

00361
6

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DEL ORIGEN Y DIVERSIDAD GENÉTICA DEL
CERDO CRIOLLO MEXICANO (*Sus scrofa*) POR
ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DEL DNA
MITOCONDRIAL

299474

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(Biología Experimental)

PRESENTADA POR:

BELEM DE JESUS HUERTA L

Asesor de Tesis:

Dr. Rogelio A. Alonso Morales



México, D. F.

COORDINACION
POSGRADO EN CIENCIAS
NOVIEMBRE 2001
BIOLÓGICAS



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente:

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de agosto de 2001, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL) de la alumna BELEM DE JESUS HUERTA LOZANO con número de cuenta 91506508, número de expediente 3991084, con la tesis titulada: "ESTUDIO DEL ORIGEN Y DIVERSIDAD GENÉTICA DEL CERDO CRIOLLO MEXICANO (Sus scrofa) POR ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DEL DNAm.", bajo la dirección de la DR. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES.

Presidente: Dr. Hiram Olivera Díaz
Secretario: Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales
Vocal: Dra. Patricia Escalante Pliego
Suplente: Dr. Diego Julio Arenas Aranda
Suplente: Dra. Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 30 de octubre de 2001

Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

AGRADECIMIENTOS

Al CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA, por brindarme su apoyo en el financiamiento para realizar mis estudios.

A DGAPA-PAPIIT-UNAM en el proyecto No. IN2007976 y a CONACYT en el proyecto 0114P-B9506 para el financiamiento de mi proyecto de tesis.

A los integrantes de MI JURADO: DR. HIRAM OLIVERA DÍAZ, DR. ROGELIO A. ALONSO MORALES, DRA. PATRICIA ESCALANTE PLIEGO, DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA y DRA. ROSENDA ISABEL PEÑALOZA ESPINOZA por sus valiosos y oportunos comentarios que favorecieron y enriquecieron este trabajo.

DEDICATORIA

Con todo mi cariño:

A DIOS que me permitió terminar esta meta de mi vida... **GRACIAS DIOS MIO**

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO Y A LA FACULTAD DE CIENCIAS por haberme permitido llegar a ser alguien en la vida.

A MIS PADRES que siempre están conmigo, apoyándome para llegar a ser mejor cada día... los quiero mucho.

A MI ESPOSO SIMON por contar con su ayuda incondicional y por ser parte de mi vida.

A mi ASESOR: DR. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES, porque gracias a él, he llegado hasta donde estoy ahora.

A MIS ABUELITOS Elvira, Carlos e Ignacio que en su momento me apoyaron... gracias donde quiera que se encuentren.

A mi ABUELITA LUPITA por brindarme todo su cariño.

A DOÑA Gloria por su apoyo incondicional.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DE LABORATORIO: Raúl Ulloa, Silvia Reyes, Jesús Saldivar, Felicitas, Noé Reyes, Carmen Castro, Clemente Lemus, Espiridión y Antonio Figueroa por los momentos felices.

A REFUGIO CORTÉS que siempre ha estado conmigo en las buenas y en las malas. Gracias por todo PEQUEÑA.

A mis nuevos AMIGOS que también me animaron a terminar este trabajo: Néstor Ledezma, Aída, Mony, Jorge y Adriana.

A una persona especial a ti MIREYA N. por brindarme esta nueva y bonita Amistad.

A Hilda Valdés y Leonor Enciso por su orientación académica.

Al Laboratorio de GENÉTICA MOLECULAR DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA - UNAM por abrirme las puertas para realizar este trabajo.

Al Laboratorio de GENÉTICA MOLECULAR DEL CENTRO MEDICO SIGLO XXI, especialmente al DR. ANTONIO ENCISO por permitirme realizar algunos experimentos de mi tesis.

Y a todos aquellos que de alguna manera me brindaron su apoyo y su amistad durante esta etapa de superación profesional.

RESUMEN

El origen y la diversidad genética del cerdo criollo mexicano (CCM), fueron investigados por análisis en la secuencia de un fragmento de 269 pares de bases correspondiente a la región más informativa del D-loop presente en el DNA mitocondrial. El fragmento fue amplificado por la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) y secuenciado en 31 CCM: 27 “pelones”, 3 “cuinos” y 1 cerdo “pata de mula” procedentes de diferentes regiones geográficas del país (Veracruz, Nayarit, Guerrero y Tabasco). Además se estudiaron 23 cerdos de raza pura (Large White, Hampshire, Yorkshire, Landrace, Duroc) incluyendo 3 cerdos de origen vietnamita. El análisis de las secuencias reveló 14 haplotipos diferentes, 9 fueron identificados en los CCM, mientras que en los cerdos de raza pura (CRP) se encontraron 8 haplotipos y 3 haplotipos se compartieron entre los CCM y CRP. El análisis filogenético entre las haplotipos obtenidos y los haplotipos de la región D-loop de cerdos con diferentes orígenes disponibles en la base de datos del GenBank, donde se mostró la existencia de dos linajes de descendencia: uno Asiático y el otro Europeo. En el linaje Asiático, se encontraron cerdos criollos (3 pelones de Nayarit y 1 pelón de Guerrero) y cerdos de raza pura (Large White, Yorkshire, Landrace), lo cual puede ser el resultado de la introgresión y cruce con cerdos origen Asiático. Dentro del linaje Europeo se identificaron 5 ramas de diferenciación genética, una rama agrupó a los jabalies europeos silvestres, 2 ramas agruparon a los CCM, otra rama agrupó a los CCM y CRP, la última rama fue la más distante al linaje Asiático y estuvo conformada sólo por CRP. Estos datos sugieren, que las poblaciones de cerdos criollos tienen un origen diverso con niveles amplios de diversidad genética con potencial como recurso para la posible mejora de razas comerciales, ya sea por la identificación de nuevos alelos que participen en incrementar rasgos de interés comercial o mediante la creación de razas sintéticas, así como un material para la selección de razas porcinas locales mejoradas.

INDICE

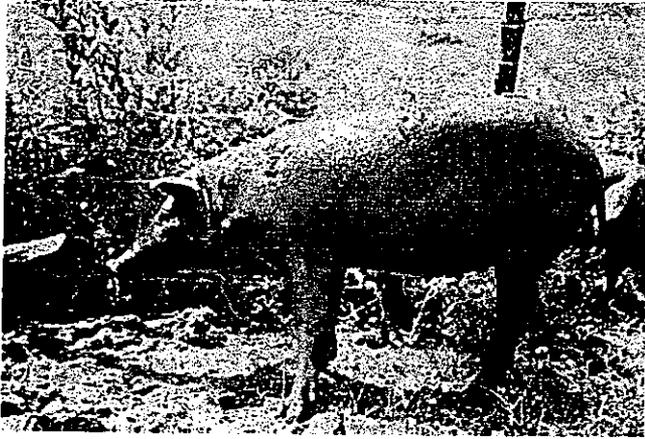
	Pag.
DEDICATORIA	
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Distribución	3
1.2. Origen	4
1.3. Conservación	4
1.4. Diversidad genética	5
1.5. Análisis filogenético	9
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
2.1. Hipótesis	17
2.2. Objetivos	17
III. MATERIALES Y METODOS	18
3.1. Material biológico	18
3.2. Purificación de DNA total	19
3.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	19
3.4. Purificación del fragmento amplificado a partir del gel de agarosa	20
3.5. Obtención de la secuencia	20
3.6. Análisis de las secuencias	21
3.7. Identificación de haplotipos	21
3.8. Análisis filogenético de las variedades criollas	22
IV. RESULTADOS	23
4.1. Purificación del DNA	23
4.2. Amplificación	23
4.3. Secuenciación de los fragmentos amplificados	24
4.4. Análisis filogenético	29
V. DISCUSIÓN	32
VI. CONCLUSIONES	35
VII. BIBLIOGRAFÍA	36
VIII. ANEXOS	42
IX. LISTA DE ABREVIATURAS	47

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente en el mundo existe una gran variedad de razas porcinas (*Sus scrofa*) que aunque presentan diferencias morfológicas, todas ellas han sido seleccionadas por sus características productivas como la rapidez de crecimiento, prolificidad, carne magra, entre otras. Se piensa que a partir del Jabalí europeo, se han originado todas las razas de cerdos modernos. En México, las razas porcinas comerciales más difundidas son de tipo europeo entre las cuales se encuentran las razas: Duroc, Hampshire, Yorkshire, Landrace y Large White. Sin embargo, en algunas regiones tropicales de nuestro país aun se encuentran algunas variedades criollas o locales como el cerdo “pelón mexicano”, el “cuino” y el cerdo “pata de mula”.

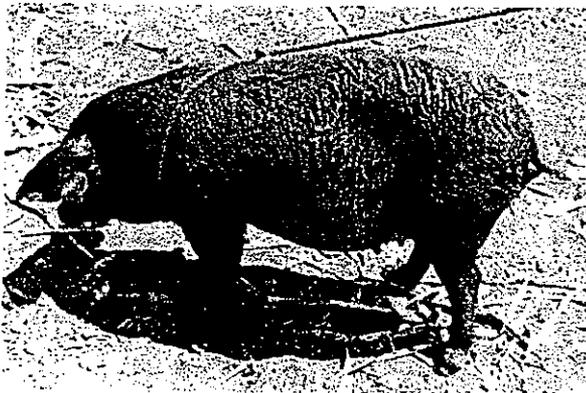
De estas variedades, la más estudiada hasta ahora es el cerdo “pelón mexicano”, que se caracteriza principalmente por presentar poco pelo en la superficie corporal o bien carecer de él (Robles, 1967; Baldizon, 1971; Castro, 1981; Cenobio, 1993; Rojas, 1993), haciéndolo menos susceptible a la infestación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

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



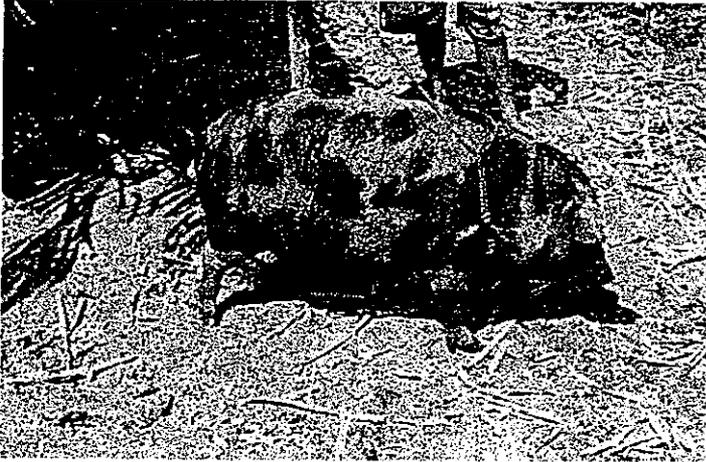
Cerdo Pelón Mexicano

Con lo que respecta al cerdo “pata de mula”, éste se caracteriza por presentar sindactilia, debido a que sus patas no tienen separación interdígital y el casco está formado en ocasiones por una sola unidad bien marcada o en muchas veces con rudimentos de la otra pezuña (Flores y Agraz, 1981). Presenta una talla mediana que es menor a la del cerdo “pelón”, su perfil es cóncavo, las orejas son medianas de preferencia caídas, el hocico es ligeramente rectilíneo, su cuerpo está cubierto de pelos generalmente rizados y presentan coloración variable (Flores y Agraz, 1981).



Cerdo Pata de Mula

El “cuino” es de alzada pequeña pero robusto, presenta papada en regiones laterales e inferior, el cuello es corto bien implantado al tronco, trompa corta y pequeña, perfil cóncavo o con tendencia a rectilíneo en algunos animales. Además en estos animales es común la acumulación de gran cantidad de grasa con amplia distribución en todo su cuerpo (Flores y Agraz, 1981).



Cerdo Cuino

La crianza de estas variedades criollas puede repercutir favorablemente en la economía de comunidades rurales de escasos recursos económicos, ya que existen alternativas que podrían dar valor agregado a este tipo de animal si se aprovechara su característica de engrasamiento, la cual es fundamental para la elaboración de productos de alta calidad, como el jamón tipo serrano y tipo ibérico que se elabora de manera industrial en España (Aparicio,1987).

I.1. Distribución

Actualmente estos tres biotipos de cerdos (“pelón mexicano”, “pata de mula” y “cuino”) se localizan en el Golfo y costas del Pacífico de México: Veracruz, Tabasco, Campeche,

Yucatán, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas (Robles, 1967; Flores y Agraz, 1979; Castro, 1981; Cenobio, 1993; Cárdenas, 1996).

Estas variedades de cerdo en algunos casos viven de forma silvestre, pero comúnmente son criados de forma rústica, alimentándose de plantas forrajeras, frutas, raíces, tubérculos y subproductos agrícolas. Las variedades criollas han sido criadas sin programas de cruzamiento sistematizado y ocasionalmente son explotados bajo un sistema de pastoreo poco tecnificado, sin manejo preventivo contra las enfermedades más comunes de la región. Se ha documentado que en epizootias de fiebre porcina clásica, hay gran cantidad de cerdos muertos, pero también algunos sobreviven, por consiguiente, es probable que estos cerdos presenten resistencia a las enfermedades de manera natural, siendo esta una de las causas principales por lo que han subsistido durante muchas generaciones sin vacunación alguna (Cárdenas, 1996).

1.2. Origen

Hay pocos datos auténticos concernientes al origen de las variedades de cerdo criollo. Se piensa que fue originado a partir de especímenes introducidos por los españoles, durante los primeros años de la conquista de nuestro país (Flores, 1981, Gallardo 1941). Posiblemente sea una mezcla de cerdos de tipo Ibérico, Céltico y Napolitano con cerdos de tipo asiático, provenientes del Japón o de las Filipinas. Sin embargo, Medina (1965) reportó en un estudio antropológico, el hallazgo de un cráneo de suideo del periodo preclásico, encontrado bajo la lava del pedregal de San Angel, en México. Utilizando el método de carbono 14 se pudo determinar que es de un individuo del género *Sus*, de tipo cóncavo y de características similares a los cráneos de los actuales tipos cóncavos que se remontan a épocas anteriores a la llegada de los españoles, lo que hace sospechar de la existencia autóctona de esta especie (Baldizon, 1971; Flores, 1977).

1.3. Conservación

Como consecuencia de la constante introducción de razas mejoradas de cerdos en las explotaciones porcícolas en el país, el cerdo criollo mexicano está en peligro de desaparecer como grupo genético puro. Esto se debe principalmente a que son considerados por los porcicultores como variedades corrientes, no mejoradas y sin atributos comerciales (Robles, 1967). Recientemente, el sistema de información de la diversidad en animales domésticos (DAD-IS) de la FAO (<http://www.fao.org/dadis/index.htm>), considera estas tres variedades (el cerdo “pelón mexicano”, el “cuino” y el cerdo “pata de mula”) en peligro de extinción; por ejemplo, se menciona que el “cuino” está en estado crítico con menos de 100 individuos. No obstante, la FAO no reporta ningún programa de conservación para estas variedades (Loftus y Sherf, 1992).

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

Diversos estudios genéticos recientes en cerdos comerciales, indican que se ha ejercido una presión de selección muy intensa, de forma que la diversidad genética en las poblaciones comerciales se ha reducido notablemente (Fujii y cols. 1991). Se ha reportado que mutaciones genéticas indeseables como la hipertermia maligna ó síndrome de estrés porcino, está presente en el 20% de las poblaciones americanas y canadienses (Fujii y cols. 1991; O'Brien y cols. 1993). Esta reducción genética en los germoplasmas de cerdos de líneas comerciales resalta aún más la importancia de las variedades nativas de cerdos como el criollo mexicano ya que pueden representar reservorios de diversidad genética que darían la posibilidad de enriquecer y renovar en un futuro el germoplasma comercial del cerdo (Nájera, 1989; Chupin, 1994).

Igualmente, puede ser una base importante para la mejora de razas comerciales que se deseen introducir a condiciones tropicales mediante la creación de razas sintéticas porcina (Chupin, 1994).

Es urgente el estudio y preservación de los recursos genéticos locales por lo tanto, para conservar estas variedades en peligro de extinción, se requiere conocer la diversidad genética que presentan, tomando en cuenta que son un patrimonio único no renovable.

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

1.4. Diversidad genética

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

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

El estudio genético de poblaciones se basa en conocer la variación genética de las poblaciones, las técnicas en biología molecular, permiten utilizar gran cantidad de recursos metodológicos para evaluar el grado de diversidad y las distancias genéticas presentes dentro y entre poblaciones determinadas (Kirby, 1995).

Una de estas metodologías, son los marcadores genéticos que son factores hereditarios, generalmente polimórficos, definidos como la presencia de dos o más variantes (alelos) de cualquier sistema de genes (Peñaloza, 1994). Los marcadores genéticos pueden ser morfológicos o moleculares. Los morfológicos se basan en las características fenotípicas del organismo como: tamaño, color, forma etc. Desafortunadamente, estos marcadores son afectados por condiciones ambientales que pueden enmascarar el efecto del gen o genes de

interés. Además es frecuente observar epístasis es decir, que un gen puede enmascarar la acción de otro gen.

Los marcadores moleculares tienen ventajas sobre los marcadores morfológicos ya que no son afectados por condiciones ambientales y presentan codominancia, permitiendo así, la identificación de todos los posibles genotipos. Los marcadores moleculares se dividen en dos tipos: Los marcadores proteicos y los marcadores de DNA (Kirby 1995).

Los primeros se basan en el análisis de distintos tipos de proteínas. Algunas pueden ser separadas por electroforesis en geles no desnaturizantes de acrilamida. Los cambios en la composición de aminoácidos, y como consecuencia en la estructura, alteran la movilidad electroforética de la proteína, lo que permite observar la diversidad de proteínas en los diferentes individuos. Las desventajas de estos marcadores son: requieren procedimientos de extracción y tinción específicas para cada sistema enzimático, por lo que el número de marcadores que se obtiene es insuficiente porque presentan poco polimorfismo.

Entre los marcadores de DNA, se encuentran los RFLP's, (del Inglés "Restriction Fragment Length Polymorphism") nucleares o mitocondriales, los minisatélites o VNTR (del Inglés "Variable Number Tandem Repeat"), los microsátélites, los RAPDS (del Inglés "Randomly Amplified Polymorphic DNA Sequence") y dentro del DNA mitocondrial (mtDNA) la región control o "*D-loop*". La variación natural de estos marcadores se puede detectar por medio de enzimas de restricción, amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa PCR (del Inglés "Polymerase Chain Reaction") y la secuenciación directa de los nucleótidos del DNA (Kirby 1995).

Los RFLP's involucran la purificación del DNA de un individuo y su digestión con enzimas de restricción para formar una mezcla de fragmentos que difieren en su longitud debido a la distribución específica de los sitios de corte, a través de la molécula de DNA. Los fragmentos son separados de acuerdo a su tamaño por electroforesis en geles de agarosa o acrilamida. El análisis de los fragmentos se lleva a cabo mediante la técnica denominada "Southern blot" que consiste en transferir los fragmentos del gel a un filtro de nitrocelulosa que posteriormente será hibridizado con una sonda radiactiva (fragmento de DNA marcado en forma radiactiva) la cual reconocerá secuencias complementarias al DNA que han sido transferido al filtro. Los fragmentos reconocidos por la sonda son visualizados

por medio de una autorradiografía. Actualmente los RFLP's también se analizan por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los minisatélites y microsátélites son secuencias de DNA altamente repetidas de baja complejidad, organizadas en tándem y dispersas en todo el genoma. Estas secuencias se caracterizan por presentar un extenso polimorfismo genético, debido a la variación en el número de repetidos presentes, por eso son también conocidas como variantes en el número de repetidos en tándem (VNTR). La unidad de repetición en los minisatélites es de 9-64 pares de bases (pb), que llegan a extenderse por varios kilobases (kb). La manera de revelar el polimorfismo en los minisatélites, es por medio de experimentos tipo Southern; muchas veces al utilizar los minisatélites como sonda, se generan bandas sumamente polimórficas y en su conjunto forman patrones exclusivos de un individuo, a esto se le ha denominado huellas digitales del DNA o "DNA fingerprints". En los microsátélites, la unidad de repetición es de 1-5 pb y llegan a extenderse por regiones no mayores a 200 pb. Al igual que los minisatélites, cuando los microsátélites se emplean como sondas, revelan patrones tipo "fingerprints". También el polimorfismo de los microsátélites se puede detectar fácilmente por PCR, donde se observa la variación de los repetidos dentro de una población (Kirby, 1995).

Los RAPDS se basan en la técnica de PCR en donde se utilizan pequeños iniciadores (10 pb) que amplifican fragmentos al azar a partir del genoma completo de un organismo. Posteriormente los fragmentos amplificados son separados por electroforesis en geles de agarosa o de acrilamida. El polimorfismo se determina por la presencia o ausencia y tamaño variable de los fragmentos amplificados (Kirby, 1995).

Otro marcador molecular sumamente útil se encuentra en el mtDNA. El mtDNA se localiza en el compartimiento matricial de la mitocondria (organelo celular cuya función principal es la síntesis de ATP). En el caso de los mamíferos el mtDNA, es una molécula circular de doble cadena, una se conocen como la cadena pesada (H) la cual es rica en purinas y la otra es la cadena ligera (L) conformada principalmente de pirimidinas. La longitud del mtDNA es aproximadamente 16.5 Kb, en comparación con el mtDNA de levaduras y plantas que van de cientos a miles de kilobases, esta diferencia se debe a la variación en el número de secuencias repetidas (Darnell, 1980; Karp, 1987; Rus, 1993).

El mtDNA se hereda de forma materna y no sufre recombinación genética, por consiguiente todos los descendientes de una hembra heredan la misma molécula de mtDNA, estableciéndose un linaje materno que permite trazar el posible origen de los individuos y de poblaciones animales (Huchinson y cols. 1974).

Por otro lado, la tasa de substitución nucleotídica presente en el mtDNA es 10 veces más rápida que la del DNA nuclear. En los mamíferos, se ha encontrado una tasa de divergencia de aproximadamente 2% por millón de años correspondiente a una sustitución nucleotídica de 1×10^{-8} sustituciones/sitio/año en cada linaje (Brown y cols. 1979), lo que incrementa el nivel de cambios en la secuencia nucleotídica. Estos parámetros que son útiles para el estudio de diversidad genética en una población (Lan y Shi, 1993; Watanabe y cols. 1985; Watanabe y cols. 1986).

El genoma de la mitocondria se divide principalmente en 2 regiones, la región larga y una región pequeña. Dentro de la región larga se encuentran genes que codifican proteínas involucradas en la fosforilación oxidativa: el citocromo C oxidasa (CO1, CO2, CO3), las subunidades 6 y 8 del complejo ATPasa, 5 subunidades para la NADH deshidrogenasa, así como los RNA's ribosomales (rRNA's) y de RNA's de transferencia (tRNA's) necesarios para la expresión del gen. La región pequeña es conocida como región control o "*D-loop*". La región del "*D-loop*" contiene secuencias que controlan los mecanismos tanto de replicación como de transcripción, tiene una longitud de 1.3 Kb y es típicamente la región más variable del mtDNA (10 veces mayor que el resto del mtDNA).

En los cerdos la región "*D-loop*" contienen un arreglo de repetidos variable (GTACACGTGC), un sitio de origen de replicación de la cadena pesada, tres bloques conservados (CSB1, CSB2, CSB3) y una región central conservada que se piensa está involucrada en la regulación de la replicación (Clayton, 1982; Rus, 1993, Arnason 1998).

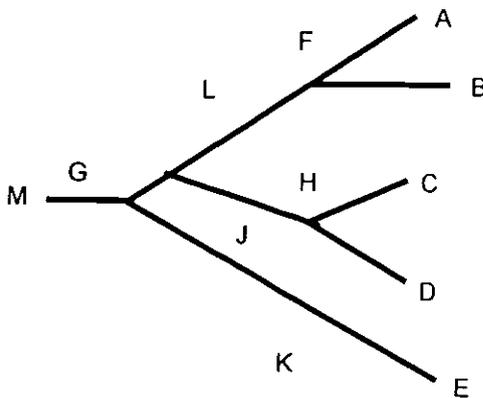
Debido a la alta variabilidad que presenta la región control del mtDNA, el estudio de la secuencia de nucleótidos se ha usado como un marcador molecular importante para inferir las relaciones filogenéticas en poblaciones humanas (Hedges y Kumar 2000), perros (Vila y cols. 1997), bovinos (Loftus y cols. 1993) y cerdos (Giuffra y cols. 2000).

1.5 Análisis Filogenéticos

El propósito de los estudios filogenéticos, es la reconstrucción correcta de la genealogía y la estimación del tiempo de divergencia entre un grupo organismos. Estas relaciones evolutivas son resumidas a través de un árbol filogenético que consiste en la representación gráfica de nodos y ramas. Los nodos representan las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) y las ramas definen las relaciones evolutivas entre los OTUs en términos de ancestro-descendiente.

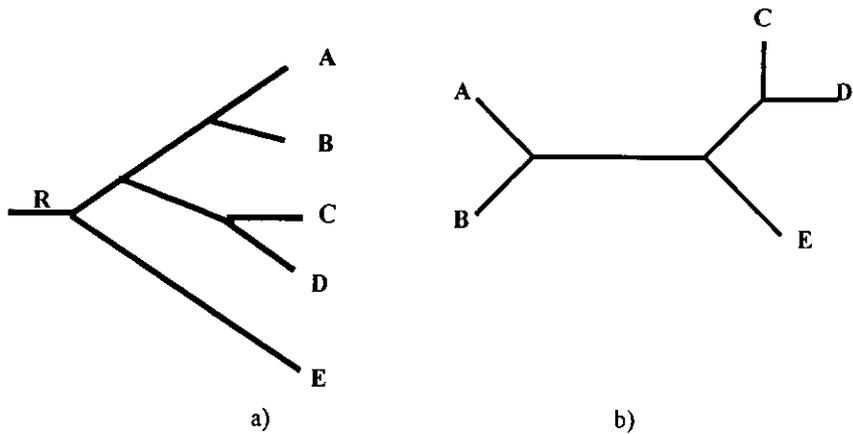
Las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) representadas por los nodos pueden ser especies, poblaciones, individuos o genes (Avisé, 1994). Los nodos en un árbol filogenético son de dos tipos internos y externos. En el esquema 1 los nodos externos están representados por los OTUs A, B, C, D y E mientras que el resto de los nodos son internos y representan las unidades ancestrales de los OTUs. (Wen-Hsiung, 1997).

Las ramas también se clasifican en: ramas internas y externas. Por ejemplo las ramas principales a los nodos A, B, C, D y E son externas, mientras que las ramas internas son las que conectan a los nodos internos (esquema 1).



Esquema 1: Representación gráfica de un árbol filogenético.

Además los árboles filogenéticos pueden tener la presencia o ausencia de una raíz. En un árbol enraizado existe un nodo particular llamado raíz (R en el Esquema 2a) que representa el ancestro común de todos los OTUs bajo estudio. En cambio, un árbol sin raíz solo especifica las relaciones entre los diferentes OTUs sin la presencia de un antecesor común (Esquema 2b).



Esquema 2 Representación gráfica de un árbol con la presencia o ausencia de raíz.

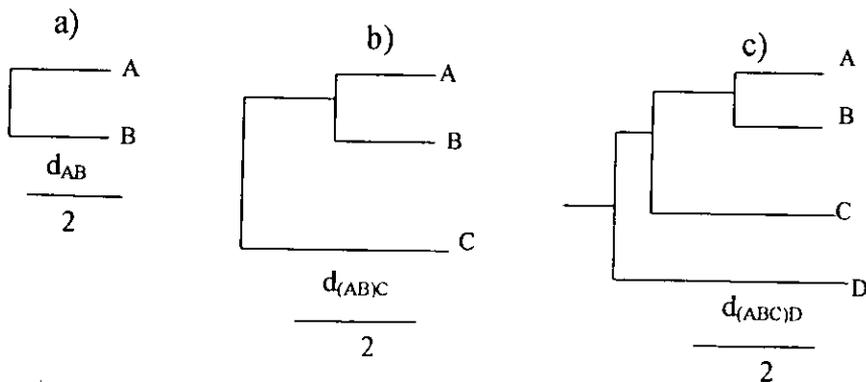
En los estudios de evolución, las secuencias de DNA son mucho más informativas que las secuencias de proteínas por que una gran parte de la secuencia de DNA no codifican proteínas es decir, que se observan un número mayor de diferencias genéticas en las regiones no codificantes del DNA como: intrones, regiones intergénicas o silenciosas. También las secuencias de DNA revelan una información detallada en los mecanismos de delección, inserción, transposición de genes, conversión de genes y transferencia de genes horizontales (Nei 1987).

Existen varios métodos estadísticos para construir árboles filogenéticos o dendrogramas a partir de las secuencias de DNA. Estos métodos pueden ser clasificados en: métodos de carácter discreto y métodos de distancia. En los métodos de distancia, las distancias genéticas son calculadas por pares en todas las especies y el árbol filogenético se construye usando algoritmos basados en alguna relación funcional entre los valores de distancia (Wen-Hsiung, 1997). La distancia genética se define como la magnitud de las diferencias génicas o genómicas entre poblaciones y es medida con alguna cantidad numérica. El

número de sustituciones de nucleótidos por sitio o número de sustitución génica por locus es una medida de distancia genética (Nei, 1987). Los métodos de distancia más comunes son: el método de neighbor-joining (NJ) y el método de medias aritméticas no ponderado (UPGMA).

El método de UPGMA se basa en suponer que la tasa de evolución es aproximadamente constante entre los diferentes linajes evolutivos de modo que existe una relación lineal entre la distancia evolutiva y el tiempo de divergencia (Takesaki y Nei 1996; Socal, 1958). UPGMA emplea un algoritmo secuencial de agrupamiento que consiste en identificar a los dos OTUs con la menor distancia, (esquema 3a) esta agrupación es considerada como un simple OTU compuesto a partir del cual se empieza un nuevo cálculo y el siguiente OTU con la distancia más pequeña es agrupado con el OTU compuesto (esquema 3b).

Este procedimiento se repite hasta contemplar todos los OTUs bajo estudio (esquema 3c).



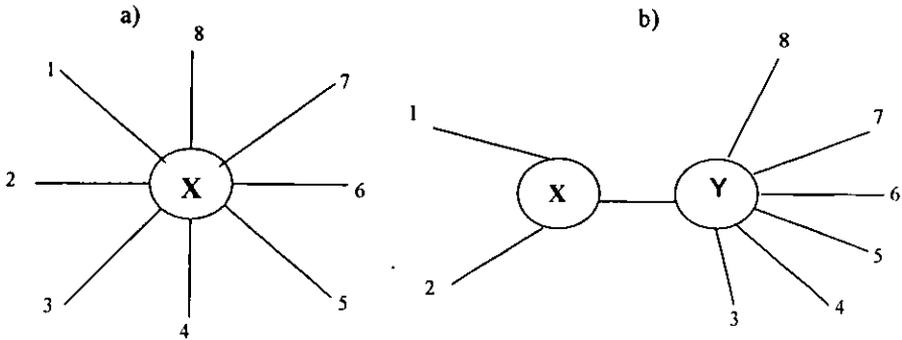
Esquema 3 Ilustra la construcción de un árbol filogenético por el método de UPGMA.

El principio del método de NJ supone que la tasa de evolución no es constante entre los diferentes linajes de estudio y basa en encontrar continuamente "vecinos" que pueden minimizar la longitud total de árbol. (Wen-Hsiung, 1997).

El método empieza con un árbol en forma de estrella en donde no existe agrupación de OTUs (esquema 4a). El primer paso de este método consiste en separar un par de OTUs con el valor más pequeño en la longitud de la rama, este par de OTUs es considerado después

como un simple OTU (esquema 4b), nuevamente las distancias genéticas son calculadas entre los demás OTUs, el siguiente par de OTUs con la suma más pequeña en la longitud de la rama es seleccionado para formar la siguiente ramificación del árbol.

El procedimiento se repite hasta determinar el árbol con la mínima suma en la longitud de sus ramas.

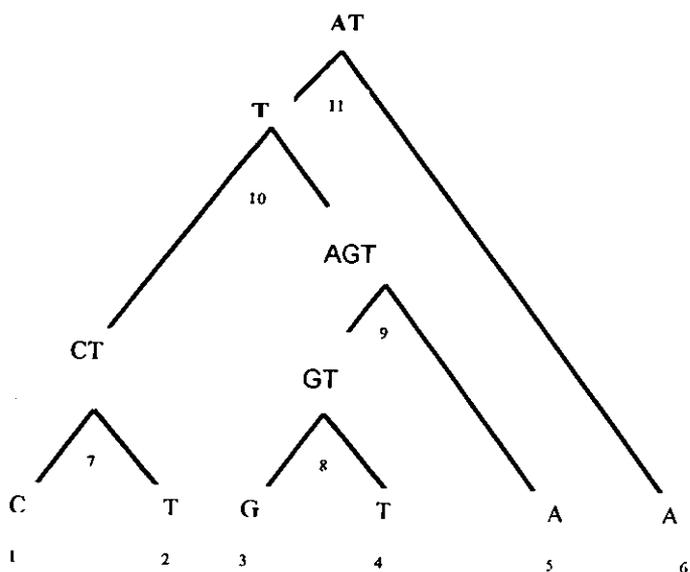


Esquema 4 Ilustra la construcción de un árbol filogenético por el método NJ.

En los métodos de carácter discreto, el árbol es construido considerando las relaciones evolutivas de las secuencias de DNA en cada sitio nucleotídico (Takesaki y Nei 1996). Los métodos más representativos en esta categoría son: el método de máxima parcimonia (MP) que se basa en inferir el árbol con el menor número de cambios evolutivos para explicar las diferencias observadas entre los OTUs bajo estudio.

El procedimiento para determinar el árbol de MP es el siguiente. Primero se identifican todos los sitios informativos, para que un "sitio" sea informativo debe tener al menos dos diferentes tipos de nucleótidos y se deben de repetir al menos dos veces en las secuencias bajo estudio. Si se utilizan pocos nucleótidos o aminoácidos (sitios) la probabilidad de obtener un árbol erróneo es alta (Wen-Hsiung, 1997).

Posteriormente se determina el número mínimo de sustituciones en cada sitio informativo y sumar el número total de cambios presentes en los sitios informativos con la finalidad de escoger el árbol de MP que posea el menor número de sustituciones nucleotídicas.



Esquema 5 Ilustra la construcción de un árbol filogenético por el método MP

El método de máxima verosimilitud (ML) requiere un modelo probabilístico para el proceso de sustituciones nucleotídicas. Esto es, uno debe especificar la probabilidad de transición de un estado nucleotídico a otro en un tiempo de intervalo en cada rama. El método consiste en calcular la Máxima Verosimilitud de la secuencia de nucleótidos en los grupos se calculan varias topologías. Finalmente se escoge aquella que obtenga el mayor valor de verosimilitud (Nei, 1987; Wen-Hsiung 1997).

De los cuatro métodos antes mencionados, NJ y ML son más eficientes para construir la topología correcta del árbol en comparación de UPGMA y MP (Saitou y Imanishi 1989; Tateno y cols. 1994). Sin embargo, el método de NJ requiere menor tiempo de cálculo que el método de ML (Takesaki y Nei 1996).

Actualmente para realizar el análisis filogenético a partir de un gran número de datos moleculares existen programas computacionales que permiten calcular matrices de distancia y algoritmos filogenéticos de una manera rápida (Avice 1994). Los paquetes de software comúnmente empleados son: **PHYLIP** (disponible por Joseph Felsenstein, University of Washington, Seattle), **PAUP** (escrito por David L. y distribuido por Illinois

Natural History Survey, Champaign), **BIOSYS-1** (Swofford and Selander distribuido por Illinois Natural History Survey, Champaign) y **FREQPARS** (Swofford and Berlocher disponible por Smithsonian Institution, Washington, D.C.).

Dentro del paquete PHYLIP, se encuentran una serie de programas con diferentes algoritmos que se emplean dependiendo de las características de los datos que se desean procesar. Las subrutinas usadas en el análisis de la región más informativa del D-loop fueron:

DNADIST. Emplea 2 diferentes métodos para calcular la matriz de distancias genéticas. La fórmula de Jukes-Cantor asume que la tasa de sustitución nucleotídica (transiciones o transversiones) ocurre con igual probabilidad en un sitio nucleotídico. El método de Kimura (método de 2 parámetros) considera que la tasa de sustitución nucleotídica transicional es diferente a la tasa nucleotídica transversional, Este último método es mejor aplicable cuando se estudian secuencias de DNA mitocondrial debido a que las sustituciones nucleotídicas transicionales son más frecuentes que las sustituciones nucleotídicas transversionales (Brown 1982).

NEIGHBOR. Con los valores de la distancia genética se construye el dendograma por el método Neighbor joining que se basa en encontrar continuamente “vecinos” que pueden minimizar la longitud total de árbol. (Wen-Hsiung, 1997) considerando que la tasa de evolución no es constante entre los diferentes linajes bajo estudio.

SEQBOOT. Es una técnica frecuentemente usada como una medida para estimar el nivel de confianza sobre la agrupación entre los diferentes OTUs. Se basa principalmente en hacer un determinado número de replicas (generalmente 1000) de muestreo con remplazamiento es decir, un sitio que es escogido al azar, este sitio puede ser nuevamente escogido con la misma probabilidad de cualquier otro sitio.

CONSENSE. Esta pequeña rutina generalmente se utiliza como un paso final después de haber empleado la técnica de muestreo con remplazamiento (SEQBOOT). El árbol consenso es calculado por el método “Majority rule” que permite encontrar con mayor facilidad el árbol con la topología más confiable.

TREE VIEW. Es la subrutina que muestra la gráfica final del árbol y permite seleccionar las diferentes formas de presentación (filograma, radial) que pueden tener el árbol. También esta subrutina es utilizada para la conversión entre un árbol con o sin raíz.

En general, es difícil reconstruir el verdadero árbol filogenético con la información de las poblaciones actuales; los errores que se cometen son los de la topología o patrón de ramificación del árbol. La exactitud del método escogido dependerá del tipo de datos utilizados y de los propósitos del investigador (Nei, 1987).

Considerando las características antes mencionadas de la región control ("*D-loop*"), en el presente estudio se utilizó la secuencia más informativa del "*D-loop*" (Takeda y cols. 1995) para evaluar la diversidad genética y el posible origen del cerdo criollo mexicano (CCM) con la finalidad de aportar mayor información en estas poblaciones en peligro de extinción.

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPOTESIS

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

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivo general

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

2.2.2. Objetivos particulares

- 1) Amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la región control (“*D-loop*”) en cerdos criollos y cerdos de raza pura.
- 2) A partir de los fragmentos amplificados obtener la secuencia de nucleótidos de la región más informativa del *D-loop*.
- 3) Analizar las relaciones filogenéticas entre los cerdos criollo mexicano, cerdos de raza pura y algunas razas de cerdos de origen Europeo y Asiático.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

Se obtuvo de sangre periférica en tubos con EDTA de 31 cerdos criollos mexicanos (CCM): 27 cerdos “pelón mexicano”, 1 cerdo “pata de mula” y 3 cerdos “cuino”, procedentes de diferentes regiones geográficas del país. También se contó con muestras de sangre periférica de 23 cerdos de raza pura (CRP): 4 Landrace, 4 Hampshire, 4 Large White, 4 Duroc, 4 Yorkshire y 3 cerdos vietnamitas obtenidas en granjas comerciales (Cuadro 1)

Cuadro 1. Procedencia de las muestras.

CERDOS	NUM.	PROCEDENCIA Raza	IDENTIFICACIÓN
CRIOLLOS N = 31 Pelón Mexicano (P)=27 Cuinos (C)=3 Pata de Mula (PM) =1	4	Guerrero (Altamirano)	PG1, PG2, PG3, PG4
	4	Veracruz	PV1, PV2, PV3, PV4
	4	Tabasco	PT1, PT2, PT3, PT4
	4	Nayarit (Quiviquinta)	PN2, PN10, PN11, PN12
	8	Nayarit (Huajicori)	PN1, PN3, PN4, PN5, PM1, CN1, CN2, CN3
	4	Nayarit (San Diego)	PN6, PN8, PN13, PN14
	3	Nayarit (Tamarindo)	PN7, PN9, PN15
CERDOS DE RAZA PURA N = 23	3	Vietnamita (CV)	CV1, CV2, CV3
	4	Large white (LW)	LW1, LW2, LW3, LW4
	4	Landrace (LA)	LA1, LA2, LA3, LA4
	4	Duroc (DU)	DU1, DU2, DU3, DU4
	4	Hampshire (HA)	HA1, HA2, HA3, HA4
	4	Yorkshire (YK)	YK1, YK2, YK3, YK4
TOTAL	54		

PG: Pelón de Guerrero, PN: Pelón de Nayarit, PT: Pelón de Tabasco, PV: Pelón de Veracruz, PM: Pata de Mula, CN: Cuino de Nayarit, LA: Landrace, HA: Hampshire, LW: Large White, CV: Vietnamita YK: Yorkshire.

3.2. Purificación de DNA total

A partir de las diferentes muestras de sangre, se obtuvo DNA total mediante la técnica reportada por Miller y cols. (1998) con algunas modificaciones (anexo 1).

La integridad del DNA se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (anexo 2). La concentración del DNA se determinó en un fluorómetro (Hoefer, DyNA Quant 200) siguiendo las instrucciones del proveedor (anexo 3).

3.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En la reacción de PCR, se utilizaron 100 ng del DNA total para amplificar la región control ("*D-loop*") presente en el DNA mitocondrial.

Para la amplificación de la región del *D-loop*, se diseñó un par de iniciadores: mitL3 (^{15,321}ATATACTGGTCTTGTAACCC) y mitH4 (²⁶AGGCATTTTCAGTGCCTTG) que se localizan en el gen del RNA de transferencia para treonina, y en el gen del RNA de transferencia de fenilalanina, respectivamente. Los números indican la posición correspondiente a la secuencia completa de nucleótidos del mtDNA del cerdo (Arnason y Ursing 1998).

La reacción de amplificación se realizó, utilizando un paquete de reactivos para PCR (BIOTECSA), adicionando las cantidades recomendadas por la casa comercial (anexo 4). Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo a 94°C (3min), 30 ciclos a 94°C (30seg), 55°C (1min), 72°C (1min) y 1 ciclo final de 72°C (3min).

La amplificación se verificó en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio, utilizando como marcador de peso molecular DNA del bacteriofago λ digerido con BstE II (λ /BstEII).

3.4 Purificación del fragmento amplificado a partir del gel de agarosa.

Los productos amplificados de PCR se purificaron a partir del gel de agarosa por un KIT comercial "QIAquick, Gel Extraction" (QIAGEN, CA USA) Num. de catálogo 28704, siguiendo las instrucciones del proveedor (anexo 5).

La purificación del fragmento de DNA previamente amplificado, se verificó en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. La concentración del fragmento de DNA se determinó por medio de un Kit de cuantificación en un fluorómetro (fluoroskan Ascent FL) (anexo 6).

3.5 Obtención de la secuencia

El fragmento purificado de mtDNA, se empleó como molde para obtener la secuencia de 269 pb de nucleótidos correspondientes a la región más informativa dentro del "D-loop".

La reacción de secuenciación se preparó mediante un KIT comercial "BigDye terminator Cycle Sequencing" (PE, Applied Biosystems Foster, CA USA), siguiendo las instrucciones del proveedor (anexo 7). Los iniciadores que se emplearon para obtener la secuencia fueron: "mitL3" (^{15,321}ATATACTGGTCTTGTAACCC) y "448" (^{15,894}TAAGGGGAAAGAGTGGGCGA) como sentido y antisentido respectivamente. Los números indican la posición correspondiente a la secuencia completa del mtDNA en el cerdos (Ursing y Arnason, 1998).

La reacción de secuencia, se trabajó por PCR, bajo las siguientes condiciones de amplificación: 25 ciclos a 96°C (10seg), 50°C (5seg), 60°C (4min) con un ciclo final a 4°C. Al término, de las condiciones anteriores de amplificación, los dideoxinucleotidos no incorporados en la reacción de secuencia se eliminaron por filtración a través de columnas "DyeEx Spin" (QIAGEN, CA USA) Núm. de catálogo 63104.

El volumen recuperado se colocó en un concentrador de DNA (Automatic SpeedVac AS160) hasta secarse completamente. A continuación se agregó 1.5 µl del colorante de corrida (5:1 formamida: EDTA 25Mm, 50mg/ml de azul dextran) para resuspender perfectamente cada muestra. Finalmente las muestras se desnaturalizaron a 94°C durante 10

min. y se cargaron por separado en geles de acrilamida colocados en un secuenciador automático **DNA ABI Prysrm 377 (PE, Foster City USA)**.

3.6 Análisis de las secuencias.

Las secuencias de nucleótidos de cada muestra, se registraron de forma electrónica y en electroferogramas. El primer paso de análisis de la secuencia de nucleótidos obtenida fue ubicar los iniciadores en ambas cadenas con la finalidad de recortar la secuencia y tener sólo el fragmento de interés.

El paso siguiente consistió en editar errores de secuencia que aparecen en la lectura original, a partir de la identificación de nucleótidos no definidos en los electroferogramas. En promedio la lectura de cada cadena se leyó 4 veces para tener mayor confiabilidad en la secuencia. Posteriormente, las lecturas obtenidas de las cadenas sentido y antisentido, se alinean para detectar si hay bases que no son idénticas en ambas lecturas. Para esto, a una de las lecturas se le obtiene la secuencia complementaria.

Si hay discrepancias entre las lecturas ambas cadenas se procedió a obtener nuevas lecturas.

3.7 Identificación de haplotipos

Con la finalidad de identificar los diferentes haplotipos presentes en la región más informativa del "D-loop", a cada secuencia se le realizó una alineación múltiple en el programa Multalin (Corper, 1988) con todos los haplotipos previamente descritos en cerdos.

El polimorfismo en la región del "D-loop" se analizó comparando las diversas sustituciones nucleotídicas a lo largo de la secuencia de los diferentes haplotipos.

3.8 Análisis filogenético de las variedades criollas

Con el objeto de estudiar las relaciones genéticas de los cerdos, se compararon los haplotipos que se identificaron en los 54 cerdos y los haplotipos correspondientes a la misma región del “*D-loop*” previamente reportadas en cerdos de origen asiático y europeo disponibles en la base de datos del GenBank.

Los números de acceso a las secuencias de los haplotipos que se utilizaron en este análisis son: Raza Duroc: DU0 (D16483); Jabalí silvestre europeo: EWB1 (AB015094), EWB3 (AB015095); Göttingen: GOT (D16483); Jabalí silvestre japonés: JWB4 (D42176), JWB8 (D42174), JWB10 (D42177), JWB39 (D42178), JWB55 (AB015085), JWB72 (AB015086); Cerdo Landrace: LA0 (D42170); Large White: LW0 (D16483); Meishan: ME1 (D16483), ME2 (D16483); New Satsuma: NSA (D42182), Ohmini: OHM (D42183) Cerdo de Okinawa: OK1 (AB015092); Cerdos de Ryukyu: RY1 (AB015087), RY2 (AB015088), RY3 (AB01589), RY4 (AB01590); Satsuma: SAT1 (D42180), SAT2 (AB015091); Cerdo miniatura de Yucatán CMY (AB015093).

Las relaciones filogenéticas se analizaron de la siguiente manera:

Se realizó una alineación múltiple en el programa: ClustalW 1.8 (Worley, 1995) con las secuencias antes mencionadas. Posteriormente, se analizó el resultado de alineamiento en el paquete de computación PHYLIP versión 3.57 (Felsenstein, 1995).

Las distancias genéticas entre las diferentes secuencias se calcularon por el modelo de 2 parámetros de Kimura (1980), empleando la subrutina “DNADIST”.

Con los valores de distancia genética se construyó un dendrograma por el método de “neighbor-joining” (Saitou y Nei, 1987) utilizando la subrutina NEIGHBOR. La confiabilidad en la topología del árbol se calculó con 1000 réplicas generadas por el método de “bootstrapping” (Felsenstein, 1985) dentro de la subrutina SEQBOOT, el árbol consenso se obtuvo por el método “Majority rule” (Margush & McMorris, 1981) empleando la subrutina CONSENSE.

La gráfica del árbol se obtuvo por medio del programa “Tree View”, versión 1.2 considerando un cerdo Ryukyu como grupo externo.

IV. RESULTADOS

4.1. Purificación del DNA

El DNA total obtenido a partir de muestras de sangre periférica de los cerdos criollos y cerdos de raza pura, se verificó en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). La integridad del DNA purificado fue aceptable por que no se observó ningún tipo de barrido que indicara degradación parcial o total del material genético (figura 1).

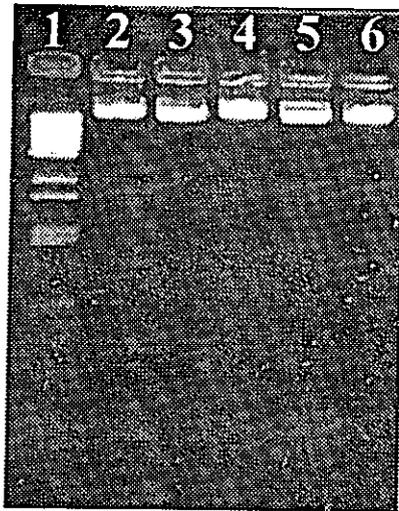


Figura 1. Integridad del DNA total. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular λ BstE II del carril 2 al 6 se encuentran las muestras: Pelón de Guerrero (PG1), Pelón de Nayarit (PN1), Pelón de Tabasco (PT1), Cerdo Large White (LW1) y Cerdo Vietnamita (CV1) respectivamente.

4.2. Amplificación

En la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se observó la amplificación de dos fragmentos, el primer fragmento de 1274 pb corresponde a la región control (D-loop)

presente en el mtDNA, el segundo fragmento de aproximadamente 900 pb corresponde a un producto de amplificación inespecífico (figura 2).

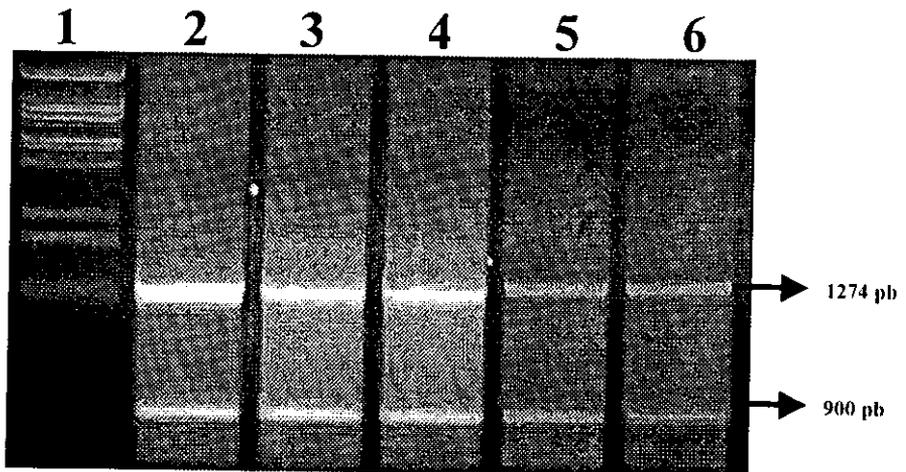


Figura 2. Amplificación de la región control (D-loop). En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular λ BstE II. Del carril 2 al 6 los fragmentos amplificados de los cerdos: Pelón de Guerrero (PG1), Pelón de Tabasco 1 (PT1), Pelón de Veracruz 1 (PV1), Cerdo Vietnamita 1 (CV1) y Cerdo Landrace 1 (LA1).

Posteriormente, para obtener la secuencia de nucleótidos el fragmento amplificado de 1274pb, se purificó a partir del gel de agarosa con la finalidad de eliminar amplificaciones inespecíficas, iniciadores, nucleótidos y restos de sales que pudieran inhibir la reacción de secuencia (figura 3).

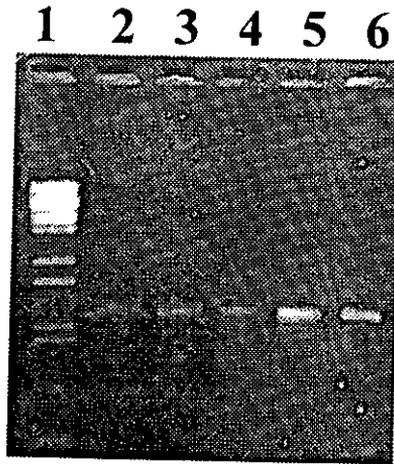


Figura 3. Purificación del fragmento a partir del gel de agarosa. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular λ BstE II, del carril 2 al 6 se encuentra los fragmentos purificados del Cerdo Vietnamita 1 (CV1), Cerdo Landrace 1 (LA1), Pelón de Tabasco 1(PT1), Pelón de Guerrero 1 y Pelón de Veracruz 1.

4.3. Secuenciación de los fragmentos amplificados

A partir de los fragmentos purificados del gel de agarosa, se obtuvo una secuencia de 269pb correspondiente a la región más informativa del D-loop. La secuencia se obtuvo de ambas cadenas de las diferentes muestras.

Los electroferogramas se utilizaron para evaluar la calidad y editar los posibles errores de lectura de las secuencias. La calidad de la secuencia, se determinó mediante la legibilidad de la lectura y en tener un número de nucleótidos no identificados reducidos en los electroferogramas (figura 4). Las secuencias que no estuvieran dentro de estos rangos fueron repetidas.

y HP14). El haplotipo más común en los cerdos de raza pura fue HP8 con 12 cerdos (3 hampshire, 2 landrace, 4 duroc, 1 large white y 2 cerdos vietnamita) (cuadro 2).

Hubo 3 haplotipos compartidos entre los cerdos criollos y los cerdos de raza pura: HP1, HP3 y HP4 (cuadro 2).

En los 13 sitios polimórficos presentes en la región más informativa del D-loop, se observaron 4 tipos de sustituciones nucleotídicas, 3 transiciones (C por T, G por A y T por C) y una tranversión (C por G). El número de cambios nucleotídicos totales en las secuencias fue de 305 de los cuales el 55.0 % corresponde a la transición de T-C, el 28.24% a la transición G-A, el 16.40 % corresponde a la transición C-T y el 0.33 % a la transversión C-G (Cuadro 3)

Cuadro 3. Sustituciones nucleotídicas observadas en la región más informativa del D-loop con relación a la secuencia del cerdo Meishan.

SUSTITUCIÓN NUCLEOTÍDICA	POSICIÓN (bp)	No. DE CERDOS QUE CAMBIARON	PORCENTAJE
T por C	15,682	1	55.00 %
	15,711	42	
	15,738	46	
	15,755	26	
	15,822	47	
	15,837	5	
G por A	15,886	1	28.24 %
	15,726	46	
C por T	15,875	40	16.40 %
	15,673	48	
	15,805	1	
C por G	15,884	1	0.36 %
	15,704	1	
CAMBIOS TOTALES		305	100 %

Los haplotipos identificados en este trabajo se depositaron de manera electrónica en la base de datos del Genbank, bajo los siguientes números de acceso (Cuadro 4).

Cuadro 4. Números de acceso al GenBank, para los haplotipos registrados en este estudio.

HAPLOTIPO	MUESTRA	NUM. DE ACCESO
HP1	PG1	AF364309
HP2	PN3	AF082020
HP3	PM1	AF082022
HP4	PT1	AF082017
HP5	PV4	AF082016
HP6	PN12	AF082018
HP7	PT4	AF364310
HP8	CV3	AF364311
HP9	LA2	AF364312
HP10	PN14	AF082014
HP11	PN15	AF082015
HP12	YK1	AF364313
HP13	YK4	AF364314
HP14	LW3	AF364315

4.4 Análisis filogenético

Al comparar la alineación entre los 14 haplotipos registrados en este trabajo con los haplotipos previamente descritos y disponibles en la base de datos del Genebank de cerdos de origen tanto Asiático como Europeo se encontraron 21 sitios polimórficos dentro de la región más informativa del D-loop (Cuadro 5). Los cambios nucleotídicos revelaron 30 haplotipos totales incluyendo los 14 haplotipos identificados en este estudio. De estos, 9 haplotipos no habían sido descritos (HP1, HP3, HP5, HP7, HP9, HP10, HP11, HP12 y HP13). Los haplotipos HP2, HP4, HP6, HP8 y H14 fueron previamente reportados en cerdos de Okinawa y Satsuma (OK1, SAT1) un cerdo Duroc (DU0), un cerdo miniatura de Yucatán (CMY), un cerdo Landrace (LA0), un cerdo Satsuma y un Large White (SAT2, LW0) respectivamente (cuadro 5).

Cuadro 5 Haplotipos presentes en la región D-loop del DNA mitocondrial en cerdos.

HP	CERDOS	15,646	15,673	15,680	15,682	15,692	15,704	15,708	15,711	15,726	15,733	15,734	15,738	15,755	15,805	15,819	15,822	15,837	15,875	15,884	15,886	15,906
0	ME2	T	C	G	T	C	C	T	T	G	C	A	T	T	C	A	T	T	G	C	T	C
1																			A			
2	OKI, SAT1		T																A			
3			T						C	A			C				C					
4	DU0		T						C	A			C				C		A			
5			T		C				C	A			C				C		A			
6	CMY		T							A			C	C			C		A			
7			T						C	A			C	C			C					
8	LA0		T						C	A			C	C			C		A			
9			T				G		C	A			C	C			C		A			
10										A			C	C			C		A		C	
11			T							A			C	C	T		C		A			
12			T						C	A			C	C			C	C	A			
13									C									C	A			
14	SAT2 LW0							C									C	A	T			
15	EWB3		T					C					C	C			C					
16	EWB1		T					C					C				C					
17	ME1			A															A			
18	NSA																		A			T
19	JWB72		T																A	T		
20	GOT		T						C								C		A	T		
21	OHM								C											T		
22	JW10		T						C			G							A	T		
23	JWB4		T						C										A	T		
24	JWB8		T			T			C				C						A	T		
25	JWB39		T						C				C						A	T		
26	JWB55		T						C				C						A			
27	RYU1		T										C			G						
28	RYU2		T								T		C			G						
29	RYU3	C	T								T		C			G						
30	RYU4	C	T								T					G						

Haplotipos (HP) 1-14 corresponden a los descritos en el cuadro 3. Los cerdos de origen Europeo y Asiático registrados en el GeneBank incluidos en el cuadro son: **OKI**: Cerdo de Okinawa, **SAT**: Cerdo Satsuma, **DU** Cerdo Duroc, **CMY**: Cerdo de Yucatán, **LA0**: Cerdo Landrace, **EWB**: Jabali Silvestre Europeo, **ME**: Cerdo Meishan, **SAT**: Cerdo Niv Satsuma, **JWB**: Jabali Silvestre Japonés, **GOT**: Gottingen, **LW0**: Large White, **OHM**: Ohmini, **RYU**: Ryukyu

DISCUSIÓN

Los diferentes cambios nucleotídicos a lo largo del fragmento de 269 pb correspondiente a la región más polimórfica dentro del *D-loop* presente en el mtDNA (Takeda y cols., 1995), permitió identificar 14 haplotipos en los cerdos analizados (31 CCM y 23 CRP), de los cuales 5 (HP2,HP4,HP6, HP8 y HP14) habían sido descritos previamente

En los CCM se registraron 9 haplotipos (HP1, HP2, HP3, HP4, HP5, HP6, HP7, HP10 y HP11) en comparación, con los CRP donde se identificaron 8 haplotipos (HP1, HP3, HP4, HP8, HP9, HP12, HP13 y HP14), considerando que se estudiaron 5 razas comerciales diferentes (Duroc, Hampshire, York, Large White, Landrace) además de los cerdos Vietnamitas. Se encontraron 3 haplotipos (HP1, HP3 y HP4) que se compartieron los CCM y los CRP. Estos resultados se compararon con un estudio similar hecho por Okumura y cols. (1996) quienes analizaron un fragmento de 1055 pb del *D-loop* y encontraron 8 haplotipos diferentes en un grupo de 40 cerdos silvestres japoneses. En cambio, en este estudio se identificaron 9 haplotipos en un grupo de 31 CCM, lo cual puede sugerir que los niveles de diversidad genética en los cerdos criollos son considerables.

Por otro lado, el análisis filogenético efectuado entre los 14 haplotipos y los haplotipos presentes en la región del D-loop de cerdos con origen Asiático y Europeo, mostró la existencia de 2 principales líneas maternas de descendencia: una línea que origina a razas asiáticas y otra donde provienen las razas europeas. Esta genealogía concuerda con la descrita previamente en los trabajos realizados por Wantanabe y cols. (1985) quienes analizaron RFLP's en el mtDNA, Okumura y cols. (1995) usando la secuencia completa de la región D-loop y recientemente por Giuffra y cols. (2000) quienes analizaron un fragmento de 440 pb de la misma región del D-loop.

De los 14 haplotipos registrados en este trabajo, 4 haplotipos (HP1, HP2 y HP13 HP14) se encontraron en la rama asiática, los haplotipos HP1 y HP13 corresponden a haplotipos asiáticos nuevos. El HP1 agrupó a un cerdo pelón de Guerrero (PG1), un Large White (LW1) y un cerdo Landrace (LA4). El HP13 solo incluyó al cerdo Yorkshire (YK4). Los haplotipos HP2 y HP14 fueron previamente reportados, el HP2 agrupó a un cerdo de Okinawa, un Satsuma y tres cerdos pelones de Nayarit (PN1, PN2 y PN3) y el HP14 se conformó de 2 cerdos Large White (LW0 y LW3) y un Satsuma.

También dentro de la rama asiática se encontraron a los jabalies silvestres japoneses, a los cerdos Meishan, Ohmini, Newsatsuma y Gottingen. Los cuatro cerdos Ryukyu se agruparon en una línea genealógica independiente pero formando parte de la rama Asiática. La presencia de haplotipos asiáticos en cerdos de razas modernas no es sorprendente, ya que existen reportes en donde se menciona que algunas razas comerciales se originaron a partir de razas Asiáticas (Giuffa y cols.2000; Watanabe y cols.1985).

El descubrimiento de haplotipos asiáticos en los cerdos criollos probablemente sea el resultado de importaciones de cerdos de diversas regiones orientales traídos a México a través de la ruta náutica de la Nao de China (Santiago-Cruz, 1962) que fueron criados y lograron establecerse hasta los presentes días en nuestro país.

Otra posible explicación es la cruce de cerdos criollos con cerdas comerciales de raza moderna que conservan haplotipos asiáticos, aunque esto es poco probable debido, a que la mayoría de los cruzamientos utilizan preferentemente sementales de raza mejorada que se cruzan con un gran número de cerdas locales.

Con lo que respecta a la rama Europea se observaron 5 nodos (A-E) de diferenciación genética que siguen un orden progresivo de diferenciación. El nodo A, fue la rama más cercana al linaje asiático y agrupó los haplotipos HP15 y HP16 que incluyeron a los jabalies silvestres Europeos (EWB1 y EWB2) respectivamente. El nodo B estuvo integrado solo por haplotipos encontrados en los CCM (HP6, HP10 y HP11). Interesantemente, el HP6 fue previamente reportado en un cerdo miniatura de Yucatán (con número de acceso al GeneBank AB015093). Esto no es extraño ya que el cerdo miniatura de Yucatán (CMY) se originó a partir de poblaciones criollas de cerdos (Panepinto y cols.1978). El hecho de encontrar este haplotipo en regiones tan distantes como Nayarit, sugiere que existió un amplio tráfico de los cerdos criollos en el país. Los haplotipos HP10 y HP11 no han sido descritos en razas comerciales, por lo que es muy probable que sean específicos de los CCM. Aunque es importante resaltar que las poblaciones comerciales de cerdos han sido pobremente estudiadas y no se conocen todos los haplotipos existentes en estas poblaciones de cerdos.

El nodo C incluyó los haplotipos HP3 y HP7 que fueron casi exclusivos para los CCM con la excepción del HP3 que incluyó a un cerdo "Vietnamita".

En el nodo D se encontraron dos haplotipos, el HP5 incluyó sólo un cerdo pelón de Veracruz; y el HP4 que se conformó por siete CCM (tres pelones de Guerrero, tres pelones de Veracruz y un pelón de Tabasco) y dos CRP (un cerdo Large White y un Duroc). Es difícil asegurar si este haplotipo proviene de un cruzamiento entre CRP con CCM; o sea un haplotipo ancestral entre los CCM y los CRP.

El nodo E fue el más distante de la rama asiática. Este nodo incluyó los haplotipos HP8, HP9 y HP12 que agruparon sólo a CRP incluyendo a dos cerdos Vietnamita. Previamente, Lan y Shi (1993) basándose en estudios de RFLP's (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción) del DNA mitocondrial, propusieron que los cerdos vietnamitas son un grupo más cercano a las razas europeas que a las razas asiáticas. Por lo tanto, los resultados obtenidos en la secuencia nucleotídica de la región más informativa del D-loop, apoyan la idea evolutiva de que los cerdos vietnamitas y europeos se originaron a partir de un ancestro común distante a los cerdos asiáticos. Esto explica el encuentro de haplotipos vietnamitas compartidos con cerdos de raza comercial, cerdos pelones, cuinos y cerdos pata de mula.

Otro aspecto relevante es la confirmación que la raza de cerdos Large White sé derivada de haplotipos tanto Europeos como Asiáticos. Este resultado concuerda con los estudios previamente realizados por Watanabe y cols. (1985) quienes mediante RFLP's concluyeron que los cerdos Large White se originaron de la cruce de cerdos Europeos y cerdos Asiáticos.

Es importante resaltar la ramificación en los nodos B y C que agruparon exclusivamente las poblaciones de CCM, en comparación con los nodos D y E que incluyeron a CRP, estos agrupamientos sugieren que los ancestros de las poblaciones de CCM no tomaron parte en las poblaciones que originaron a las razas modernas de cerdos. Una consecuencia de esto es que la constitución genética de algunas poblaciones de CCM pueden tener diferentes y únicos alelos en comparación a los CRP. Lo anterior, esta de acuerdo con un reciente estudio donde se analizó la frecuencia de 10 microsatélites en 177 CCM no relacionados de siete regiones de México y 111 CRP (Landrace, Large White, Hampshire y Duroc). Los resultados concluyeron que los CCM pertenecen a un linaje genético divergente de los CRP. Además los CCM han desarrollado varios linajes de diferenciación genética asociados a su localización geográfica (Lemus-Flores y cols; 2001 en prensa). Sin embargo,

se requieren de estudios más extensos para resolver estas cuestiones acerca de la distribución geográfica de los patrones basados en la mitocondria.

VII. CONCLUSIONES

- 1) Se identificaron 14 haplotipos en la región más informativa del D-loop en los 54 cerdos que se estudiaron.
- 2) En los CCM se encontraron 9 haplotipos (HP1, HP2, HP3, HP4, HP5, HP6, HP7, HP10 y HP11) en comparación con los CRP que tuvieron 8 haplotipos (HP1, HP3, HP4, HP8, HP9, HP12, HP13 y HP14) presentes en 5 razas diferentes.
- 3) Los datos obtenidos en los análisis filogenéticos sugieren que las poblaciones de cerdo criollo tienen un origen diverso debido a que se encontraron 2 haplotipos en la rama Asiática y 12 haplotipos en la rama Europea.
- 4) Este estudio permite proponer que los cerdos no participan en la formación de las variedades comerciales modernas.

se requieren de estudios más extensos para resolver estas cuestiones acerca de la distribución geográfica de los patrones basados en la mitocondria.

VII. CONCLUSIONES

- 1) Se identificaron 14 haplotipos en la región más informativa del D-loop en los 54 cerdos que se estudiaron.
- 2) En los CCM se encontraron 9 haplotipos (HP1, HP2, HP3, HP4, HP5, HP6, HP7, HP10 y HP11) en comparación con los CRP que tuvieron 8 haplotipos (HP1, HP3, HP4, HP8, HP9, HP12, HP13 y HP14) presentes en 5 razas diferentes.
- 3) Los datos obtenidos en los análisis filogenéticos sugieren que las poblaciones de cerdo criollo tienen un origen diverso debido a que se encontraron 2 haplotipos en la rama Asiática y 12 haplotipos en la rama Europea.
- 4) Este estudio permite proponer que los cerdos no participan en la formación de las variedades comerciales modernas.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Aparicio M. J. B. (1987): El cerdo Ibérico. Premio de Investigación, Universidad de Córdoba, España.

Arnason U. and Ursing B. (1998): The Complete Mitochondrial DNA Sequence of Pig (*Sus scrofa*). *Journal of Molecular Evolution*. 47: 302-306.

Avise J. (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. ED Chapman & Hall New York U.S.A. 511pp.

Baldizon S. O. (1971): Contribución a la determinación de algunos valores hemáticos normales del cerdo Pelón Mexicano. **Tesis de Licenciatura, FMVZ-UNAM**. México D.F.

Brown W. M. and Wilson A. C. (1979): Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:1967.

Brown W. M., Prager A., Wang A. and Wilson A. C. (1982): Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* 18:225-239.

Bruford M. Hanotte O. Brookfield J. and Burke. T. (1991): Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. En Hoelzel A. R. (*Editor*) *Molecular Genetic Analysis of Populations a Practical Approach*. Ed .IRL PRESS Oxford University Press.

Castro G. E. M. (1981): Importancia que ejercen algunos factores ambientales y el efecto del semental sobre el tamaño y peso de la camada al nacimiento y al destete en el Cerdo Pelón Mexicano en la etapa de la lactancia en el Altiplano. **Tesis de Licenciatura, FMVZ-UNAM**. México D.F.

Cárdenas P.C. (1996): Introducción al estudio zoométrico del cerdo Pelón Veracruzano. **Tesis de licenciatura, FMVZ-UNAM**. México D.F.

- Clayton D.A. (1982): Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, 28:693-705.
- Cenobio S. L. (1993): Evaluación del comportamiento reproductivo de un lote de cerdas Pelón Mexicano en la etapa de lactancia en el Altiplano. Tesis de licenciatura, FMVZ-UNAM México D.F.
- Coper F. (1988): *Nucl. Acids Res* 16 (22) 10881-10890.
- Chupin D. (1994): Le Role des Biothechnologies de la reproduction pour la conservation. *Animal Genetic Ressources Information*. FAO-UNEP Roma 13-26pp
- Darnell, J. Lodish, H. Baltimore, D. (1980): Molecular Cell Biology. Ed. OMEGA ,S.A 1188pp.
- Felsenstein J. (1995): Phylogeny inference package *PHYLIP* version 3.57c. Executables for PC, University of Washington, Seattle.
- Felsenstein J. (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 573-791.
- Flores M. J. Agraz A. (1981): Ganado Porcino cría, explotación, enfermedades e industrialización. Ed. *Limusa*, S. A. de C. V. México, D.F.
- Flores M. J. (1977): Orígenes probables de los cerdos mexicanos, características generales, zoometría, distribución, población probable actual, futuro. *Porcivama* 56: 37-45.
- Fujii J. Otsu K. Zorzato F. Khanna V. Weiler K. O'Brien P. and MacLennan D. H. (1991): Identificación of a mutation in porcine Ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, 253:448-451.

Gallardo R. A. (1941): Contribución al mejoramiento del cerdo criollo en México. **Tesis de Licenciatura de la FMVZ-UNAM.** México D.F.

Giuffra E. Kijas J. M. Amarger V. Carlborg O. Jeon J. and Andersson L. (2000): The origin of the Domestic pig: Independent Domestication and subsequent introgression. *Genetics* 154: 1785-1791.

Hall J.G. and Bradley D.G. (1995): Conserving livestock breed biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 267-270.

Hedges B. Kumar S. Tamura K. and Stoneking M. (1992): Human origins and Analisis of mitochondrial DNA sequences. *Science*. 225: 737-739.

Huchinson C. A. Newbold J. E. Potter S. S. and Edgell M. H. (1974): Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature*. 251:536.

Karp G. (1987): *Biología Celular*. Ed. McGraw Hill, México. 950 pp.

Kimura M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rate base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.

Kirby R. (1995): Genetic Diversity, Conservation and Sustainable Utilization. *Genetic Engineering and Biotechnology Monitor*. 2: 1-7.

Lan H. and Shi L. (1993): The Origen and Genetic differentiation of Native Breeds of Pigs in Southwest China: An Approach from Mitochondrial DNA Polymorphism. *Biochemical Genetics*. 31: 51-60.

Lemus-Flores C. Ulloa-Arvizu R. Ramos-Kuri M. Estrada F. J. y Alonso R. A. (2001): Genetic analysis of Mexican hairless pig populations. *J. Anim. Sci.*, in Press.

- Loftus R. Machugh E. D. Bradley G. D. Sharp M. P. y Cunningham P. (1994): Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2757-2761.
- Loftus R. Scherf B. (1992): Word watch list for domestic animal diversity. FAO.
- Margush T. and McMorris F. R. (1981): Consensus n-trees. *Bulletin of Mathematical Biology* 43: 239-244.
- Medina G. J. (1965): Estudio Craneológico de un Suideo del Preclásico. **Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias .UNAM México D. F.**
- Miller S. A. Dykes D. Polesky H. F. (1989): A simple procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16:1216.
- Nájera O. H. (1989): Alternativas de investigación y su aplicación animal en las zonas marginales del trópico de Chiapas. *Las profesionales en México* Vol. 1 Núm. 2 Universidad Autónoma Metropolitana. México.
- Okumura N. Ishiguro N. Nakano M. Hirai K. Matsui A. and Sahara M. (1996): Geographic population structure and sequence divergence in the mitochondrial DNA control region of the Japanese wild boar (*Sus scrofa leucomystax*), with reference to those of domestic pigs. *Biochemical Genetics* 24, 179-189.
- O'Brien P. Shen J. Cory H. and Zhang R. (1993): Use of DNA-based test for the mutation associated with porcine stress syndrome (malignant hyperthermia) 10,000 breeding swine. *JAVMA*, 203:842-851.
- Panepinto L. M. Phillips R. W. Wheeler L.R. and Will D. H. (1978): The Yucatan miniature pig as a laboratory animal. *Laboratory Animal Science* 28:308-313.
- Peñalosa R. Salamanca F. (1994): Los marcadores genéticos y sus aplicaciones en biomedicina. *Revista Mexicana de Patología Clínica* 41:5-9.

- Robles R. T. (1967): Contribución al estudio de los cerdos lampiños o pelones mexicanos (Costa de Jalisco) **Tesis de licenciatura de la FMVZ-UNAM**. México D. F.
- Rojas C. (1993): Comparación del comportamiento productivo durante la lactancia entre cerdos de raza Pelón Mexicano e híbrido de Yorkshire con Pelón Mexicano y Landrece con Pelón Mexicano en el Altiplano. **Tesis de Licenciatura de la FMVZ-UNAM**. México D.F.
- Rus A. (1993): Evolution by turnover in the control region of vertebrate mitochondrial DNA. *Current Opinion in Genetics and Development* 3:891-895.
- Saito N. and Nei M. (1987): neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.
- Saitou N. and Imanishi T. (1989): *Molecular Biology and Evolution*. 6:514-525.
- Santiago-Cruz F. (1962): La Nao de China. *ED Jus*, S.A. México D.F.
- Silhavy T.J. Berman M.L. and Enquist L.W. (1984): Experiments with gene fusions. Cold Harbor Laboratory.
- Takeda K. Onishi A. Ishida N. (1995): SSCP analysis of pig mitochondrial DNA D-loop region polymorphism. *Animal Genetics* 26:321-326.
- Takesaki N. and Nei M. (1996): Genetic distance and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144: 389-399.
- Tajima F. and Nei M. (1984): Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol Biol. Evol.* 1:269-285.

- Tanaka K. Yamagata T. Masangkay J. (1995): Nucleotide diversity of mitochondrial between the swamp and the river types of domestic water buffaloes, based on restriction endonuclease cleavage patterns. *Biochemical Genetics* 33:137-147.
- Tateno Y. Takezaki N. and Nei M. (1994): *Molecular Biology and Evolution* (in press).
- Vázquez P. C. (1973): Historia de los animales domésticos de México, su origen autóctono o su introducción al país. **Tesis de licenciatura. Fac. Ciencias UNAM. México.**
- Vila C. Savolainen P. Maldonado J. E. Amorim I. R. Rice J. E. Honeycutt R. L. Crandall K. A. Lundeberg J. Wayne R. K. (1997): Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science*. 276: 1687-1689.
- Watanabe T., Hayashi Y., Ogasawara N., and Tomita T. (1985): Polymorphism of mitochondrial DNA in pigs based on restriction endonuclease patterns. *Biochemical Genetics* 23:105-113.
- Watanabe T., Hayashi Y., Kimura J., Yasuda Y., Saitou N. (1986): Pig mitochondrial DNA: polymorphism, restriction map orientation, and sequence data. *Biochemical Genetics* 24:385-396.
- Wen-Hsiung Li (1997) *Molecular Evolution*. *ED* Sinauer Associates. Sunderland Massachusetts U.S.A. 487pp.
- Worley K. Human Genome Center, Baylor College of Medicine (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/readseq.html>).

ANEXOS

ANEXO 1: PURIFICACION DE DNA TOTAL A PARTIR DE SANGRE PERIFERICA

Emplear 1ml de sangre y hacer 2 a 3 lavados con un volumen de agua desionizada estéril, centrifugar por 10 min. a 12,000 rpm. Resuspender perfectamente el botón celular con 200 μ l de la solución de lisis, añadir RNAasa a una concentración final de 10 μ g/ml incubar por 1 hora a 37°C. Al término de esta incubación adicionar proteinasa K a una concentración de 50 μ g/ml dejar incubar 2 horas a 50°C y 1 hora a 65°C.

Agregar Cloruro de Sodio a una concentración final de 2M y centrifugar 15 min. a 12,000 rpm recuperar con mucho cuidado el sobrenadante en un tubo eppendorf de 1.5 ml.

Posteriormente, precipitar el DNA con 2 volúmenes de etanol frío al 100%. La pastilla se recupera por centrifugación durante 10 min. a 12,000 rpm.

Realizar 2 lavados a la pastilla de DNA con etanol frío al 70% utilizando las mismas condiciones de centrifugación, poner a secar la pastilla en una centrifuga de baja velocidad (speedVac).

Finalmente la pastilla de DNA se resuspende en 200 μ l en H₂Odd estéril, cuantificar y diluir a una concentración de 50ng/ μ l, almacenar en congelación hasta su utilización.

Soluciones necesarias:

Solución de lisis: Tris-HCL pH 8.0, 400mM NaCl, 20mM EDTA, 0.5% SDS

Rnasa: (20mg/ml)

Proteinasa K: (50mg/ml).

ANEXO 2: PREPARACIÓN DE GELES DE AGAROSA AL 1%

Colocar 1gr de agarosa en 100 ml de TBE 1X calentar en baño María hasta que la agarosa se disuelva. Posteriormente agregar bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 $\mu\text{g/ml}$.

Soluciones necesarias:

TBE 5 X: 54 g. de Tris base, 27.5 g de ácido bórico, 20 ml de EDTA 0.5 molar pH 8.
Aforar a un litro de agua destilada estéril.

Bromuro de Etidio 10 mg/mL: Pesar 50 mg de bromuro de etidio disolver en 5 ml con agua estéril.

ANEXO 3: CUANTIFICACION DEL DNA

- 1.- Preparar la solución standard, colocar 2 ml de esta solución en una cubeta de vidrio como blanco, ponerla dentro del fluorómetro (Hoefer, DyNA Quant 200) y presionar <ZERO>, cuando la pantalla indique cero remover la cubeta.
- 2.- Calibrar el fluorómetro diluyendo 2 μl del DNA standard en 2 ml de la solución standard, presionar el botón de <CALIB>, indicar el valor de calibración (100 ng/ μl) y presionar el botón <ENTER> para aceptar la instrucción.
- 3.- Para la lectura de cada muestra problema, se utiliza el blanco para llevar a cero el aparato. Emplear 2 μl de la muestra por cada 2 ml de la solución standard. Hacer las repeticiones que sean necesarias para cada muestra.

Soluciones necesarias:

Buffer TNE 10X: 12.11 g de Tris (100 mM), 3.72 g de EDTA (10 mM), 116.89 g de NaCl (2 M). Disolver en 800 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.4 con HCL concentrado. Aforar a 1 litro con agua destilada

Solución standard : 10µl de la solución stock H 33258, 10 ml de TNE (10X) y 90 ml de agua destilada estéril.

Solución Stock de Hoechst: Adicionar 10 ml de agua destilada a 10 mg del colorante H 33258.

ANEXO 4: REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

DNA 50ng/µl	2 µl
Amortiguador (1.5 mM MgCl ₂)10X	5 µl
Deoxinucleotidos(dATP,dCTP, dGTP,dTTP) 2mM	5 µl
BSA 3 mg/ml	2.5 µl
Triton 2%	2.5 µl
Iniciadores (10µM)	2.5 µl
Taq polimerasa (250 U/µl)	0.5 µl
H ₂ O dd estéril	cbp 50µ

ANEXO 5: PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

- 1.- Cortar el fragmento amplificado del gel de agarosa y colocarlo en un tubo eppendorf de 2 ml.
- 2.-Pesar el fragmento y adicionar 3 volúmenes de del Buffer QG a un volumen de gel (100 mg/100µl), incubar 10 minutos a 55°C hasta que la agarosa este completamente disuelta.
- 3.- Adicionar un volumen de isopropanol a la muestra y mezclar perfectamente.

- 4.- Colocar una columna QIAquick dentro de un tubo colector, adicionar la muestra y centrifugar a 13,500 rpm por 1 min.
- 5.- Decantar el sobrenadante del tubo colector y adicionar 500 μ l del buffer QG para remover trazas de agarosa, centrifugar a las mismas condiciones.
- 6.- Lavar la columna con 750 μ l de buffer PE, dejar reposando la columna durante 5 min. Volver a centrifugar bajo las mismas condiciones.
- 7.- Decantar el sobrenadante del tubo colector y centrifugar por 1 min. adicional.
- 8.- Colocar la columna en un tubo eppendorf limpio, eluir el DNA agregando 50 μ l de buffer EB dentro de la columna QIAquick y centrifugar a las mismas condiciones.
- 9.- Alternativamente, para incrementar la concentración de DNA, adicionar 30 μ l del buffer EB al centro de la columna, dejar reposar 1 min. y centrifugar a 13,500 durante 1 min.

ANEXO 6: CUANTIFICACION DEL FRAGMENTO PURIFICADO

- 1.- Construir una curva teórica de lectura a partir de un DNA standard (2 μ g/ml) haciendo las siguientes diluciones.

Tubo	ng/ml	2 μ g/ml	TE (1X)	PicoGreen (1X)
0	0	0	100 μ l	100 μ l
1	10 μ l	1 μ l	99	100
2	15	1.5	98.5	100
3	20	2.0	98	100
4	30	3.0	97	100
5	40	4.0	96	100
6	60	6.0	94	100
7	80	8.0	92	100
8	100	10	90	100
9	151	15	85	100
10	200	20	80	100

Para cada muestra problema, hacer una dilución 1:20.

MUESTRA PROBLEMA	TE	PICOGREEN
5 μ l	95 μ l	100 μ l

2.- Mezclar perfectamente y distribuir por duplicado 100 μ l de cada muestra sobre una placa de ELISA. Las muestras se leen en un FluoroSkan utilizando el programa ASCENT.

3.- La concentración del fragmento de DNA purificado se obtuvo por medio del análisis de regresión lineal.

Nota: Las diluciones tanto del DNA standard como las muestras problema pueden aumentar o disminuir dependiendo del valor obtenido en el análisis de regresión lineal.

ANEXO 10: REACCIÓN DE SECUENCIA

1.- Preparar una reacción para cada iniciador adicionando los siguientes reactivos:

Buffer Mix 10 X	4 μ l
DNA	10-15 ng
*Iniciador μ l 3.2 pmol	1.6 μ l
DMSO	1 μ l
H ₂ O dd esteril	Cpb 20 μ l

LISTA DE ABREVIATURAS

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