

66  
2E<sub>3</sub>



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANALISIS DEL POLIMORFISMO EN LA REGION  
D-loop DEL DNA MITOCONDRIAL Y EL POSIBLE  
ORIGEN DEL CERDO CRIOLLO MEXICANO  
(Sus scrofa)

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G A**

**P R E S E N T A :**

**BELEM DE JESUS HUERTA LOZANO**



ASESOR DE TESIS: DR. ROGELIO A. ALONSO MORALES

DIRECCION DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION DE TESIS

1999

273349

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACION

1) IS CONTINUA.



INSTITUTO NACIONAL  
DE ESTADÍSTICA Y  
CENSO

**MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO**  
**Jefa de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: ANALISIS DEL POLIMORFISMO EN LA REGION D-LOOP DEL DNA MITOCONDRIAL Y EL POSIBLE ORIGEN DEL CERDO CRIOLLO MEXI CANO (Sus scrofa).

realizado por BELEM DE JESUS HUERTA LOZANO

con número de cuenta 9150650-8 , pasante de la carrera de **BIOLOGIA**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	DR. ROGELIO A. ALONSO MORALES	
Propietario		
✓ Propietario	M.en C. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO	
✓ Propietario	M.en C. VICTOR MANUEL VALDEZ LOPEZ	
✓ Suplente	DR. RENE DE JESUS CARDENAS VAZQUEZ	
Suplente	BIOL. FERNANDO HERNANDEZ SANCHEZ	

FACULTAD DE CIENCIAS  
U N A M.

*Edna Maria Suarez Diaz*  
**Consejo Departamental de BIOLOGIA.**  
**DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ**

**DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA**

# DEDICATORIA

---

---

**Con gran cariño:**

**A DIOS POR DARME LA VIDA Y PERMITIRME LLEGAR HASTA ESTE MOMENTO DE MI VIDA.**

**A MIS PADRES: JESÚS Y LUZ MARÍA** que siempre me han apoyado en todas mis decisiones y por el grande AMOR que me brindan

**A MI GRAN AMOR** que ha sido algo muy especial en mi vida. Gracias **SIMON**.

**A ROSA, ISRAEL E IVAN** por confiar en mí.

**A mi abuelita GUADALUPE** por su gran cariño.

**A MIS TÍAS, TÍOS y PRIMOS** que siempre me alentaron por ser alguien en la vida.

**A ROSY Y CHRISTIAN** por su gran compañía y amistad

**A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO: RAUL, REFUGIO, AMANDA, TOÑO, ANGEL,** etc. por estar siempre conmigo.

**A MIS COMPAÑEROS DE LA CARRERA** por su gran amistad y cariño.

**Y A TODOS AQUELLOS QUE A LO LARGO DE MI VIDA** me dieron alegría y felicidad.

# ***AGRADECIMIENTOS***

---

---

**A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO Y A LA FACULTAD DE CIENCIAS** por haberme permitido llegar a ser alguien en la vida.

**A MI ASESOR DR. ROGELIO A. ALONSO MORALES** por aportarme todos sus conocimientos en el área de Biología Molecular y por su paciencia a lo largo de mi estancia en su laboratorio

**A los integrantes de MI JURADO** por sus valiosos y oportunos comentarios que favorecieron y enriquecieron este trabajo

**A RAUL, REFUGIO, SIMÓN Y AMANDA** por su orientación académica.

**A DGAPA-PAPIIT-UNAM** por financiar el proyecto con No. IN2007976

## RESUMEN

---

---

**HUERTA LOZANO BELEM DE JESÚS :** Análisis del polimorfismo en la región D-Loop del DNA mitocondrial y el posible origen del cerdo criollo mexicano (*Sus scrofa*). Bajo la dirección del *Dr. Rogelio A. Alonso Morales*.

El cerdo criollo Mexicano esta representado principalmente por tres variedades (El cerdo pelón mexicano, el cerdo pata de mula y el cuino). Las poblaciones de cerdos que aún existen, se encuentran distribuidas en las costas del pacifico, el golfo y el sureste Mexicano. El cerdo criollo Mexicano normalmente es explotado en condiciones rústicas y sin ningún control de selección. Posiblemente por que son considerados como variedades no mejoradas y debido a que poseen pocos atributos comerciales, este tipo de cerdos se encuentran en peligro de extinción Sin embargo, son cerdos que en nuestro País han sido criados por mas de 400 años en situaciones extremas, por lo que de manera natural se han adaptado a diversas condiciones ecológicas. Actualmente se desconoce, qué tanta diversidad genética existe entre las distintas poblaciones de cerdo criollo; además de no existir datos acerca de que tan parecidas o distantes son de otras razas de cerdos mejoradas. Así mismo, existen muchas dudas sobre su origen.

El objetivo de este trabajo, fue analizar por medio del DNA mitocondrial la diversidad genética y el posible origen del cerdo criollo mexicano. Para esto, se purificó DNA genómico de ocho cerdos pelón mexicano, un cerdo cuino y un cerdo pata de mula de diferentes regiones geográficas del país, así como la de un cerdo vietnamita. Mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se amplificó un fragmento de 270pb correspondiente a la región mas informativa del DNA mitocondrial. Posteriormente, los fragmentos amplificados fueron clonados y secuenciados.

Las secuencias analizadas revelaron 7 haplotipos diferentes, indicando que estas poblaciones de cerdos presentan altos niveles de diversidad genética. El análisis de las relaciones filogenéticas en estas variedades determinaron un origen diverso, ya que 2 de los haplotipos encontrados fueron similares a razas asiáticas (Satsuma y Vietnamita) y 5 a razas Europeas, dentro de los cuales, uno fue idéntico al descrito anteriormente en la raza Duroc, otro fue igual al cerdo miniatura de Yucatán y 3 haplotipos resultaron ser únicos dentro de las poblaciones de cerdo criollo mexicano.

Este trabajo en una forma preliminar, permite concluir que el origen de las poblaciones de cerdos criollos Mexicanos es tanto asiático como europeo y que estas poblaciones poseen altos niveles de diversidad genética

# CONTENIDO

	Pag.
DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
RESUMEN .....	iv
INDICE DE ESQUEMAS, CUADROS Y FIGURAS .....	vi
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Distribución .....	3
1.2. Origen .....	3
1.3. Conservación .....	3
1.4. Diversidad genética .....	5
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>10</b>
3.1. Material biológico .....	11
3.2. Purificación de DNA total .....	11
3.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	11
3.4. Clonación .....	12
3.5. Obtención de secuencia .....	13
3.6. Análisis de las secuencias .....	13
3.7. Análisis filogenético de las variedades criollas .....	14
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>15</b>
4.1. Amplificación .....	15
4.2. Clonación y secuenciación de los fragmentos amplificados .....	15
<b>V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>21</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>24</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>27</b>
ANEXO 1: Purificación de DNA total a partir de sangre .....	27
ANEXO 2: Preparación de geles de agarosa al 1% .....	28
ANEXO 3: Reacción en Cadena de la Polimerasa .....	28
ANEXO 4: Purificación de fragmentos a partir de geles de agarosa .....	29
ANEXO 5: Reacción de ligación .....	29
ANEXO 6: Preparación de células competentes .....	30
ANEXO 7: Preparación de cajas Luria/Ampicilina .....	31
ANEXO 8: Purificación rápida de DNA de plásmido .....	31
ANEXO 9: Digestión para la excisión de fragmentos clonados .....	32
ANEXO 10: Reacción de secuencia .....	33
ANEXO 11: Preparación del gel de secuencia al 6% .....	34
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>35</b>

# ÍNDICE DE ESQUEMAS, CUADROS Y FIGURA

	Pág.
<b>ESQUEMAS</b>	
1. Representación esquematizada de la metodología utilizada para la obtención de las secuencias de interés .....	10
2. Alineación de los diferentes haplotipos encontrados en la región más informativa del <i>D-Loop</i> de cerdos criollos mexicanos .....	17
<b>CUADROS</b>	
1. Procedencia de las muestras de los cerdos criollos .....	11
2. Número de acceso a GenBank para las secuencias obtenidas de los cerdos criollos, designados por el banco de genes .....	16
3. Sustituciones nucleotídicas observadas en relación a la secuencia del cerdo Meishan .....	18
4. Porcentaje representado en las sustituciones nucleotídicas .....	19
5. Porcentaje de sustitución nucleotídica en cada haplotipo en relación a la secuencia del cerdo Meishan .....	19
6. Distancias genéticas y sustituciones nucleotídicas entre los haplotipos .....	19
<b>FIGURAS</b>	
1. Muestras de un gel de agarosa al 2% con los fragmentos amplificados de 270pb .....	15
2. Patrón de digestión de una clona recombinante .....	16
3. Relaciones filogenéticas de los cerdos criollos mexicanos .....	20

# I. INTRODUCCIÓN

---

La porcicultura constituye una de las principales fuentes alimenticias a nivel mundial, la carne de cerdo es un excelente almacén de proteínas, vitaminas, minerales y grasa. Actualmente, en México se producen 960 mil toneladas de carne de cerdo al año, contribuyendo en gran medida al bienestar humano.

El cerdo es un vertebrado que pertenece a la clase *Mammalia* (mamíferos), subclase *Theria* (vivíparos), orden *artiodactyla* (con pezuña y número par de dedos), poseen cuatro dedos en las extremidades, de los cuales, solo los dos centrales sirven de apoyo, mientras que los otros dos se encuentran reducidos (Vázquez, 1973; Orr, 1974; Flores y Agraz, 1979). Se incluyen en la Familia de los *Suideos*, en ella se encuentra el género *Sus*; que incluye varias especies como *Sus scrofa* (cerdo doméstico), *Sus cristatus* (jabali indico) y *Sus barbatus* (jabali barbudo). Los diversos géneros de esta familia se han desarrollado, adaptándose a las particularidades propias del medio en el que habitan (Orr, 1974).

A partir de la especie *Sus scrofa*, se han originado todas las razas de cerdos modernos que aunque presentan diferencias morfológicas; todas ellas han sido seleccionadas por sus características productivas como la rapidez de crecimiento, prolificidad, carne magra, entre otras.

En México, las razas porcinas comerciales más difundidas son de tipo Europeo (Duroc, Hampshire, Yorkshire, Landrace, etc.). No obstante a esto, aún prevalecen en algunas regiones tropicales las variedades criollas o locales como el cerdo pelón mexicano, el cuino y el cerdo pata de mula.

De estas variedades, la más estudiada es el Cerdo pelón mexicano, el cual se caracteriza por presentar poco pelo en la superficie corporal o bien carecer de él (Robles, 1967; Baldizon, 1971; Castro, 1981; Cenobio, 1993; Rojas, 1993), haciéndolo menos susceptibles a la infestación por ectopárasitos, como los piojos que son comunes en las zonas donde estos animales se desarrollan (Castro, 1981). Su piel es de color gris pizarra o negro con arrugas en la región maxilar, abdominal y del cuello; por el color de piel, no se observan casos de fotosensibilización o eritema solar como es común en las razas de color claro (Robles, 1967, Cenobio, 1993).

Morfológicamente son muy heterogéneos, pero se ha reportado que los cerdos adultos alcanzan una alzada promedio de 60cm (Robles, 1967; Castro, 1981), cabeza alargada con un perfil subcóncavo, cara larga y afilada, hocico estrecho y rectilíneo, los ojos son grandes, orejas de tamaño medio, dirigidas hacia adelante y hacia abajo tapando ligeramente los ojos (Robles, 1967; Baldizon, 1971; Flores y Agraz, 1979; Castro, 1981; Cenobio, 1993), su dorso es rectilíneo, el tren posterior es más alto que el anterior (Robles, 1967; Cenobio, 1993), grupa caída con poco desarrollo muscular (Baldizon, 1971; Flores y Agraz, 1979; Castro, 1981; Cenobio, 1993; Rojas, 1993).

Con lo que respecta al cerdo pata de mula, este se caracteriza principalmente por presentar sindactilia, debido a que sus patas no tienen separación interdigital y el casco está formado en ocasiones por una sola unidad bien marcada o en muchas veces con rudimentos de la otra pezuña, incluso en un mismo animal (Flores y Agraz, 1979). Presenta una talla mediana menor a la del cerdo pelón, su perfil es cóncavo, orejas medianas de preferencia caídas, el hocico es ligeramente rectilíneo, cuerpo cubierto de pelos generalmente rizados y presentan coloración variable (Flores y Agraz, 1979).

El Cuino es de alzada pequeña pero robusto, presenta papada en regiones laterales e inferior, el cuello es corto bien implantado al tronco, trompa corta y pequeña, acumulan gran cantidad de grasa en todo su cuerpo, perfil cóncavo o con tendencia a rectilíneo en algunos animales (Flores y Agraz, 1979).

### **1.1. Distribución**

Actualmente estos tres biotipos de cerdos (pata de mula, pelón y cuino) se localizan en el Golfo y costas del Pacífico de México: Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas (Robles, 1967; Flores y Agraz, 1979; Castro, 1981; Cenobio, 1993; Cárdenas, 1996). Son cerdos que en algunos casos viven de forma silvestre, pero comúnmente son criados de forma rústica, alimentándose de plantas forrajeras, frutas, raíces, tubérculos y subproductos agrícolas. Estas poblaciones han sido criadas sin programas de cruzamiento sistematizado y ocasionalmente, son explotados bajo un sistema de pastoreo poco tecnificado, sin manejo preventivo contra las enfermedades más comunes de la región. Se ha documentado que en epizootias de fiebre porcina clásica, hay gran cantidad de cerdos muertos, pero también algunos sobreviven; por consiguiente, es probable que estos cerdos presenten resistencia a las enfermedades de manera natural, siendo esta una de las causas principales para que hayan subsistido durante muchas generaciones sin vacunación alguna (Baldizon, 1971; Cárdenas, 1996).

### **1.2. Origen**

El origen del cerdo criollo no es claro, se piensa que fue originado a partir de especímenes introducidos por los españoles, durante los primeros años de la conquista en nuestro País; posiblemente sean una mezcla de cerdos de tipo Ibérico, Céltico y Napolitano con cerdos de tipo asiático, provenientes del Japón o de las Filipinas. Sin embargo, Medina (1965) reportó en un estudio antropológico, la existencia de restos de un cráneo en la zona del pedregal de San Angel, perteneciente al periodo preclásico, que se remontan a épocas anteriores a la llegada de los españoles, lo que hace sospechar de la existencia autóctona de esta especie (Baldizon, 1971; Cárdenas, 1996).

### **1.3. Conservación**

Como consecuencia de la constante introducción de razas mejoradas de cerdos en el país, han hecho que el cerdo criollo mexicano esté en peligro de desaparecer como grupo genético puro.

Esto se debe principalmente a que son considerados por los porcicultores como variedades corrientes, no mejoradas y sin atributos comerciales. Recientemente, el sistema de información de la diversidad en animales domésticos (DAD-IS) de la FAO (<http://www.fao.org/dadis/index.htm>), ha considerado estas tres variedades (el cerdo pelón mexicano, el cuino y el pata de mula) en peligro de extinción; por ejemplo, se menciona que el cuino está en estado crítico con menos de 100 individuos. No obstante, la FAO no reporta ningún programa de conservación para estas variedades.

Poco se conoce sobre la diversidad genética existente en el cerdo criollo mexicano. No se sabe qué tan homogéneos son entre los distintos grupos poblacionales de las diferentes regiones geográficas. Ni se tienen datos acerca de qué tan parecidas o distantes son estas variedades de las razas comerciales. Por igual, existen muchas dudas sobre su origen.

Diversos estudios genéticos recientes en cerdos comerciales, indican que se ha ejercido una presión de selección muy intensa, de forma que la diversidad genética en las poblaciones comerciales se ha reducido notablemente (Fujii *et al.*, 1991). Se ha reportado que mutaciones genéticas indeseables como la hipertermia maligna o síndrome de estrés porcino, está presente en el 20% de las poblaciones americanas y canadienses (Fujii *et al.*, 1991; O'Brien *et al.*, 1993). Esta reducción genética en los germoplasmas comerciales resalta aún más la importancia de las variedades nativas de cerdos como el criollo mexicano que pueden representar reservorios de diversidad genética que darían la posibilidad de enriquecer y renovar en un futuro el germoplasma comercial del cerdo.

Por lo tanto, para conservar estas variedades en peligro de extinción, se requiere conocer la diversidad genética que presentan, tomando en cuenta que son un patrimonio único no renovable.

Si la diversidad es grande, entonces más de un grupo poblacional será requerido como fuente para preservarse, en cambio, si es reducida entre los diversos grupos conservando individuos provenientes de un sólo grupo, sería suficiente para garantizar su preservación.

#### **1.4. Diversidad genética**

El polimorfismo da como resultado la diversidad genética, que se describe como la variación en la constitución genética existente entre y dentro de poblaciones, esta variación se debe a cambios en la secuencia de nucleótidos en el DNA que se dan por mutaciones tales como: deleciones (eliminación de nucleótidos), inserción (adición de nucleótidos), traslocaciones (cambio en la posición de un segmento de un cromosoma dentro de el mismo o con otro cromosoma) o inversiones (inversión de un segmento en un cromosoma).

La variabilidad genética es un fenómeno común en la naturaleza y es la materia prima de la evolución de los organismos; se puede observar a nivel de población, en donde se encuentran diferencias en las frecuencias alélicas de los diferentes loci entre los grupos.

Con el advenimiento de técnicas en biología molecular, es posible utilizar gran cantidad de recursos metodológicos para evaluar el grado de diversidad y las distancias genéticas dentro de una población determinada.

Unas de estas metodologías, es el uso de marcadores genéticos que pueden ser morfológicos o moleculares. Los morfológicos se basan en las características fenotípicas del organismo como: tamaño, color, forma etc. Desafortunadamente, estos marcadores son afectados por condiciones ambientales que pueden enmascarar el efecto del gen o genes de interés. Además es frecuente observar epístasis, es decir, que un gen puede enmascarar la acción de otro gen.

Los marcadores moleculares tienen ventajas en algunos casos sobre los morfológicos, ya que no son afectados por condiciones ambientales y presentan codominancia, permitiendo así, la identificación de todos los posibles genotipos. Los marcadores moleculares se dividen en proteicos y de DNA.

Los proteicos se basan en la evolución de enzimas activas que son separadas por electroforesis en geles no desnaturizantes de agarosa y acrilamida. Los cambios en la composición de

aminoácidos y en la estructura pueden alterar la movilidad electroforética de la enzima, lo que permite observar la diversidad de enzimas en los diferentes individuos. Las desventajas de estos marcadores son muchas, por ejemplo, se requiere de procedimientos de extracción y de tinción específicos para cada sistema enzimático, por lo que el número de marcadores que se obtiene es insuficiente porque presentan poco polimorfismo.

Entre los marcadores de DNA, se encuentran los RFLP's, (del Inglés "Restriction Fragment Length Polymorphism"), minisatélites, microsátélites, y el DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>). La variación natural de estos se puede detectar por medio de enzimas de restricción, amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR del Inglés "Polymerase Chain Reaction") y secuenciación directa de los nucleótidos del DNA.

Los RFLP<sub>s</sub> involucran la purificación del DNA de un individuo y su digestión con enzimas de restricción para formar una mezcla de fragmentos que difieren en su longitud de acuerdo a la distribución específica de los sitios de corte, a través de la molécula de DNA. Los fragmentos son separados con base en su longitud por electroforesis en geles de agarosa o acrilamida. El análisis de los fragmentos se lleva a cabo mediante la técnica denominada "Southern blot" que consiste en transferir los fragmentos del gel a un filtro o membrana y posteriormente son hibridados comúnmente con un fragmento de DNA marcado (sonda radiactiva) que reconocerán secuencias específicas del DNA. Los fragmentos son visualizados por autorradiografía.

Los minisatélites y microsátélites son secuencias de DNA altamente repetidas de baja complejidad, organizadas en tándem y dispersas en todo el genoma. Estas secuencias se caracterizan por presentar un extenso polimorfismo genético, debido a la variación en el número de repetidos presentes, por eso son también conocidas como variantes en el número de repetidos en tándem (VNTR's). La unidad de repetición en los minisatélites es de 9-64 pares de bases (pb), que llegan a extenderse por varios kilobases (kb). La manera de revelar el polimorfismo en los minisatélites, es por medio de experimentos tipo Southern; muchas veces al utilizar los minisatélites como sonda, se generan bandas sumamente polimórficas y en su

conjunto forman patrones exclusivos de un individuo, a esto se le ha denominado huellas digitales del DNA o "DNA fingerprints". En los microsátélites, la unidad de repetición es de 1-5pb y llegan a extenderse por regiones no mayores a 200pb. Al igual que los minisátélites, cuando los microsátélites se emplean como sondas, revelan patrones tipo fingerprint. También el polimorfismo de los microsátélites se puede detectar fácilmente por PCR, donde se observa la variación de los repetidos dentro de una población.

Otro marcador molecular sumamente útil es el DNAMt que se localiza en el compartimento matricial de la mitocondria (Darnell, *et al.*, 1980; Karp, 1987). En el caso de los mamíferos, es una molécula circular con aproximadamente 16.5Kb, en comparación con el DNAMt de levaduras y plantas que van de cientos a miles de kilobases, esta diferencia se debe a la variación en el número de secuencias repetidas (Rus, 1993).

El DNAMt es heredado de forma materna y no sufre recombinación genética, por lo que todos los descendientes de una hembra heredan la misma molécula de DNA mitocondrial, estableciéndose un linaje materno que permite trazar el origen de los individuos y poblaciones (Darnell *et al.*, 1980; Lan y Shi, 1993). Por otro lado, la tasa de sustitución nucleotídica es 10 veces más rápida que la del DNA nuclear, lo cual incrementa el nivel de cambios en la secuencia nucleotídica, parámetros que son útiles para el estudio de diversidad genética en una población (Lan y Shi, 1993; Watanabe *et al.*, 1985; Watanabe *et al.*, 1986).

El DNAMt contiene genes que codifican las subunidades del citocromo C oxidasa (CO1, CO2, CO3), las subunidades 6 y 8 del complejo ATPasa, cinco subunidades para la NADH deshidrogenasa, genes que codifican varios tipos rRNAs, tRNAs y una región no codificante denominada región control (conocida como *D-loop*). El *D-loop* es típicamente la región más variable del DNAMt (10 veces mayor que el resto del DNAMt), se encuentra situada entre los genes que codifican tRNA<sup>pro</sup> y el tRNA<sup>phe</sup> y tiene una longitud de 1.3Kb. La región *D-loop* del DNAMt en mamíferos, está integrada por una serie de repetidos en tándem llamados RS1,RS2,RS3,RS4 y RS5, un sitio de origen de replicación de la cadena pesada, tres bloques

conservados (CSB1-CSB3) y una región central conservada que se piensa está involucrada en la regulación de la replicación (Clayton, 1982; Rus, 1993).

Debido a la alta variabilidad en el DNAm, este se ha usado como una herramienta importante para determinar el polimorfismo y la evolución en algunas poblaciones de cerdos, búfalos y bovinos, mediante análisis de RFLPs y secuenciación de la región D-loop (Watanabe *et al.*, 1985; Watanabe *et al.*, 1986; Lan y Shi, 1993; Takeda *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1995).

## **II. ΗΥΠÓΤΕΣΗΣ Υ ΟΒΥΕΤΕΝΟΣ**

---

---

### **2.1. ΗΠÓΤΕΣΙΣ**

Debido a que las diversas poblaciones de cerdo criollo no han estado sujetas a un sistema de selección controlada, se podría encontrar niveles altos diversidad genética.

### **2.2. ΟΒΥΕΤΙΥΟΣ**

#### **2.2.1. Οβυετιυο γενερα**

Estudiar la diversidad genética y posible origen del cerdo criollo mexicano (*Sus scrofa*) utilizando como marcador genético, la región mas polimórfica del *D-loop* en el DNA mitocondrial.

#### **2.2.2. Οβυετιυοσ παρτικυλαρεσ**

- 1) Clonación y Secuenciación de la región mas polimórfica del *D-loop* en las variedades criollas de cerdo mexicano.
- 2) Analizar las relaciones filogenéticas entre las diversas variedades de cerdos criollos y algunas razas de cerdos Europeos y Asiáticos.

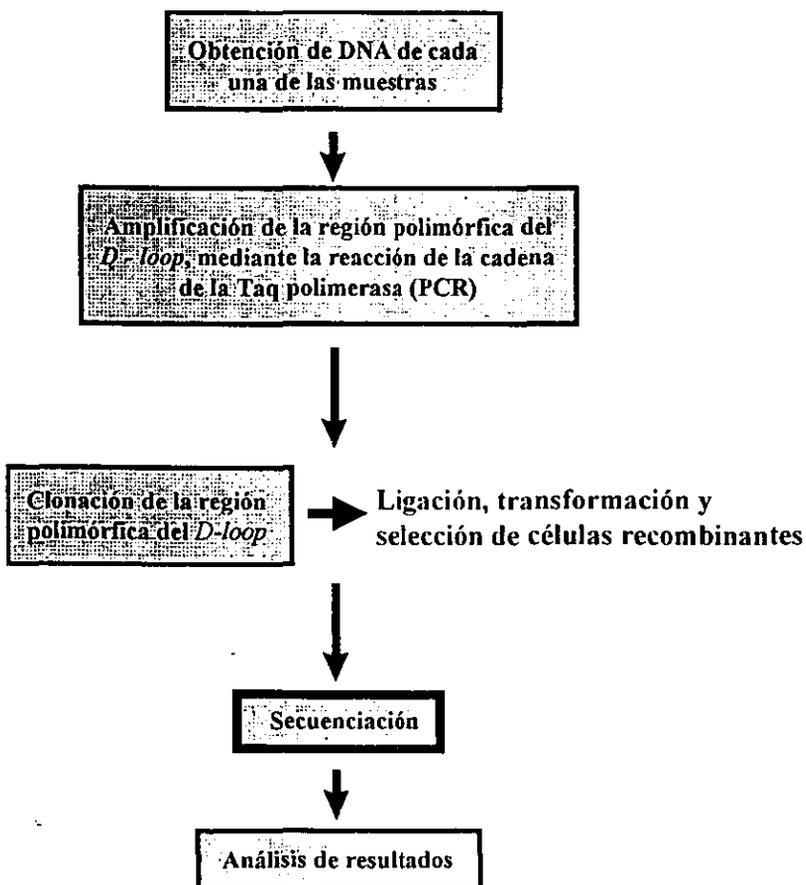
### III. MATERIAL Y MÉTODOS

---

---

El estudio se realiza de acuerdo al esquema 1.

**Esquema 1.** Representación esquematizada de la metodología utilizada para la obtención de las secuencias de interés.



### 3.1. Material biológico

Se utilizaron muestras sanguíneas de cerdo criollo mexicano (8 cerdos pelón mexicano, 1 cerdo pata de mula y 1 cerdo Cuino), pertenecientes a diferentes regiones geográficas, así como un cerdo de origen vietnamita.

**Cuadro 1.** Procedencia de las muestras de los cerdos criollos.

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA	PROCEDENCIA
1. CP16	Altamirano (Guerrero)
2. CP71	Chapa de mota (Edo. De México)
3. CP80	Tabasco
4. CP132	Quiviquinta (Nayarit)
5. CP159	San Diego (Nayarit)
6. CP171	San Diego (Nayarit)
7. CP183	Tamarindo (Nayarit)
8. CP189	Huajicori (Nayarit)
9. CPM 185	Huajicori (Nayarit)
10. CUINO 191	Huajicori (Nayarit)
11. CV1 CERDO VIETNAMITA	Granja comercial

CP: Cerdo Pelón

CV: Cerdo Vietnamita

CPM: Cerdo pata de mula

### 3.2. Purificación de DNA total

Se obtuvo DNA total de diferentes muestras sanguíneas mediante la técnica de Bruford *et al.* (1991) (anexo 1). La integridad del DNA se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio (anexo 2). La concentración del DNA se determinó en un fluorómetro, de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

### 3.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), consiste en la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de DNA, cada ciclo de la reacción consta de tres pasos:

1. **Desnaturalización:** Separación de cadenas complementarias del DNA blanco.
2. **Alineamiento:** Se realiza el apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de DNA blanco desnaturalizado.
3. **Extensión.** La DNA polimerasa adiciona deoxinucleótidos libres complementarios al DNA blanco, resultando nuevas cadenas.

Para la amplificación de la región mas informativa del *D-loop*, se diseñó un par de iniciadores: forward 5' CATATTATTATTAATATTAC 3' y el reverse 5' TAAGGGGAAAGAGTGGGCGA 3', los cuales se localizan en la posición 209 y 478, respectivamente en la región *D-loop* de un cerdo Meishan (Takeda *et al.*, 1995)

La reacción de amplificación se realizó, utilizando un paquete de reactivos para PCR (BIOTECSA) adicionando las cantidades recomendadas por la casa comercial (anexo 3). Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo a 94°C (3min), 30 ciclos de 94°C (30seg), 45°C (30seg), 72°C(1min) y 1 ciclo final de 72°C (3min).

Los productos de PCR fueron purificados del gel, con un método de "perlas de vidrio" implementado en el laboratorio (Boyle & Lew, 1995) (anexo 4).

### 3.4. Clonación

Los fragmentos de PCR purificados se clonaron en un paquete de reactivos comercial KIT (TA cloning, Invitrogen), siguiendo las instrucciones del proveedor (anexo 5). Se transformaron 3µl de cada ligación con 100µl de células competentes (DH 10B), previamente preparadas (anexo 6). La mezcla se incubó por 30 min. en hielo, 2 min. a 42°C y 2 min. en hielo, al término de esta incubación se adicionaron 900µl de medio luria y se dejó incubar 1 hora a 37°C. El volumen transformado fue "espatulado" en cajas selectivas de agar (anexo 7) (Maniatis *et al.*, 1989), y se incubaron por toda la noche a 37°C.

La colonias recombinantes (plásmido con inserto) fueron seleccionadas en base a la ausencia de coloración y se recuperaron en cajas de LB ampicilina.

Con la finalidad de verificar la clonación, se obtuvo DNA de las colonias recombinantes (anexo 8) (Silhavy *et al.*, 1984) y fue digerido con la enzima de restricción EcoRI (anexo 9).

### **3.5. Obtención de secuencia**

La secuencia de los fragmentos clonados, se obtuvo por el método de terminación de la cadena con dideoxinucleótidos, usando el paquete comercial de Amplicycle (Perkin Elmer; Foster, CA USA).

La reacción de secuencia se preparó según las instrucciones del proveedor (anexo 10), la reacción se trabajo por PCR, utilizando las mismas condiciones de amplificación del fragmento más informativo del *D-loop*.

Se cargaron 3µl de cada reacción en geles de acrilamida al 6% (anexo 11) y fueron sometidos a electroforesis a 2000 volts, 60 watts durante hora y media.

Los geles fueron transferidos a papel filtro, secados (1 hora a 80°C) y expuestos en placas radiográficas X-OMAT (KODAK) durante 12 horas.

### **3.6. Análisis de las secuencias**

Se realizó un alineamiento en el programa Clustal V (Higgins *et al.*, 1991) entre las secuencias de la región mas polimórfica del *D-loop* de los cerdos criollos y la secuencia de la misma región del *D-loop* en un cerdo chino (Meishan, con número de Acceso D17739).

El polimorfismo en esta región del *D-loop* se analizó, observando las diferentes sustituciones nucleotídicas a lo largo de los fragmentos secuenciados de 270 bp.

### 3.7. Análisis filogenético de las variedades criollas

Con el objeto de estudiar las relaciones genéticas de los cerdos criollos mexicanos, se compararon las secuencias obtenidas con respecto a todas las secuencias del *D-loop* reportadas en cerdos asiáticos y europeos disponibles en GenBank. Los números de acceso de las secuencias que se utilizaron son: Raza Duroc: (D16483); Jabali europeo silvestre: EWB1 (AB015094), EWB3 (AB015093); Göttingen (D16483); Jabali japonés silvestre: JWB1 (D42171), JWB2 (D42172), JWB4 (D42176), JWB8 (D42174), JWB10 (D42177), JWB11 (D42173), JWB14 (D42175), JWB39 (D42178), JWB55 (AB015085), JWB56 (AB015084), JWB72 (AB015086); Raza Landrace (D42170); Raza Large White (D16483); Cerdos Meishan: M1 (D16483), M2 (D17739); Raza New Satsuma (D42182), Ohmini (D42183) Cerdo de Okinawa (AB015092); Cerdos de Ryukyu: Ry0 (D42184), Ry1 (AB015087), Ry2 (AB015088), Ry6 (AB01589), Ry10 (AB01590); Raza Satsuma: Sat0 (D42180), Sat29 (AB015091); Cerdo miniatura de Yucatan (AB015093).

Las relaciones filogenéticas se analizaron en un programa de computación PHYLIP versión 3.57 (Felsenstein, 1995) de la siguiente manera:

Las secuencias de DNA tanto de cerdos criollos como las secuencias de cerdos europeos y asiáticos, se alinearon en el programa de alineamiento múltiple Clustal V (Higgins *et al.*, 1991); y las distancias genéticas entre las diferentes secuencias fue calculada por el método de Kimura (1980), empleando el programa "DNADIST".

Con estos valores se construyó un dendograma por el método de "neighbor-joining" (Saitou y Nei, 1987) La confiabilidad en la topología del árbol se calculó con 1000 réplicas generadas por el método de bootstrapping (Felsenstein, 1985), el árbol consenso se obtuvo por el método "Majority rule" (Margush & McMorris, 1981). Finalmente, el dendograma fue dibujado en el programa Tree View, versión 1.2.

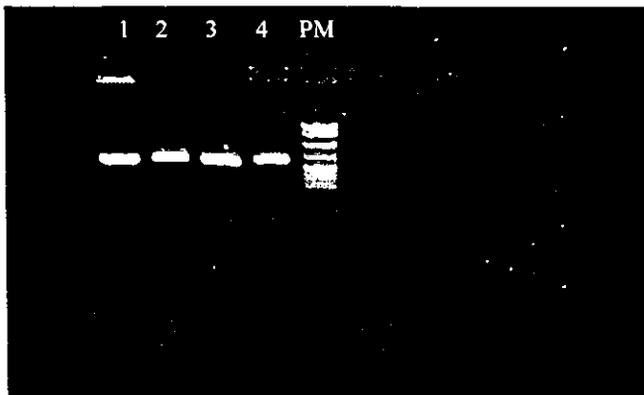
## IV. RESULTADOS

---

---

### 4.1. Amplificación

100ng de DNA proveniente de 10 variedades de cerdo criollo (8 cerdos Pelón mexicano, 1 cerdo Cuino, 1 cerdo Pata de mula) y un cerdo de origen vietnamita, se utilizaron para amplificar un fragmento de 270pb, correspondiente a la región más polimórfica del *D-loop* (figura 1).

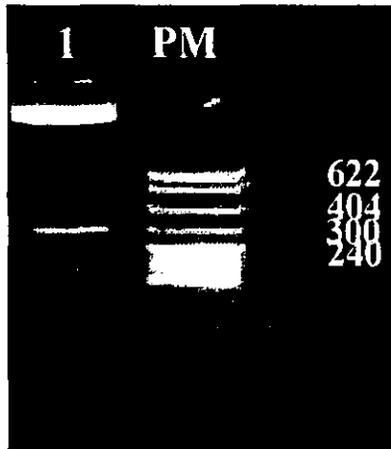


**Figura 1.** Muestra de un gel de agarosa al 2% con los fragmentos amplificados de 270bp. El carril 1 corresponde a la muestra del cerdo CP16, el 2 al CP132, el 3 al CP185 y el 4 al CV1. El PM corresponde al marcador de pesos moleculares DNAPBR322/MspI.

### 4.2. Clonación y secuenciación de los fragmentos amplificados

Los fragmentos amplificados se clonaron en el vector pCR 2.1. Las clonas recombinantes se digirieron con la enzima de restricción Eco RI. La digestión dio como resultado un fragmento

de 270pb que corresponde al fragmento clonado y un fragmento de 3900pb, este último pertenece al vector de clonación (figura 2).



**Figura 2.** Patrón de digestión de una clona recombinante. En un gel de agarosa al 2%. Se observa el DNA de la clona, digerido con la enzima Eco RI. el carril 1 presenta los fragmentos de 270pb y de 3900pb. PM corresponden al marcador de pesos moleculares DNA pBR322/MspI.

Las clonas recombinantes fueron secuenciadas y las secuencias obtenidas en este trabajo fueron depositadas en la base de datos del GeneBank, bajo los siguientes números de acceso (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Números de acceso a GenBank para las secuencias obtenidas de los cerdos criollos, designados por el banco de genes.

MUESTRA	NUMERO DE ACCESO
CP159	AF082013
CP171	AF082014
CP183	AF082015
CP71	AF082016
CP80	AF082017
CP132	AF082018
CP16	AF082019
CP189	AF082020
Cuino 191	AF082021
CPM 185	AF082022
Vietnamita (CVI)	AF082023

La alineación de las secuencias de los diferentes cerdos criollos con respecto al cerdo Meishan, se presenta en la esquema 2.

**Esquema 2.** Alineación de los diferentes haplotipos encontrados en la región mas informativa del *D-loop* de cerdos criollos mexicanos. Se muestran las diferencias comparativas con la secuencia de un cerdo de raza china (Meishan)

	10	20	30	40	50	60
MEISHAN2	CATATTATTATTAATATTACATAGTACATATCATTATTGATCGTACATAGCACATATCAT					
CP16	.....T.....					
CP71	.....T.....C.....					
CP80	.....T.....					
CP132	.....T.....					
CP159	.....T.....					
CP171	.....					
CP183	.....T.....					
CP189	.....T.....					
CUINO	.....T.....					
PATAMULA	.....T.....					
VIETNAMITA	.....T.....					
	70	80	90	100	110	120
MEISHAN2	GTCAAATAATCCAGTCAACATGCGTATCACCACCATTAGATCAGGCTTAATTACCAT					
CP16	.....C.....A.....C.....					
CP71	.....C.....A.....C.....					
CP80	.....C.....A.....C.....					
CP132	.....C.....A.....C.....C.....					
CP159	.....C.....A.....C.....					
CP171	.....A.....C.....C.....					
CP183	.....A.....C.....C.....					
CP189	.....					
CUINO	.....C.....A.....C.....					
PATAMULA	.....C.....A.....C.....					
VIETNAMITA	.....C.....A.....C.....					
	130	140	150	160	170	180
MEISHAN2	GCCGCGTGA AACCAGCAACCGCTTGGCAGGGATCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCATAAA					
CP16	.....					
CP71	.....					
CP80	.....					
CP132	.....					
CP159	.....					
CP171	.....					
CP183	.....T.....					
CP189	.....					
CUINO	.....					
PATAMULA	.....					
VIETNAMITA	.....					
	190	200	210	220	230	240
MEISHAN2	TCGTGGGGTTTCTATTGATGAACCTTAAACAGGCATCTGGTTCTTACTTCAGGGCCATCT					
CP16	C.....A.....					
CP71	C.....A.....					
CP80	C.....A.....					
CP132	C.....A.....					
CP159	C.....					
CP171	C.....A.....					

```

CP183      C.....A.....
CP189      .....A.....
CUINO      C.....
PATAMULA   C.....
VIETNAMITA C.....

                250      260
                *        *

MEISHAN2   CACCTAAAATCGCCCACTCTTCCCTTA
CP16       .....
CP71       .....
CP80       .....
CP132      .....
CP159      .....
CP171      ...C.....
CP183      .....
CP189      .....
CUINO      .....
PATAMULA   .....
VIETNAMITA .....

```

Al alinear las secuencias de cerdo criollo con respecto al cerdo Meishan, se apreciaron 3 tipos de sustituciones nucleotídicas (C por T, G por A y T por C), las cuales se presentaron en 10 sitios polimórficos diferentes (cuadro 3).

**Cuadro 3.** Sustituciones nucleotídicas observadas en relación a la secuencia del cerdo Meishan.

SUSTITUCIÓN NUCLEOTÍDICA	POSICIÓN (bp)	NÚMERO DE CAMBIOS
C por T	32	10/11
	164	1/11
T por C	41	1/11
	70	7/11
	97	10/11
	114	3/11
	181	10/11
G por A	245	1/11
	85	10/11
	234	7/11

El número total de cambios observados en las tres sustituciones nucleotídicas fue de 60, dentro de los cuales el 53.3% corresponde a la transición de T a C, el 28.3% a la transición G-A y un 18.3% corresponde a la transición C-T (cuadro 4).

**Cuadro 4.** Porcentaje representado en las sustituciones nucleotídicas.

SUSTITUCIÓN NUCLEOTÍDICA	NÚMERO DE CAMBIOS TOTALES	PORCENTAJE
C por T	11	18.3%
G por A	17	28.3%
T por C	32	53.3%
<b>TOTAL</b>	<b>60</b>	<b>100.0%</b>

El análisis de estas secuencias reveló 7 haplotipos diferentes. El porcentaje de sustitución nucleotídica de cada haplotipo con respecto al cerdo Meishan se observa en el cuadro 5, y las distancias genéticas entre cada haplotipo se observan en el cuadro 6.

**Cuadro 5.** Porcentaje de sustitución nucleotídica en cada haplotipo en relación a la secuencia del cerdo Meishan.

HAPLOTIPOS DIFERENTES	CAMBIOS EN LA SECUENCIA	SUSTITUCIÓN NUCLEOTÍDICA (%)
1.- CP16, CP80	6	2.22
2.- CP71	7	2.59
3.- CP132	6	2.22
4.- CP159, Pata de Mula, Cuino y Vietnamita	5	1.85
5.- CP171	6	2.22
6.- CP183	7	2.59
7.- CP 189	2	0.74

**Cuadro 6.** Distancias genéticas y sustituciones nucleotídicas entre los haplotipos.

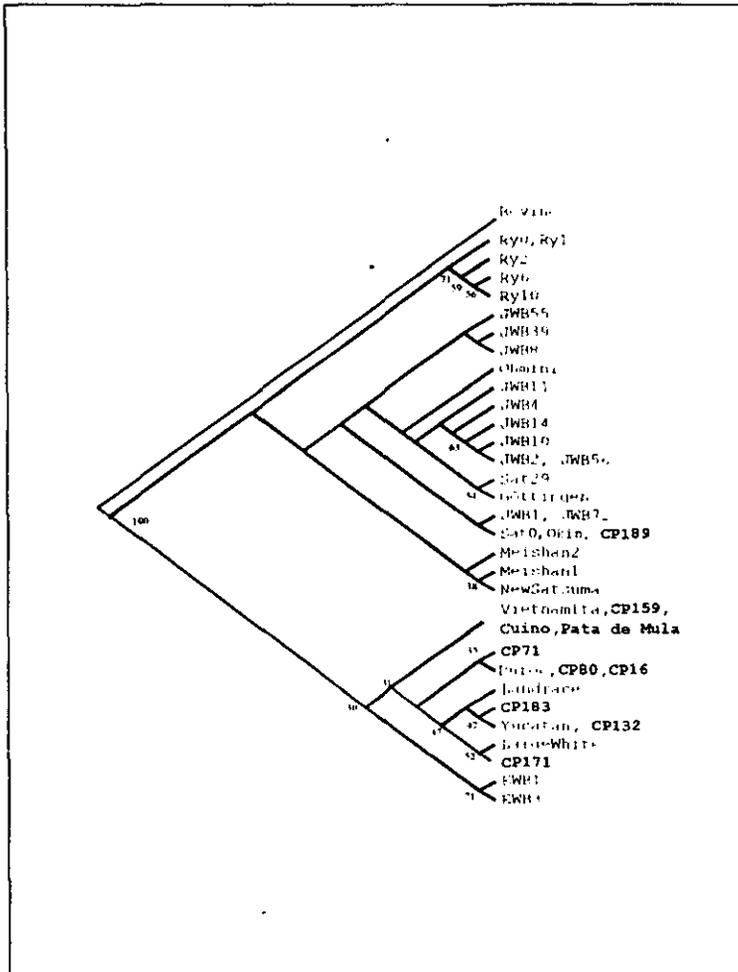
	CP16 <sup>a</sup>	CP71	CP132	CP159 <sup>b</sup>	CP171	CP183	CP189
CP16	0	1	2	1	4	3	4
CP71	0.0037	0	3	2	5	4	5
CP132	0.0075	0.0112	0	3	2	1	4
CP159	0.0037	0.0075	0.0112	0	5	4	5
CP171	0.015	0.0188	0.0075	0.0188	0	3	6
CP183	0.0112	0.015	0.0037	0.015	0.0112	0	5
CP189	0.015	0.0188	0.015	0.0188	0.0226	0.0188	0

a) CP80

b) Vietnam, Cuino, Pata de mula.

Los datos arriba de la diagonal, indican el número de sustituciones nucleotídicas entre las variedades de cerdo criollo y los datos por debajo de la diagonal son las distancias genéticas entre los cerdos.

Con el fin de evaluar el origen y las relaciones filogenéticas de los cerdos criollos, se compararon secuencias de la región mas informativa del D-loop de estos animales y secuencias de la misma región, en diversas razas de cerdo de diferente origen; así como también, la secuencia del D-loop de un bovino que fue utilizada como control, la cual genero un grupo totalmente independiente de las ramas maternas de los cerdos (Figura 3).



**Figura 3.** Relaciones filogenéticas de los cerdos criollos mexicanos. Los valores en los nodos corresponden al porcentaje de veces que se repite la topología de la rama en 1000 réplicas. Los cerdos criollos son indicados en negritas.

## V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

---

---

El alineamiento entre las secuencias correspondientes a la región más polimórfica del *D-loop* (Takeda *et al.*, 1995) de los cerdos criollos y la secuencia de un cerdo chino (Meishan), mostró 10 posiciones polimórficas a lo largo de las secuencias de 270pb, estos cambios revelaron 7 haplotipos diferentes en sólo 11 cerdos criollos estudiados, incluyendo un cerdo vietnamita; sin embargo, en un estudio similar realizado por Okumura *et al.* (1996) donde utilizaron un fragmento de 1055pb del *D-loop*, encontraron 8 haplotipos en un grupo de 40 cerdos silvestres japoneses. La frecuencia de haplotipos mitocondriales (7/11) observada, nos sugiere que los niveles de diversidad genética en las poblaciones de cerdo criollo estudiadas, es elevado.

En el análisis filogenético realizado con las secuencias de los cerdos criollos y las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank de cerdos asiáticos europeos, reveló que existen 2 líneas maternas principales de descendencia: una línea que origina a razas asiáticas y otra, de la que provienen las razas europeas. Esta genealogía concuerda con la descrita recientemente por Okumura *et al.* (1995). Sin embargo, los cerdos vietnamitas se agruparon en una línea genealógica independiente más cercana a la rama europea de descendencia que a la asiática. Previamente, Lan y Shi (1993) en base a estudios de los patrones de digestión del DNA mitocondrial, propusieron que los cerdos vietnamitas son un grupo más cercano a las variedades europeas que a las razas asiáticas. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo evolutivamente, apoyan la idea de que los cerdos vietnamitas y europeos se originaron de un ancestro común distante a los cerdos asiáticos.

En general, se observó que los cerdos criollos tienen diversos orígenes, por ejemplo, el cerdo CP189 presentó un haplotipo semejante a la raza japonesa Satsuma que se agrupó en la rama

asiática. En cambio los cerdos CP159, cuino y pata de mula presentaron un haplotipo semejante al cerdo vietnamita.

Es probable que el origen asiático de los cerdos criollos presentes en el País, se deba a la importación de cerdos de diversas regiones orientales, a través de los viajes realizados por la Nao de China que empezaron en las últimas décadas del siglo XVI y terminaron en el año de 1815 (Flores, 1977). También, se menciona que durante la conquista de nuestro País, los españoles introdujeron de Europa, cuatro razas porcinas (Céltica, Napolitana, Ibérica y Asiática) que dieron origen a las variedades de cerdo criollo (Flores y Agraz, 1981).

En los haplotipos que se agruparon dentro de la rama europea, se observó que los cerdos CP16 y CP80 tuvieron un haplotipo idéntico a la raza Duroc. Es difícil asegurarse si este haplotipo proviene de un cruzamiento entre cerdos de la raza Duroc con cerdos criollos o es un haplotipo ancestral compartido por los cerdos criollos.

El cerdo CP132, que provino de Nayarit, tiene un haplotipo semejante al cerdo miniatura de Yucatán, esto no es extraño ya que el cerdo miniatura de Yucatán se originó de poblaciones criollas de cerdos. El hecho de encontrar este haplotipo en regiones tan distantes, sugiere que existió un amplio tráfico de los cerdos criollos en el País. Por otro lado, los cerdos CP71, CP171 y CP183 presentaron haplotipos únicos, que no han sido previamente descritos en razas comerciales por lo que muy probable sean específicos de estas variedades. Aunque hay que considerar, que las poblaciones comerciales de cerdos han sido pobremente estudiadas y no se conocen todos los haplotipos existentes en estas poblaciones de cerdos.

Al realizar un análisis individual de la genealogía de los cerdos, se observó que los valores del "bootstrap" (majority rule) en la topología del dendograma son bajos, posiblemente esto es debido al tamaño relativamente pequeño del fragmento analizado (270 pb) y a los pocos cambios polimórficos encontrados; por lo que se sugiere emplear la región completa del *D-loop* (1.3Kb) a fin de poder encontrar una topología más confiable.

Los resultados presentados en este trabajo indican que las poblaciones de cerdo criollo mexicano tienen un origen diverso. Además se muestra que las variedades criollas son genéticamente heterogéneas y pueden representar reservorios de diversidad genética, que en algún momento podrían ser utilizadas como un recurso para la mejora de razas comerciales que se desee introducir a condiciones tropicales extremas, mediante la creación de razas sintéticas o como punto de partida, para la selección de razas porcinas locales mejoradas. Sin embargo, este trabajo es preliminar y es necesario extender este estudio a un número mayor de individuos, tanto criollos como comerciales. Y para tener una mejor idea del origen y evolución del cerdo Criollo Mexicano, sería importante evaluar cerdos Ibéricos y de otros países latino americanos.

## BIBLIOGRAFÍA

---

---

- 1.- Baldizon S. O. (1971): Contribución a la determinación de algunos valores hemáticos normales del cerdo Pelón Mexicano **Tesis de Licenciatura, FMVZ-UNAM**. México D.F.
- 2.- Boyle J.S. & Lew A.M. (1995): An inexpensive alternative of glassmilk for DNA purification. *Trends in Genetics* 11, 8.
- 3.- Bruford, M., Hanotte, O., Brookfield, J., Burke. T. (1991): Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. En Hoelzel A. R. (Editor) *Molecular Genetic Analysis of Populations a Practical Approach*. Ed. IRL PRESS Oxford University Press.
- 4.- Clayton D.A. (1982): Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, 28:693-705.
- 5.- Cárdenas P.C. (1996): Introducción al estudio zoométrico del cerdo Pelón Veracruzano. **Tesis de licenciatura, FMVZ-UNAM México D.F.**
- 6.- Cenobio S.L. (1993): Evaluación del comportamiento reproductivo de un lote de cerdas Pelón Mexicano en la etapa de lactancia en el Altiplano. **Tesis de licenciatura, FMVZ-UNAM México D.F.**
- 7.- Castro G. E. M. (1981): Importancia que ejercen algunos factores ambientales y el efecto del semental sobre el tamaño y peso de la camada al nacimiento y al destete en el Cerdo Pelón Mexicano en la etapa de la lactancia en el Altiplano. **Tesis de Licenciatura, FMVZ-UNAM**. México D.F.
- 8.- Darnell, J. Lodish, H. Baltimore, D. (1980): *Molecular Cell Biology*. Ed. Scientific American Books. 1105pp.
- 9.- Felsenstein J. (1995): Phylogeny inference package *PHYLIP* version 3.57c. Executables for PC, University of Washington, Seattle.
- 10.- Felsenstein J. (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 573-791.
- 11.- Flores, M. J. Agraz, A. (1981): Ganado Porcino cría, explotación, enfermedades e industrialización. Ed. Limusa, S. A de C V México, D.F.

- 12.- Flores, M. J. (1977): Orígenes probables de los cerdos mexicanos, características generales, zootecnia, distribución, población probable actual, futuro. *Porcicultura* (56) 37-45.
- 13.- Fujii J., Otsu K., Zorzato F., Khanna V., Weiler K., O'Brien P. and MacLennan D. H. (1991): Identificación de una mutación en el receptor de rianodina porcino asociada con hipertermia maligna. *Science*, 253:448-451.
- 14.- Hall S.J.G. & Bradley D.G. (1995): Conserving livestock breed biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution* 10, 267-270.
- 15.- Higgins D.G., Bleasby A.J. & Fuchs R. (1991): CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *CABIOS* 8, 189-191.
- 16.- Karp G. (1987): *Biología Celular*. Ed. McGraw Hill, México. 950 pp.
- 17.- Kimura M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rate base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *Journal of Molecular Evolution* 16, 111-120.
- 18.- Lan H., Shi L. (1993): The Origin and Genetic differentiation of Native Breeds of Pigs in Southwest China: An Approach from Mitochondrial DNA Polymorphism. *Biochemical Genetics*. 31:51-60.
- 19.- Maniatis, T. Fritsch, E.E.; Sambrook, J. (1989): *Molecular Cloning*. 6:6.4. ED. Centennial (CSH)
- 20.- Margush T. & McMorris F. R. (1981): Consensus n-trees. *Bulletin of Mathematical Biology* 43: 239-244.
- 21.- Medina G. J. (1965): Estudio Craneológico de un Suideo del Preclásico. **Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias .UNAM México D. F.**
- 22.- Okumura N., Ishiguro N., Nakano M., Hirai K., Matsui A., & Sahara M. (1996): Geographic population structure and sequence divergence in the mitochondrial DNA control region of the Japanese wild boar (*Sus scrofa leucomystax*), with reference to those of domestic pigs. *Biochemical Genetics* 24, 179-189.
- 23.- O'Brien P., Shen J., Cory H., Zhang R. (1993): Use of DNA-based test for the mutation associated with porcine stress syndrome (malignant hyperthermia) in 10,000 breeding swine. *JAVMA*, 203:842-851.
- 24.- Orr R. T. (1974): *Biología de los vertebrados*. Ed. Interamericana

- 25.- Robles R. T. (1967): Contribución al estudio de los cerdos lampiños o pelones mexicanos (Costa de Jalisco) **Tesis de licenciatura de la FMVZ-UNAM**. México D.F.
- 26.- Rojas C. (1993): Comparación del comportamiento productivo durante la lactancia entre cerdos de raza Pelón Mexicano e híbrido de Yorkshire con Pelón Mexicano y Landrace con Pelón Mexicano en el Altiplano. **Tesis de Licenciatura de la FMVZ-UNAM**. México D.F.
- 27.- Rus A. (1993): Evolution by turnover in the control region of vertebrate mitochondrial DNA. *Current Opinion in genetics and Development* 3:891-895
- 28.- Saito N., Nei M. (1987): the neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425
- 29.- Silhavy, T.J.; Berman, M.L. and Enquist, L.W. (1984): Experiments with gene fusions. Cold Harbor Laboratory
- 30.- Takeda K., Onishi A., Ishida N. (1995): SSCP analysis of pig mitochondrial DNA Dloop region polymorphism. *Animal Genetics* 26:321-326
- 31.- Tajima F., Nei M. (1984) Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol Biol. Evol.* 1:269-285
- 32.- Tanaka K., Yamagata T., Masangkay, J. (1995): Nucleotide diversity of mitochondrial between the swamp and the river types of domestic water buffaloes, based on restriction endonuclease cleavage patterns. *Biochemical Genetics* 33:137-147
- 33.- Vázquez P. C. (1973) Historia de los animales domésticos de México, su origen autóctono o su introducción al país. **Tesis de licenciatura. Fac. Ciencias UNAM**. México.
- 34.- Watanabe T., Hayashi Y., Ogasawara N., and Tomita T. (1985): Polymorphism of mitochondrial DNA in pigs based on restriction endonuclease patterns. *Biochemical genetics* 23:105-113
- 35.- Watanabe T., Hayashi Y., Kimura J., Yasuda Y., Saitou N. (1986): Pig mitochondrial DNA: polymorphism, restriction map orientation, and sequence data. *Biochemical genetics* 24:385-396.

# ***ANEXOS***

---

---

## **ANEXO 1: PURIFICACIÓN DE DNA TOTAL A PARTIR DE SANGRE**

Emplear 1ml de sangre y mezclar con un volumen de H<sub>2</sub>O dd estéril, centrifugar 5 min. a 12,000 rpm (realizar 2-3 lavados).

Resuspender el botón celular en 200µl con la solución de lisis, añadir RNAsa a una concentración final de 10µg/ml incubar por 1 hora a 37°C adicionar proteinasa K a una concentración de 50µg/ml dejar incubar 2 horas a 50°C y 1 hora a 65°C.

Agregar Cloruro de Sodio a una concentración final de 2M y centrifugar 10 min. a 12,000rpm recuperar el sobrenadante.

El DNA se precipita con 2 volúmenes de etanol frío al 100%, la pastilla se recupera centrifugando 5 min. a 12,000 rpm.

Lavar 2 veces la pastilla con etanol frío al 70%, resuspender en 500µl en H<sub>2</sub>O dd estéril, cuantificar y diluir a 50ng/µl, almacenar en congelación hasta su utilización.

**Soluciones necesarias:** Solución de lisis: 200mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS.

**RNasa** (100mg/ml)

**Proteinasa K** (50mg/ml)

## **ANEXO 2: PREPARACIÓN DE GELES DE AGAROSA AL 1%**

Colocar 1gr de agarosa en 100 ml de TBE 1X calentar en baño María hasta que la agarosa se disuelva. Posteriormente agregar bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml.

**Soluciones necesarias:** TBE 10 X: 108 grs de tris base, 55grs de ácido bórico, 40 ml de EDTA 0.5 molar pH 8 disolver y aforar a 1 litro con agua destilada

**Bromuro de etidio 10 mg/ml.:** Disolver 10 mg por cada ml de agua destilada

## **ANEXO 3: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

DNA 50ng/µl	2µl
Amortiguador (1.5Mm MgCl <sub>2</sub> )10X	2µl
Deoxinucleotidos (DaTP.Dctp.dGTP.dTTP) 2Mm	2µl
Iniciadores (10µM)	1µl
Taq polimerasa (5U/µl)	0.5µl
H <sub>2</sub> O dd esteril	Cbp 20µl

#### **ANEXO 4: PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS A PARTIR DE GELES DE AGAROSA**

Cortar la banda de interés y adicionar 3 volúmenes de Yoduro de sodio (6M), incubar 10 minutos a 55°C hasta que la agarosa este completamente disuelta agregar 8µl de perlas, incubar 30 min. en hielo.

Recuperar la pastilla centrifugando 3min. a 12,000 rpm, lavar la pastilla 2 veces con la solución de lavado, centrifugar bajo las mismas condiciones, secar la pastilla y resuspender en 50µl de H<sub>2</sub>O dd estéril.

**Soluciones necesarias: Yoduro de Sodio 6M**

**Perlas en PBS 100 mg/ml**

#### **ANEXO 5: REACCIÓN DE LIGACIÓN**

La reacción de ligación de cada muestra se preparo de la siguiente manera:

DNA del fragmento purificado (5 ng)	3µl
Vector 2.1 PCR (25ng/µl)	2µl
Amortiguador de ligación 10X	1µl
T4 DNA ligasa (4U)	1µl
H <sub>2</sub> O dd estéril	cbp 10µl

La reacción se incubo 16 horas a 14°C.

**ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA**

## **ANEXO 6 : PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES**

- 1.- Crecer en cinco mililitros de LB una colonia de XL1B, incubar 2 horas a 37°C en un baño de agitación
- 2.- Vaciar el cultivo en 100 ml de LB e incubar a 37°C hasta obtener una D.O.<sub>550</sub> de 0.5, posteriormente las células se empastillan centrifugando a 2,500 rpm por 5 minutos a 4°C.
- 3.- El material es decantado y la pastilla es resuspendida en 30 ml de Tfb I, incubar en hielo durante 1 hora.
- 4.- Centrifugar las células a 2,000 rpm por 5 min. a 4°C. y resuspender en 3 ml de Tfb II (1 ml de Tfb II por cada 10 ml de Tfb I).
- 5.- Finalmente colocar 200µl en tubos eppendorf y almacenar a -70 °C.

**Soluciones necesarias: Tfb I pH 5.8 (500ml):** 1.47g Kac, 4.95g MnCl<sub>2</sub>, 3.73g KCl, 0.74g CaCl<sub>2</sub>, 60ml Glicerina. Disolver en agua todos los compuestos, ajustar el pH a 5.8 con ácido acético 0.2M y esterilizar por filtración, almacenar a 4°C.

**Tfb II (500ml):** 10.47g MOPS (disolverlo en 300ml de agua destilada, ajustar el pH a 7 con NaOH 10M y en seguida adicionar los demás componentes). 5.51g de CaCl<sub>2</sub> (100mM), 0.37g KCl 6 y 60ml Glicerina Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C

NOTA: Es importante que el CaCl<sub>2</sub> y el KCl se adicionen en forma de solución, para evitar su precipitación.

Lab. Genética Molecular, Depto. Morfología Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

## **ANEXO 7: PREPARACIÓN DE CAJAS LURIA/AMPICILINA**

Fundir en baño María el medio LB agar, enfriar hasta alcanzar una temperatura de 50°C, adicionar ampicilina a una concentración de 100µg/ml, Xgal e IPTG, a una concentración final de 0.16mg/ml. Vaciar en cajas de petri y esperar a que solidifiquen.

**Soluciones necesarias: MEDIO LURIA (LB)** :Tryptona 10 gr, Extracto de levadura 5 gr, Nacl 5 gr, aforar a 1 litro con agua y esterilizar por autoclave.

NOTA: Para el LB agar adicionar 15 gr de Bactoagar por cada litro de medio.

**X gal 20 mg/ml**

**IPTG 20mg/ml**

**Ampicilina 100mg/ml**

## **ANEXO 8 : PURIFICACIÓN RÁPIDA DE DNA DE PLÁSMIDO**

1.-Sembrar en 3 ml de LB una colonia e incubar 37°C toda la noche

2.-Centrifugar 5 min. a 1200rpm, resuspender la pastilla en 200µl de la solución lisis y agregar 5µl de lisozima (50mg/ml), dejar reposar 10 min

3 -Colocar el tubo en agua hirviendo por un min . centrifugar 10 min a 1200rpm, recuperar el sobrenadante y precipitar el DNA con 2 volúmenes de etanol puro

4 -Congelar 15 min a -70°C

5 -Recuperar el sobrenadante centrifugando 10 min a 1200rpm, secar y resuspender la pastilla de DNA en 80µl H<sub>2</sub>O dd esteril.

**Soluciones necesarias: Solución de lisis:** 8% sacarosa, 5% triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8

**Lisozima:** 100 mg/ml

**ANEXO 9 : DIGESTIÓN PARA LA EXCISIÓN DE FRAGMENTOS CLONADOS**

<b>DNA DEL PLASMIDO (50ng/µl)</b>	<b>BUFFER H 10X</b>	<b>ESPERMIDINA (100mM)</b>	<b>ENZIMA Eco IR</b>	<b>AGUA DESTILADA</b>
5µl	2.5µl	0.5µl	1µl (5 U)	Cbp 25µl

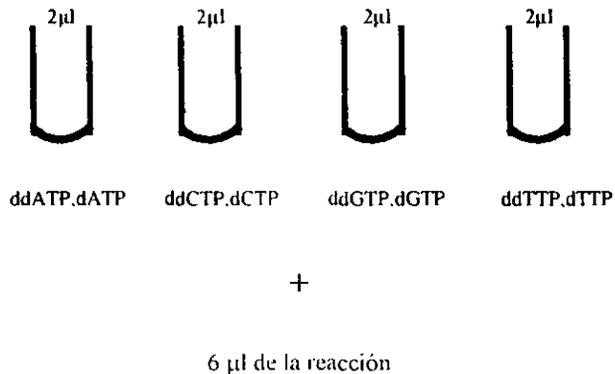
Incubar la reacción de digestión a 37°C toda la noche

## ANEXO 10 : REACCIÓN DE SECUENCIA

Buffer Mix 10 X	4 $\mu$ l
DNA (20ng/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l
*Iniciadores 20 $\mu$ M	2 $\mu$ l
Deoxyadenosine ( <sup>35</sup> S-dATP 1mCi)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O dd esteril	18 $\mu$ l

\* Preparar una reacción para cada iniciador.

Colocar 2 $\mu$ l de cada nucleótido por separado y adicionar 6  $\mu$ l de la reacción de secuencia..



· ANEXO 11 : PREPARACION DEL GEL DE SECUENCIA AL 6%

Preparar un stock con los siguientes reactivos

REACTIVO	CANTIDAD
TBE 10X	100 ml
UREA 7.8 Molar	234.39 gr
ACRILAMIDA-BISACRILAMIDA 40%	75 ml
H <sub>2</sub> O dd esteril	Cbp 500 ml

Calentar a 55°C para disolver, pasar por un filtro de nitrocelulosa (0.45) y almacenar a 4°C.

Posteriormente por cada 50 ml de stock agregar 250µl de persulfato de amonio al 10% y 25µl de TEMED, mezclar y verter sobre los vidrios de la cámara de secuencia (OWL SCIENTIFIC modelo S4S) con TBE1X.

## ***LISTA DE ABREVIATURAS***

---

---

<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNAmt</b>	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
<b>bp</b>	Pares de bases
<b>cbp</b>	Cuanto baste para
<b>pH</b>	Potencial de iones hidrogeno
<b>min</b>	minutos
<b>ml</b>	Mililitro
<b>μl</b>	Microlitro
<b>ng</b>	nanogramos
<b>O.D.</b>	Densidad óptica
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>seg</b>	Segundos