



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

**CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE SECUENCIAS
ASOCIADAS AL COMPLEJO MAYOR DE
HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE I DE ANÁTIDOS
SILVESTRES DEL GÉNERO ANAS.**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS

P R E S E N T A

Sofía González Guzmán

TUTOR:

Dr. Gary García Espinosa

COMITÉ TUTORAL:

Dra. Elizabeth Loza-Rubio Dra. Virginia León-Régagnon

México, D.F.

2007



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.

DECLARACIÓN

El autor da su consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la presente tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción o intercambio bibliotecario.

M.V.Z. Sofía González Guzmán.

**CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE SECUENCIAS ASOCIADAS AL COMPLEJO
MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE I DE ANÁTIDOS SILVESTRES DEL
GÉNERO ANAS.**

Dedicatoria a:

A mis Padres y Hermanos (as)...

A los que siempre me han apoyado en mis decisiones, sean buenas o malas.

Y han soportado mi ausencia por mi formación académica.

Les quiero expresar mi agradecimiento por su cariño, su confianza y sobre todo por su amor, gracias.

A los que marcaron este gran paso de mi vida...

Mi más amplio agradecimiento al Dr. Gary García Espinosa, por su invaluable apoyo, paciencia, y entusiasmo al compartirme su conocimiento como mi tutor de tesis y sobre todo por compartirme su gran amistad.

A mi comité Tutoral las Dras. Elizabeth Loza Rubio y Virginia León Régagnon, por sus valiosas aportaciones y consejos para la realización de esta tesis y por brindarme su amistad incondicional.

A mis profesores y compañeros de posgrado que me han aceptado, enseñado y han hecho lo que soy.

Al M. en C. Edgar Arturo Cuevas Domínguez, por enseñarme que si amas lo que haces puedes obtener lo que quieras.

Al Biólogo Pedro Esteban Díaz Díaz y al M.V.Z Jesús Chávez Ponce quienes estuvieron vinculados de alguna manera en este proyecto en la coordinación y apoyo de información y logística en campo.

Al M. en C. Félix Sánchez Godoy por sus consejos, paciencia y opiniones que me ayudaron a seguir adelante.

A la Dirección General de Vida Silvestre de la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) Distrito Federal y del Estado de México, por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto.

A los integrantes del departamento de Producción Animal Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por su colaboración, su entusiasmo, su compañerismo y su amistad que me han hecho el honor de otorgarme a lo largo de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico para la realización de esta investigación No. Registro 201722.

Muchas gracias...

RESUMEN

Los loci del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) tienen un papel relevante en el procesamiento y reconocimiento de antígenos. En las galliformes domesticas, la molécula del MHC esta expresada por diferentes alelos que se asocian a la susceptibilidad o resistencia hacia diferentes agentes infecciosos lo que ha ayudado al control de enfermedades en estas aves. Sin embargo, en otras especies de aves como los patos silvestres es poco documentado.

Para comprender las enfermedades de los patos silvestres es necesario conocer aspectos inmunológicos entre las diferentes especies de patos. En el presente trabajo, se propuso caracterizar una parte de secuencias asociadas al Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I de nueve especies de patos, tanto migratorios como residentes del género *Anas* en las ciénegas de Lerma en el Estado de México, con base a reportes previos en pato doméstico. Los resultados por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación a partir de muestras de *Anas platyrhynchos diazi* y *Anas platyrhynchos domesticus* mostraron un fragmento 750pb con una similitud de 91% con el cromosoma 8 de *Gallus gallus*, el cual corresponde a un protooncogen.

El fragmento fue amplificado en los 9 patos. Sin embargo, al análisis con Polimorfismo del Largo de los Fragmentos de Restricción (RFLP) se observó que la especie *Anas americana*, *Anas platyrhynchos diazi* y *Anas platyrhynchos domesticus* fueron diferentes al resto de los patos (*Anas discors*, *Anas crecca*, *Anas cyanoptera*, *Anas acuta*, *Anas strepera*, *Anas clypeata*).

Lo anterior pone de manifiesto la presencia de un protooncogen en patos silvestres y que pudieran existir diferencias entre patos del género *Anas*. Este es el primer reporte de un protooncogen en patos silvestres.

Palabras clave: protooncogen, oncogen, *Anas*, pato.

ABSTRACT

The loci of the major histocompatibility complex (MHC) has an outstanding paper in the prosecution and recognition of antigens. In the galliformes, the molecule of the MHC this expressed by different alelos that are associate to the susceptibility or resistance to different infectious agents, that helped to the control of illnesses in these birds. However, in other species of birds like the wild ducks it's little documented.

To understand the illnesses of the wild ducks (waterfowl) it is necessary to know immunologic aspects among the different species of ducks. The objective is characterize a part of sequences associated to the mayor histocompatibility complex class I of nine species of ducks, both migratory as residents species of Lermas wetlands in the State of Mexico, with base to previous reports in domestic duck. The results for polymerase chain reaction (PCR) and sequence starting from samples of *Anas platyrhynchos diazi* and *Anas platyrhynchos domesticus* showed a fragment 750pb with a similarity of 91% with the chromosome 8 of *Gallus gallus*, which corresponds to a protooncogen.

The fragment was amplified in the nine wild ducks. However, in the analysis with restriction fragment length polymorphism (RFLP) was observed that the species *Anas americana*, *Anas platyrhynchos* and *Anas platyrhynchos domesticus* were different to the rest of the ducks (*Anas discors*, *Anas crecca*, *Anas cyanoptera*, *Anas acuta*, *Anas strepera*, *Anas clypeata*).

These show the presence of a protooncogen in wild ducks and suggest differences among ducks of the gender *Anas*. This is the first report of a protooncogen in wild ducks.

Words key: protooncogen, oncogen, waterfowl, duck.

INDICE.**PAG.**

I.	Introducción.....	1
II.	Antecedentes.....	3
	1- Complejo Mayor de Histocompatibilidad.....	3
	2- Protooncogenes.....	11
	3- Humedales y Aves Acuáticas.....	17
III.	Justificación.....	20
IV.	Hipótesis.....	22
V.	Objetivos.....	23
	General.....	23
	Específicos.....	23
VI.	Material y Métodos.....	25
	Fase 1.....	25
	Fase 2.....	26
	Fase 3.....	28
	Fase 4.....	30
	Fase 5.....	30
	Fase 6.....	32

VII.	Resultados.....	33
VIII.	Discusión.....	36
IX.	Conclusión.....	40
X.	Anexos.....	42
XI.	Literatura Citada.....	61

Lista de Abreviaturas.

A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
Ag	Antígeno
Ac	Anticuerpo
ARN	Ácido ribonucleico
C	Citosina
Da	Dalton
EDTA	Ácido etilen-diamin-tetraacético
TcR	Receptor de células T
TNF	Factor de Necrosis tumoral
G	Guanina
GenBank	Base de datos moleculares de Estados Unidos
HLA	Human Leucocyte Antigen
HCl	Ácido clorhídrico
Hrs	Horas
IB	Bronquitis Infecciosa
Ig	Inmunoglobulina
IgA	Inmunoglobulina tipo A
IgG	Inmunoglobulina tipo G
IgM	Inmunoglobulina tipo M
Kb	Kilo bases
LT	Linfocitos T
LT _C	Linfocitos T citotóxicos
LT _H	Linfocitos T colaboradores
LB	Linfocitos B

MDV	Marek disease virus
MHC	Major Complex Histocompatibility
ng	Nanogramos
NK	Natural Killer
°C	Grado Centígrado
PBS	Tampón fosfato salino
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RFLP	Polimorfismo del largo de los Fragmentos de Restricción.
RSV	Virus del Sarcoma de Rous
T	Tiamina
Taq	<i>Termophilus acuaticus</i>
U	Unidades
µl	microlitros
V	Voltio
WorkBench	Programa de análisis de secuencias http://workbench.sdsc.edu/
xg	Fuerza centrifuga relativa

I. Introducción

En México, es cada día más evidente la convivencia entre especies de aves silvestres y aves domésticas, por factores antropogénicos principalmente, lo cual puede facilitar la transmisión y diseminación de agentes infecciosos responsables de enfermedades de vigilancia epidemiológica, así como de enfermedades exóticas y de aquellas enfermedades específicas para un grupo de especies de ave. El riesgo de transmisión de enfermedades puede traer consecuencias de salud pública, salud animal, y la extinción de especies amenazadas, que pueden afectar la economía y biodiversidad de nuestro país.

Uno de los elementos importantes en la presentación de enfermedades infecciosas en el huésped, es el grado de susceptibilidad de ésta a los agentes infecciosos, de tal forma que algunas especies de aves se sabe son más susceptibles que otras; contrariamente, hay especies catalogadas como resistentes. Esta resistencia a la enfermedad no excluye el proceso de infección y de un estado de portador asintomático.

El fenómeno susceptibilidad/resistencia esta mejor documentado para varias enfermedades de los pollos y gallinas, donde conocemos que existen gallinas menos susceptibles a padecer tifoidea Aviar, enfermedad de Marek,^{1,2,3} leucosis linfoide,^{4,5} entre otras. Además del grado de susceptibilidad entre individuos de la misma especie, también existen ejemplos de diferente grado de susceptibilidad entre individuos de diferente especie, género o familia⁶ un ejemplo de ello es la susceptibilidad de aves paseriformes como el cuervo (*Corvus corax*) a la enfermedad del virus del oeste del Nilo; mientras que las Galliformes como el pollo domestico (*Gallus gallus*) son resistentes a la enfermedad. Otro ejemplo de ello es la influenza aviar es capaz de enfermar y matar a los pollos, no así a varias especies de patos.

Sin embargo, existen una gran cantidad de especies de aves silvestres que podrían ser o no parcialmente susceptibles a un número determinado de agentes infecciosos. El estudio en este sentido tiene algunas limitantes como son: 1) La dificultad para experimentar con estos animales en el laboratorio o unidades de aislamiento, 2) El estrés durante el manejo y cautiverio de la mayoría de las especies, 3) Estado fisiológico del ave durante la época migratoria, reproductiva, de crianza o sedentaria, y 4) Especies amenazadas por la extinción. También influyen otros factores como la dificultad para lograr los aislamientos de los agentes patógenos, no solo por el desconocimiento del grado de susceptibilidad a cierto patógeno, sino por la posibilidad real de aislar el agente a partir de las heces o secreciones de aves clínicamente sanas, que además podrían no desarrollar anticuerpos hacia el agente etiológico y tener un papel importante en la transmisión de enfermedades infecciosas.

Dentro del orden de las aves, los anseriformes son morfológicamente y biológicamente un grupo diverso con alrededor de 150 especies distribuidas mundialmente, entre estos la familia *Anatidae* (aproximadamente 41 géneros y 147 especies), es considerada la familia con más reservorios naturales, de algunos agentes infecciosos como orthomyxovirus tipo A, paramixovirus tipo 1, 6 y 9.^{7, 8}

Muchos estudios en modelos vertebrados han demostrado que hay genes involucrados en la inmunidad innata y adaptativa, los cuales exhiben altos niveles de polimorfismo. Los estudios basados en el MHC (por sus siglas en inglés Major Histocompatibility Complex) han sido de ayuda para explicar la variación a la susceptibilidad de enfermedades de animales domésticos y silvestres.

II. Antecedentes

1- Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC).

Estructura del MHC

El MHC fue descubierto como un locus extendido con un alto contenido de genes sumamente polimórficos, los cuales determinaban el pronóstico de los tejidos transplantados entre individuos.

En 1940, George Snell y colaboradores realizaron estudios para analizar el rechazo a implantes entre ratones del mismo y distintos linajes. Para realizar esto, primero se crearon líneas endogámicas, es decir, que posean la misma secuencia de ácidos nucleicos en todos los alelos del genoma, esto lo obtuvieron entrecruzando hermanos y luego de veinte generaciones fue posible establecer líneas genéticamente idénticas. Se realizaron injertos de piel entre los linajes endogámicos, el órgano fue aceptado, mientras que los injertos en los linajes distintos fueron rechazados. Cuando se transplanta un tejido o un órgano pueden ocurrir dos eventos, que el sistema inmunitario reaccione en contra de este y lleve al rechazo o bien que sea aceptado.^{9,10}

Esta idea sería atribuible al polimorfismo de los genes encargados del reconocimiento tisular. Cuando hablamos de polimorfismo, hacemos referencia a que existen variaciones entre cada linaje o individuo, es decir formas alternativas de expresarse, o variantes de una frecuencia estable dentro de una población. A este grupo de genes polimórficos se los denominó “genes de histocompatibilidad”. Este polimorfismo es el resultado de un largo proceso de evolución a lo largo de miles de millones de años, como consecuencia de la presión evolutiva ejercida por los agentes infecciosos, los cuales han contribuido de diferente forma a la creación de nuevos alelos, de esta manera algunos son el resultado de mutaciones puntuales mientras que otros proceden de la combinación de secuencias completas entre diferentes alelos, mediante un proceso de recombinación génica

o por conversión génica, según el cual una secuencia es reemplazada por otra semejante de un gen homólogo. La recombinación entre alelos del mismo locus parece ser el mecanismo más frecuentemente utilizado para la creación del polimorfismo, así muchos alelos diferentes pueden proceder de procesos de recombinación repetidos a partir de un pequeño número de genes ancestrales.

En cuanto a los seres humanos, el descubrimiento del MHC humano, llamado HLA (por sus siglas en inglés Human Leukocyte Antigen), se llevó a cabo a través de estudios de transfusiones sanguíneas y trasplantes de órganos. En 1953 y 1954 varios grupos de investigadores (Goudsmit y Van Loghem; Dausset; Miescher y Fauconnet) demostraron anticuerpos aglutinantes en pacientes con una variedad de condiciones que incluía agranulocitosis y reacciones postransfusionales.^{10,11} Estos anticuerpos tenían afinidad por antígenos de leucocitos provenientes de algunos individuos. Durante las décadas de 1960 y 1970 se descubrió la gran importancia de los genes del MHC en la respuesta inmunitaria frente a antígenos proteicos. Ahora sabemos que la función fisiológica de esta molécula es la presentación de los péptidos a los linfocitos T.

El MHC es una región multigénica altamente polimórfica, está presente en los vertebrados y sus proteínas se expresan en una variedad de células del organismo. Se le denomina complejo, porque los genes están estrechamente unidos y se heredan en bloque, como una unidad, es decir, como un “complejo supergénico” o haplotipo.

El MHC de las aves es compacto y simple.¹² Las aves tienen un locus genético simple llamado complejo B. Dentro de este complejo se ubican un conjunto de genes que codifican y controlan la síntesis de glicoproteínas de la membrana celular, las cuales determinan el rechazo de trasplante de tejido en combinación con reacciones combinadas de linfocitos y la cooperación celular para la producción de anticuerpos, así como para codificar antígenos de clase I (B-F) y

clase II (B-L) que son altamente polimorficos y fuertemente expresados con apropiada distribución en los tejidos.¹³ Las proteínas del MHC clase I juegan un papel fundamental en la presentación de péptidos endógenos a las células de los linfocitos T (por sus siglas en ingles CTLs) y sirve para el reconocimiento de las células asesinas naturales (por sus siglas en ingles NK =natural killers).¹⁴

El MHC influye sobre el repertorio de antígenos (epitopos) que pueden reconocer sus linfocitos T cooperadores (T_H) y linfocitos T citotoxicos (T_C). Por ello la capacidad de repuesta frente a los patógenos (es decir la mayor o menor susceptibilidad a la enfermedad infecciosa) y los fenómenos de autoinmunidad, dependen parcialmente de los diferentes alelos del MHC. La heterogenicidad genética esta ligada fuertemente a la resistencia del hospedador a enfermedades infecciosas, en particular a la heterogenicidad del MHC que es un loci altamente polimorfico que controla el reconocimiento inmunológico de patógenos, del cual se sugiere que confiere una ventaja selectiva para desarrollar resistencia a enfermedades infecciosas.¹⁵

Localización y función de las regiones de MHC.

El MHC es un conjunto de genes alineados en una región grande y continua del genoma:

- | | | |
|----------|--------------|-------|
| • Humano | Cromosoma 6 | HLA |
| • Ratón | Cromosoma 17 | H-2 |
| • Pollo | Cromosoma 16 | BF/BL |

En las aves, el MHC del pollo es el más estudiado, en el cual se han determinado 19 genes contenidos en aproximadamente 92Kb, en contrasté con los 4000kb del MHC del humano o de los mamíferos. Virtualmente todos los genes tienen sus genes homólogos en el MHC de mamíferos, definiendo un grupo mínimo esencial

de genes de MHC conservados por más de 200 millones de años de divergencia entre aves y mamíferos.^{16,17,18,19} Otro orden taxonómico con la expresión de un gen sencillo y clásico del MHC clase I se ha observado en vertebrados menores como en los anfibios.^{14,20}

Los loci que componen el MHC son los genes mas polimórficos encontrados en el genoma de todas las especies analizadas hasta nuestros días.^{21,22}

La expresión genética es de tipo codominante, esto quiere decir que cada individuo hereda un juego de MHC del padre y uno de la madre, cada uno con sus distintos alelos (cada juego se denomina haplotipo), haciendo que se expresen al mismo tiempo los dos tipos de variantes alélicas de cada locus.^{22,23,24}

Moléculas de MHC Clase I (B-F).- Esta constituida por dos cadenas polipeptídicas unidas sin enlaces covalentes, una cadena α (44 a 47 KD), una subunidad no codificada por MHC denominada microglobulina β_2 (12KD) y un péptido antigénico unido dando así una molécula heterotrímico (Anexo 1, Figura 1).

Los genes del MHC se expresa en la membrana de casi todos los órganos, donde encontramos células nucleadas (órganos linfocitarios, hígado, riñón, pulmones y en menor cantidad en cerebro y músculo esquelético), sirven para presentar antígenos peptídicos tanto de células propias, como alteradas a los Linfocitos T_C .

Moléculas de MHC Clase II (B-L).- Esta compuesto por dos cadenas polipeptídicas unidas de forma no covalente, una cadena α (32-34 KD) y una cadena β_2 (29 a 32 KD) a diferencia de lo que sucede en las moléculas de clase I, las dos cadenas de las moléculas de clase II están codificadas por genes polimórficos del MHC (Anexo1, Figura 2).

Por lo tanto la molécula de clase II totalmente ensamblada es un heterotrimerio constituido por una cadena α , una cadena β y un péptido antigénico unido.

La molécula de MHC clase II, se expresa en la membrana de células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas, linfocitos B, células de Langerhans de la piel) y participa en la presentación de antígenos peptídicos exógenos al linfocito T_H .²⁵

Ambas clases de MHC's tienen una estructura similar y están constituidas por una hendidura de unión al péptido, una región no polimorfa tipo inmunoglobulina (Ig) una región transmembrana y una región citoplasmática. La hendidura de unión al péptido de la molécula del MHC esta formada por hélices α laterales y por una lámina de ocho hebras antiparalelas plegadas β en la base. La hendidura de unión al péptido de las moléculas clase I está formada por los segmentos $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la cadena pesada; mientras que la hendidura de las moléculas de clase II están formadas por los segmentos $\alpha 1$ y $\beta 1$ de las dos cadenas. Los dominios tipo Ig de las moléculas de clase I y II contienen los sitios de unión para los correceptores CD8 y CD4 de las moléculas T respectivamente.^{25,26}

Las moléculas del MHC se unen a un único péptido. Sin embargo, todos los péptidos que se unen a una molécula de MHC comparten motivos. En el caso de la molécula de MHC de clase I se puede unir a péptidos de 7 o 10 aminoácidos debido a que la hendidura del MHC clase I esta cerrada por ambos extremos. Los péptidos que alberga en la hendidura la molécula de MHC clase II constan de 13 a 20 aminoácidos, debido a que su hendidura no esta tan cerrada en sus extremos.

Esta distribución diferencial de las moléculas de histocompatibilidad de clase I y II se encuentra directamente relacionada con la diferente función de cada tipo de

moléculas. Los niveles relativos de las moléculas MHC en diferentes órganos y tejidos son muy variados.

Moléculas de MHC Clase III.- Aquí están los genes de proteínas del complemento y el Factor de Necrosis Tumoral (TNF). Las proteínas del complemento interaccionan con complejos específicos Ag-Ac, el sistema de complemento esta formado por enzimas séricas que interaccionan de manera ordenada y secuencial con células bacterianas provocando lisis bacteriana, muerte microbiana y facilita la fagocitosis que no se produce durante la infección, (consta de 11 proteínas denominadas C1-C11 respectivamente). El TNF es una proteína sintetizada por linfocitos activados, favorece el reclutamiento leucocitario, posee actividad citotóxica contra células tumorales, estimula la proliferación de fibroblastos en las zonas de inflamación y participa en el rechazo de órganos.

Moléculas de MHC Clase IV (B-G).- Se ha reportado exclusivamente en aves, células del hígado, células del timo, linfoblasto y células estroma. Están involucradas en la respuesta de anticuerpo, el cual involucra a las células B he interviene en el reconocimiento y ligamiento de células B al Antígeno.¹³

Hay múltiples moléculas B-G presentes en eritrocitos y moléculas muy similares están presentes en los trombocitos, linfocitos, bolsa de Fabricio, timo y en células epiteliales del intestino delgado. Esta molécula varía significativamente en tamaño (35-55KDa), dependiendo de la longitud de la cola citoplasmática. Las moléculas B-G en las células del estroma, en la bolsa de Fabricio, timo, tonsilas cecales y en las células del epitelio del intestino delgado, son más grandes que las moléculas B-G de los eritrocitos.

Región Rfp-Y.- Se piensa que esta involucrado en el reconocimiento para eliminar epitopos invasores.

Los dos genes localizados en el grupo II/IV (Rfp-Y, II, IV y el gen del grupo III), son diferentes al grupo I, pero virtualmente idénticos a cada uno y son pobremente expresados (ver Fig. 1), posiblemente como un resultado de una duplicación en bloque y transposición.

Esta región alberga los genes no clásicos de MHC, sin embargo esta no ha sido aun plenamente secuenciada. El término “clásico” es a menudo usado para indicar que un gene del MHC es polimorfo y altamente expresado. Genes “no clásicos”, son genes MHC que se agrupan con otros genes MHC filogenéticamente, pero estos usualmente no se expresan a niveles altos y no son polimorficos.^{26,27}

La región B-F/B-L del pollo (*Gallus gallus*) es simple y compacta, con 19 genes encontrados en 92Kb de ADN en comparación con la codorniz (*Coturnix japonica*) que tiene 41 genes contenidos en 180 Kb de ADN. (Diagrama 1 y 2) En cambio a otro tipo de aves como al pato (*Anas platyrhynchos*) solamente se han determinado hasta el momento 5 genes en 36.8 Kb de ADN.^{14, 23, 28, 29,30}

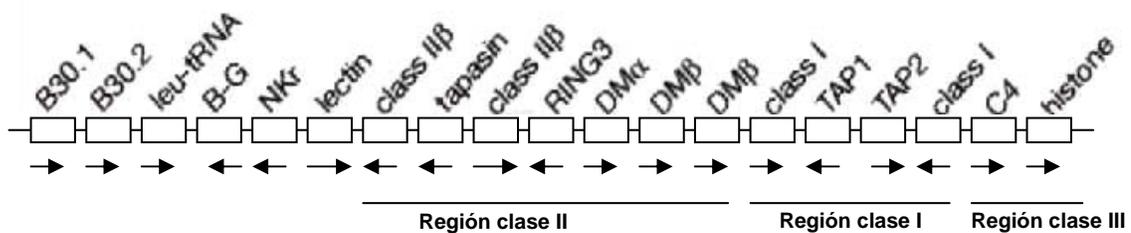


Diagrama. 1 El orden de los genes en la región B-F/B-L del Haplotipo B12. Las flechas indican la descripción transcripcional. La secuencia anotada esta ubicada en el EMBL Genebank con número de acceso AL023516.³¹

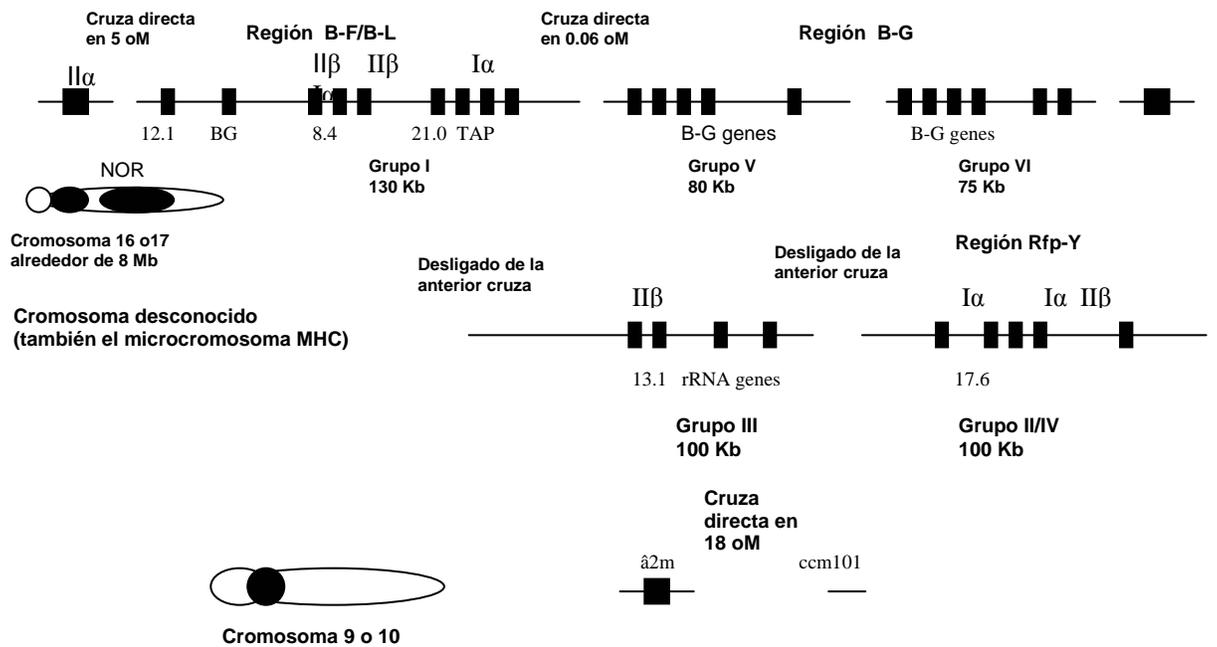


Diagrama. 2 MHC del pollo y de las regiones genómicas las cuales contienen genes relacionados Kaufman.²⁹

Los alelos del MHC han sido asociados a la susceptibilidad o resistencia de varias enfermedades infecciosas, lo que ha sido una herramienta valiosa para determinar poblaciones susceptibles a ciertas patologías.^{18,32,33}

El MHC dependiente de la resistencia y susceptibilidad de los pollos se presume que depende de la especificidad de la unión peptídico a la dominancia expresada por moléculas de clase I, esto se ve con mayor frecuencia en la resistencia de pequeños patógenos, o para virus que contengan pocos péptidos. Un buen ejemplo, es la resistencia al virus del sarcoma Rous (RSV),^{34,35} que se atribuye a la presencia de péptidos apropiados ligados al MHC clase I de células afectadas (tumor) para ser reconocidas por las células citotóxicas (T CD8). Otros estudios sobre el MHC en el pollo (complejo B) muestran un control genético de resistencia a enfermedades.³⁵ En pollos de razas Leghorn se ha mostrado que tienen haplotipos que confieren resistencia a diferentes enfermedades, como son el haplotipo B21, B2, B6, B13, B14 hacia la enfermedad de Marek; haplotipos B1

hacia Cólera aviar; haplotipos B3 hacia coccidiosis, haplotipo B15 para Bronquitis infecciosa (BI).^{36, 37, 38,39,40}

Aunque también se tienen haplotipos que confieren susceptibilidad a ciertas enfermedades, como es el caso del haplotipo B12, B15, B19 en pollos, en la enfermedad de Marek, haplotipos B13 y B21 para Bronquitis infecciosa.^{38,40}

Para poder determinar la susceptibilidad de las aves silvestres en México y su papel dentro del surgimiento de enfermedades infecciosas de vigilancia epidemiológica, como la enfermedad de Newcastle, Influenza aviar y *Salmonella*, así como enfermedades exóticas como la causada por el virus del oeste del Nilo, es necesario conocer el MHC en distintas especies de aves de México y su relación entre ellas.^{41,42}

2- Protooncogenes.

Los protooncogenes son genes responsables de la codificación de proteínas nucleares, citoplasmáticas y de membrana que intervienen en la proliferación, crecimiento y diferenciación celular, por lo tanto su nivel de expresión está estrictamente regulado. Muchos protooncogenes están expresados durante el ciclo celular del desarrollo embrionario. Los protooncogenes se localizan en lugares estratégicos del genoma y cuando un grupo de ellos es alterado, puede desencadenar la transformación maligna de la célula, desarrollando cáncer. A este cambio se le conoce como oncogen.

Las primeras investigaciones realizadas para el estudio del genoma del pollo fueron a partir de un ejemplar de la raza asiática "Red Jungle Fowl" (*Gallus gallus*), que es el origen de las distintas razas de gallinas domésticas. Su genoma reside en 39 pares de cromosomas, los cuales se dividieron con base en el

tamaño de los microcromosomas (cromosomas del 11-39), macrocromosomas (1-5) y algunos cromosomas intermedios (6-10).

Las primeras evidencias de los protooncogenes se obtuvieron en 1908 con el descubrimiento del primer virus oncogénico por los veterinarios daneses Ellermann y Bang. Ellos demostraron que al inocular extractos celulares de pollos con leucemia en pollos sanos, causaban la enfermedad.

En 1911, Rous comprobó que la inoculación de partículas menores a 450 nm de diámetro, aisladas de un sarcoma de pollo, producía sarcomas similares en pollos normales.

En 1936 Bittner descubrió que el cáncer viral de mama se transmitía de una cepa de ratón a otra a través del amamantamiento.

En 1959 Liberman y Kaplan demostraron que los ratones irradiados con rayos x inducían una leucemia y que sus células leucémicas transferían la enfermedad a ratones sanos.

En 1976 Michael Bishop, descubrió que el cromosoma 8 del pollo contiene un protooncogen llamado src, similar al encontrado en el virus del sarcoma de Rous (SRV, v-src) en 1911, por Peyton Rous. Sin embargo, el src del virus no tiene intrones.^{16,43,44,45}

El descubrimiento del oncogen viral *v-src* desencadenó inmediatamente un análisis molecular sistemático de todos los otros virus oncogénicos de origen aviar, murino, felino, simio etc., obteniéndose aproximadamente 25 oncogenes diferentes, cada uno de ellos con su correspondiente protooncogen en el cromosoma (c-onc)⁴⁶ (Anexo13; cuadro7).

En el cromosoma 8 del pollo encontramos otro protooncogen, el de la Leucemia de las aves llamado c-myc. Este c-myc participa en la regulación de la proteína de choque térmico 70 (hsp70), el gen del colágeno y el promotor E4 de los Adenovirus.⁴³ Se ha demostrado que estos oncogenes, myc participan en la respuesta inmunológica de linfocitos T y B,⁴⁷ ejemplo de ello es que disminuyen la expresión del MHC I y de la molécula de adhesión linfocitaria.

Los protooncogenes codifican proteínas que intervienen en el control de los mecanismos de proliferación celular como son: factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, receptores hormonales y factores de transmisión intracelular (proteínas con actividad tirosin-cinasa, proteínas de unión a guanosina-trifosfato y factores de transcripción nuclear). Una variedad están involucrados en la regulación de la actina del citoesqueleto, la adhesión celular y de la matriz extracelular. Cuando hay un descontrol de estas vías se activan a oncogenes, promoviendo la migración celular y la independencia de sustitos requeridos para la invasión y la metástasis.

Activación de los protooncogenes.

La activación de un protooncogen hacia un oncogen se produce mediante dos mecanismos principales: por cambios en la expresión genética o por cambios de tipo epigenéticos, los cuales no son provocados por alteraciones en la secuencia primaria de bases nitrogenadas, siendo heredables a corto plazo, pero no involucran mutaciones.⁴⁸

a) mutaciones puntuales.

En las mutaciones puntuales se sustituye una base del ADN por otra. Dichas mutaciones suponen el cambio de un aminoácido por otro en posiciones críticas de la proteína, generando una alteración estructural, de modo que su actividad biológica puede variar o anularse. Son algunos ejemplos de este mecanismo, la activación de los oncogenes de la familia *ras*, *neu*, entre otros.

b) inserciones de ADN en lugares próximos al protooncogen.

La inserción de pequeños fragmentos de ADN (por ejemplo, por infección viral o por mecanismos propios de la célula) en la proximidad del protooncogen o en su interior puede inducir una mayor expresión del protooncogen o la producción de una proteína con secuencias de aminoácidos distintos a los normales. Entre los ejemplos podemos citar los oncogenes *c-myc*, *int-1*, *int-2*, *mos*, etc.

c) deleciones de material genético.

La pérdida de material genético de un cromosoma puede activar a un oncogén por medio de tres mecanismos:

1. La pérdida puede ser de una secuencia inhibitoria de un protooncogen que provoca la sobreexpresión del producto del oncogén.
2. La pérdida puede provocar que el oncogén quede más cerca de una secuencia promotora, produciendo también una sobreexpresión.
3. La pérdida puede ser de un gen supresor tumoral y suele ser el mecanismo probablemente más importante por el que una pérdida cromosómica puede activar un oncogén.

d) translocaciones.

La translocación, consiste en el desplazamiento de un segmento de un cromosoma de longitud variable, hacia otro diferente. Entre los más conocidos podemos citar el oncogen *myc*, en el linfoma de Burkitt, el *abl*, el *bcl-1*, *bcl-2*, en leucemias y el *trk* en sarcomas. La translocación produce un protooncogen truncado que a veces no afecta a su parte codificante, de modo que la proteína es la misma, pero puede modificar su expresión, mientras que en otros casos la translocación provoca la aparición de una nueva proteína.

Existe un caso particular de interacción entre dos genes presentes en un mismo cromosoma que generan un nuevo oncogen. Este proceso se conoce con el

nombre de reordenamiento. Un ejemplo es el oncogen *ret* en el tumor de la glándula tiroides humana.

e) amplificación.

La amplificación génica consiste en la repetición del número de copias del protooncogen, aumentando la concentración de la proteína codificada. Este mecanismo lo presenta el *c-myc*, en cánceres de pulmón y *N-myc* en neuroblastomas, así como el *myb* en leucemias mieloides agudas y el *c-erbB-2* en cánceres de mama, entre otros. La amplificación puede ser de varias a cientos de veces.

f) sobreexpresión.

Otro tipo de activación es el aumento de los niveles de transcripción, lo cual se traduce en una sobreexpresión de la proteína codificada por ese protooncogen.^{43,44,46}

g) cambios epigenéticos.

Se refiere a un cambio heredable en el patrón de expresión por mecanismos diferentes a las mutaciones:

- Modificaciones secundarias de la cromatina (remodelado de la cromatina)
- Cambios en la metilización de ADN.⁴⁸

h) agentes físicos.

-Las radiaciones electromagnéticas como los rayos X y los rayos gamma.

-Las radiaciones corpúsculares como los rayos α , los rayos β y los flujos de protones o neutrones que generan los reactores nucleares u otras fuentes de radiactividad natural o artificial.

-Ciertos factores físicos como los ultrasonidos, los choques térmicos, la centrifugación, etc.

i) agentes químicos.

- Los análogos de las bases nitrogenadas.
- El ácido nitroso (HNO^2), porque desamina ciertas bases nitrogenadas.
- Los alcaloides como la cafeína, la nicotina, etc.
- El gas mostaza, el agua oxigenada (H_2O_2), el ciclamato, etc.^{43,44,46}

Una vez transformado, el oncogén tiene una intensa actividad sobre los genes de la proliferación celular y este exceso de actividad proliferativa desencadena el inicio de la transformación maligna. Existen hasta la fecha más de 100 diferentes protooncogenes descritos, sin embargo, sólo un grupo limitado de ellos pueden producir tumores. Mientras que leucemias y linfomas están asociados con la sobre expresión de un grupo reducido de oncogenes y alteraciones citogenéticas en forma específica, la mayor parte de los tumores sólidos contienen abundantes cambios genéticos tanto específicos como no específicos, con sobré expresión de varios oncogenes en forma simultánea, por otro lado es claro que un mismo oncogen puede estar involucrado en la génesis de diferentes neoplasias, que se producen sobre un período prolongado de tiempo, años e incluso décadas.

La activación de oncogenes y la pérdida de actividad antioncogénica o supresora de los tumores permiten a las células tener una ventaja proliferativa a la vez que evita su diferenciación normal o su muerte.⁴⁹ Por tanto, los mecanismos de oncogénesis dependen del equilibrio entre estímulos genéticos para la proliferación de las células y estímulos represivos o inhibitorios de la división de estas mismas células. Al interactuar estos dos grandes mecanismos se determina la producción o no de transformación maligna. Sin embargo, el panorama molecular es mucho más complejo y requiere de la participación no sólo de los oncogenes, genes supresores y genes reparadores reguladores, sino a demás de otras moléculas reguladoras como la familia de las ciclinas/ciclinquinasas, la expresión o inhibición de la actividad de telomerasas, la presencia de otros sistemas de regulación de apoptosis, el factor de necrosis tumoral (TNF) y otros que complican el panorama genético del cáncer.^{16,43,44,45}

3- Humedales y Aves acuáticas.

Las aves acuáticas constituyen uno de los componentes más carismáticos de la fauna que habita los humedales. No obstante, y con una flexibilidad mayor que la de los peces, las aves pueden hacer uso de estos ambientes (humedales) durante sólo parte del año y para cubrir una determinada etapa de su ciclo anual, como es la nidificación, muda del plumaje, cría, entre otras.

Las aves acuáticas juegan un papel importante en el mantenimiento de la biodiversidad de los ecosistemas acuáticos mediante el transporte de plantas, semillas y la propagación de invertebrados entre diferentes humedales y los humedales son ecosistemas claves para la supervivencia de aves acuáticas tanto migratorias como residentes y de otras especies de organismos y microorganismos.⁵⁰

Humedales.

Los humedales son complejos ecosistemas naturales que funcionan según leyes físicas, químicas y biológicas fundamentales. Cualquier impacto sobre su correcto funcionamiento ecológico va a afectar, inevitablemente, a las funciones que realizan para las sociedades humanas.

Los humedales se cuentan entre los ecosistemas de agua dulce más productivos del planeta, cumpliendo al mismo tiempo funciones ecológicas fundamentales para el hombre, como ser la regulación de los regímenes hidrológicos y la provisión de recursos de los cuales dependen las comunidades locales y vecinas a estos ambientes. Son descritos como riñones del planeta por su función como filtros de nutrientes y contaminantes, a demás de tener la capacidad de funcionar como una zona de amortiguamiento contra inundaciones, recargar el acuífero, entre otras, el

agua almacenada y liberada contribuye a prevenir la sequía en las estaciones secas y en los períodos de gran demanda de riego pero, además, sirve para recargar la capa freática cuando se extrae un exceso de aguas subterráneas.

Los humedales aumentan la calidad del agua. Los sedimentos y sustancias tóxicas tienden a ser retenidos en su seno. Si además existe vegetación palustre, que disminuye la corriente de un río, esa capacidad de sedimentación aumenta. Los humedales retienen nutrientes, especialmente fósforo y nitrógeno, por acumulación en el suelo y almacenamiento en la misma vegetación.^{51,52}

En la actualidad existen más de 50 definiciones diferentes para el término “Humedales”, siendo la de la Convención Ramsar³ una de las más amplias y adecuadas para fines de conservación y manejo. Es un ecosistemas totalmente inundados, cuando menos una parte del año. Extensiones de marismas, pantanos y turberas o superficies cubiertas de aguas, sean éstas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, incluidas las extensiones de agua marina cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros. El término agrupa a una gran variedad de ambientes interiores y costeros que comparten una característica fundamental: “el papel determinante del agua en la estructuración del ecosistema”.

La firma del convenio de Ramsar sobre humedales en 1971 fue un avance importante para la conservación internacional de las aves acuáticas. Todos los participantes en este convenio se comprometieron a señalar y proteger al menos una región de humedal dentro de sus fronteras. Entre otros criterios fijados en el convenio el humedal debe soportar regularmente al menos 20,000 aves acuáticas o alternativamente como mínimo un 1% de la población de alguna especie. En el 2002, 130 países suscribieron el convenio y existen hoy 1,040 sitios de Ramsar, los cuales cubren una superficie total de 917,000Km.^{52,53}

En México contamos con 51 humedales prioritarios que en su conjunto reciben al 84% del total de las aves acuáticas que invernan en nuestro país.⁵³

Aves acuáticas.

Las aves acuáticas pertenecientes a la familia *Anatidae*, recompone de 150 especies distribuidas mundialmente, incluyendo aproximadamente 41 géneros y 147 especies. Representadas por los patos, gansos y cisnes, estas aves constituyen en América del Norte el grupo más importante, en el cual se genera una gran actividad económica y social a través de su aprovechamiento y observación, lo cual a motivado programas nacionales e incluso tratados internacionales que buscan la conservación y manejo de estas especies y sus hábitats a lo largo de su rango de distribución.

La mayoría de estas aves acuáticas son migratorias, debido a su gran movilidad y a su capacidad de desplazamiento tanto en ámbitos locales, regionales, estatales, comprendiendo diferentes países e inclusive continentes, las aves acuáticas forman parte de un recurso compartido entre países por lo que su manejo y conservación requiere de un enfoque nacional y continental que atienda las necesidades de las especies migratorias y residentes, para completar su ciclo biológico y que tienda a la conservación a largo plazo de este valioso recurso natural.^{52,54,55}

III. Justificación

Una estrategia para analizar la susceptibilidad y resistencia de las aves silvestres, sería a través del conocimiento de la susceptibilidad del huésped por medio de la caracterización molecular de genes relevantes para la respuesta inmunológica de distintas especies de aves silvestres.^{1,56,57,58} A la fecha, estos estudios solo se han realizado en modelos animales, como los pollos o gallinas, los cuales han involucrado el análisis de citocinas, complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) y los receptores tipo toll. Por el contrario, en las aves silvestres como el faisán, gorrión y carricero tordal sólo se ha caracterizado molecularmente el MHC. Una de las moléculas claves en el control de agentes intracelulares, es el MHC clase I que procesa antígenos endógenos por parte de los linfocitos T, tanto los cooperadores (T_H), como los citotóxicos (T_C), como parte de la respuesta inmune celular.³²

Los loci del MHC desempeña un papel principal del sistema inmune, por esto se consideran como genes candidatos para el estudio de la resistencia o susceptibilidad a enfermedades infecciosas.^{59,60} Las moléculas expresadas de MHC se presume podrían incrementar la diversidad del repertorio de las células T y así la probabilidad del reconocimiento de péptidos extraños.⁶¹ Por lo tanto en este proyecto se caracterizo parcialmente secuencias asociadas al complejo mayor de histocompatibilidad clase I de distintas especies de patos migratorios y residentes del genero *Anas*, en las ciénegas de Lerma en el Estado de México.

Los humedales constituyen el hábitat de muchas especies de aves y vegetales acuáticas que dependen de zonas húmedas. Aunque sólo cubren un pequeño porcentaje de la superficie terrestre, los humedales albergan una enorme diversidad de tipos de hábitats y de especies de fauna y flora que no se encuentran en ningún otro lugar, son descritos como los riñones del planeta, debido a que filtran nutrientes y contaminantes. A demás sirven como corredores de dispersión y migración, como áreas de descanso y avituallamiento de muchas especies migratorias, favoreciendo así, la colonización de nuevos hábitats y el intercambio genético entre poblaciones viables de aves, peces, plantas, invertebrados, entre otras especies.^{50,51,52,54,55}

El incremento hacia el conocimiento de resistencia a enfermedades, ha hecho que estén disponibles varias estrategias para definir el control genético de enfermedades en la producción avícola y en aves silvestres. Los genes y estudios de genes candidatos pueden revelar asociaciones con la resistencia a enfermedades y las técnicas para estudiar la expresión del gen son una herramienta poderosa en la investigación de esta resistencia. La nueva disponibilidad de la secuencia del genoma del pollo ha acelerado este proceso.^{58,59}

IV. Hipótesis

Las secuencias asociadas al complejo mayor de histocompatibilidad clase I son similares entre las diferentes especies silvestres de anátidos (patos) del género *Anas* que habitan las ciénegas de Lerma, Estado de México.

V. Objetivos

Objetivo general

Realizar el análisis del fragmento de ADN que codifica para secuencias asociadas al complejo mayor de histocompatibilidad clase I entre los diferentes ejemplares de *Anátidos* silvestres del género *Anas*.

Objetivos específicos

- 1.- Obtener muestras de tejidos de hígado de las especies de patos silvestres del género *Anas*, en la laguna de Chiconahuapan, Almoloya del Rio, Estado de México.
- 2.- Determinar el método adecuado para la obtención de ADN genómico.
- 3.- Amplificar por PCR secuencias asociadas al complejo mayor de histocompatibilidad clase I de la especie *Anas platyrhynchos domesticus* y de *Anas platyrhynchos diazi*, como especie control.
- 4.- Determinar la secuencia del fragmento de la cadena alfa del complejo mayor de histocompatibilidad clase I de la especie *Anas*.
- 5.- Determinar en qué especies de patos silvestres del género *Anas* esta presente el fragmento de secuencias asociadas al complejo mayor de histocompatibilidad clase I de *Anas platyrhynchos*.

6.- Determinar por RFLP la similitud entre los fragmentos de la secuencia asociada al complejo mayor de histocompatibilidad clase I obtenido a partir de aquellas especies de patos del género *Anas* donde se amplificó el fragmento y agrupar a las especies con base en ese criterio.

VI. Materiales y Métodos

Fase 1. Recolección de muestras.

Las muestras se obtuvieron a partir de aves capturadas o muertas por actividad cinegética en la Laguna de Chiconahuapan, Bienes Comunales, Almoloya del Río, Estado de México durante la temporada otoño-invierno (Noviembre de 2006-Marzo de 2007). Permiso de colecta científica DGVS/07198 (Anexo 2)

La población de aves que se muestreó, se compone de diferentes especies de anátidos migratorios y residentes del género *Anas*. Los anátidos del género *Anas* representativos del lugar se indican en el cuadro 1.

Cuadro 1. Lista de anátidos del género *Anas* presentes en la Laguna de Chiconahuapan.

Nombre Común	Nombre Científico	No. Animales
Cerceta de ala azul	<i>Anas discors</i>	3
Cerceta de ala verde	<i>Anas crecca</i>	2
Cerceta canela	<i>Anas cyanoptera</i>	3
Pato golondrino	<i>Anas acuta</i>	2
Pato chalcúan o panadero	<i>Anas americana</i>	1
Pato cucharón norteco	<i>Anas clypeata</i>	3
Pato cola negra	<i>Anas strepera</i>	1
Pato mexicano/ triguero	<i>Anas platyrhynchos diazi</i>	4
Pato doméstico	<i>Anas platyrhynchos domesticus</i>	1

Se obtuvieron muestras de sangre e hígado de diferentes anátidos del género *Anas* con base a un cronograma para la temporada cinegética (cuadro 2).

**Cuadro 2. Cronograma de Muestreo:
Temporada 2006-2007.**

Actividades	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril
Reconocimiento de la Laguna								
1er Monitoreo Antes del Inicio de Temporada de Caza								
2° Monitoreo Durante La Temporada de Caza								
3er Monitoreo Fin de Temporada de Caza								

El ADN fue obtenido a partir de sangre completa con EDTA y mantenido a -20° C hasta uso.

Los hígados se conservaron en formalina amortiguada de fosfatos al 10% y en etanol al 70%, mantenido a temperatura ambiente.

Fase 2. Extracción de ADN genómico.

La extracción del ADN genómico se realizó por medio de los siguientes métodos:

* Fenol-cloroformo.

La extracción de ADN genómico a partir de hígado, se realizó por medio del método fenol-cloroformo, este órgano parenquimatoso se maceró en solución de PBS estéril en proporción 1:10, después se centrifugaron (Marca: Sorvall Herdeus, Modelo: Biofuge fresco, Rango: 13000rpm) durante 10min a 225 x g (1500rpm), se recolectó 250µl de sobrenadante que se homogenizó con 250µl de solución de

lisis y 12.5µl de Proteinasa K (Fermentas, No cat. E00491) a una concentración de 1mg/ml, posteriormente se incubó en baño maría a 37 °C por 2 hrs para facilitar la liberación del ADN. La muestra final es aproximadamente de 500µl. Se procedió a realizar la extracción con fenol-cloroformo-isoamílico y cloroformo-alcohol-isoamílico (RESEARCH ORGANICS, No cat. 0641P). El ADN se precipitó con etanol absoluto frío y una vez concentrado se resuspendió en 50µl de agua DEPC (0.2%), esto se conservó a -20 °C en un ultracongelador (Marca: Daigger, Modelo: 253, Rango: -19 a -23°C).^{62,63,64}

* QIAGEN, QIAquick.

El otro método de extracción de ADN se utilizó el sistema comercial (QIAGEN QIAquick Gel Extracción, No cat. 28704), siguiendo el protocolo del fabricante como sigue: Se cortaron y maceraron aproximadamente 25mg de tejido hepático en un mortero estéril, posteriormente las muestras se maceraron en seco, fueron transferidas a tubos eppendorff con capacidad para 2ml (Marca: Axigen scientific, Modelo: microtubos MCT-200-A), se adiciona 180µl de buffer ATL y 20µl de proteinasa K a una concentración de 100mg (solución de 600 mAU/ml o proteinasa a 40 mAU/mg) (Fermentas, No cat. E00491), la mezcla se homogenizó en un vortex (Marca: Thermolyne, Modelo: Maxiplus) y se incubó a Baño maría (Marca: Techne Tempette, Modelo: Temple TE80) a 55°C hasta que el tejido estuvo completamente lisado, observándose de color café transparente, en un tiempo aproximado de 1 hora.

Posteriormente la muestra se pasó a columnas (aproximadamente 500µl). El ADN presente en la columna fue lavado varias veces con solución amortiguadora ET. Para eluir el ADN de la columna se agregó agua destilada o inyectable estéril, dejando incubarse por 1 minuto a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó por 1 minuto a 65 x g (8 000rpm) para obtener el ADN genómico.

La lectura del contenido de ADN de las muestras previamente procesadas con la técnica Fenol-cloroformo y con el sistema comercial (QIAGEN QIAquick Gel Extracción, No cat. 28704), se realizó en el Espectrofotómetro (Marca: BECKMAN, Modelo: DU-640B) (Anexo 3; cuadro 3).

Fase 3. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Oligonucleótidos

Para determinar en qué especies de anátidos del género *Anas* está presente el fragmento de secuencias asociadas al complejo mayor de histocompatibilidad clase I de *Anas platyrhynchos* se realizaron pruebas de PCR. Los fragmentos de ADN fueron observados en geles de agarosa al 0.8%, 1% y 2%, teñidos con bromuro de etidio (Sigma. No cat. E7637) a una concentración 10X, para posteriormente observarlos en un Transiluminador (Marca: UVP, Modelo: 20, Rango: 115volt. 60Hz).

La prueba de PCR se realizó en un termociclador de gradiente (Marca: Thermo Hyaid, Modelo: PCR Express). La cadena alfa del MHC de pato fue amplificada con los oligonucleótidos descritos por Moon *et al* (1999),¹⁴ sentido 5'-GCCCCACTCCCTGCGCTA-3' y el antisentido 5'-GCAGATAGGAGATGTGAGAGGTTG-3'. La especificidad de los oligonucleótidos para la cadena alfa del MHC de pato fueron corroborados por medio del programa Net Primer, PREMIER Biosoft Internacional y el software WorkBench 3.0., para asegurarnos que no hubiese fallas, como una nula amplificación del producto, debido a amplificaciones no específicas o a la formación de dímeros o de horquillas de oligonucleótidos que pueden competir con el producto deseado. El tamaño del fragmento esperado fue de 750pb.

Reactivos y condiciones de la PCR.

1.- Se preparó una reacción de PCR en un volumen total de 50µl en tubos eppendorff de 0.2ml (Marca: Axigen scientific, Modelo: Tubes PCR-02-C), la cual contenía 1X de amortiguador de polimerasa, 1mM MgCl₂, 2mM dNTP's (US Biological. No cat. D3191), 0.5U Taq polimerasa (Fermentas. No cat. EPO402), 10µM oligonucleótidos (Invitrogen), 50ng de ADN⁶⁵ y agua DEPC para completar los 50µl.

2.- Las condiciones del termociclador fueron como sigue: un primer tiempo de 95°C por 2 minutos y medio, el segundo tiempo consistió de 35 ciclos cada uno con la siguiente programación; para desnaturalización a 95 °C por 45 segundos, alineamiento a 57.1 °C por 45 segundos, la elongación a 72 °C por 45 segundos. Al terminó de los 35 ciclos, se programo un único tiempo de 72 °C por 5 minutos para finalmente mantener el producto amplificado a 4 °C hasta la realización de la electroforesis. El cálculo para la temperatura media (T_m) se realizó con la siguiente fórmula: $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ Formula de Wallace (Anexo 4, cuadro 4).

3.- El análisis del producto de PCR se realizó en una cámara de electroforesis (Marca: Cleaver Scientific, Modelo: MSMIDI, Rango: 250mA) en un gel de agarosa con amortiguador TAE (200mM EDTA pH 8, 48.4g Tris, 11.4ml ácido acético glacial) a una concentración 1X y mantenido a 100 Voltios por 25 minutos. Para determinar el tamaño del fragmento del producto amplificado se utilizaron marcadores de peso molecular de 50pb (Fermentas. No cat. SM1133) y otro de 1Kb (Fermentas. No cat. SM1163). El gel fue teñido con bromuro de etidio 10X (Sigma. No cat. E7637) durante 20 minutos para observar las bandas en el transiluminador (Marca: UVP, Modelo: 20, Rango: 115volt. 60Hz).

El producto de PCR con el tamaño esperado fue almacenado a -20 °C para su posterior secuenciación o análisis por RFLP.

Fase 4. Purificación de productos de PCR para secuenciación y RFLP.

Para la realización de la purificación de las bandas a partir de gel de agarosa TAE IX al 1%, se utilizó un sistema comercial de purificación en columnas (QIAGEN QIAquick Gel extraction. No cat. 28704) (Anexo 5).

El producto de 750pb amplificado por la PCR y observado en el gel de agarosa fue cortado con una navaja de bisturí y colocado en pequeños pedazos en un tubo eppendorff de 2ml (Marca: Axigen scientific, Modelo: microtubos MCT-200-A). Utilizando el protocolo del sistema comercial (QIAGEN QIAquick Gel extraction. No cat. 28704) el ADN fue purificado a través de columna, lavado varias veces con amortiguador; eluído con agua inyectable estéril y conservado a -20°C hasta el momento de secuenciar.

Fase 5. Reacción de Secuenciación.

La secuenciación del producto purificado de PCR se llevo acabo en un secuenciador automático (Marca: PERKIN ELMER, Modelo: 310), usando los oligonucleótidos; sentido 5'-GCCCCACTCCCTGCGCTA-3' y el antisentido 5'-GCAGATAGGAGATGTGAGAGGTTG-3', revisados en el programa de internet Net Primer (PREMIER Biosoft Internacional).

Secuenciación.

1.- La reacción de secuenciación se llevo a cabo en tubos eppendorff de 0.2ml con un volumen total de reacción de 10 μ l. La reacción estuvo compuesta por los siguientes reactivos: Un terminador Big Dye, 2.5X amortiguador de secuenciación (Applied Biosystems. No part. 4336917), 10 μ M de oligonucleótido (Invitrogen), 2 μ l de ADN (aproximadamente 50ng ADN), y agua bidestilada estéril.

2.- Una vez obtenida la mezcla, se colocaron los tubos eppendorf en un termociclador (Marca: Thermo Hybaid, Modelo: PCR Express) para llevar a cabo la amplificación en el programa ABI, donde se ajusto la temperatura de alineación a 57.1°C.

3.- Después de la reacción de secuenciación, se realizó la recuperación y purificación del ADN a través de columnas de Sephadex G-50-50 (Sigma. No cat. G25-50 (Anexo 6) se colocaron 10 μ l del producto de PCR en la columna de Sephadex, colocando estas columnas en tubos eppendorf de 1.5ml y centrifugados a 750 x g (2800 rpm) durante 2 minutos a 4 °C, los tubos eppendorff de 2ml (Marca: Axigen scientific, Modelo: microtubos MCT-200-A), el DNA se coloco en un concentrador de ADN (Marca: Eppendorf, Serie: 5301) hasta secar las muestras, quedando una pastilla, que se almacena a -20 °C, hasta ser procesadas, la lectura de las muestras se realiza en un secuenciador automático (Marca: PERKIN ELMER, Modelo: 310).

Fase 6. RFLP (Polimorfismo de largo de los Fragmentos de Restricción).

Para determinar diferencias en la secuencia del MHC entre las 9 especies de patos silvestres, se realizó la prueba de polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción (RFLP). Para el corte del producto de PCR se utilizaron las enzimas de restricción Hind III (GIBCOBRL. No cat. 15207-020), BsrG I (Fermentas. No cat. ERO931) y RsaI (Invitrogen. No cat. 15424-013) con base al análisis de la secuencia del producto de PCR por el software Workbench (Anexo 7 y cuadro 5). Los fragmentos de ADN fueron observados en geles de agarosa al 1% y 3%, teñidos con bromuro de etidio 10X y observados en un transiluminador (Marca: UVP, Modelo: 20, Rango: 115volt. 60Hz).

El corte con enzimas del producto de PCR se realizó como sigue:

1.- El volumen de reacción de la restricción se llevó a cabo en 30µl, compuesto por una mezcla de 50ng de ADN aproximadamente, amortiguador de la enzima, BSA (Bovineserum, albumin acetylated 100X dilution) (Promega), y agua DEPC. La mezcla se incubó a 37°C por 16 hrs, se analizó en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio 10X y se observó en un transiluminador (Marca: UVP, Modelo: 20, Rango: 115volt. 60Hz).

VII. Resultados

Se determinó que el método adecuado para la obtención de ADN genómico a partir de hígado (conservado en etanol al 70%), fue el sistema comercial de QIAGEN QIAamp ADN, ya que por este método se obtiene ADN de mejor calidad y mayor cantidad; con el método fenol-cloroformo se obtuvo ADN de buena calidad pero poca cantidad, para determinar esto se realizó lectura de las muestras en el espectrofotómetro, se realizó electroforesis en geles de Agarosa al 1%. Además de que los residuos de fenol o cloroformo interferían en la reacción de PCR, por lo que se utilizó el método de extracción de ADN genómico el sistema comercial de QIAGEN QIAamp ADN.

Se amplificó por PCR el fragmento de la cadena alfa del complejo mayor de histocompatibilidad clase I, utilizando el sentido 5'-GCCCACTCCCTGCGCTA-3' y antisentido 5'-GCAGATAGGAGATGTGAGAGGTTG-3', los cuales ya se habían probado para amplificar esta región en la investigación realizada por Moon y colaboradores.¹⁴ Tomando las muestras de ADN, de Ad (*Anas platyrhynchos diazi*) y PD (*Anas platyrhynchos domesticus* o Pato doméstico), las cuales son las especies más cercanas a *Anas platyrhynchos*. Los resultados de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa, no fueron específicos, ya que se obtuvieron varias bandas con diferentes pesos moleculares (Anexo 8; Figura 3).

La secuencia (GenBank, AB119993) de *Anas platyrhynchos*, indica que el fragmento que buscamos, (complejo mayor de histocompatibilidad clase I cadena alfa) es de aproximadamente 1300pb. Por lo tanto se cortó la banda que tenía ese peso, se purificó con el sistema comercial de purificación QUIAQUICK QIAGEN. Una vez purificada la banda se secuenció. Sin embargo esta no fue. Se concluyó que se trataba de una banda accesoria, por lo tanto se intentó con la banda más brillante, que tenía un peso aproximado de 750pb. Esta banda se purificó y nuevamente se realizó electroforesis en gel de Agarosa al 1% TAE IX, para

observar su tamaño en el transiluminador. Observando una banda de 750pb aproximadamente (Anexo 9; Figura 4).

Con el producto purificado se realizó la reacción de secuenciación. Los resultados obtenidos para las muestras Ad (*Anas platyrhynchos diazi*) y PD (*Anas platyrhynchos domesticus* o Pato doméstico), fueron de 669bp correspondiente al sentido, 242bp para el antisentido y de 575bp sentido, 247bp para el antisentido. Estas lecturas se transcribieron a formato Word, de esta manera se alimentó respectivamente al programa de WorkBench, se compararon con las secuencias del fragmento de la cadena alfa del complejo mayor de histocompatibilidad clase I de *Anas platyrhynchos*, *Gallus gallus*, (GenBank, NW_001471740) y entre ellas. Con respecto a la comparación entre las secuencias de *Anas diazi* y *Anas platyrhynchos domesticus*, se encontró una similitud del 60% y del 57% para *Anas platyrhynchos diazi* y *Gallus gallus*, respectivamente, para la comparación que se realizó entre *Anas platyrhynchos diazi* y Pato doméstico, se encontró similitud entre ellas, casi del 100% (Anexo 10).

No se encontró similitud, con la secuencia registrada en el banco de datos (GenBank, AB119993) del complejo mayor de histocompatibilidad clase I cadena alfa de *Anas platyrhynchos*, con respecto a las muestras secuenciadas de *Anas platyrhynchos diazi* y *Gallus gallus*. Estas fueron introducidas en el programa de NCBI/BLAST para realizar una búsqueda, se encontró similitud con el cromosoma 8 de *Gallus gallus*, para ambas secuencias, es decir para el sentido como para el antisentido. El programa no cuenta con secuencias de pato; debido a la falta de información con respecto a esta especie, no se pudo realizar la comparación de las secuencias obtenidas de *Anas platyrhynchos diazi* y *Anas platyrhynchos domesticus*.

Para la muestra de *Anas platyrhynchos diazi* se encontró, similitud del 90-91%, y para la muestra de *Anas platyrhynchos domesticus* del 91% con el cromosoma 8 de *Gallus gallus* (GenBank, NW_001471740) (Anexo 11; cuadro 6), el cual se refiere a un protooncogen. Comparándolas con el humano y el ratón no se encontró similitud significativa con el programa (NCBI/BLAST).

Se determinó, con la prueba de la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR), que en las muestras de *Anas discors*, *Anas crecca*, *Anas cyanoptera*, *Anas acuta*, *Anas americana*, *Anas clypteata* y *Anas strepera* está presente el fragmento de 750pb, que corresponde al cromosoma 8, al igual que en las muestras control *Anas platyrhynchos diazi* y *Anas platyrhynchos domesticus* (Anexo 12; Figura 5).

A partir del corte de fragmentos con enzimas de restricción, se encontró que el fragmento amplificado por PCR de los ejemplares del género *Anas* es diferente. Se obtuvieron cortes con las enzimas de restricción RsaI y BsrGI para todos los ejemplares de *Anátidos* silvestres. La diferencia se encontró con el corte de la enzima de restricción HindIII. Esta enzima sólo hizo corte para los ejemplares *Anas platyrhynchos diazi*, *Anas platyrhynchos domesticus* y *Anas americana*; mientras que para los patos *Anas discors*, *Anas crecca*, *Anas cyanoptera*, *Anas acuta*, *Anas clypteata* y *Anas strepera* no realizó corte alguno (Anexo 13; Figuras 6,7,8).

VIII. Discusión

Es importante recordar que los patos silvestres migratorios constituyen uno de los componentes más carismáticos de la fauna que habitan los humedales, juegan un papel importante en el mantenimiento de la biodiversidad de los sistemas acuáticos mediante el transporte de plantas, semillas, propagación de invertebrados, entre diferentes humedales. Los humedales son descritos como los riñones del planeta, debido a que filtran nutrientes y contaminantes, además de ser fuertes zonas de amortiguamiento contra inundaciones, recargando el manto acuífero, “son los ecosistemas más productivos del planeta”. Estas especies y estas zonas se han ido perdiendo en el transcurso de los años por factores antropogénicos principalmente, facilitando la transmisión y diseminación de agentes infecciosos responsables de enfermedades de vigilancia epidemiológica, exóticas, o de tipo neoplásico, poniendo en riesgo la salud pública, salud animal y a especies que estén amenazadas o en peligro de extinción, afectando así la biodiversidad y economía de nuestro país.

Como ya hemos visto a lo largo de esta investigación, los loci del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) desempeñan un papel importante en el sistema inmunológico, por lo que constituyen genes candidatos para estudios de asociación entre marcadores genéticos y resistencia o/y susceptibilidad a enfermedades tanto de tipo infeccioso como neoplásicas. El objetivo de esta investigación es el de amplificar secuencias asociadas al Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I, en patos silvestres migratorios del género *Anas*, contribuyendo al conocimiento de las capacidades inmunológicas de estas aves. Se sabe que el MHC del pato está compuesto por 5 genes polimórficos contenidos en 36.8 Kb de ADN,¹⁴ lo que no sabemos es si hay diferencia en esta región, entre individuos de la misma especie, pertenecientes al mismo género (ver cuadro 1).

La secuenciación de las muestras provenientes de *Anas platyrhynchos diazi* y *Anas platyrhynchos domesticus*, se realizó debido a que son las especies que se han estudiado a lo largo de los años por diversos investigadores en el mundo.^{14,27,41,59} Por lo que tomamos a estas especies como controles positivos, y así corroborar que se amplificó una secuencia asociada al MHC clase I.

Desafortunadamente el fragmento amplificado por PCR no corresponde al Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I, usando los primers utilizados por Moon y colaboradores,¹⁴ con la especie *Anas platyrhynchos domesticus* en cautiverio. Esto puede ser debido, a que las muestra de ADN genómico, utilizadas en esta investigación, provinieron de *Anátidos* silvestres migratorios, por lo tanto se desconoce su reacción, o puede tratarse de fragmentos de secuencias relacionadas a esta región, por lo que se obtuvieron resultados diferentes, al amplificar una parte de la secuencia del cromosoma 8 del pollo, para todas nuestras muestras de *Anátidos*, se obtuvo una banda con peso molecular aproximado de 750pb. Hasta el momento no hay investigaciones relacionadas con el cromosoma 8 en patos, por lo tanto no encontramos registros en el banco de datos (GenBank) para comparar la secuencia amplificada. Haciendo la comparación con el ave mas cercana *Gallus gallus*, obtuvimos una correlación del 91% de similitud con el cromosoma 8 de *Gallus gallus* (GenBank, NW_001471740).

El análisis de RFLPs con las enzimas BsrG I y Rsa I que todas las muestras: *Anas platyrhynchos diazi*, *Anas platyrhynchos domesticus*, *Anas americana*, *Anas discors*, *Anas crecca*, *Anas cyanoptera*, *Anas acuta*, *Anas clypteata* y *Anas strepera*, tienen los mismos sitios de corte con estas enzimas. Para la enzima Hind III no se encontró la región de corte para los ejemplares *Anas discors*, *Anas crecca*, *Anas cyanoptera*, *Anas acuta*, *Anas clypteata*, *Anas strepera*, lo que las hace diferentes de las otras especies de patos estudiadas, por corte con enzimas de restricción.

Los resultados obtenidos, brindan información valiosa sobre los patos silvestres migratorios del género *Anas*, indicando que estas aves pueden ser susceptibles a enfermedades neoplásicas.

Se sabe que uno de los mecanismos por los cuales las células tumorales evaden las defensas del huésped es su capacidad de no mostrar antigenicidad o que esta no sea captada por las células presentadoras de antígenos. Introducir genes que confieran mayor antigenicidad a las células y sean mejor reconocidas por el sistema inmune y por tanto más efectivo, es una posibilidad atractiva, son las llamadas vacunas. Se ha hecho en animales, introduciendo genes del antígeno mayor de histocompatibilidad clase I y clase II.⁶⁶

Las células de tipo cancerígenas disminuyen la expresión de las moléculas MHC clase I y clase II. Debido a que la mayoría de los péptidos asociados al MHC clase I derivan de proteínas propias intracelulares o de microorganismos infecciosos. Estas proteínas son cortadas en segmentos polipeptídicos por los proteosomas y transportadas hacia el retículo endoplasmático por las proteínas dependientes de ATP llamadas TAP (transportadoras asociadas al procesamiento antigénico), hasta asociarse al MHC y ser presentadas en la superficie celular a los linfocitos T. Cualquier defecto en el funcionamiento de los componentes del procesamiento y presentación antigénica incide en la capacidad de los linfocitos T de reconocer a la célula presentadora, en este caso la célula tumoral. La pérdida de uno o varios alelos de MHC es un evento común en varios tipos de tumores, especialmente en las metástasis. Estos defectos han sido atribuidos a mutaciones puntuales en la proteína β 2-microglobulina o en otros genes del MHC. Recientemente, defectos en otras proteínas relacionadas con la presentación antigénica, como los proteosomas y las TAP, han sido también descritos en melanomas y otros carcinomas.^{67,68,69,70,71}

La variación individual de la respuesta inmune esta ligada a la diversidad funcional y estructural del MHC, TcR, inmunoglobulinas (anticuerpos), citoquinas, NTF, entre otras proteínas. Estas proteínas están codificadas por múltiples y polimórficos genes, la variabilidad de estos genes constituyen las principales bases, en las variaciones de la resistencia a determinada enfermedad o enfermedades. Una de las teorías más aceptadas es la relativa simpleza y naturaleza compacta del gen de MHC del pollo ya que permite bajos niveles de recombinación, se presume de algún modo que contribuye a la asociación estricta de MHC´s con diferentes resistencias a ciertos patógenos infecciosos.¹⁸

La cantidad y calidad de la respuesta inmune depende en gran medida de la naturaleza de la interacción de estas moléculas.

El MHC dependiente de la resistencia o susceptibilidad de los pollos, se presume que depende de la especificidad de la unión peptídica de la dominancia expresada por moléculas de clase I. Esto parece probable en la resistencia de pequeños patógenos o para virus que contengan pocos péptidos. Un buen ejemplo es la resistencia MHC determinado y susceptibilidad al virus del Sarcoma de Rous (RSV)^{54,55,56} en que la resistencia esta relacionada con la presencia de apropiados péptidos ligados a MHC clase I de células afectadas (tumor) para ser reconocidas por células T CD8+. Con estos estudios se ha podido seleccionar razas de pollos que son más resistentes a cierta enfermedad. Como son las líneas B21 que son resistentes a MDV debido a que tienen haplotipos de MHC clase I que se expresan menos, en cambio cuando su expresión es abundante como en las líneas B19, son susceptibles a MDV.⁵

IX. Conclusión

Como ya hemos visto la transformación de una célula normal en maligna se debe a cambios genéticos o epigenéticos provocados por agentes químicos, físicos, por algunos virus y se requieren múltiples cambios en los genes para poder producir cáncer, sin embargo, una alteración de una copia del gen puede desencadenar la transformación cancerosa ya que es de tipo dominante. Hemos localizado por primera vez una secuencia homologa al cromosoma 8 de *Gallus gallus* en aves silvestres migratorias del genero *Anas*. El conocimiento generado en la realización de esta investigación, nos ha dado un nuevo panorama acerca de los patos silvestres migratorios del género *Anas*, que pueden ser susceptibles a padecer enfermedades de tipo canceroso, y que la activación de ellos podría presentarse en el hábitat (Ciénegas de Lerma).

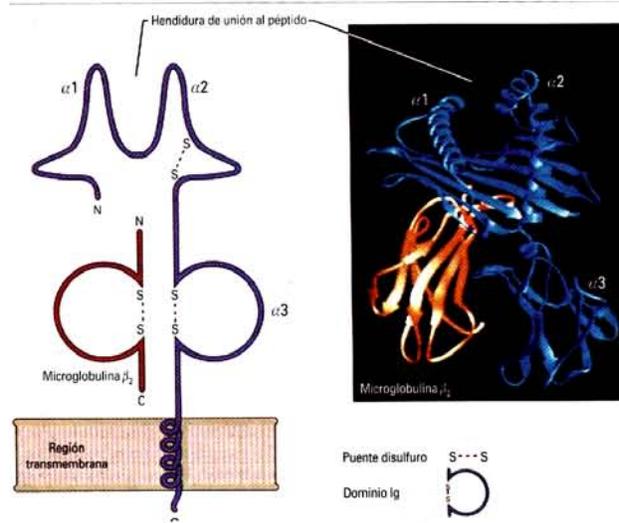
En el hábitat encontramos varios factores que pueden producir cambios tanto de tipo genéticos como epigenéticos en los patos. Por ejemplo los asentamientos humanos que cada vez se establecen mas cerca de los nichos ecológicos de estas aves, trayendo consigo aves de corral que por la cercanía pudiesen tener contacto con ellas y por consiguiente con algún virus y de esta forma activar un oncogen, los factores físicos como los choques térmicos por los drásticos cambios de temperaturas en los últimos años, o ciertos agentes químicos que estén en el agua por algún derrame de las fábricas aledañas a la zona.

El conocimiento de la secuencia completa del genoma del pato y de otros organismos, marca el comienzo de la biología moderna.

La selección genética para el MHC es un acercamiento deseable para desarrollar inmunorespuesta y resistencia a enfermedades, aunque el progreso por generación podría ser pequeño, dicho progreso es heredable y el conocimiento es acumulativo a través del tiempo. Entendiendo la asociación MHC-enfermedad ya sea de tipo cancerígeno o no, podría lograrse la selección genética para el desarrollo de marcadores moleculares, en lugar del desafío directo de las poblaciones a los agentes infecciosos, evitando así, altos costos y la dificultad para experimentar con este tipo de animales en el laboratorio o unidades de aislamiento, debido al estrés durante el manejo y cautiverio, el estado fisiológico del ave durante la época migratoria, reproductiva, de crianza o sedentaria, y el tratar con especies en peligro de extinción.

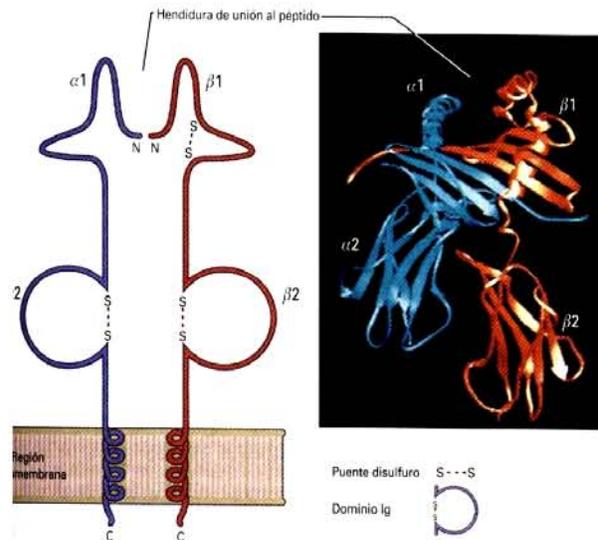
X. Anexos

Anexo 1



Fuente: Abbas 2006.

Figura 1. Estructura de una molécula de MHC clase I.



Fuente: Abbas 2006.

Figura 2. Estructura de una molécula de MHC clase II.

Anexo 2


SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES

**SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN
PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL**
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE
AV. REVOLUCIÓN No. 1425,
COL. TLACOPAC,
DELEG. ÁLVARO OBREGÓN
01040-MÉXICO, D. F.

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/ 07198
MÉXICO, D. F., A 07 JUL, 2005

MVZ. SOFIA GONZÁLEZ GUZMÁN
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
CIRCUITO EXTERIOR S/N, C. U.,
04510, COYOACÁN, MÉXICO, D. F.
crazytatanka@yahoo.com.mx

Considerando que ha dado cumplimiento a los requisitos establecidos para efectuar investigación y colecta científica de flora y fauna silvestres en territorio mexicano y con fundamento en el Artículo 32 Bis fracciones I, III, V, XXII, XXXIX de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; Artículos 5 fracción XI, 79, fracciones I, II, III, VI y VII, 80 fracción I, 82, 83 y 87 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente; Artículo 31, fracción VI del Reglamento Interior de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Artículos 1º, 97 y 98 de la Ley General de Vida Silvestre; Título Sexto, Capítulo I, Artículo 85, fracciones I, II, III, IV, V y VI, Capítulo II, Artículo 88, fracciones I, II y VI, Capítulo IV, Artículo 105, fracciones II y III del Reglamento de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente en Materia de Áreas Naturales Protegidas (ANP's); las disposiciones relativas de la Norma Oficial Mexicana NOM-126-SEMARNAT-2000, por la que se establecen las especificaciones para la realización de actividades de colecta científica de material biológico de especies de flora y fauna silvestres y otros recursos biológicos en el territorio nacional; la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001, protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo, la Dirección General de Vida Silvestre **autoriza** la captura, toma de datos, toma de muestras de sangre, plumas y liberación inmediata del número de ejemplares que se consideren necesarios de los Géneros *Anas*, *Amazona* y *Buteo*. Las actividades se llevarán a cabo en el Centro para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre (CIVS) "Los Reyes". Esta autorización tendrá una vigencia a partir de la fecha de expedición de la presente y hasta el 30 de junio del año 2006.

DICHAS ACTIVIDADES DEBERÁN REALIZARSE EN TOTAL COORDINACIÓN CON EL PERSONAL DE LA DIRECCIÓN DE SANIDAD, CONTROL Y FOMENTO DE LA VIDA SILVESTRE.

La presente se expide en apoyo a las actividades inherentes al desarrollo del proyecto "Caracterización molecular de la cadena alfa del complejo mayor de histocompatibilidad clase I de aves del género *Anas*, *Amazona* y *Buteo*", que llevará a cabo la Universidad Nacional Autónoma de México, **debiendo sujetarse obligatoriamente a las siguientes condiciones:**

1. - Tomando en consideración lo establecido por el Artículo 87 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y por el Capítulo IV, Artículo 97 de la Ley General de Vida Silvestre, el titular de la presente deberá contar con la autorización expresa de los legítimos propietarios de la(s) tierra(s) donde pretende desarrollar el proyecto.
2. - Cumplir con las disposiciones Administrativas, Fiscales y de Sanidad exigibles por las autoridades competentes. **Obligatoriamente y previo al inicio de las actividades de campo deberá contactar al Personal de la Dirección de Sanidad, Control y Fomento de la Vida Silvestre, de la Dirección General de Vida Silvestre (Av. Revolución 1425, Col. Tlacopac, San Ángel, C. P. 01040, Deleg. Álvaro Obregón, Nivel 9, Tel. 5624 3665), para coordinar las actividades.**
3. - En la realización del proyecto propuesto, se responsabilizará al titular de la investigación de cualquier impacto significativo que resulte sobre las poblaciones de la flora o fauna silvestres y sus hábitats, por lo que deberá considerar el riesgo de perturbación del ecosistema, antes de su ejecución y no llevarlo a cabo si existe algún riesgo.

1 de 2



SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES

**SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN
PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL**

DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE
AV. REVOLUCIÓN No. 1425,
COL. TLACOPAC,
DELEG. ÁLVARO OBREGÓN
01040-MÉXICO, D. F.

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/ 07198

MÉXICO, D. F., A 07 JUL. 2005

4. - Previo al inicio de las actividades de campo, deberá enviar obligatoriamente por escrito y utilizando cualquier medio su programa de trabajo a la Delegación Federal de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales en el Estado de México (Tel. 01 (722) 276 78 06, 276 7835), enviando copia del mismo a la Dirección General de Vida Silvestre. De igual manera, al término de dichas actividades lo notificará a esa Delegación Federal, enviando un reporte detallado por escrito. alcohol

5. - La totalidad del material colectado deberá destinarse exclusivamente a los fines específicos del proyecto, objeto de la presente autorización. Con base al Capítulo IV, artículo 98 de la Ley General de Vida Silvestre, el material colectado será analizados en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, donde el titular, asume la responsabilidad de remitir a esta Dirección General, copia de la(s) constancia(s) del(os) depósito(s) debidamente firmado(s), especificando la cantidad de ejemplares depositados.

6. - Con base al Capítulo IV, Artículo 98 de la Ley General de Vida Silvestre, el responsable deberá someter a la consideración de la Dirección General de Vida Silvestre, en un plazo no mayor de 30 (TREINTA) días de concluida la vigencia de la presente, un informe que describa detalladamente las actividades realizadas, especificando el número de muestras colectadas, los resultados obtenidos, la problemática del área trabajada, las potenciales alternativas de solución y en su oportunidad, la(s) publicación (es) y sobretiros producto de la investigación.

7. - Queda estrictamente prohibido efectuar cualquier aprovechamiento de las especies de flora y fauna silvestres, cualesquiera que sea su estatus, excepto lo aquí autorizado, así como realizar actividades en áreas naturales protegidas de México, sean Estatales o Federales, sin previa autorización.

8. - De acuerdo al Artículo 87 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y al Capítulo IV, Artículo 97 de la Ley General de Vida Silvestre, esta autorización no ampara el aprovechamiento de los especímenes colectados para fines comerciales, ni de utilización en biotecnología.

Se recomienda que durante sus actividades de campo, en el caso de encontrar ejemplares de especies listadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001, se notifique de ello (la especie, ubicación geográfica y la fecha) a esta Dirección General, en el informe de actividades referido en la cláusula número seis antes mencionado.

La presente autorización es personal e intransferible y habrá de mostrarse a las Autoridades Federales, Estatales y Municipales cuantas veces lo soliciten. Asimismo, tomando en consideración lo establecido por el Artículo 87 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y por el Capítulo IV, Artículo 97 de la Ley General de Vida Silvestre, el titular de la presente deberá contar con la autorización expresa de los legítimos propietarios de la(s) tierra(s) donde pretende desarrollar el proyecto.

El incumplimiento de las condiciones aquí establecidas, dará origen a la instauración de un procedimiento administrativo ante la autoridad competente, para proceder a la cancelación de la autorización y a la aplicación de la legislación correspondiente, según sea el caso.

ATENTAMENTE
SUFRAGIO EFECTIVO. NO REELECCIÓN.
EL DIRECTOR GENERAL

Felipe Ramírez Ruiz de Velasco
FELIPE RAMÍREZ RUIZ DE VELASCO



Copias al reverso...!



SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES

**SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN
PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL**

DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE
AV. REVOLUCIÓN No. 1425,
COL. TLACOPAC,
DELEG. ÁLVARO OBREGÓN
01040-MÉXICO, D. F.

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/ **09814**

MÉXICO, D. F., A **09 SET. 2005**

Septiembre de 2005,
veinte años de participación solidaria desde los sismos del '85

MVZ. SOFÍA GONZÁLEZ GUZMÁN
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
CIRCUITO EXTERIOR S/N, C. U.,
04510-COYOACÁN, MÉXICO, D. F.
crazytatanka@yahoo.com.mx

En alcance al Oficio NÚM.SGPA/DGVS/07198 de fecha 07 de julio del año 2005, medio por el cual se autorizó el desarrollo del proyecto denominado "Caracterización molecular de la cadena alfa del complejo mayor de histocompatibilidad clase I de aves del género *Anas*, *Amazona* y *Buteo*"; al respecto, tengo a bien informarle que **no existe inconveniente** en que se incluyan las Ciénegas de Lerma del Estado de México en el proyecto.

Sin embargo, deberá cumplir con las disposiciones Administrativas, Fiscales y de Sanidad exigibles por las autoridades competentes. **Obligatoriamente y previo** al inicio de las actividades de campo deberá contactar al **C. Guillermo Ramírez Fillipini**, Director Regional de a Región Centro y Golfo (Nueva Tabachin No. 104, Col. Tlaltenango, Mpio. de Cuernavaca, Morelos, C.P. 62170, Tel/Fax (777) 37 22 219, e-mail: gfillipini@conanp.gob.mx), para presentar copia del proyecto de investigación, programa de actividades, lista de participantes y fechas en que pretenden ingresar al Área Natural Protegida; así mismo se le asignará el personal del ANP que lo acompañarán durante los trabajos de campo y deberá acatar las indicaciones y recomendaciones que le haga dicho personal.

Finalmente, le informo que este oficio deberá estar acompañado invariablemente del similar arriba citado y **queda sujeto estrictamente a las condiciones establecidas en el mismo.**

ATENTAMENTE
SUFRAGIO EFECTIVO. NO REELECCIÓN.
EN AUSENCIA DEL DIRECTOR GENERAL,
CON FORME AL ARTÍCULO 154 DEL REGLAMENTO
INTERIOR DE LA SEMARNAT, FIRMA EL PRESENTE
DIRECTOR DE CONSERVACIÓN DE LA VIDA SILVESTRE




ARIEL ROJO CURIEL

- C.c.p. **C. Francisco Giner De Los Rios**.- Subsecretario de Gestión para la Protección Ambiental.- Edificio.
- C. José Bernal Stopen**.- Director General de Inspección de Vida Silvestre, PROFEPA.- Carr. Picacho Ajusco No. 200, Col. Jardines de la Montaña, Deleg. Tlalpan, C. P. 14210, México D. F.
- C. Ricardo Tejeda Nichols**.- Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado de México.- Rancho San Lorenzo, Conjunto SEDAGRO, Edificio C-1, C.P. 52140, Metepec, Estado de México.
- C. Guillermo Ramírez Fillipini**.- Director Regional de a Región Centro y Golfo (Nueva Tabachin No. 104, Col. Tlaltenango, Mpio. de Cuernavaca, Morelos, C.P. 62170).
- C. David Gutiérrez Carbonell**.- Director General de Manejo para la Conservación de Áreas Naturales Protegidas, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas.- Carr. Picacho Ajusco No. 200, 8º Piso, Col. Jardines de la Montaña, Delegación Tlalpan, C. P. 14210, México, D. F.
- C. Fernando Sánchez Camacho**.- Jefe del Departamento de Análisis para el Aprovechamiento de Otras Especies. Edificio. Archivo General (09/C2-2241/06/05)

RFM/ACG/FS/ESR

c:colectificenciaalcances/oficioalcanceSofia-Gonzalez_aves.doc esr (06/09/05)

Anexo 3

Lectura de ADN en el espectrofotómetro de las muestras de hígado de *Anas diazi* y Pato doméstico con la técnica de fenol-cloroformo y utilizando el sistema comercial de QIAGEN para extracción de ADN.

Cuadro 3. Lecturas del Espectrofotómetro.						
Especie	Método de Extracción	Simple ID	abs 260.0 nm	abs 280.0 nm	260 280.0nm	280 260.0nm
PD	Fenol -		0.0256	0.0180	1.4248	0.7018
Ad	Cloroformo		0.0493	0.0366	1.6235	0.5802
PD	Kit		0.0623	0.0370	1.6846	0.5916
Ad	(QIAGEN)		0.1053	0.0623	1.6912	0.5913

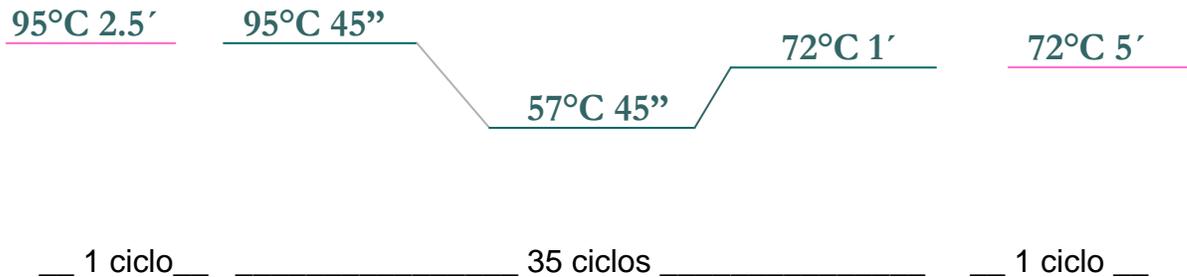
PD = *Anas platyrhynchos domesticus*; Ad = *Anas platyrhynchos diazi*.

Anexo 4

Cuadro 4. Reactivos para llevar acabo la PCR.

Reactivos	Stock	Final	µl por muestra
Buffer Taq	10X	1X	5
dNTP's	10mM	0.2mM	1
Sentido	10µM	0.6µM	3
Antisentido	10µM	0.6µM	3
ADN	50, 25ng		-
MgCl₂	25mM	2.5mM	5
Taq polimerasa	5U	2.5	0.5
Agua PC	cbp 50µl por tubo.		

Temperaturas del Termociclador:



Anexo 5

PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN
PRODUCTOS DE PCR
Columnas de QIAQUICK de QIAGEN

Procedimiento para purificar productos de PCR desde gel.

1. Correr todo el producto de la PCR en un gel de agarosa 2%.
2. Visualizar el gel en un transiluminador UV cortar las franjas del gel que contengan la banda del fragmento amplificado de interés y colocarlas en un tubo de 1.5 mL por muestra.
3. Pesar cada uno de los tubos con el producto de amplificación.
4. Adicionar a cada tubo 3 volúmenes de buffer QG (W peso del gel x 3000= Volumen de buffer QG adicionado).
5. Incubar a 50°C por 10 minutos (hasta que el gel esté completamente disuelto). Agitar continuamente. Revisar que el color de la muestra sea amarillo (similar al del buffer QG), si tiene un color anaranjado o violeta adicionar 10 µl de acetato de sodio 3M.
6. Después de la incubación, agregar a cada tubo W x 1000 µl de isopropanol 100%. Mezclar con vortex.

7. Vaciar la mezcla en una columna. Centrifugar por 1 min a velocidad alta. Desechar el líquido.
8. Añadir 500 µl de buffer QG a la columna y centrifugar por 1 min. Desechar el líquido.
9. Añadir 700 µl de buffer PE a la columna. Esperar 5 min. Centrifugar por 1 min. Desechar el líquido.
10. Centrifugar 1 min adicional para eliminar el sobrante de buffer PE.
11. Cambiar la columna a un tubo de 1.5 ml rotulado con la clave de la muestra. Añadir 30-50 µl de ddH₂O al centro de la membrana de la columna (sin tocarla con la punta de la micropipeta). Dejar reposar 1 min. Centrifugar 1 min. Posteriormente puede concentrarse la muestra hasta 7-10 µl en la vacofuga.

Anexo 6

REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN

Reactivos:

Big Dye Terminator (-20° C)

2.5X Sequencing Buffer (-20° C)

Sephadex G-50-50

NOTA: Se preparan dos tubos de reacción por cada muestra (uno para cada primer). Se rotulan los tubos eppendorff de 0.2 ml necesarios por cada muestra y por cada primer.

1. En cada tubo eppendorff se adicionan:
 - 2 µl de 2.5X Sequencing Buffer (en el congelador de -20°)
 - 2 µl de Big Dye Terminator (en el congelador de -20°)
 - 0.5 µl de oligo o primer (si está a una concentración de 5 pmol)

X μ l de ADN

Y μ l de agua bidestilada estéril

El volumen final debe ser de 10 μ l.

NOTA:

X está relacionado con cantidad de ADN que se visualice en la fotografía del gel de electroforesis para la concentración después de la PCR (10 ng por cada 100 pb que se quieran leer).

Y es la cantidad de agua que se necesita para completar el volumen final (Vf) de 10 μ l.

2. Cada tubo de reacción se mezcla con cuidado a mano.
3. Se centrifugan 15 segundos a máxima velocidad.
4. Se colocan los tubos en el termociclador para llevar a cabo la amplificación en el programa ABI (según la temperatura media o de alineamiento utilizada en la PCR 50°, 55°, etc.).

Para recobrar el ADN después de la reacción de secuenciación

En el caso de columnas nuevas:

1. Se debe verificar que el Sephadex (el polvo blanco dentro de la columna) no se encuentre adherido a la tapa de la columna dando unos golpecitos a la tapa para que el Sephadex caiga al fondo de la columna.
2. A cada columna se le adicionan 800 μ l de agua bidestilada esterilizada.
3. Se mezcla en el vortex hasta que se disuelva el Sephadex (el agua de la columna se observa turbia), teniendo cuidado de que no se formen burbujas.
4. Las columnas se dejan hidratar por dos horas.
5. Transcurrido este tiempo, las columnas se destapan, a una por una se le quita la base y se tapa la abertura de la columna con el dedo y se oprime para que el agua de la columna se elimine y se coloca en un tubo colector.
6. Cuando se observe que se ha eliminado totalmente el agua de la

columna, se tira el agua que se depositó en cada tubo colector y las columnas se centrifugan a 2800 rpm por dos minutos.

7. Se tira el agua que se depositó en el tubo colector.
8. Se coloca la muestra (producto de PCR) (20µl) en el centro de la columna sin tocar las paredes de la misma ni al Sephadex.
9. Se coloca la columna en un tubo eppendorff de 1.5 ml ya rotulado con la clave de la muestra.
10. Se centrifuga a 2800 rpm por dos minutos a una temperatura de 4° C.
11. Los tubos eppendorff ya con la solución que contiene al ADN se colocan en la centrifuga al vacío, donde se centrifugan hasta secar las muestras (aproximadamente 15-20 minutos). El Sephadex de la columna se desecha en el recipiente para desechos no tóxicos. Las tapas, bases, columnas y tubos colectores se colocan en el recipiente dispuesto para tal objetivo.
12. Las muestras ya secas se dejan en el congelador de -20° C hasta que sean entregadas a la técnico del secuenciador automático.

Para preparar el Sephadex G-50-50

2.6 gr de Sephadex

40 ml de agua bidestilada estéril.

Se mezcla en el vortex hasta que el sephadex se haya disuelto completamente.

Se mantiene en el refrigerador de -20° C.

Si se van a usar columnas para recobrar el producto de la PCR, se toman 750-800 µl y se colocan en la columna, dejándose hidratar por dos horas. Después de este tiempo se sigue con el procedimiento.

Para preparar 100 µl el 2.5X Sequencing Buffer

50 µl de 5X Sequencing Buffer (en el refrigerador de -20° C)

50 µl de agua bidestilada estéril.

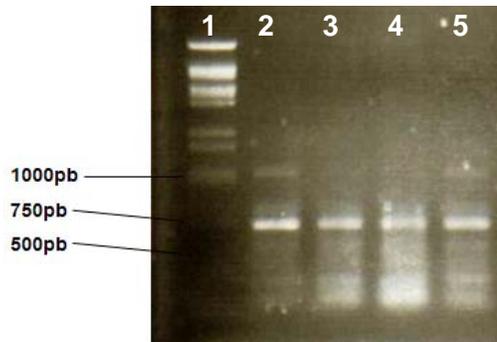
Colocar en un tubo eppendorf rotulado. Conservar en el refrigerador de -20°

Anexo 7

Cuadro 5. Enzima de restricción.			
Enzima	Secuencias reconocidas y sitios de corte (↓)	Número de cortes	Peso de la banda
HindIII	A↓AGCTT	1	411
RsaI	GT↓AC	5	189,296,339,428,448
BsrGI	T↓GTACA	1	446

Anexo 8

a)



b)

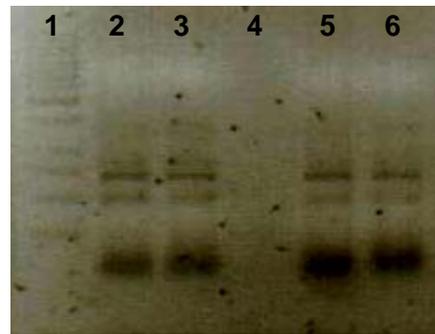


Figura 3. Amplificación del fragmento del cromosoma 8 con bandas accesorias.

Gel de agarosa al 1%. a) 1) Marcador molecular 1Kb, 2) *Anas platyrhynchos diazi* 50ng DNA, 3) *Anas diazi* 25ng DNA, 4) *Anas platyrhynchos domesticus* 50ng DNA, 5) *Anas platyrhynchos domesticus* 25ng DNA; b) 1) Marcador molecular 1Kb, 2) *Anas diazi* 50ng DNA, 3) *Anas diazi* 25ng DNA, 4) Control negativo, 5) *Anas platyrhynchos domesticus* 50ng DNA, 6) *Anas platyrhynchos domesticus* 25ng DNA.

- *Gallus gallus* Secuencia de pollo encontrada en GenBank (NW_001471473.1)
- APD (muestra *Anas platyrhynchos domesticus*).
- AD (muestra *Anas diazi*).

```

APD -----
AD -----
POLLO TAGGCATCAGGAAGGTGGGAGATTCCAGGTCAGTTTGTTCCTAATTGTGATCTTTTAATG
APD -----
AD -----
POLLO ATGTTTCTCCATCAGGTGGACATTTGGAAGTGGTTCGACTGGGAAGAGGACGTGATGA

APD -----TCNTATNTNATTTCCCTAC-CNGCCTGTG
AD -----TCNCTTNGNTCTTCTTCACCGCCTGTG
POLLO TGGCATCAGGTAGAGCTCAGAAAGTGGTATTTATCAGCAAAGCAATTTTCAGGTCGTGT
                                         * * * * *

APD GACTTATAG-TATCACCAGTCTGGCTCAC---CAAATGG-ATCACTGTTGGATGAGGCCT
AD  GNCTTATAGGTATCACCAGTNTGGCTCAC---CAAATGGCATCACTGTTGGATGAGGCCT
POLLO TTTTCCCAATTTTCCCATATTTTTTCTTATTTCAGGGAAGAGGAACGCGGATCTTGGTGA
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

APD GAGACCCATCAGGCTAGAAATACAAGAACATAAACACCTTTTCTCAACAATAGAAA-GT
AD  GAGACCCATCAGGCTAGAAATACAAGAACATAAACACCTTTTCTCAACAATAGAAA-GT
POLLO GTGATTTTCTTCCTTTTACCTTCAAAAAGT--CCCTTCCATGTGTAGAAATGGATATAC
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

APD GAAAAGTCAACACGAGGTTATTTTCATGCTGTGGCATAACAAGTACAT---CCTATCTC
AD  GAAAAGTCAACACGAGGTTATTTTCATGCTGTGGCATAACAAGTACAT---CCTATCTC
POLLO GTACCCCCACTGATACCCATTTCTTGTCTGTCTTATATTTATACTTCCCATAT
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

APD ATGAAAAC TAGAAA GTGAGACCTCACCAT TGATACGTTCTCAAAGCCATAATGTTTTC
AD  ATGAAAAC TAGAAA GTGAGACCTCACCAT TGATACGTTCTCAAAGCCATAATGTTTTC
POLLO TTGAACACATGAAAACAAGCC-CACATTAATAAATTCATAAACAGTGCAAT--TTTTG
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

APD TGTAGCTGATGCAGGCAGGAAAAGACTACACCAGTACCTGTTGGAGTCCATGCAGGAGA-
AD  TGTAGCTGATGCAGGCAGGAAAAGACTACACCAGTACCTGTTGGAGTCCATGCAGGAGA-
POLLO GACTATTATTTCCATAGAAAAGTATTAAATCAGTGC--AGAAAGTGCCTCTGGAGGTGAC
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

APD TGCCACAGACTTCAAAGGTA CTGGATTAGA--TAAACCAGAACTGCAAAAGGCCCTGAAA
AD  TNCCACAGACTTCAAAGGTA CTGGATTAGA--TAAACCAGAACTGCAAAAGGCCCTGAAA
POLLO TTCTGCAGCACCCCAAAGAGAGGGCGTAGGGCTGAGTGCTCTCTCTGTCTCTCTTTTAGA
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

APD AGCTGTGAACCTACATAAATCAGAAAGAGTTCAAGCTTGTGTCATTTTGTACTTCTGGGT
 AD AGCTGTGAACCTACATAAATCAGAAAGAGTTCAAGCTTGTGTCATTTTGTACTTCTGGGT
 POLLO AGAATGGGA--TGCAAAAATCAGTGAGTGCCCTTTTTTCC--TCTCCCTCACGGTGAGGT
 ** * * * * * ** * * * * *
 APD CTGTATTTGAA----CAGACTCCTTCT---TGCCTTTGGTTCACTT-AGGCTCTTATCTG
 AD CTGTATTTGTA----CAGACTCCTTCT---TGCCTTTGGTTNACTT-AGGCTCTTATCTG
 POLLO ATGGGTGTGGAGGACCTGAATTAATGTGAATTCCTCTGTTTAAAGGGAAGCTAACAGAAG
 **
 APD CCTAAGATACCTTNGTGATTTNAAGTCATCTCNTTTTGATAACCATTNCTTGCTTTGGTTCA
 AD CCTAAGATACCTTGTGATTTAAAGTCATCTCTTTTGTGATAACCATTTCTTGCTTTGGTTCA
 POLLO ATTTTGGTAAGTCGCTTATTTTCCTCGATCTGAGTGCATATTTCTACACCTTTACCATCA
 *
 APD CTGA-GACTAAGGCCAAGAATAATTNNNN-----
 AD CTGA-GACTAAGGCCAAAGAATAAGCAAGGGCCAGAACATTGAGGAATGCAACGAGGCAAG
 POLLO GTGATGACCAACGTGTGTAATGCAATTTCTCTTTATTCCATTTAGAAGAG-AGCGACACAGA
 *** ** * * * * *
 APD -----
 AD CAACTGGGATGCCAGAAGGTGCANGACAACNTCAACCATCATCTTTTAACACACNACCTC
 POLLO GCTCGGTGAGTGCTTTGGGGTCTTATCAAGGTGGAAAGATGCCCTCTGTGCAACAGTGG
 APD -----
 AD T-----
 POLLO GGATTGGGAGAAGCCCTTCAGCTCTTCCATTTATCCACATCTGATACCCAGATGGAGTCA

Anexo 11

Secuenciada amplificada de *Anas diazi* y *Anas platyrhynchos domesticus*, similar a una parte del cromosoma 8 de *Gallus gallus* (NW_001471740).

CTAGCTACCGACCTGTGGACTTATAGTATCACCAGTTGGCTCACCAAATGGATCACTGTTGGATGAGGCCTGAGACTCATC
 AGGCTAGAATACAAGAACATAACACCTTTTTTTCTCAACAATAGAAAGTGAAAAGTCAACATGAGGTTATTTTCATGCTGT
 GGGCATAACAAGTACATCCTATCTCATGAAAACCAGAAGTGAGACCTCACCACTGATACATTCTCAAAGCCAAAATGCTT
 TTCTACAGCTGATGAAGGCAGGAAAGGACCATATGTGTACCTTTGGGTCCTTTTTTGTACAGAGTCTTCTTG
 CCTTTGGCTCACTTAGGCTCTTATCTGCCTAAGATACCTTGTGATTCAAAGTCACTTCATTTTGATAATATTTCTTGCTTT
 GGTCCTACTGAGTCTAAGGCAAAGAAATACCAAGGGCCAGAACATTGAGGAATGCAACGAGGGAAGCAACTGGGATGCCAGA
 ATGTGGAAGACAACATCAACCATCATTTTTTAACACACAACCTCTCGCATTTCTTCTGCATCTCAGCACTCATGTCACT
 TTACCTTGGACTCCCTTACCACCAGTAAGTGAATGTGGTACACTGGATAAAGTTAATGTATATTACTTCATGTATGAAC
 CTGAGTTTGGTTCTCGCATGCAATATTAGGACACATCAACAGATA-----

Cuadro 6. Composición del Cromosoma 8 de *Gallus gallus*.

Símbolo	Origen	Descripción
LOC770019	Proteína	Proteína hipotética LOC770019
ATF6	Proteína	Factor de activación de transcripción 6
LOC424369	mRNA	similar a KIS kinase
PRDX6	best RefSeq	Peroxiredoxina 6
LOC424416	mRNA	similar a acyl-Coenzima A uniendo dominio conteniendo 6
GLT25D2	mRNA	glycosiltransferasa 25 conteniendo dominio 2
LOC429082	mRNA	similar a célula estroma derivado del factor receptor 2
LOC424485	mRNA	similar a calponin 3; calponin, acidic
GCLM	best RefSeq	glutamate-cysteine ligase, modifier subunit
HS2ST1	best RefSeq	heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1
LOC771009	Proteína	similar to calcium-activated chloride channel-2
LOC424546	mRNA	similar a proteína MGC68819
LOC424547	best RefSeq	vitellogenin I
GPBP1L1	mRNA	GC- rico promoter proteína de unión 1-like 1
LOC424615	Proteína	similar a MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 2C
LOC429105	mRNA	similar a RIKEN cDNA 2010305A19
MAGOH	best RefSeq	mago-nashi homolog, proliferation-associated (Drosophila)
TMEM59	best RefSeq	Proteína de transmembrana 59
NFIA	best RefSeq	Factor nuclear I/A
LOC424698	mRNA	similar a KIAA0473 proteína

Fuente: GenBank 2007.

Anexo 12

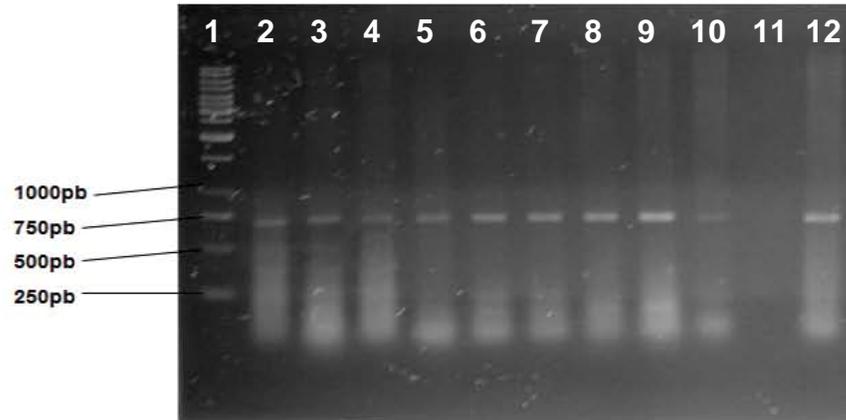


Figura 5. Amplificación del cromosoma 8, en diferentes *Anátidos*. Gel de agarosa al 1%. 1) Marcador molecular 1K, 2) *Anas discors*, 3) *Anas crecca*, 4) *Anas cyanoptera*, 5) *Anas acuta*, 6) *Anas americana*, 7) *Anas clypteata*, 8) *Anas strepera*, 9) *Anas platyrhynchos diazi*, 10) *Anas platyrhynchos domesticus*, 11) Control negativo, 12) Control positivo.

Anexo 13

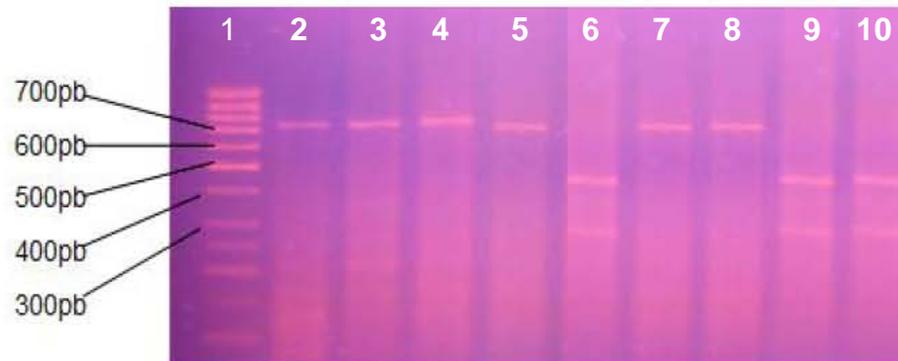


Figura 6. Sitios de corte por la enzima HindIII, de amplificación del fragmento del cromosoma 8 en *Anátidos*. Gel de agarosa al 3%, corte con enzima de restricción HindIII. 1) Marcador molecular 50pb, 2) *Anas discors*, 3) *Anas crecca*, 4) *Anas cyanoptera*, 5) *Anas acuta*, 6) *Anas americana*, 7) *Anas clypteata*, 8) *Anas strepera*, 9) *Anas platyrhynchos diazi*, 10) *Anas platyrhynchos domesticus*.

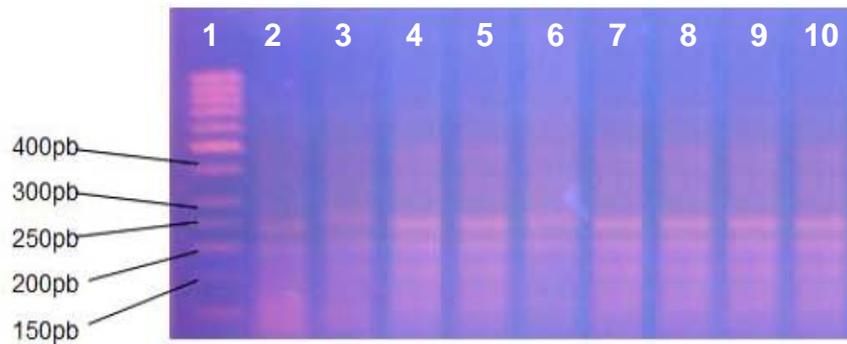


Figura 7. Sitios de corte por la enzima RsaI, de amplificación del fragmento del cromosoma 8 en *Anátidos*. Gel de agarosa al 3%, corte con enzima de restricción RsaI. 1) Marcador molecular 50pb, 2) *Anas discors*, 3) *Anas crecca*, 4) *Anas cyanoptera*, 5) *Anas acuta*, 6) *Anas americana*, 7) *Anas clypteata*, 8) *Anas strepera*, 9) *Anas platyrhynchos diazi*, 10) *Anas platyrhynchos domesticus*.



Figura 8. Sitios de corte por la enzima BsrGI, de amplificación del fragmento del cromosoma 8 en *Anátidos*. Gel de agarosa al 3%, corte con enzima de restricción BsrGI. 1) Marcador molecular 50pb, 2) *Anas discors*, 3) *Anas crecca*, 4) *Anas cyanoptera*, 5) *Anas acuta*, 6) *Anas americana*, 7) *Anas clypteata*, 8) *Anas strepera*, 9) *Anas platyrhynchos diazi*, 10) *Anas platyrhynchos domesticus*.

Anexo 13

Cuadro 7. Principales neoplasias y oncogenes en animales vertebrados.

Oncogen	Virus	Especie	Neoplasia producida
<i>Abl</i>	de Abelson	Ratón	Leucemia pre B
<i>Erb A y B</i>	Eritroblastosis aviar	Pollo	Eritroblastosis y sarcomas
<i>Ets y myb</i>	Mieloblastosis aviar	Pollo	Mieloblastosis y eritroblastosis
<i>Fes</i>	de Snyder-Theilen	Gato	Sarcoma
<i>Fgr</i>	de Gardner-Rasheed	Gato	Sarcoma
<i>Fms</i>	de McDonough	Gato	Sarcoma
<i>Fos</i>	murino FBJ	Ratón	Osteosarcoma
<i>Kit</i>	de Hardy-Zuckerman	Gato	Sarcoma
<i>Mos</i>	de Moloney	Ratón	Sarcoma
<i>Myc</i>	MC29	Pollo	Mielocitoma
<i>Raf</i>	murino 3611	Ratón	Sarcoma
<i>H-ras</i>	de Harvey	Rata	Sarcoma y eritroleucemia
<i>K-ras</i>	de Kirstein	Rata	Sarcoma y eritroleucemia
<i>Rel</i>	Reticuloendoteliosis	Pollo	Reticuloendoteliosis
<i>Ros</i>	aviar UR2	Pollo	Sarcoma
<i>Sis</i>	simio SS	Mono	Sarcoma
<i>Ski</i>	aviar SKV	Pollo	Carcinoma escamoso
<i>Src</i>	de Rous	Pollo	Sarcoma
<i>Yes</i>	de Yamaguchi	Pollo	Sarcoma

Fuente: Michelin, S.C. 1998.

XI. Literatura Citada

1. Dalgaard TS. Molecular characterization of major histocompatibility complex class I (B-F) mRNA variants from chickens differing in resistance to Marek's disease. *Scand J Immunol.* 2005;62(3):259-70.
2. Dalgaard TS. Immunogenetical analyses of MHC (class I) related resistance to viral diseases in chickens. *Danish Medical Bulletin.* 2004;51(3): 309.
3. Cole RK. Studies on genetic resistance to Marek's disease. *Avian Diseases.* 1985;12:9-28.
4. Jody KM, Bacon LD, Pandiri AR, Fadly AM. Response of white Leghorn chickens of various B haplotypes to infection at hatch with subgroup J avian leucosis virus. *Avian Diseases.* 2005;49(2):214-219.
5. Weigend S, Matthes S, Sölkner J, Lamont SJ. Resistance to Marek's disease virus in White Leghorn chicken: Effects of avian leucosis virus infection genotype, reciprocal mating and Major Histocompatibility Complex. *Poultry Science.* 2001;80:1064-1072.
6. Pisenti JM, Delany ME, Taylor RL, Abbott UK, Abplanalp H, Arthur JA. *et al.* Avian Genetic Resources at Risk: An assessment and proposal for conservation of genetic stocks in the USA and Canada" Report No. 20. University of California Division of Agriculture and Natural Resources, Genetic Resources Conservation Program, Davis CA USA. 1999;5-14.
7. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers T M, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Mol Biol Rev.* 199;56(1):152-179.

8. Alexander DJ. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 2000;19:443–462.
9. Piertney, Piernet S, Oliver M. et al. The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity*. 2006;96:7-21.
10. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Inmunología Celular y Molecular*. 4a ed. Madrid: McGRAW-HILL. INTERAMERICANA; 2001.
11. Correa M, Ossa JE. *Inmunobiología del Trasplante Renal, Historia de los Trasplantes y del Complejo Mayor de Histocompatibilidad*. IATREIA. 1990;3(2):97-104.
12. Butcher GD. *The avian immune system*. University of Florida. 2003:1-3.
13. Johnson W, Ewald SJ. Molecular Characterization of major histocompatibility complex (B) haplotypes in broiler chickens. *Animal Genetics*. 1997;28:258-267.
14. Moon DA, Veniamin SM, Parks-Dely JA, Magor KE. The MHC of the duck (*Anas platyrhynchos*) contains five differentially expressed class I genes. *The Journal of Immunology*. 2005;175:6702-6712.
15. Penn DJ, Damjanovich K, Potts WK. MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections. *PNAS*. 2002;99(17):11260-11264.
16. Sharma JM. The structure and function of the avian immune system. *Acta Vet Hung*. 1997;45(3):229-38.
17. Furusho JK. Papel de los genes del complejo principal de histocompatibilidad en los procesos infecciosos. *Investigación Clínica*. 2000;52(4):461-466.

18. Lamont SJ. The chicken major histocompatibility complex and disease. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 1998;17 (1):128-142.
19. Kaufman J. The simple chicken major histocompatibility complex: life and death in the face of pathogens and vaccines. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 2000;355:1077-1084.
20. Wittzell H, Madsen T, Westerdahl H, Shine R, Schantz T. MHC variation in birds and reptiles. *Genetica.* 1999;104:301-309.
21. Emara MG, Kim H, Zhu J, Lapierre RR, Lakshmanan N, Lillehoj HS. Genetic diversity at the major histocompatibility complex (B) and the microsatellite loci in three commercial broiler pure lines. *Poultry Science.* 2002;81:1609-1617.
22. Kelley J, Walter L, Trowsdale J. Comparative genomic of major histocompatibility complexes. *Immunogenetics.* 2005;56:683-695.
23. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Inmunología celular y molecular.* 5a ed. Madrid España: ELSEVIER, 2006.
24. Msoffe PLM, Mtambo MMA, Minga UM, Gwakisa PS, Mdegela RH, Olsen JE. Productivity and natural disease resistance potential of free-ranging local chicken ecotypes in Tanzania. *Livestock Research for Rural Development.* 2002;14(3):1-9.
25. Wittzell H, Bernot A, Auffray C, Zoorob R. Concerted Evolution of Two MHC Class II B Loci in Pheasants and Domestic Chickens. *Molecular Biology and Evolution.* 1999;16(4):479-490.

26. Hess Ch, Edwards S. The Evolution of major histocompatibility complex in birds. *BioScience*. 2002;52:423-431.
27. Rotundo S, Saltini G, Sironi L, Cerolini S, Mariani P. Characterisation of duck (*Anas Sp*) MHC region. XXVIII. ISAG Conference, Göttingen, Germany, 11-15/08/02.
28. Kaufman J, Milne S, Göbel W F, Walker B A, Jacob JP, Auffray Ch, Zoorob R, Beck S. The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. *Macmillan Magazines Ltd*. 1999;401:923-925.
29. Kaufman J, Heiner Volk, Hans J, Wallny A. "Minimal Essential MHC" and "Unrecognized MHC": Two extremes in Selection for Polymorphism. *Immunological Reviews*. 1995;143:63-88.
30. Tizard I. *Inmunología Veterinaria*. 4a ed. México: Interamericana-McGraw Hill, 1992.
31. Miller MM, Bacon L, Hala K, Hunt H, Ewald S, Kaufman, Zoorob R, Briles WE. 2004 Nomenclature for the chicken major histocompatibility (B and Y) complex. *Inmunogenetics*. 2004;56:261-279.
32. Bereket Z, Agnes AH, Ter H, Wil JM, Johanna MJ, Jan MA. et al. Immunological basis of differences in disease resistance in the chicken. *Vet Res*. 2002;33:109-125.
33. Blackwell JM. Genetics and genomics in infectious disease susceptibility. *Trends Mol. Med*. 2001;7(11):521-526.

34. Senseney HL, Briles WE, Abplanalp H, Taylor RL. Allelic complementation between MHC haplotypes B^Q and B¹⁷ increases regression of Rous Sarcomas. Poultry Science. 2000;78:1736-1740.
35. Van der Laan MP, Soubieux D, Mérat L, Bouret D, Luneau G, Dambrine G, Thoraval P. Genetic analysis of a divergent selection for resistance to Rous sarcomas in chickens. Genet. Sel. Evol. 2004;36: 65-81.
36. Bacon LD. Influence of the Major Histocompatibility Complex on disease resistance and productivity. Poultry Science. 1987;66:802-811.
37. Briles WE, Briles RW, Pollock D L, Pattison M. Marek's Disease resistance of B (MHC) heterozygotes in a cross of pure-bred Leghorn Lines. Poultry Science. 1982;61:205-211.
38. Lamont SJ, Bolin C, Chevillat N. Genetic resistance to fowl cholera is linked to the Major Histocompatibility Complex. Immunogenetic. 1987;25:284-289.
39. Caron LA, Abplanalp H, Taylor RLJ. Resistance, Susceptibility and Immunity to *Eimeria tenella* in Major Histocompatibility (B) complex congenic lines. Poultry Science. 1997;76:677-682.
40. Bacon LD, Hunter D, Zhang H, Brand K, Etches R. Retrospective evidence that the MHC (B haplotype) of chickens influences genetic resistance to attenuated infectious bronchitis vaccine strains in chickens. Avian Pathology. 2004;33(6):605-609.
41. Chun X, Tuanjun Hu, Tianyao Y, Wang G.X, Hu TJ, Yang TY. cDNA cloning and genomic structure of the duck (*Anas platyrhynchos*) MHC class I gene. Immunogenetics. 2004;56: 304-309.

42. Spackman E, McCracken K, Winker K, Swayne D. H7N3 avian influenza virus found in a South American wild duck is related to Chilean 2002 poultry outbreak, contains genes from equine and north American wild bird lineages, and is adapted to domestic turkeys. *Journal of Virology*. 2006;80:7760-7764
43. Cisneros E, Benitez G. *Biología Molecular del Cáncer I: Oncogenes*. www.ilustrados.com/publicaciones/EEKAApFpFKaEljuWEU.php.
44. Alonso T, Morales MJ. Oncogenes: Aspectos básicos de interés para la clínica nefrológica y urológica. *Nefrología*. 1994;14(2):163-174.
45. Haussen Z. Virus and humancancer. *Science*. 1991;254(5035):1167-1173.
46. Michelin SC. 1998. <http://200.0.198.11/menoriaT/Pi26.pdf>
47. Kerkhoff E, Bister K. Myc protein structure: localization of DNA binding and protein dimerization domains. *Oncogenes*. 1992;6:93.
48. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *Engl Journal Medic*. 2003;349:2042-2054.
49. Jordan J. Apoptosis: muerte celular programada. *Bioquímica*. Universidad de Castilla- LaMancha. www.uclm.es/profesorado/jjordan/30.pdf
50. Post DM, Taylor J, Kitchell J, Olson M, Schindler D, Herwig B. The role of migratory waterfowl as nutrient vectors in a managed wetland. *Conservation Biology*. 1998;12(4):910-920.

51. Nummi P, Poysa H. Habitat associations of ducks during different phases of breeding season. *Ecography*. 1993;16 (4): 319-328.
52. Figuerola J, Green A, Santamaría L. Passive internal transport of aquatic organism by waterfowl in Doñana, South-west Spain. *Global Ecology and Biogeography*. 2003;12: 427-436.
53. Ramsar. <http://www.ramsar.org/indexsp.htm> -6datos de humedales en México.
54. Newton I. Links between the abundance and distribution of birds. *Ecography*. 1997;20: 137-145.
55. Manny B, Johnson W. Nutrient additions by waterfowl to lakes and reservoirs: predicting their effects on productivity and water quality. *Hydrobiologia*. 1994;279/280:121-132.
56. Joiner KS, Hoerr FJ, van Santen E, Ewald SJ. The Avian Major Histocompatibility Complex Influences Bacterial Skeletal Disease in Broiler Breeder Chickens. 2005;42:275-281.
57. Bacon LD, Hunter DB, Zhang HM, Brand K, Etches R. Retrospective Evidence That the MHC (B Haplotype) of chickens influences genetic resistance to attenuated infectious bronchitis vaccine strains in chickens. *Avian Pathology*. 2004;33(6):605-609.
58. Lamont SJ. Genetic resistance to poultry diseases. IV Seminario Internacional de Aves e Suínos-Avesui. Florianópolis. 2005.

59. Shina T, Hosomichi K, Hanzawa K. Comparative genomics of the poultry major histocompatibility complex. *Animal Science Journal*. 2006;77:151-162.
60. Díaz S, Ripoli MV, García PP, Giovambattista G. Genetic markers for susceptibility and resistance to infectious diseases in farm animals. Major Histocompatibility Complex (MHC) loci as candidate genes. *Analecta Veterinaria*. 2005;25(1):40-52.
61. Nowak MA, Tarczy-Hornoch K, Austyn JM. The optimal number of major histocompatibility complex molecules in an individual. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1992;89:10896-10899.
62. Wilson MJr, Heitos MF, Matheucci EJr, Medaglia A, Enrique-Silva F. Large scale sex typing of ostriches using DNA extracted from feathers. *BMC Biotechnology*. 2002;2: 19.
63. Rudbeck L, Dissing J. Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. *Biotechniques*. 1998;25:588-592.
64. Leonards G, Davis, Mark D, Dibner, James F, Battey. *Molecular Biology*. Elsevier. New York. Amsterdam London. 1989.
65. Fulton J, Juul-Madsen H, Ashwell ChM, McCarron, Arthur JA, O'Sullivan N, Taylor RL. Molecular genotype identification of the *Gallus gallus* major histocompatibility complex. *Immunogenetics*. 2006;58:407-421.
66. Rammensse HG. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Current Immunology*. 1995;7:85-96.

67. Seliger B, Höhne A, Kuth A. Analysis of the mayor histocompatibility complex class I antigen presentation machinery in normal and malignant renal cells: Evidence for deficiencies associated with transformation and progression. *Cancer Res* 1996;56: 1756.
68. Cabrera T, Angustias FM, Sierra A. High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas. *Human Immunology* 1996;50: 127.
69. Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz-Cabello F, Stern PL. Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunology Today* 1993;14: 491.
70. Seliger B, Dunn T, Schwenzler A, Casper J, Huber C, Schmoll HJ. Analysis of the MHC class I antigen presentation machinery in human embryonal carcinomas: evidence for deficiencies in TAP, LMP and MHC class I expression and their upregulation by IFN-gamma. *Scand J Immunol* 1997;46:625.
71. Salazar OF. El sistema inmune, herramienta estratégica en la batalla contra el cáncer. *Rev. chil. pediatr.* 2000;71(4):296-306.