

TUTORIAL DE EVOLUCION: USO DEL SIMULADOR FORENSIC-EA LITE EN SECUENCIAS DIDÁCTICAS PARA LA ENSEÑANZA DE EVOLUCIÓN MOLECULAR.

Introducción al simulador y su relación con la epidemiología molecular y filogenia

El programa ForensicEA Lite es una simulación que permite visualizar cómo poblaciones virales pueden evolucionar bajo la presión de selección del sistema inmune del huésped examinando los cambios genómicos a través de generaciones. En esta aplicación las mutaciones son beneficiosas ya que permiten seleccionar variantes que pueden escapar al sistema inmune. La base conceptual general de la simulación puede ser utilizada también para desentrañar aspectos de filogenia (como ser el desarrollado por el proyecto Genographic), forenses, epidemiológicos, o de filiación (como el caso de las abuelas de Plaza de Mayo).

La epidemiología molecular permite no sólo determinar el diagnóstico de enfermedades infecciosas sino también establecer patrones de transmisión. Por otro lado los estudios filogenéticos proporcionan las bases para reconstruir la historia evolutiva de los organismos. Las herramientas moleculares actuales, derivadas del análisis del ADN, permiten desentrañar no solamente aspectos filogenéticos y epidemiológicos, sino también forenses y de filiación puesto que están sustentadas bajo principios generales similares que tienen que ver con indicadores de distancias génicas. *¿Cómo podríamos acercar a nuestros alumnos estos aspectos tan abstractos relacionados con la evolución molecular, y transmitirles una idea general del procedimiento para que vivencien cómo se van desentrañando problemas epidemiológicos o de filogenia?*

Breve marco teórico: En este tutorial veremos los cambios a lo largo del tiempo de una población viral en un organismo. El inicio de una infección ocurre con el ingreso de una o pocas partículas virales en el sujeto. Una vez dentro del individuo los virus se reproducen y mutan. Las mutaciones ocurren durante la replicación del material genético del virus, de modo que las poblaciones virales incorporan cambios en su genoma y evolucionan continuamente generando una **diversidad genética**. La población viral se encuentra bajo la presión de selección del sistema inmune del huésped (esto es así en tanto y en cuanto haya partes del genoma viral que sinteticen proteínas que sean reconocidas y atacadas por el sistema inmune del huésped). Los cambios genómicos pueden ser beneficiosos, deletéreos o neutros, esto dependerá del impacto de estas mutaciones en el reconocimiento de las proteínas virales por parte del sistema inmune del huésped. Como resultado del proceso de selección sólo algunos virus sobrevivirán y podrán reproducirse. Se debe tener presente que la variación y la selección natural son ingredientes necesarios para la evolución. Por lo tanto, a medida que la población viral evoluciona acumulará cambios de nucleótidos en su genoma de manera tal que cuantas más generaciones transcurran mayor cantidad de mutaciones (diferencias nucleotídicas respecto al ADN/ARN del virus que inició la infección) habrá.

Una pregunta que surge es: ¿Cómo podríamos contabilizar los cambios en el material genético que se han generado a través de generaciones? La evolución de las poblaciones virales puede utilizarse para rastrear las cadenas de transmisión o contagio entre individuos, mediante el análisis de los cambios ocurridos en los genomas en una cadena de transmisión viral. Entonces también surge la pregunta: ¿es posible establecer regularidades que permitan sacar conclusiones válidas para el rastreo de una secuencia de infecciones?

ACTIVIDAD INICIAL: EXPLORANDO EL PROGRAMA FORENSICEA LITE.

Para ver el modelo en acción, inicia la aplicación ForensicEA Lite. Después de que el anuncio “Evolutionary Analysis” desaparece, aparecerá una ventana titulada “Divergence” (**Fig. 1**).

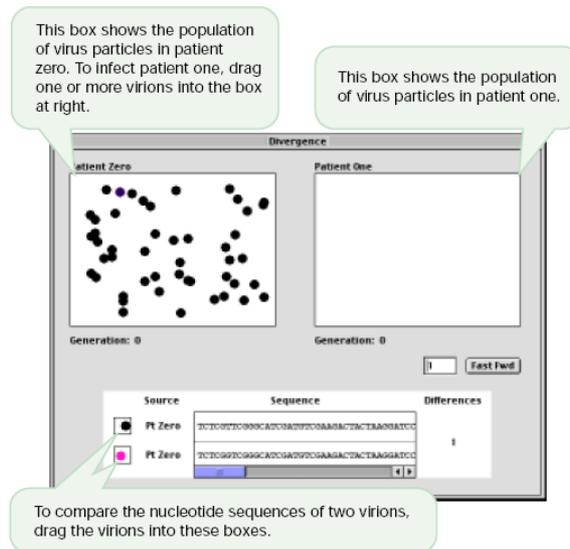


Fig. 1: Ventana “Divergence” de ForensicEA Lite

Alternativas de funcionamiento del programa:

El cuadro de arriba a la izquierda contiene la población de partículas del virus, que viven dentro de un paciente llamado *Paciente Cero*, porque él es el paciente con el cual se inicia la cadena de transmisión. El programa ofrece variantes que pueden manejarse desde la **pestaña File/Reset**. Allí se pueden especificar: a) el efecto de las mutaciones (seleccionando "beneficial", "neutra" o "deleterea"), b) el tamaño de la población de virus y c) el largo de la secuencia de ADN de cada virus. Los valores especificados al inicio son: Las mutaciones son beneficiosas, 50 virus por ventana y 100 nucleótidos de ADN por virus.

Ejercicio 1- Para obtener una mirada más cercana a un virus individual dentro del paciente, haz clic (derecho o izquierdo) y mantén presionado el botón del mouse sobre un virus. Se abrirá una ventana mostrando una imagen más realista del virus, y de la secuencia de ADN de parte de su genoma que es de 100 pares de bases de largo, (se puede variar el largo en el programa.).

Ejercicio 2- Un contador debajo de cada paciente indica el número de generaciones que han transcurrido desde que la infección comenzó. Abajo a la derecha está el botón “Fast Fwd” que permite hacer avanzar generaciones. En la ventanita al lado del botón se especifican el número de generaciones que transcurren por cada click del botón. El valor inicial en esta ventana es 1. Prueba de hacer correr una generación clickeando el botón con el número 1, y luego de hacer correr 60 cambiando este valor en la ventana.

Ejercicio 3- En la parte inferior puedes comparar las secuencias de dos virus. Esto se realiza haciendo clic con el mouse sobre un virus y arrastrándolo con el mouse presionado a las cajas pequeñas cuadradas en la parte inferior izquierda. Cuando se arrastra un virus a estos cuadros, ForensicEA Lite se muestra la identidad del paciente del cual vinieron y la secuencia de nucleótidos en el cuadro rectangular derecho. Si se arrastra un virus a cada cuadro, a la derecha se indica el número de diferencias entre las secuencias de nucleótidos. Las partículas virales de color negro son las que iniciaron la infección en el *paciente cero* y son *genéticamente idénticas entre sí*. Los virus de *otros colores son los mutantes* que difieren del fundador en uno o más nucleótidos del ADN. Compruebe esto arrastrando dos virus negros a los cuadros y comparando un virus negro con virus de diferentes colores.

ACTIVIDAD 2: EVOLUCIÓN VIRAL EN UN INDIVIDUO.

1- Para dar inicio al ejercicio, inicia una simulación y elige y arrastra un virus del *Paciente Cero* a la primera caja pequeña, mostrando su secuencia. Déjalo ahí para el resto de esta simulación, de forma de utilizarlo más tarde como un estándar para la comparación de las secuencias de los nuevos virus que se generen en sucesivas generaciones. **En esta actividad se trabajará sólo con el paciente Cero.**

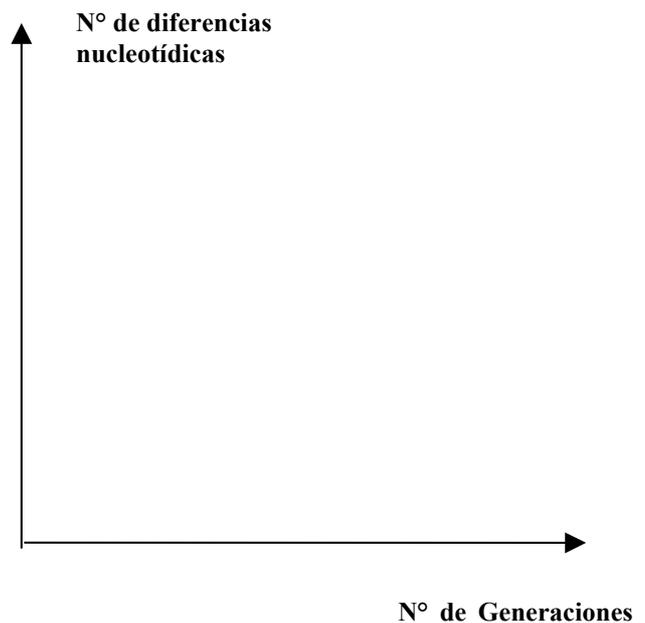
2- Una vez que has guardado un virus en la caja superior de comparación de secuencia, introduce un número, por ejemplo 60, en el cuadro de texto pequeño a la izquierda del botón de "Fast Fwd" y haz clic en el botón para que la simulación se ejecute por el número de generaciones especificado.

3- Cuando la simulación se detiene, toma un virus al azar (porqué uno solo? cómo elegirlo? podrían elegirse muchos?) y arrástralo al cuadro inferior de comparación de secuencias. Utiliza la planilla de cálculo EXCEL para armar una tabla como la **Tabla 1** y anota el número de diferencias entre el genoma original y el virus muestreado. Repite este procedimiento diez veces haciendo avanzar 60 generaciones (haciendo clic en el botón "Fast Fwd"). En cada paso, registra el número de diferencias entre el genoma de un virus al azar y el virus original. Cuando la población llega a 600 generaciones se **completa la Tabla 1.**

4- Una vez que hayas completado el paso 3, utiliza la planilla tabla de datos de la planilla EXCEL para dibujar un gráfico que muestre el número de diferencias nucleotídicas (**eje y**) como función del número de generaciones (**eje x**). Utiliza el modo de representación "XY Scatter"

GENERACIONES	Nº DE DIFERENCIAS NUCEOTÍDICAS
60	
120	
180	
240	
300	
360	
420	
480	
540	
600	

Tabla 1



Piensa y comenta lo que ocurrió en la simulación:

1- ¿A qué función se asimila el gráfico? ¿Que indicarían las pendientes de este grafico? ¿Qué significaría que diferentes tipos de virus o que un mismo virus en diferentes ambientes presenten diferentes pendientes?

2- Qué ocurre a medida que pasan las sucesivas generaciones virales? Qué relación tienen las generaciones con el tiempo de infección? ¿Cómo se realizaría un experimento real para comprobar cómo evolucionan las secuencias virales luego de una infección? El gráfico real, daría igual al simulado?

3- Si alguien te diese muestras congeladas de los virus de su paciente, ¿podrías hacer una conjetura en cuanto a qué tan lejos en el tiempo se recogieron las muestras? ¿Con qué deberías contar para poder responder?

4-¿Por qué podría un biólogo evolutivo pensar a los gráficos que ha preparado como relojes moleculares?

5- Qué ocurrirá con la simulación si se cambia las mutaciones de "beneficiosas" a "neutras" o "deletéreas"? Pueden probarlo.

ACTIVIDAD 3: DIVERGENCIA DE POBLACIONES VIRALES EN DOS INDIVIDUOS INFECTADOS

1- Inicia la simulación en el paciente cero y haz evolucionar la población por 100 generaciones, lo cual establece una población con variación genética (cómo nos damos cuenta de esto?).

2- "Infecta" al "paciente 1" con uno o dos virus del "paciente 0". Esto se realiza arrastrando uno o dos virus del "paciente cero" a la ventanilla del "paciente 1".

3- Determina el número de diferencias entre un genoma al azar del paciente 0 y el genoma del paciente 1. Arma en una planilla de cálculo EXCEL una tabla similar a la tabla 1 con una columna de "generaciones" y una de "diferencias". Anota este número de diferencias inicial como correspondiendo a "cero generaciones".

4- Haz evolucionar el sistema de 50 generaciones, y luego de cada ciclo compara dos virus al azar de cada población anotando el número de diferencias. Repite el proceso hasta llegar a 500 generaciones. Realiza un gráfico del número de diferencias entre las poblaciones en función del número de generaciones desde que divergieron. Qué se observa?

Piensa y comenta lo que ocurrió en la simulación:

1- Qué ocurre con las dos poblaciones virales a medida que pasan las generaciones?

2- Cuáles creen que serían las variaciones en el resultado si:

a) Se transfiere un tamaño grande de la población del paciente 0 al paciente 1 en vez de un virus? Pueden probarlo?

b) Qué ocurre con la divergencia si existe "transferencia horizontal" entre individuos, por ejemplo por re-infecciones? Cómo podemos simularlo con el programa? Prueben: cuan frecuentes tienen que ser las re-infecciones para 'borrar' la señal de divergencia?

MOMENTO DE CONCEPTUALIZACIÓN y DE CORRELACIÓN CONCEPTUAL: Completa la columna de la derecha de la Tabla de Correlación Conceptual con la información biológica relacionada con la simulación.

ACTIVIDAD 1 Y 2: EVOLUCIÓN VIRAL EN UN INDIVIDUO.	
Conceptos utilizados en el programa ForensicEA Lite -Situación Analógica-	Conceptos Científicos relacionados al proceso de reconstrucción filogenética.
Ventana del programa	
Esferas negras	
Sistema inmune del paciente	
Esferas de colores	
Diferencias que surgen al comparar el ADN de distintos virus	

ACTIVIDAD 4: SIMULACION Y ANALISIS DE ÁRBOLES EVOLUTIVOS

En esta simularemos cómo las poblaciones virales evolucionan en pacientes diferentes mediante representaciones llamadas árboles evolutivos. Esto nos permite comprender la evolución de poblaciones en general, y en esta simulación en particular, reconstruir una secuencia de transmisión viral.

Podemos enmarcar esta actividad y la siguiente en un estudio de caso, *imaginando que fueras un/una científic@ que actúa como perito en un juicio civil donde un individuo acusa a su doctor de haberlo contagiado con el virus del HIV y reclama indemnización. El doctor dice que es imposible que lo haya contagiado pues él toma todos los recaudos como para no haberlo hecho. El juez tiene que emitir su resolución en base a pruebas científicamente validadas, por ello te convoca como expert@ para que le des elementos para su dictamen. Aclaración:* El genoma del HIV puede ser estudiado a través del ARN de la partícula viral entera (virión) o a través del ADN integrado en el genoma (provirus) del organismo infectado. Cuando se inició la epidemia del SIDA, hubo varios casos que llegaron a los tribunales donde unos se acusaban a otros por el contagio. Cuando llegaron estas técnicas de análisis filogenético se pudo determinar la culpabilidad y hallar el patrón secuencial de transmisión.

PROCEDIMIENTO:

1- Cierren todas las ventanas en el ForensicEA Lite. Vayan al menú “simulation” y seleccionen el modo “tree”. Esto abre la ventana mostrada en la **Figura 2** pero sin el árbol, mostrando inicialmente sólo una caja conteniendo “virus”.

2- En esta simulación vamos a tratar con varios huéspedes individuales, nombrándolos te ayudará a mantenerlos en orden. Haz clic en el pequeño campo de texto blanco sobre la caja de la población, y escribe "PO" Esto significa "**POBLACIÓN ORIGINAL**" El PO sería un individuo infectado con HIV que vive en la misma ciudad que el paciente que se va a investigar, pero no se conoce de antemano si está cerca (o lejos) del paciente en la cadena de transmisión. **PO representa a la población de virus ancestral en el árbol que se irá construyendo. IMPORTANTE: Antes de seguir, guarda en una de las cajas de comparación de secuencias un virus de la ventana original de "PO".**

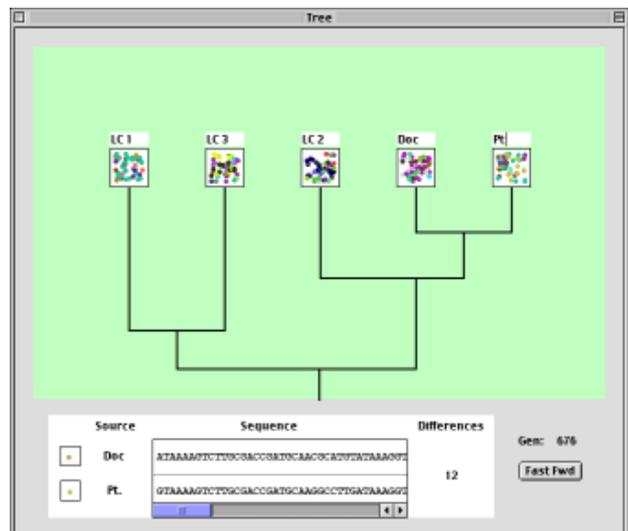


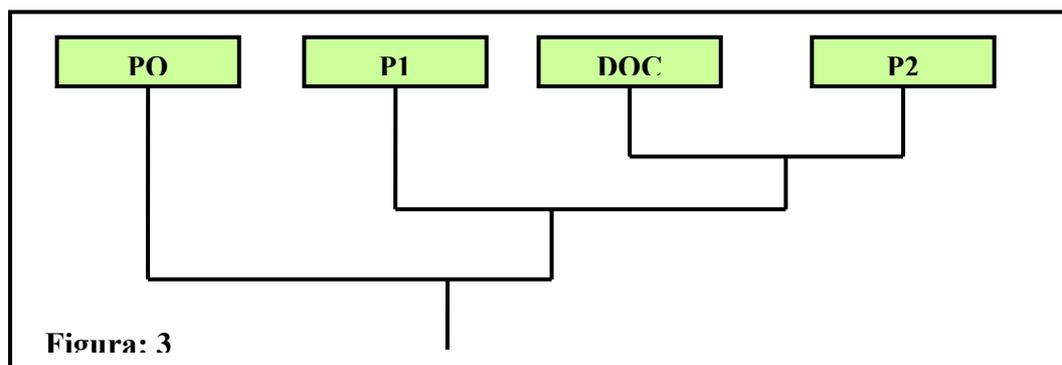
Figura 2: Se ilustra una de las ventanas del ForensicEA que representa el árbol evolutivo obtenido a partir de sucesivas infecciones virales en distintos pacientes a intervalos definidos de generaciones. La caja blanca inferior permite inspeccionar el genoma de un determinado virus haciendo clic y arrastrando el mismo a la caja de la izquierda. De esta manera se pueden comparar las secuencias de dos virus distintos en el transcurso de las generaciones analizando las diferencias nucleotídicas.

3- Haz clic en el botón “Fast Fwd” para iniciar la simulación. En este modo, la simulación corre por tiempo indefinido. Cuando la simulación corra por 200 generaciones más o menos, haz clic en la caja de la población de **PO**. Esto hará que en la pantalla aparezca una caja con una nueva población, que representa un nuevo huésped infectado por "PO". El ForensicEA Lite automáticamente infecta a este nuevo huésped con un virus escogido al azar de la población de **PO**.

4- Haz click en el botón “Pausa” y detiene la simulación. Asigna el nombre "**P1**" al nuevo infectado. Ten en cuenta que el programa está indicando que las poblaciones de virus en **PO** y **P1** están relacionadas entre sí con líneas dibujadas por debajo de las cajas de población que las conectan.

5- Ahora deja que la simulación corra por otras 200 generaciones hasta llegar a las 400 aproximadamente y nuevamente haz clic en **P1**. Detén la simulación y llama al nuevo huésped "**DOC**." Ahora deja correr 200 generaciones mas hasta llegar a las 600 generaciones y haz clic en **DOC**. Etiqueta el nuevo huésped "**P2**". Este huésped es el paciente que se está investigando, que en este escenario particular, se contagió HIV de **DOC** (tal vez mientras realizaba una cirugía.) Deja pasar 200 generaciones más y detén la simulación cuando llega a las 800 generaciones aproximadamente.

Tu árbol evolutivo debería verse como en la **Figura 3** (a pesar de que las longitudes de las ramas pueden ser diferentes)



Piensa y comenta lo que ocurrió en la simulación:

- 1- ¿Cómo refleja el árbol evolutivo el hecho que **DOC** pasó HIV a **P2** más recientemente de lo que **PO** pasó HIV a **P1**?
- 2- Compara el número de diferencias de un DNA de cada uno de los individuos al final de la simulación con el DNA original de "PO" que guardaste al principio. Qué se observa? Porqué?
- 3- Ahora, compara lo que observaste en la pregunta 2 con el cuadro de diferencias entre los diferentes genomas al final de la simulación (ver tabla 1 de la actividad 5 y armar la correspondiente para sus datos) Qué diferencias se observan? Cuál de las dos mediciones de diferencias (la del punto 2 o la del punto 3) refleja mejor las relaciones que existen en el árbol evolutivo?

ACTIVIDAD 5: RECONSTRUCCIÓN DE ÁRBOLES EVOLUTIVOS

El desafío ahora es tratar de reconstruir la cadena de transmisión viral de las cuatro poblaciones de virus representada en la Figura 3 pero utilizando sólo las secuencias de nucleótidos muestreada de las poblaciones en las puntas de las ramas. En esta actividad estamos llevando a la práctica el mismo desafío que enfrentan los biólogos que están tratando de desentrañar las relaciones evolutivas entre individuos, poblaciones o especies. La única diferencia es que ya conocemos la verdadera historia evolutiva, en este caso cadena de transmisión viral de tus poblaciones (Figura 3), (ForensicEA Lite mantiene el registro).

Hay muchos métodos para la reconstrucción de la historia evolutiva basado en secuencias nucleotídicas. Todos tienen en común que cuanto más similares genéticamente son un par de poblaciones, probablemente serán más cercanas unas a otras en el árbol evolutivo, dicho de otra manera, cuanto más tiempo haya pasado desde que dos poblaciones se separaron de su ancestro común, más serán las diferencias nucleotídicas halladas (serán más diferentes genéticamente).

El método que se utilizará como modelo para reconstruir la historia evolutiva se denomina con el acrónimo **UPGMA** (Unweighted pair method using Arithmetic averages, método de agrupación de pares usando promedios aritméticos). Es un método sencillo e intuitivo. Y, si bien no es el método más poderoso para la reconstrucción de los árboles evolutivos, funciona razonablemente bien para muchos conjuntos de datos.

Los pasos del **UPGMA** son los siguientes:

1. Primero hay que determinar las diferencias nucleotídicas entre todas las poblaciones virales entre sí. Arrastra un virus de cada caja y determina el número de diferencias nucleotídicas comparándolo con cada uno de los demás virus del árbol evolutivo representado en el programa. De esta manera determina las distancias genéticas entre todos los posibles pares de virus (Ver Figura 2). Con esos datos completa la tabla de doble entrada. En nuestro ejemplo se presentan los siguientes valores:

	PO	P1	DOC	P2
PO	----	53	53	51
P1	----	----	36	34
DOC	----	----	----	18
P2	----	----	----	----

Debajo, completa la tabla vacía con los datos correspondientes a tu simulación:

	PO	P1	DOC	P2
PO	----			
P1	----	----		
DOC	----	----	----	
P2	----	----	----	----

2. A partir de este paso se empieza a reconstruir los vínculos entre las poblaciones virales de los diferentes individuos infectados. En la tabla busca el par de virus con menos diferencias nucleotídicas. En la tabla del ejemplo, este par serían los virus del **DOC** y del **P2**, cuya diferencia es de **18** nucleótidos. Se supone que estos dos virus están más estrechamente relacionados entre sí que con cualquiera de los otros. Dibuja estas relaciones en un árbol evolutivo (simple, con sólo dos ramas) y coloca los virus del **DOC** y **P2** en los extremos de las ramas.

Ten en cuenta que la base del árbol, donde las ramas que llevan al **DOC** y al **P2** se abren, se encuentra el ancestro común de los dos virus, que llamarás virus del **[DOC-P2]**. Ahora hay que saber cómo está relacionado este ancestro común con los virus de los **P1** y **PO**.

3. Para conocer esa relación hay que confeccionar una segunda tabla de distancias genéticas, reemplazando los virus de los **DOC** y **P2** por su antepasado común, el virus del **[DOC-P2]**. No sabes a ciencia cierta la distancia genética entre el virus del **[DOC-P2]** y el virus del **P1**, pero puedes estimar que es un promedio de la distancia entre el **P1** y **DOC** y la distancia entre el **P1** y **P2**.

Esto es: distancia entre **P1** y **DOC**= 36; distancia entre **P1** y **P2**= 34, entonces: $(36 + 34) / 2 = 35$

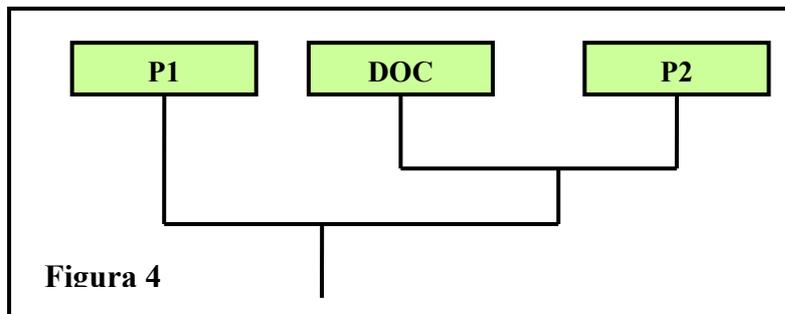
Asimismo, puedes estimar la distancia entre el virus del **[DOC-P2]** con el virus del **PO**, como el promedio de la distancia del **P2** y **PO**= 53 y la distancia del **PO** y **DOC**= 51, entonces: $(53 + 51) / 2 = 52$

	<i>PO</i>	<i>P1</i>	<i>DOC-P2</i>
<i>PO</i>	----	53	52
<i>P1</i>	----	----	35
<i>DOC-P2</i>	----	----	----

Debajo, completa la tabla vacía con los datos correspondientes a tu simulación:

	<i>PO</i>	<i>P1</i>	<i>DOC-P2</i>
<i>PO</i>	----		
<i>P1</i>	----	----	
<i>DOC-P2</i>	----	----	----

Analizando la nueva tabla se revela que los virus de **P1** y [**DOC-P2**] son los que presentan menos diferencia (**35**), podemos inferir que **P1** contagió a **DOC** o a **P2** indicando que están relacionados mas cercanamente. Relacionando a **P1** con el antecesor común de la rama **DOC-P2**, obtenemos el árbol de la **Figura 4**.



Finalmente, **PO** representa la rama más lejana, y asociándola al antecesor común de la rama **P1-DOC-P2** obtenemos el árbol de la Figura 3.

MOMENTO DE CONCEPTUALIZACIÓN y DE CORRELACIÓN CONCEPTUAL: Completa la columna de la derecha de la Tabla de Correlación Conceptual con la información biológica relacionada con la simulación.

ACTIVIDAD 3 y 4: _DESARROLLO y RECONSTRUCCIÓN DE ÁRBOLES EVOLUTIVOS	
Virus que infectan al paciente cero (de color negro)	
Infección a otro paciente	
Secuencia de ADN del virus del paciente cero.	
Virus de distintos colores que surgen a partir de mutaciones que se dan en un número X de generaciones en el mismo paciente cero.	
Diferencias que surgen al comparar el ADNc de los virus de distintos pacientes-	
Acción que determina el paso de un número X de generaciones y posterior	

cliqueo que genera una bifurcación de la población original (rama).	
Tabla que representa las diferencias halladas en el ADN al comparar virus de distintos pacientes en el transcurso de generaciones	
Construcción del árbol genealógico a partir de las diferencias en el ADN de las distintas poblaciones (distancias génicas) que permiten inferir posible vía de transmisión.	

EN EL MOMENTO DE METACOGNICIÓN:

- Especificidad de los virus a ciertos tipos de células y no a todo el individuo
- Se selecciona una región apropiada para secuenciar y analizar diferencias nucleotídicas (no cualquier parte del genoma viral).
- En la simulación se considera a los sistemas inmunes de todos los individuos como iguales, mientras que en la realidad cada individuo tendrá un sistema inmune que seleccionara de diferente manera las poblaciones virales.
- Dar tiempo a los estudiantes a investigar y generar más limitaciones de la simulación!

SUGERENCIA: POSIBLE PRÁCTICA PARA EL AULA

- Luego de practicar el procedimiento UPGMA.

- Presenta un caso donde los alumnos actúen como investigadores moleculares.

- Arma grupos de 3 o 4 estudiantes.

- Dile a los alumnos que ejecuten nuevamente una simulación, esta vez creando su propia cadena de transmisión, diferente a la de la **Figura 3** o la que le hayas dado como ejemplo (que utilicen nombres propios para cada individuo infectado)

- Luego que armen la matriz de diferencias entre poblaciones virales y que la intercambien con otro grupo pero que no pierdan el registro del árbol correspondiente a dicha tabla de diferencias.

- Cada grupo deberá aplicar el UPGMA para descubrir cómo es la secuencia de infección viral incógnita. Luego corroborarán que esté correcta con el grupo que generó el árbol correspondiente.

TABLA DE CORRELACIÓN CONCEPTUAL COMPLETA

ACTIVIDAD 2 Y 3: EVOLUCIÓN VIRAL EN UN INDIVIDUO.	
Conceptos utilizados en el programa ForensicEA Lite –Situación Analógica-	Conceptos Científicos relacionados al proceso de reconstrucción filogenética.
Ventana del programa	Individuo infectado
Esferas negras	Virus fundadores
Sistema inmune del paciente	Presión de selección.
Esferas de colores	Variantes de los virus fundadores
Diferencias que surgen al comparar el ADN de distintos virus	Mutaciones que ocurrieron en el ADN en el transcurso de las generaciones al comparar un virus con otro.
Pendiente del grafico: diferencias nucleotídicas vs generaciones	tasa o velocidad evolutiva
ACTIVIDAD 4 y 5: DESARROLLO y RECONSTRUCCIÓN DE ÁRBOLES EVOLUTIVOS	
Virus que infectan al paciente cero (de color negro)	Individuos fundadores, ancestrales.
Infección a otro paciente	Proceso de transmisión de genes
Secuencia de ADN del virus del paciente cero.	Secuencia de ADN viral donde se encuentra la zona utilizada como marcador molecular.
Virus de distintos colores que surgen a partir de mutaciones que se dan en un número X de generaciones en el mismo paciente cero.	Variantes en una población que difieren del ancestral.- La población evoluciona generando diversidad genética.
Diferencias que surgen al comparar el ADN de los virus de distintos pacientes-	Mutaciones que ocurrieron en el ADN en el transcurso de las generaciones al comparar una población con otra.
Acción que determina el paso de un número X de generaciones y posterior clickeo que genera una bifurcación de la población original (rama).	Sucesivas generaciones con posterior flujo génico (contagio) y evolución de la población
Matriz que representa las diferencias en el ADN halladas al comparar las infecciones en distintos pacientes en el transcurso de generaciones	Matriz que representa divergencias evolutivas en el transcurso de las generaciones.
Construcción del árbol genealógico a partir de las diferencias en el ADN de las distintas poblaciones (distancias génicas) que permiten inferir posible vía de transmisión.	Reconstrucción de las ramas que asocian las poblaciones en función a los grados de diferenciación en la secuencias nucleotídicas del ADN (haplotipos). Reconstrucción de vías de contagio.
<p>TABLA 1: Tabla de Correlación Conceptual (TCC). La columna de la izquierda surge en el momento de conceptualización de la analogía, la de la derecha, se completa en el momento de correlación conceptual, cuando se hace la correspondencia con la información científica relacionada al proceso de reconstrucción filogenética.</p>	