kusters *et al.* 2006). Las poblaciones de *H. pylori* son genéticamente diversas y



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

están geográficamente aisladas (Achtman *et al.* 1999; Falush *et al.* 2003; Kersulyte *et al.* 2000; Suerbaum *et al.* 1998) produciendo linajes geográficos específicos (Falush *et al.* 2003; Liu *et al.* 2005; Covacci *et al.* 1999). Este tipo de estructura poblacional coevoluciona localmente con el hospedero (Algood & Cover, 2006) lo que explica la existencia de genes que evolucionan bajo selección positiva (Covacci *et al.* 1999), como por ejemplo, *cagA* (Delgado *et al.* 2011), *vacA*, *BabA*, *OpiA*, *SabA* (Torres *et al.* 2010) y *Sel1* (Masako *et al.* 2007).

Las adhesinas AlpA, AlpB y HorB han sido ampliamente estudiadas. AlpA/B conforman un operón (Odenbreit, 1999) e inducen la expresión de interleucinas del hospedero (Odenbreit, 1999; Lu *et al.* 2007). Por otro lado, HorB además de ser una adhesina es un factor de colonización importante para la bacteria (Snelling *et al.* 2007). La delección de estos genes reduce la expresión de IL-6 y IL-8 diferencialmente entre cepas asiáticas y europeas (Lu *et al.* 2007) y disminuye significativa (entre el 60 al 70%) la capacidad de adhesión a la célula hospedera. Sin embargo, a la fecha los procesos evolutivos que dan forma a los representantes modernos de estas tres proteínas para los diferentes linajes de *H. pylori* se desconocen (Kwong & Tiing, 2010).



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

Metodología

Se empleo la metodología propuesta por Delgado *et al.* (2011). Se realizó Blast (Altschul *et al.* 1997) en Uniprot con las secuencias: O25570 (AlpA), O25595 (AlpB) y O24941 (HorB) de la cepa 26695 contra los genomas: África J99 NC_000921, SouthAfrica7 NC_017361.1, Gambia 94/24 NC_017371.1, América: Cuz20 NC_017358.1, Shi470 NC_010698, V225d CP001582, Europa: 26695 NC_000915, HPGA1 NC_008086, P12 CP001217, G27 NC_011333 y Asia: F16 NC_017368.1, 35A NC_017360.1, 51 NC_017382.1 e India7 NC_017372.1. Las secuencias de los genomas se eligieron según la epidemiología molecular revisada en Suzuki *et al.* (2012). Los homólogos identificados se alinearon con Muscle (Edgar, 2004).

Se usó Jmodeltest (Posada, 2008) para identificar el modelo evolutivo y DNAsp5.0 (Librado & Rozas, 2009) para las pruebas MKT McDonald-Kreitman, Permutación (FsT bajo 50000 réplicas), y de recombinación. Se usó MEGA 5.1 (Tamura *et al.* 2011) para la prueba Tajima (Tajima, 1989) y la prueba Z (Zhang *et al.* 1998). Para la reconstrucción filogenética se utilizó PhyML 3.0.1 (Guindon *et al.* 2010), estimando las opciones Ts/Tv, la proporción de sitios no variables y la distribución Gamma; la robustez estadística se obtuvo mediante 1000 repeticiones Bootstrap. Los árboles filogenéticos se visualizaron en la herramienta Njplot (Perrière & Gouy, 1996). El análisis de selección positiva se desarrollo usando PAML 4.5



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”
Multidisciplinario
10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México
ISBN: 978-607-95635

(Yang, 2007) y se empleó el árbol generado por el servidor selecton (Stern *et al.* 2007). Se emplearon las metodologías propuestas por Yang *et al.* 2005; 2000; Yang & Swanson, 2002; Yang, 1998; Yang & Nielsen, 2002; Zhang *et al.* 2005. Se realizó la prueba *Likelihood ratio test* usando la herramienta Jmodel test.

Resultados y discusión

La filogenia para alpA, alpB y HorB replica relativamente fiel la filogenia aceptada para *H. pylori* (Suzuki *et al.* 2012). Se observan múltiples eventos de duplicación que dieron origen a representantes modernos acumulando más cambios sinónimos que no sinónimos (alpApS = 0,081 y pN = 0,0031, alpBpS = 0.1007 y pN = 0,0283, HorBpS = 0.0890 y pN = 0,0082), siguiendo un modelo de evolución de nacimiento y muerte de genes mediado por selección purificadora (Figura 1). Los resultados de la prueba Tajima (D) son negativos para los tres genes, indicando una expansión poblacional con una baja frecuencia de polimorfismo, (Tabla 1). Bajo este modelo evolutivo, se eliminan alelos deletéreos con efectos negativos para el “fitness” de las poblaciones del patógeno, lo que genera un espacio selectivo para la fijación de mutaciones benéficas.



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

Recientemente, se identificaron marcadas diferencias funcionales entre cepas del este y del oeste con respecto a la activación de señales proinflamatorias en la célula hospedera mediadas por el locus AlpAB (Lu *et al.* 2007), lo que sugiere la existencia de eventos selectivos variables entre cepas de diferentes regiones del globo. Los resultados de los análisis de permutación permitieron detectar diferencias significativas para alpA entre las poblaciones de América-Europa (F_{ST} 0, 51395) y de Europa-Asia (F_{ST} 0,46030); además, también se reporta por primera vez una diferencia significativa para el gen alpB entre las poblaciones de América-Europa (F_{ST} 0,43711) ocurrida por eventos de selección direccional o selección positiva (Tabla 2).

Los modelos selectivos M2 y M3 lograron detectar sitios bajo selección positiva, sin embargo, su poder predictivo disminuye por eventos de recombinación que fue predicho para los tres genes (Tabla 1). Por este motivo se empleó el modelo M8 (Yang, 2007). Es importante aclarar que sólo se muestran los residuos bajo selección positiva identificados por el modelo que mejor explica la evolución según prueba LRT (*Likelihood Ratio Test*) (Tabla 3). El 9,5% del gen alpA, el 8,5% del gen alpB y el 5% del gen están bajo selección positiva, lo cual es significativo si se comparan con los estudios realizados para la región 3' del gen *cag* con un 6,95% o *babA* con un 9,4% (Masako *et al.* 2007).



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

Las proteínas AlpA, AlpB y HorB son inmunodominantes lo que probable produce la carrera adaptativa entre *H. pylori* y su hospedero. Estos resultados sugieren que estas adhesinas son mega diversas y están bajo selección positiva; lo que genera fenotipos adhesivos más virulentos connotando un nuevo papel de la adhesión en la diferenciación local de cepas (Tabla 4). Geográficamente el gen *alpA* varía diferencialmente por eventos de selección positiva, mostrando líneas evolutivas independientes; lo cual sugiere que los procesos selectivos son locales para con esta enzima constituyéndose quizás como un nuevo marcador de virulencia. Para el gen *alpB*, no se detectaron eventos selectivos para los representantes del linaje africano, pero sí se identificaron residuos bajo selección positiva para los linajes americano, asiático y europeo respectivamente. Los eventos selectivos son particularmente intensos para el linaje asiático; lo que quizás se correlaciona con la prevalencia de cáncer gástrico encontrada en la región (Tabla 5).



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”
Multidisciplinario
10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México
ISBN: 978-607-95635

Conclusiones

El modo de evolución bajo selección purificadora purga fenotipos deletéreos en términos de la adhesión haciendo más agresiva a las cepas circulantes. Se están generando variantes locales del patógeno en términos de la adherencia mediados por eventos de selección positiva sobre locus AlpAB y HorB que benefician el fitness de las poblaciones del patógeno. Esto significa que las cepas de cada región geográfica evolucionan de manera independiente con respecto a estos genes. El locus AlpAB y el gen HorB están evolucionando bajo presiones evolutivas locales estableciendo una carrera coevolutiva con el hospedero; ya que ambas especies presentan una velocidad diferencial adaptativa en la que el patógeno persigue a su hospedero que se podría explicar bajo la hipótesis coevolutiva de la reina roja (Woolhouse *et al.* 2002).



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

Bibliografía

ACHTMAN, M.; AZUMA, T.; BERG DE, ITO.; MORELLI, G.; PAN, Z.; SUERBAUM, S.; THOMPSON, S.; VAN DER ENDE, A.; VAN DOORN, L. 1999. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol. Microbiol.* (Alemania) 32 (3): 459-470.

ALGOOD, H.; COVER, T. 2006. *Helicobacter pylori* persistence: An overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev* (USA).19 (4): 597-613.

BIK, EM.; ECKBURG, P.B.; GILL, S.R.; NELSON, K.E.; PURDOM, E.A.; FRITZ, F.; PEREZ-PEREZ, G.; BLASER, M.J.; RELMAN, D.A. 2006. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (3): 732-737.



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

BLASER, M.; PEREZ, G.; KLEANTHOUS, H.; COVER, T.; PEEK, R.; CHYOU, P.; STEMMERMANN, Y.; NOMURA, A. 1995. Infection with *Helicobacter pylori* strains processing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res. (USA)*. 55 (10): 2111-2115.

COVACCI, A.; TELFORD, J.L.; GIUDICE, G.D.; PARSONNET, J.; RAPPUOLI, R. 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science (Italia)*. 284 (5418): 1328-1333.

DELGADO-ROSADO, G.; DOMINGUEZ-BELLO, M.G.; MASSEY, S.E. 2011. Positive selection on a bacterial oncoprotein associated with gastric cancer. *Gut Pathogen (Puerto Rico)*. 3: 18-22.

EDGAR, R.C. 2004. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32(5):1792-1797.

FALUSH, D.; WIRTH, T.; LINZ, B.; PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; KIDD, M.; BLASER, M.J.; GRAHAM, D.Y.; VACHER, S.; PEREZ-PEREZ, G.I.; YAMAOKA, Y.; MÉGRAUD, F.; OTTO, K.; REICHARD, U.; KATZOWITSCH, E.; WANG, X.; ACHTMAN, M.; SUERBAUM, S. 2003. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science. (Alemania)*. 299 (5612):1582-1585.

GUINDON, S.; DUFAYARD, J.F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W.; GASCUEL, O. 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML3.0. *Syst. Biol. (Francia)*. 59 (3): 307-321.

KERSULYTE, D.; MUKHOPADHYAY, A.K.; VELAPATIÑO, B.; SU, W.; PAN, Z.; GARCIA, C.; HERNANDEZ, V.; VALDEZ, Y.; MISTRY, R.S.; GILMAN, R.H.; YUAN, Y.; GAO, H.; ALARCÓN, T.; LÓPEZ-BREA, M.; BALAKRISH NAIK, G.; CHOWDHURY, A.; DATTA, S.; SHIRAI, M.; NAKAZAWA, T.; ALLY, R.; SEGAL, I.; WONG, B.C.; LAM, S.K.; OLFAT, F.O.; BORÉN, T.; ENGSTRAND, L.; TORRES,



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

O.; SCHNEIDER, R.; THOMAS, J.E.; CZINN, S.; BERG, D.E. 2000 Differences in genotypes of *Helicobacter pylori* from different human populations. *J. Bacteriol. (USA)*. 182 (11): 3210-3218.

KUSTERS, J.G.; VAN VLIET, A.H.M.; KUIPERS, E.J. 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Microbiol. Rev (Holanda)*. 19 (3): 449-490.

KWONG MING, F.; TIING LEONG, A. 2010. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Asia. *J. Gastroent. Hepatol. (China)*. 25 (3): 479-486.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics (España)*. 25 (11): 1451-1462.

LIU, Y.; PONSIOEN, C.I.J.; XIAO, S.; TYTGAT, G.N.J.; TEN KATE, F.J.W. 2005. Geographic pathology of *Helicobacter pylori* gastritis. *Helicobacter*. 10 (2): 107-113.

LU, H.; WU, J.Y.; BESWICK, E.J.; OHNO, T.; ODENBREIT, S.; HAAS, R.; REYES, V.E.; KITA, M.; GRAHAM, D.Y.; YAMAOKA, Y. 2007. Functional and intracellular signaling differences associated with the *Helicobacter pylori* AlpAB adhesin from Western and East Asian strains. *J. Biol. Chem. (USA)*. 282 (9): 6242-6254.

MASAKO OGURA, J.; PEREZ, C.; MITTL, P.R.E.; HAE-KYUNG, L.E.E.; GEIDRIUS, SHUMIN, T.; YOSHIYUKI, I.T.O.; OUSMAN, S.; DAIVA, D.; KALYANI, PUTTY.; BERG, D.; AWDHESH, K. 2007. *Helicobacter pylori* Evolution: Lineage-Specific Adaptations in Homologs of Eukaryotic Sel1-Like Genes. *PLoS Comput. Biol. (USA)*. 3 (8): e151.

MBULAITEYE, S.M.; HISADA, M.; EL-OMAR, E.M. 2009. *Helicobacter pylori* associated global gastric cancer burden. *Front. Biosci. (USA)*. 14:1490-1504.



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

ODENBREIT, S.; TILL, M.; HOFREUTER, D.; FALLER, G.; HAAS, R. 1999. Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol. Microbiol* 31 (5):1537-1548.

PERRIÈRE, G.; GOUY, M. 1996. WWW-Query: An on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie. (Francia)* 78 (5): 364-369.

POSADA, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25 (7): 1253-1256.

SNELLING, W.J.; MORAN, A.P.; RYAN, K.A.; SCULLY, P.; MCGOURTY, K.; COONEY, J.C.; ANNUK, H.; O'TOOLE, P.W. 2007. *HP0127* is a gastric epithelial cell adhesin. *Helicobacter*. 12 (3): 200-209.

STERN, A.; DORON-FAIGENBOIM, A.; PEREZ, E.; MARTZ, E.; BACHARACH, E.; PUPKO, P. 2007. Selecton 2007: advanced models for detecting positive and purifying selection using a Bayesian inference approach. *Nucleic Acids Res. (Israel)*. 35(Web Server issue): W506–W511.

SUERBAUM, S.; SMITH, J.M.; BAPUMIA, K.; MORELLI, G.; SMITH, N.H.; KUNSTMANN, E.; DYREK, I.; ACHTMAN, M. 1998 Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (Alemania)*. 95(21):12619-12624.

SUZUKI, R.; SHIOTA, S.; YAMAOKA, Y. 2012. Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of *Helicobacter pylori*. *Infect. Genet. Evol. (Japan)*. 12 (2): 203-213.

TAJIMA, F. 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics (Japan)*. 123(3):585-595.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* (Japan). 28(10):2731-2739.

TORRES, A.; GIONO, S.; CAMORLINGA, M.; CARLOS, F.; VARGAS, C.; TORRES, J. 2010. Evolution of bacterial genes: Evidences of positive Darwinian selection and fixation of base substitutions in virulence genes of *Helicobacter pylori*. *Infect. Gen. Evol.* 10 (6): 764-776.

WOOLHOUSE, M.E.; WEBSTER, J.P.; DOMINGO, E.; CHARLES WORTH, B.; LEVIN, B.R. 2002 Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nat. Genet.* (Belgica). 32(4):569-577.

YANG, Z. 1998. Likelihood ratio tests for detecting positive selection and application to primate lysozyme evolution. *Mol. Biol. Evol.* 15(5): 568-573.

YANG, Z.; NIELSEN, R. 2002 Codon-substitution models for detecting molecular adaptation at individual sites along specific lineages. *Mol. Biol. Evol.* 19 (6): 908-917.

YANG, Z.; NIELSEN, R.; GOLDMAN, N.; PEDERSEN, A.MK. 2000. Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. *Genetics.* 155 (1): 431-449.

YANG, Z.; SWANSON, WJ. 2002. Codon-substitution models to detect adaptive evolution that account for heterogeneous selective pressures among site classes. *Mol. Biol. Evol.* 19 (1): 49-57.

YANG, Z.; WONG, W.; NIELSEN, R. 2005. Bayes empirical Bayes inference of amino acid sites under positive selection. *Mol. Biol. Evol.* 22 (4): 1107-1118.

YANG, Z. 2007. PAML 4: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol. Biol. Evol.* 13 (5): 555-566.



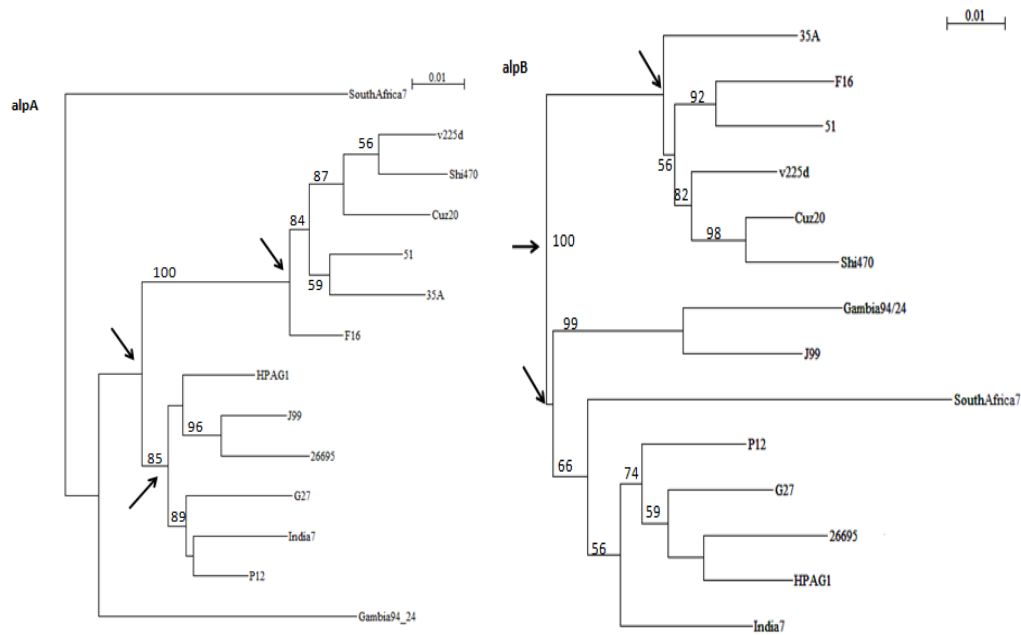
“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”
Multidisciplinario
10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México
ISBN: 978-607-95635

ZHANG, J.; NIELSEN, R.; YANG, Z. 2005. Evaluation of an improved branch-site likelihood method for detecting positive selection at the molecular level. *Mol. Biol. Evol.* (USA). 22 (12): 2472-2479.

ZHANG, J.; ROSENBERG, H.F.; NEI, M. 1998. Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 (7): 3708-3713.



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”
Multidisciplinario
 10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México
 ISBN: 978-607-95635





“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”
Multidisciplinario
 10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México
 ISBN: 978-607-95635

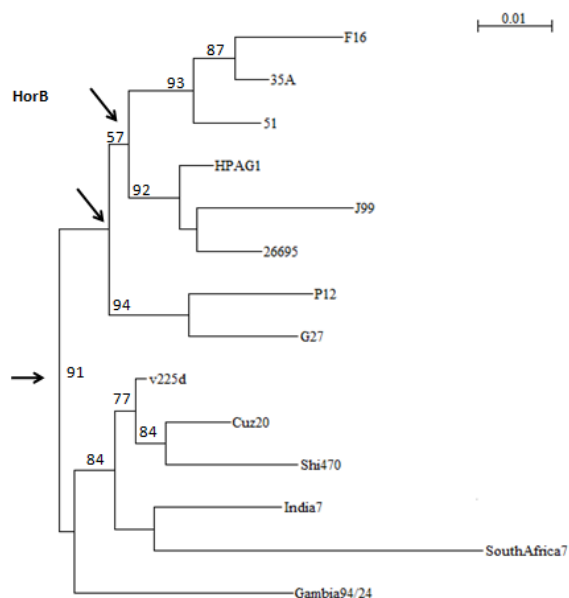


Figura 1. Árboles filogenéticos desarrollados para *alpA*, *alpB* y *HorB* con la herramienta PhyML 3.4.1 con 42 secuencias representantes de genomas secuenciados de cepas de diferentes orígenes geográficos de la siguiente manera: América: Cuz20, v225d y Shi70, Asia: F16, 35A y 51, África: Gambia94/24, SouthAfrica7 y J99 y Europa: P12, G27 y 26695. Se aplicaron los modelos evolutivos GTR+G+I y HKY85 con 1000 repeticiones bootstrap. Se muestran valores bootstrap mayores a 50% y árboles consenso.

Tabla1. Propiedades evolutivas poblacionales de los genes *alpA*, *alpB* y *HorB*. La prueba Tajima se desarrolló a partir de 42 secuencias de ADN. Todas las posiciones con gaps y datos perdidos fueron eliminadas.

Prueba Parámetros						
Tajima	M	S	Ps	Θ	π	D
<i>alpA</i>	14	241	0,157208	0,049434	0,045705	-0,340035
<i>alpB</i>	14	277	0,181046	0,056930	0,052302	-0,366789



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”
Multidisciplinario
 10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México
 ISBN: 978-607-95635

HorB	14	104	0,120790	0,037983	0,033222	-0,559505
Z-test	N/Stat	Pos/Stat	Pur/Stat			
alpA	0,000/-7,016	1,000/-7,026	0,000/6,999			
alpB	0,000/-8,787	1,000/-8,920	0,000/9,106			
HorB	0,000/-8,098	1,000/-7,956	0,000/8,103			

m=número de secuencias, S=número de sitios segregantes, $ps=S/m$, $\Theta=ps/a1$, π =diversidad nucleotídica, y D es el estadístico de Tajima. La prueba Z se desarrollo en promedio.



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”
Multidisciplinario
 10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México
 ISBN: 978-607-95635

Tabla 2. Parámetros evolutivos y poblacionales de los genes alpA, alpB y horB. A) Prueba de diferenciación genética y permutación. B) Prueba de McDonald y Kreitman. RM: prueba de recombinación.

A.

Gene/Origen geográfico	FsT	RM	Valor (P>0,05)
alpA		54	0,0001
África-América	0,28669		
África-Europa	0,04535		
África-Asia	0,26891		
América-Europa	0,51395*		
América-Asia	0,23272		
Europa-Asia	0,46030*		
alpB		67	0,0001
África-América	0,32362		
África-Europa	0,17963		
África-Asia	0,19328		
América-Europa	0,43711*		
América-Asia	0,15020		
Europa-Asia	0,23524		
horB		23	0,0001
África-América	0,10811		
África-Europa	0,04808		
África-Asia	0,08525		
América-Europa	0,32927		
América-Asia	0,23793		
Europa-Asia	0,11223		

B.

Gene	Fijos	Polimórficos	Índice de diversidad
AlpA			
América-Europa	12	73	0,395/alpha(0,605)
	20	48	
Europa-Asia	9	82	0,281/alpha(0,719)
	16	41	
AlpB			
América-Europa	8	83	0,263/alpha(0,737)
	15	41	



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”
Multidisciplinario
 10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México
 ISBN: 978-607-95635

Tabla 3. Prueba LRT (Likelihood test ratio) realizada bajo los parámetros de Yang *et al.* (2002) y Yang *et al.* (2000) para los genes alpA, alpB y horB. GL: grados de libertad. LRT: estadístico de prueba. MS: modelo seleccionado.

Gene	Modelos	GL	LRT	(p>0.05)	MS
alpA					
Yang et al. (2000).	M0-M2	2	537,9	0,0001	M3
	M1-M2	2	132,0	0,0001	M8
	M0-M3	4	545,7	0,0001	
	M1-M3	4	139,8	0,0001	
	M2-M3	2	7,74	0,02	
	M7-M8	2	132,3	0,0001	
Yang et al. (2002).	M0-M2	2	567,9	0,0001	M3
	M1-M2	2	136,6	0,0001	M8
	M0-M3	4	577,9	0,0001	
	M1-M3	4	146,6	0,0001	
	M2-M3	2	10,0	0,0001	
	M7-M8	2	135,7	0,0001	
alpB					
Yang et al. (2000).	M0-M2	2	527,8	0,0001	M3
	M1-M2	2	73,7	0,0001	M8
	M0-M3	4	535,3	0,0001	
	M1-M3	4	81,2	0,0001	
	M2-M3	2	7,5	0,02	
	M7-M8	2	74,2	0,0001	
Yang et al. (2002).	M0-M2	2	579,8	0,0001	M3
	M1-M2	2	79,7	0,0001	M8
	M0-M3	4	594,0	0,0001	
	M1-M3	4	93,9	0,0001	
	M2-M3	2	14,2	8,1E-4	



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”
Multidisciplinario
10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México
ISBN: 978-607-95635

	M7-M8	2	81,2	0,0001	
HorB					
Yang et al. (2000).	M0-M2	2	432,6	0,0001	M1
	M1-M2	2	3,88	0,14	M8
	M0-M3	4	434,72	0,0001	
	M1-M3	4	5,96	0,20	
	M2-M3	2	2,08	0,35	
Yang et al. (2002).	M7-M8	2	8,36	0,01	
	M0-M2	2	113,5	0,0001	M3
	M1-M2	2	16,9	2,1E-4	M8
	M0-M3	4	106,6	0,0001	
	M1-M3	4	10,0	0,04	
	M2-M3	2	6,88	0,03	
	M7-M8	2	25,4	3,0E-6	

Tabla 4. Detección de sitios bajo selección positiva a nivel poblacional para los genes alpA, alpB y horB. NEB (sitios con * = P > 95%. Sitios con ** = P > 99%).

Gen/Proteína	-lnL	Modelos	Parámetros	Sitios bajo selección positiva
alpA Yang et al. (2000).	4459,36	M3	p0=0,870w0= 0,017 p1=0,108 w1= 1,688 p2=0,021 w2= 11,741	NEB: 6R**, 47T**, 49R**, 94E**, 98G*, 108Q**, 113N**, 123G*, 124S**, 125S**, 126S**, 128T*, 144T**, 147V**, 160D*, 176G**, 190N**, 191G**, 192T**, 193S**, 198Q**, 199N**, 202T*, 205T**, 206Q**, 213D**, 216T*, 252A**, 266L**, 272T**, 273K**, 275T**, 280A**, 281V**, 283S**, 285I**, 287P**, 294N**, 295T**, 298S**, 301P**, 307A**, 315T*, 322R**, 337A**, 341L**, 348I**, 424F**, 462N**
	4465,52	M8	p= 0,012 q= 0,083 w= 8,81039	NEB:94E*, 108Q**, 125S**, 198Q**, 205T**, 206Q*, 266L**, 287P**, 337A**, 341L**



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

alpA Yang et al. (2002).	4710,62	M3	p0=0,859w0 = 0,020 p1=0,116w1 = 1,882 p2=0,023 w2= 11,26	BEB: 94E**, 108Q**, 125S**, 198Q**, 205T**, 206Q**, 266L**, 287P**, 294N*, 337A**, 341L**, 348I* NEB: 11R**, 52T**, 54R**, 99E**, 103G*, 113Q**, 118N**, 128G*, 129S**, 130S**, 131S**, 135T*, 151T*, 154V**, 167D*, 83G**, 196S**, 206S**, 207N**, 208G**, 211T**, 212S**, 217Q**, 218N**, 221T*, 224T**, 225Q**, 232D**, 235T*, 271A**, 285L**, 291T**, 292K*, 294T*, 299A**, 300V**, 302S**, 304G**, 305I**, 307P**, 317N**, 318T**, 321S**, 324P**, 330A**, 338T*, 345R**, 360A**, 364L**, 371I**, 447F**, 485N**
	4717,12	M8	p= 0,005 q= 0,020 w= 8,656	NEB: 99E*, 113Q**, 130S**, 217Q**, 224T**, 225Q*, 285L**, 307P**, 360A**, 364L** BEB: 99E**, 113Q**, 130S**, 206S**, 217Q**, 224T**, 225Q**, 285L**, 304G*, 307P**, 317N*, 360A**, 364L**, 371I*
alpA Yang, (1998); Yang et al.(2002) Yang et al.(2005) Zhang et al.(2005)	4715,63	Selección positivaNSsites = 2	p0=0,814 w0= 0,003 p1=0,150 w1= 1,000 p2=0,034 w2= 8,102	NEB:99E**, 113Q**, 130S**, 217Q**, 224T**, 225Q*, 285L**, 307P**, 360A**, 364L** BEB:99E**, 113Q**, 130S**, 217Q**, 224T**, 225Q*, 285L**, 307P**, 360A**, 364L**
alpB Yang et al. (2000).	4843,95	M3	p0=0,882 w0= 0,015 p1=0,108 w1= 1,464 p2=0,008 w2= 12,56	NEB: 23P**, 64N**, 71I**, 105S**, 106S**, 107I*, 108H*, 111G**, 112S**, 113S**, 114G**, 115A**, 117T**, 120T*, 121S**, 122S**, 123P**, 130A**, 134N*, 137S**, 143G**, 145Q**, 146I**, 147K**, 148N**, 160A**, 168E**, 177T**, 196N**, 199Q**, 200A**, 204G*, 213I**, 219I*, 226D**, 227S**, 231T**, 267D**, 269Q**, 297A**, 298R**, 314T**, 428R**, 448L**
	4848,91	M8	p= 0,006 q= 0,038 w= 9,388	NEB: 113S**, 122S**, 130A*, 160A** BEB: 112S**, 113S**, 114G*, 115A*, 117T*, 122S**, 130A**, 160A**, 231T**, 269Q*
alpB Yang et al. (2002).	5131,93	M3	p0=0,877 w0= 0,018 p1=0,117 w1= 1,814 p2=0,004w2= 32,31	NEB: 38P**, 79N**, 86I**, 120S**, 121S**, 124I*, 125H*, 128G*, 129A**, 135S**, 136G**, 137S**, 138S**, 139G**, 140A**, 142T**, 145A**, 151T*, 154S**, 155S**, 156P*, 163A**, 167N*, 170S**, 176G*, 178Q**, 179I**, 180K**, 181N**, 193A**, 201E**, 210T**, 229N**, 232Q**, 233A**, 237G*, 246I**, 259D**, 260S**, 264T**, 300D**, 302Q**, 330A**, 331R**, 347T**, 461R**, 481L**
	5141,65	M8	p= 0,010 q= 0,068 w= 8,733	NEB: 138S**, 145A*, 155S**, 163A*, 193A** BEB: 129A*, 137S**, 138S**, 139G*, 140A*, 145A**, 155S**, 163A**, 193A**, 264T**, 302Q*
alpB Yang (1998); Yang et al. (2002); Yang et al. (2005); Zhang et al.(2005)	5139,04	Selección positivaNSsites = 2	p0=0,846 w0= 0,007 p1=0,142 w1= 1,000 p2=0,011 w2= 9,624	NEB: 138S**, 145A*, 155S**, 163A*, 193A** BEB: 138S**, 145A**, 155S**, 163A**, 193A**, 264T*
HorB Yang et al. (2000).	2224,79	M1	p0=0,968 w0= 0,010 p1=0,031 w1= 1,000	84S, 192V, 213E, 266V, 269K
	2219,85	M8	p= 1,393 q= 99,000 w= 2,310	NEB:84S**, 126S*, 192V**, 213E**, 266V**, 269K** BEB: 192V**
HorB Yang et al. (2002).	2223,87	M3	p0=0,439 w0= 0,013 p1=0,535 w1= 0,013 p2=0,024 w2= 2,289	NEB: 85S**, 127S*, 193V**, 214E**, 267V**, 270K**
	2223,90	M8	p= 1,393 q= 99,000 w= 2,310	NEB:85S**, 127S*, 193V**, 214E**, 267V**, 270K** BEB:193V**
HorB Yang (1998); Yang et al. (2002); Yang et al. (2005); Zhang et al.(2005)	2220,39	Selección positivaNSsites = 2	p0=0,968 w0= 0,011 p1=0,027 w1= 1,000 p2=0,003 w2= 9,890	NEB: 193V** BEB: 193V**



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”
Multidisciplinario
10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México
ISBN: 978-607-95635

Tabla 5. Detección de sitios bajo selección positiva a nivel regional para los genes *alpA*, *alpB* y *horB*. NEB (sitios con * = $P > 95\%$. Sitios con ** = $P > 99\%$).

Gen/Proteína	-lnL	Modelos	Parámetros	Sitios bajo selección positiva
alpA				
África	2812,58	M2	p0=0,959 w0= 0,108 p1=0,000 w1= 1,000 p2=0,040 w2= 10,912	NEB: 94E*, 108Q**, 191I*, 193K**, 196G**, 205Q**, 212T*, 273L*, 302N*, 303T*, 470N** BEB: 108Q**, 193K*
	2812,59	M8	p= 12,092 q= 99,000 w= 10,937	NEB: 108Q**, 191I*, 193K**, 196G**, 205Q*, 212T*, 273L*, 302N*, 303T*, 470N** BEB: 108Q**, 193K*, 196G*, 205Q*, 212T*, 273L*, 303T*, 470N*
América	2373,98	M2	p0=0,990 w0= 0,430 p1=0,000 w1= 1,000 p2=0,009 w2= 250,80	NEB: 208Q**, 209Q**, 269S** BEB: 208Q*, 209Q*
	2373,98	M8	p= 69,954 q= 92,629 w= 250,873	NEB: 208Q**, 209Q**, 269S** BEB: 208Q*, 209Q*
Asia	2675,44	M2	p0=0,751 w0= 0,000 p1=0,241 w1= 1,000 p2=0,006 w2= 20,505	NEB: 199S**, 288S* BEB: 199S**, 288S**
	2675,72	M8	p= 0,005 q= 0,019 w= 8,868	NEB: 199S**, 288S* BEB: 199S**, 288S**
Europa	2554,40	M2	p0=0,880 w0= 0,000 p1=0,104 w1= 1,000 p2=0,014 w2= 29,337	NEB: 113S**, 125T*, 126S*, 288D** BEB: 113S**, 125T*, 126S**, 208Q*, 269A*, 288D**
	2554,41	M8	p= 0,011 q= 0,091 w= 27,665	NEB: 113S**, 125T*, 126S*, 288D** BEB: 113S**, 125T*, 126S**, 192R*, 208Q*, 269A*, 288D**
alpB				
América	2358,51	M2	p0=0,871 w0= 0,000 p1=0,036 w1= 1,000 p2=0,092 w2= 4,233	NEB: 106S*, 111G*, 112A*, 164Q*, 172E* BEB: Estadísticamente no significativos.
	2358,51	M8	p= 0,005 q= 1,995 w= 3,839	NEB: 69T**, 72N**, 106S**, 111G**, 112A**, 113S**, 114G**, 115T**, 116T**, 124N**, 164Q**, 172E**, 181T**, 202N**, 204G**, 207N**, 231G**, 270N**, 301A**, 304S**, 328P**, 440R** BEB: Estadísticamente no significativos.
Asia	2811,84	M2	p0=0,869 w0= 0,000 p1=0,000 w1= 1,000 p2=0,130 w2= 2,292	NEB: 38P**, 79N**, 120S**, 121S**, 123T**, 130S**, 132G**, 133S**, 134A**, 136T**, 139A**, 140S**, 141S**, 142S**, 143P**, 150T**, 157G**, 163S**, 165N**, 166I**, 167S**, 168K**, 191T**, 197A**, 216H**, 220A**, 224G**, 233V**, 235K**, 239I**, 246D**, 247S**, 271D**, 289Q**, 318R**, 334T**, 468L**, 495I**, 513F** BEB: 142S*
	2811,84	M8	p= 0,005 q= 2,933 w= 2,292	NEB: 38P**, 79N**, 120S**, 121S**, 123T**, 130S**, 132G**, 133S**, 134A**, 136T**, 139A**, 140S**, 141S**, 142S**, 143P**, 150T**, 157G**, 163S**, 165N**, 166I**, 167S**, 168K**, 191T**, 197A**, 216H**, 220A**, 224G**, 233V**, 235K**, 239I**, 246D**, 247S**, 271D**, 289Q**, 318R**, 334T**, 468L**, 495I**, 513F**



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”
 Multidisciplinario
 10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México
 ISBN: 978-607-95635

Europa	2589,21	M8	p= 8,313 q= 99,000 w= 4,424	BEB: 132G*, 142S** NEB: 120G**, 127A*, 129G**, 131G*, 135A* BEB: 120G*, 129G*
HorB				
África	1444,96	M8	p= 0,005 q= 0,092 w= 22,187	NEB: 84S* BEB: 84S*, 192V*
Asia	1375,96	M2	p0=0,965 w0= 0,016 p1=0,030 w1= 1,000 p2=0,003 w2= 29,746	NEB: 192V** BEB: no se detectaron sitios.
	1375,89	M8	p= 0,012 q= 0,241 w= 29,518	NEB: 192V** BEB: 192V*