Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada



Caracterizacion Molecular del Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase I en la Vaquita (Phocoena sinus)

TESIS MAESTRIA EN CIENCIAS

AINES DEL CARMEN CASTRO PRIETO

ENSENADA BAJA CFA, MEXICO MAYO DE 2006

TESIS DEFENDIDA POR Aines del Carmen Castro Prieto Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ Dr. Horacio Jesús de la Cueva Salcedo Director del Comité Dr. Se Ramírez Codirector del Comité Dr. Lorenzo Rojas Bracho Dr. Ricardo Vázquez Juárez Miembro del Comité Miembro del Comité Dra. Yolanda Sohramm Urrutia

Miembro del Comité

Dr. Alexel Fedorovish Licea Navarro Miembro del Comité

r. Juan Carlos Herguera García

Coordinador del programa de posgrado en Ecología Marina

Dr. Raúl Ramón Castro Escamilla Director de Estudios de Posgrado

9 de Mayo de 2006

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA



PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MARINA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE I EN LA VAQUITA (*Phocoena sinus*).

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

AINES DEL CARMEN CASTRO PRIETO

Ensenada, Baja California, México, Mayo del 2006.

Resumen de la tesis de **Aines del Carmen Castro Prieto**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en Ecología Marina. Ensenada, Baja California, México.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE I EN LA VAQUITA (*Phocoena sinus*).

Resumen aprobado por: Dr. Horacio de la Cueva Salcedo Director

giofilac"

Dr. Sergio Flores Ramírez Codirector

Phocoena sinus la Vaguita, un cetáceo endémico del Alto Golfo de California y muy amenazado es un buen modelo para estudiar como la selección natural y la historia demográfica han moldeado el polimorfismo del Complejo Principal de Histocompatibilidad (Mhc) en poblaciones pequeñas de cetáceos y otros animales que muestran diversidad genética reducida. El análisis de la variabilidad de los genes sujetos a selección como el Mhc es relevante en la conservación de especies. Se aislaron y caracterizaron secuencias que codifican la región de unión al péptido (PBR) y se utilizaron análisis filogenéticos para segregar las secuencias obtenidas en linajes alélicos potenciales indicativos de la especificidad del locus. Las secuencias que pertenecieron a un linaje alélico potencial (locus) se alinearon para detectar regiones conservadas de un solo locus que flanquean los exones 2 y 3 de las secuencias Mhc-I aisladas, candidatas para el diseño de oligonucleótidos específicos para la especie. Finalmente se realizó un análisis preliminar del polimorfismo Mhc-I en cuatro individuos. Se emplearon PCR, clonación, análisis SSCP's y secuenciación automatizada para aislar y caracterizar secuencias variables que codifican la PBR de MHC-I a partir de dos vaquitas. Se obtuvieron un total de seis secuencias únicas de 570pb en un individuo, que incluyen: 171pb del exón 2, 201pb del intrón 2 y 198pb del exón 3 Mhc-I. Estas representan las secuencias de ADN genómico más completas de genes de histocompatibilidad clase I en todos los cetáceos. Las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de los exones 2 y 3 correspondieron respectivamente a las posiciones 34-90 (dominio α 1) y 91-156 (domino α 2), de moléculas HLA-I en humanos. Los análisis de homología revelaron que las secuencias son muy similares a las secuencias Mhc-I de otros cetartiodáctilos y Eschrichtius robustus dentro de los cetáceos. La reconstrucción filogenética mostró consistentemente tres agrupaciones, Locus A, Locus B, Locus C, y una cuarta el Locus D, que corresponde a una secuencia Mhc-I del segundo exón novedosa aislada en el mismo individuo, lo que sugiere que el individuo de P. sinus analizado es heterocigoto para los loci clase I potenciales. El análisis de polimorfismo en las secuencias Mhc-I segundo exón (N=4) sugiere que dichos loci son potencialmente polimórficos en la población. Sin embargo, se requiere analizar un tamaño de muestra más grande. Las secuencias de los loci Mhc-I en Phocoena sinus revelaron un mayor número de sustituciones no sinónimas que sinónimas, que implicaron un cambio en las propiedades fisicoquímicas del residuo involucrado, lo que sugiere la existencia de un repertorio diverso de sitios de reconocimiento antigénico MHC-I en P. sinus y que la selección mantiene la diversidad alélica de P. sinus. La eficiencia de los oligonucleótidos iniciadores locus-específicos clase I para la especie diseñados en este estudio deberá ser sometida a prueba y utilizados para estimar su polimorfismo en la única muestra representativa de la población disponible (N=30, amplificada en este estudio).

Palabras clave: Complejo Principal de Histocompatibilidad, MHC clase I, Phocoena sinus.

Resumen de la tesis de **Aines del Carmen Castro Prieto**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en Ecología Marina. Ensenada, Baja California, México.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE I EN LA VAQUITA (*Phocoena sinus*).

Resumen aprobado por: Dr. Horacio de la Cueva Salcedo

Director

-g. + /. lac

Dr. Sergio Flores Ramírez Codirector

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF VAQUITA'S (*Phocoena sinus*) MAJOR HISTOCOMPATIBILITY CLASS I GENES.

The vaguita Phocoena sinus, the endemic porpoise from the Gulf of California is critically endangered and represents an outstanding model to study how selection and historical demography have shaped the Major Histocompatibility Complex (Mhc) polymorphism in reduced cetacean and other species populations displaying low genetic diversity. The polymorphism analysis of genes subject to selection like those of the Mhc is relevant for the conservation of natural populations. We aimed to isolate and characterize class I sequences encoding the PBR and used the most updated phylogenetic analyses to segregate obtained sequences into putative allelic lineages indicative of locus specificity. Sequences belonging to putative single allelic lineage (locus) were aligned to detect conserved locus specific regions flanking the variable exon 2 and 3 Mhc-I sequences, candidates for oligonucleotide primers design. Finally, we conducted a preliminary assessment of their polymorphism in 4 individuals. Thus, we used Polymerase Chain Reaction, Cloning, SSCP's analysis and Automated Sequencing to isolate and characterize variable exon 2 and 3 Mhc-I sequences encoding the PBR from two vaguitas. A total of 6 unique sequences of 570 bp were obtained from one individual, corresponding to: 171bp exon 2, 201bp intron 2,198bp exon 3 Mhc-I. These represents the most complete genomic DNA sequences for Mhc class I genes in cetacean species. Deduced amino acid sequences from exons 2 and 3 corresponded to amino acid positions 34-90 (domain a1), and 91-156 (domain a2), respectively, of human HLA-I molecules. Homology analysis showed that these Mhc-I sequences share greatest homology to like Mhc-I from other cetartiodactyls and gray whales among cetaceans. Their reconstructed phylogeny consistently showed three clusters (Locus A, Locus B, Locus C) and a fourth one (Locus D) from a unique exon 2 Mhc-I sequence obtained from the same individual, suggesting that P. sinus is heterozygote for their putative Mhc-I loci. The preliminary polymorphism analysis using exon 2 Mhc-I sequences (N=4) inferred that these loci might be polymorphic in the population. Although this assumption must be supported by a large population size. The sequences from putative Mhc-I loci in P. sinus showed greater number of non-synonymous than synonymous substitutions, that commonly shifted the physiochemical properties of the involved residue, suggesting the existence of a diverse repertoire of Mhc-I antigen recognition sites in P. sinus and that selection maintains P. sinus allelic diversity. The efficiency of the locus specific Mhc-I oligonucleotide primers designed in this study for the species will be tested and used to assay their polymorphism in the largest sample available (N=30, amplified in the present study).

Key words: Major Histocompatibility Complex, MHC class I, Phocoena sinus.

Dedicatoria

Esta tesis está dedicada a las personas que creen en mí.

Son aquellas que siempre han estado luchando junto a mí para lograr mis metas y mis anhelos, que de alguna manera también son los suyos.

Que me han enseñado lo mejor de la vida y a quienes he y me han amado desde el primer día que llegué a este mundo.

Está dedicada a aquellas que forman parte de mí y que son inmortales.

Mi mayor esfuerzo para ustedes con todo mi cariño.

¡Gracias por todo el amor y confianza!

Agradecimientos

Son muchas las personas que han contribuido de alguna forma al desarrollo de esta tesis y a todas quisiera tener la oportunidad de agradecer de corazón.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización del posgrado.

Al programa de posgrado en Ecología Marina de CICESE en especial al Dr. Horacio de la Cueva por todo el apoyo en muchos aspectos y amistad recibidos durante mi estancia en Ensenada.

Al Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada y a todo su personal del área académica, técnica, administrativa y mantenimiento por el apoyo otorgado de muchas maneras.

A mi director Horacio de la Cueva por su gran amistad, confianza y profesionalismo. Así mismo, por el apoyo que recibí de principio a fin durante mi posgrado.

A mi codirector Sergio Flores Ramírez por compartir sus conocimientos e inspiración sobre el MHC, la confianza y el apoyo durante mi estancia en La Paz.

A mis asesores Yolanda Schramm, Alexei Licea, Ricado Vázquez y Lorenzo Rojas por el apoyo académico, tiempo, trabajo y consejos que empeñaron en la realización de esta tesis.

A mi asesor extraoficial y no menos importante, Adrián Munguía Vega por su amistad, apoyo académico e innumerables intervenciones en el trabajo de laboratorio y a lo largo del desarrollo de esta tesis.

Un especial agradecimiento a Yolanda Shramm y al Dr. Jorge de la Rosa por abrirme las puertas del Laboratorio de Ecología Molecular de la UABC, Ensenada, BC., así como por los consejos recibidos durante mis estancia en este mismo, que me permitieron iniciar el trabajo experimental de esta tesis.

Un especial agradecimiento al Dr. Ricardo Vázquez Juárez por abrirme las puertas del Laboratorio de Biotecnología de Organismos Marinos del CIBNOR, La Paz, BCS para poder desarrollar y culminar la fase experimental de esta tesis. Así como por el gran apoyo económico que recibí de su parte para realizar este trabajo.

Un especial agradecimiento a Sergio Flores por abrirme las puertas del Laboratorio de Ecología Molecular y de la Conservación de la UABCS, La Paz, BCS en el cual desarrollé parte de los experimentos de esta tesis.

A la "American Cetacean Society" por el Grant otorgado, el cual contribuyó de manera importante en la realización de este estudio.

A mis padres, a mi hermana Montaña y a la gran familia con la que siempre he contado y que me ha motivado y apoyado a lograr mis anhelos.

A Rafa por toda la felicidad y todos los momentos que hicieron mucho más bonito todo, además de la participación activa durante la culminación de este proyecto.

A todos mis amigos viejos y nuevos que compartieron algunos de los mejores y peores momentos y que fueron un gran apoyo durante esta etapa de mi vida.

A la Baja California por ser un lugar bellísimo, que me ha inspirado y que cada día me recuerda lo hermoso que es esta tierra y lo afortunada que soy de estar aquí.

A mi Cosmo, mi mejor y fiel compañero en el último año.

;GRACIAS!

CONTENIDO

1

INTRODUCCIÓN	
La marsopa endémica del Alto Golfo de California.	1
La genética en el ámbito de la conservación de especies.	6
El Complejo Principal de Histocompatibilidad.	8
Estudio del Complejo Principal de Histocompatibilidad en P. sinus.	16
Antecedentes sobre el estudio del MHC en mamíferos marinos.	18
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO	
Objetivos específicos.	21
MÉTODOS	
Colección de tejidos y extracción de ADN de Phocoena sinus.	22
Cuantificación de la concentración de ácidos nucleicos.	23
Amplificación de secuencias Mhc-I en Phocoena sinus.	23
Clonación de secuencias Mhc-I en Phocoena sinus.	26
Identificación de secuencias polimórficas Mhc-I en un individuo de Phocoena sinus.	27
Secuenciación automática de Mhc-I en Phocoena sinus.	29
Análisis de las secuencias Mhc-I obtenidas para Phocoena sinus.	30
RESULTADOS	
Caracterización de las secuencias Mhc-I de Phsi25.	36
Segregación de secuencias Mhc-I del individuo Phsi25 en 4 loci Mhc- I potenciales, con base en sus afinidades evolutivas.	52

CONTENIDO (Continuación)

Análisis preliminar del polimorfismo Mhc-I en P. sinus.	60
Diversificación en las secuencias del dominio α 1 Mhc-I de P sinus.	63
Regiones candidatas para el diseño de marcadores moleculares de histocompatibilidad clase I específicos para P. sinus.	65
DISCUSIÓN	68
Aislamiento de secuencias Mhc-I en Phocoena sinus.	69
Naturaleza histocompatible de las secuencias Mhc-I de Phocoena sinus.	71
Funcionalidad histocompatible de las secuencias Mhc-I de Phocoena sinus.	71
Patrón de polimorfismo en la PBR de las secuencias MHC-I de Phocoena sinus.	74
Historia evolutiva de las secuencias Mhc-I exón 2-exón 3 de Phocoena sinus.	78
Loci Mhc-I potenciales en Phocoena sinus.	79
Polimorfismo preliminar y selección diversificadora en las secuencias del segundo exón Mhc I de Phocoena sinus.	83
Marcadores moleculares de histocompatibilidad clase I específicos para Phocoena sinus.	86
CONCLUSIONES	89
REFERENCIAS	92
ANEXO I	105
ANEXO II	109

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema de vista lateral del fenotipo de Vaquita, Phocoena sinus.	1
2	Distribución geográfica de P. sinus.	2
3	Mapa genético del Complejo Principal de Histocompatibilidad (HLA).	10
4	Diagrama de la estructura y organización de intrones y exones de un gen MHC.	11
5a	Esquema de la estructura tridimensional de una molécula MHC clase I.	12
5b	Esquema de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ MHC-I vistos desde arriba.	12
6	Biopsia de piel de aleta dorsal de un individuo P. sinus.	22
7	Técnica molecular de detección de mutaciones puntuales "SSCP".	28
8	Diagrama de flujo que muestra la metodología que se utilizó para aislar y caracterizar secuencias nucleotídicas.	35
9	Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con EtBr que muestra los extractos de ADN de dos individuos <i>P. sinus: Phsi</i> 25 y <i>Phsi</i> 26.	36
10	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con EtBr que muestra los fragmentos <i>Mhc</i> -I amplificados vía PCR.	38
11	Secuencias nucleotídicas de clonas que comprenden el exón 2, intrón 2, exón 3 <i>Mhc</i> -I obtenidas a partir del individuo <i>Phsi</i> 25.	41
12	Secuencias de aminoácidos de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ MHC-I de <i>P</i> . sinus.	45
13	Reconstrucción filogenética de Máxima Verosimilitud (ML) – Neighbor Joining (NJ) de las secuencias exón 2 – exón 3 de P. sinus y otros cetartiodáctilos.	51

- Reconstrucción filogenética de Máxima Verosimilitud (ML) 54
 Neighbor Joining (NJ). que indica la segregación de las secuencias
 Mhc-I exón 2 intrón 2 exón 3 de Phsi25 en tres linajes (loci)
 potenciales.
- 15 Reconstrucción filogenética de Máxima Verosimilitud (ML) 56 Neighbor Joining (NJ) que indica la segregación de los alelos del segundo y tercer exón *Mhc*-I de *Phsi*25 en tres loci potenciales.
- 16 Filograma construido a partir de una matriz NJ de las secuencias 57 nucleotídicas del intrón 2 *Mhc*-I de *Phsi*25.
- 17 Reconstrucción filogenética ML-NJ de las afinidades evolutivas entre
 59 alelos del segundo exón *Mhc*-I de *Phsi*25: *Phsi*25.4 y *Phsi*25.6;
 *Phsi*25.7 y *Phsi*25.20; *Phsi*25.8 y *Phsi*25.9, segregados entre loci
 potenciales A, B y C.
- 18 Afinidades filogenéticas de las secuencias proteicas del dominio α1 61
 Mhc-I.
- Electroforesis que revela la presencia de ADN genómico de alto peso
 molecular, amplificado a partir de los extractos de ADN originales de
 24 individuos de *P. sinus*.
- 20 Secuencias nucleotídicas ambiguas de clonas que comprenden el exón 110 2, intrón 2, exón 3 *Mhc*-I obtenidas a partir del individuo *Phsi*25.

LISTA DE TABLA

Tabla I	Oligonucleótidos iniciadores utilizados en la amplificación vía PCR de secuencias <i>Mhc</i> -I en <i>P. sinus</i> .	Página 24
П	Condiciones de la reacción de PCR utilizadas para cada ensayo.	25
III	Amplicones generados y temperaturas de anillamiento (Ta) durante la PCR.	26
IV	Denominación de secuencias amplificadas, región amplificada y tipo de edición de las secuencias <i>Mhc</i> -I generadas a partir de las clonas analizadas del individuo de <i>Phsi</i> 25.	39
V	Secuencias histocompatibles clase I homólogas a las secuencias exón 2 - intrón 2 - exón 3 <i>Mhc</i> -I de <i>P. sinus</i> .	43
VI	Propiedades físico-químicas de los aminoácidos con sustitución no sinónima en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ MHC-I de l individuo <i>Phsi25</i> .	47
VII	Promedio general de las sustituciones nucleotídicas por sitio $(d) \pm ES$ en el intrón 2 y de las sustituciones sinónimas (d_S) y no sinónimas (d_N) por sitio en exones 2 y 3 de las secuencias extensas <i>Mhc</i> -I del individuo <i>Phsi25</i> .	48
VIII	Alelos del dominio $\alpha 1$ de moléculas MHC-I presentes en cuatro individuos <i>P. sinus</i> .	49
IX	Comparación del promedio general de sustituciones nucleotídicas sinónimas (d_S) y no sinónimas (d_N) por sitio ± ES de las secuencias del exón 2 <i>Mhc</i> -I de cuatro individuos de <i>P. sinus</i> .	63
Х	Sitios variables de los alelos Mhc-I de Phsi25.	64
XI	Regiones nucleotídicas candidatas para el diseño de primers locus- específicos del segundo exón en <i>P. sinus</i> .	66
XII	Regiones nucleotídicas candidatas para el diseño de primers locus- específicos del segundo exón en <i>P. sinus</i> .	67
XIII	Clave interna y número de serie correspondiente a cada uno de los individuos de <i>P. sinus</i> utilizados para generar la amplificación genómica de su ADN total.	105

INTRODUCCIÓN

La marsopa endémica del Alto Golfo de California.

La Vaquita marina *Phocoena sinus* descrita por Norris y McFaraland (1958) es el odontoceto más pequeño existente (longitud máxima ≈ 1.50 m, fig. 1) y representa una de las seis especies de la familia Phocoenidae (Fig. 1). *P. sinus* es una especie endémica de aguas costeras mexicanas y es clasificada como "críticamente amenazada" de acuerdo al criterio de su reducido tamaño poblacional y tendencia a la disminución de su población (DOF 1994, IUCN 1996, CITES 1998).



Figura 1. Esquema de vista lateral del fenotipo de Vaquita, *Phocoena sinus* (dibujo por Pieter A. Folkens). El patrón de pigmentación se divide en dorso gris oscuro, campo lateral gris pálido y campo ventral blanco (Perrin 1972). Las características más conspicuas de su coloración son grandes manchas negras alrededor de ojos y labios (Brownell *et al.* 1987) y de su anatomía externa es la forma y altura de su aleta dorsal ya que es proporcionalmente mayor que el resto de las marsopas (Vidal *et al.* 1999).

La dificultad que implica realizar estudios de *P. sinus* en vida silvestre (baja abundancia, hábitat turbio, comportamiento elusivo y talla reducida) ha propiciado que la mayor parte de la información biológica (Hohn *et al.* 1996, Pérez-Cortés 1996, Vidal *et al.* 1999),

incluyendo muestras de tejido, provengan de individuos muertos incidentalmente en redes de pesca agalleras.

La vaquita presenta un ámbito de distribución confinado a la parte noroeste del Golfo de California concentrándose en un área de 2,700 km² alrededor de las Rocas Consag frente a la costa somera de San Felipe, B.C. (Fig. 2), por lo que se considera su distribución como la más restringida para cualquier cetáceo (Gerrodette *et al.* 1995, Vidal *et al.* 1999).



Figura 2. Distribución geográfica de *P. sinus*. Noroeste del Alto Golfo de California (Brownell 1986, Silber 1990, Gerrodette *et al.* 1995) con una mayor concentración alrededor de las Rocas Consag, mapa original tomado de Jaramillo-Legorreta *et al.* (1999).

Lo anterior determina que sólo se reconozca una sola población aislada constituida por \approx 567 individuos, (I.C._{95%} 177-1073, Jaramillo-Legorreta *et al.* 1999). Durante la segunda mitad del siglo pasado, su población fue mermada como resultado de la pesca incidental en redes agalleras para la totoaba (*Totoaba macdonaldi*). Recientemente, se ha estimado que alrededor de 40 individuos son removidos de la población cada año (Rojas-Bracho y Taylor 1999, D'Agrosa *et al.* 2000). A pesar de su reciente reducción poblacional, se ha sugerido que el tamaño poblacional de *P. sinus* nunca ha sido muy abundante.

Se ha sugerido que *P. sinus* es una población relicta de una especie ancestral relacionada a la marsopa de Burmeister (*Phocoena spinipinnis*) con una distribución a lo largo de las costas del océano Pacífico y Atlántico de Sudamérica. Una población ancestral de *P. spinipinnis* se desplazó hacia el norte durante los últimos periodos glaciales del Pleistoceno, de manera que la población quedó atrapada en aguas más templadas del Noroeste del Golfo de California (Norris y McFarland 1958, Barnes 1985, Rosel *et al.* 1995). De acuerdo a la hipótesis sugerida, la población aislada evolucionó *in-situ* como resultado de un evento fundador (Taylor y Rojas-Bracho 1999).

Las poblaciones que han sufrido disminuciones drásticas en su abundancia, como cuellos de botella, al fundar una nueva población en un hábitat marginal o al ser sometidas a caza desmedida, pueden ver reducida su capacidad para responder al cambio ambiental y simultáneamente sufrir fusión mutacional por endogamia (Lynch y Gabriel 1990). La fusión mutacional consiste en la coincidencia de mutaciones deletéreas en individuos de poblaciones pequeñas y endógamas, lo que intensifica su pérdida de adecuación, determinando que el número poblacional disminuya aún más, y con ello coincidan en los

individuos más mutaciones deletéreas. Así, la población puede verse atrapada en un vortex de extinción (Lande 1988, Amos & Balmford 2001).

Se ha argumentado que los efectos de la reducción drástica y remota de la abundancia de *P. sinus* se ven reflejados en su fenotipo. Por ejemplo, todos los individuos analizados a la fecha presentan polidactilia en sus aletas pectorales y fusión de vértebras (Ortega-Ortíz *et al.* 2000), y un acervo genético pobre como se describe a continuación.

El primer estudio sobre variabilidad genética de la especie reporta la ausencia de polimorfismo en 43 individuos analizados para 322 pares de bases (pb), de la región control del ADN mitocondrial (Rosel y Rojas-Bracho 1999), algo notable al ser este uno de los marcadores genéticos más polimórficos hallado entre los vertebrados (*e.g.* Avise 2004). De manera interesante, aunque preliminar, también se reporta la variabilidad de dos loci microsatelitales (n=7). Posteriormente, Munguía-Vega (2002) aisló y caracterizó siete secuencias únicas histocompatibles clase I que comprenden 147pb del segundo exón a partir de tres individuos analizados. Sin embargo, la incertidumbre del locus particular del cual proviene cada secuencia y el número bajo de la muestra analizado, limitó su interpretación en términos de variabilidad a nivel poblacional de la especie. También analizó una sub-muestra de 25 individuos de *P. sinus* que resultó ser monomórfica para 171 pb del segundo exón del locus histocompatible clase II *DQB*. Recientemente la misma muestra también mostró variabilidad reducida, 2 alelos, para 210 pb del segundo exón del locus histocompatible clase II *DRB* (Esquer-Garrigós 2006).

La ausencia y polimorfismo reducido respectivos a ambos marcadores es notable, especialmente si se considera que en el caso de los genes histocompatibles, éstos son los más polimórficos hallados en los vertebrados (Robinson *et al.* 2003, Sommer 2005) y que

4

llegan a presentar mayor polimorfismo que marcadores neutrales como el ADN mitocondrial (Aguilar *et al.* 2004).

La variabilidad genética baja observada en esta especie y su endemismo extremo sugieren que su tamaño poblacional se ha mantenido muy reducido desde su origen (Taylor y Rojas-Bracho 1999, Munguía-Vega 2002, Hedrick *et al.* 2001), por lo que se considera una especie rara por naturaleza (Taylor y Rojas-Bracho 1999).

En años recientes, se ha generado más información sobre las vaquitas, que incluye estudios de genética, previamente mencionados, hábitat (Silber 1990, 1991; Jaramillo-Legorreta *et al.* 1999), dieta (Pérez-Cortés 1996), comportamiento (Silber *et al.* 1988), morfología (Brownell *et al.* 1987, Torre-Cosío 1995), historia de vida (Hohn *et al.* 1996), mortalidad en redes de pesca (D'Argosa *et al.* 1995), y estatus de conservación (Vidal 1995, Rojas-Bracho y Taylor 1999).

En lo que concierne a la conservación de la especie, se ha evaluado el grado en la contribución de ciertos factores que ponen en riesgo la supervivencia a largo plazo de la vaquita. Como se menciona arriba, la pérdida de variabilidad y depresión endogámica son las principales amenazas genéticas que enfrentan las poblaciones reducidas como la de *P. sinus*, pues estas condiciones pueden conducir a una menor capacidad adaptativa al cambio ambiental (e.g. mayor susceptibilidad a enfermedades) y a la fusión mutacional (Amos y Balmford 2001).

El riesgo de extinción por depresión endogámica ha sido evaluado y no puede ser considerado como un factor determinante en la supervivencia de la especie, siempre y cuando el tamaño de la población no disminuya abruptamente (Taylor y Rojas-Bracho 1999).

La degradación de su hábitat debido a la disminución del aporte de agua y los nutrientes que acarrea a lo largo del Río Colorado, así como la concentración de contaminantes (pesticidas) en su área de distribución, se consideran factores de bajo riesgo para la vaquita, no obstante, los cambios a largo plazo en el hábitat de la vaquita, como la disminución de nutrientes es un factor importante que debe ser investigado.

Finalmente, la captura incidental asociada a las operaciones de la pesca ribereña dentro del Alto Golfo de California ha sido el impacto antropogénico más intenso y constante (desde los 1940's) que ha afectado la demografía de esta población, situándola en riesgo de extinción. Por lo que se considera que las pesquerías son el factor de riesgo con mayor impacto a corto plazo en la especie (CIRVA 1997, Rojas-Bracho y Taylor 1999).

Al respecto, el gobierno mexicano ha implementado acciones de conservación como el establecimiento de la Reserva de la Biosfera de del Alto Golfo de California y el Delta del río Colorado (1993), con el objetivo de proteger a la vaquita entre otras especies. Posteriormente se anunció una estrategia de recuperación para *P. sinus* (Anon 1996) y se formó el Comité Internacional para la Recuperación de la Vaquita (CIRVA).

La genética en el ámbito de la conservación de especies.

Se considera que la meta central de la Biología Evolutiva y de la Conservación es entender mejor como la selección natural, la demografía y las características de la historia de vida de las especies interactúan para moldear la adaptación a las condiciones de un determinado ambiente local.

Gran parte de los estudios de conservación se basan en información genética derivada del uso de herramientas moleculares que permiten conocer la estructura poblacional y afinidades evolutivas. A menudo estos emplean marcadores neutrales, llamados así por que su secuencia no esta sujeta a selección (e.g. D-loop del ADNmt o microsatélites), para estimar el grado de variación presente en individuos y poblaciones y así llegar a entender mejor la biología de las especies (e.g. Paetkau *et al.* 1997, Avise 2000, Avise *et al.* 2002, Fabiani *et al.* 2003). Sin embargo, el polimorfismo neutral no provee información precisa respecto a como la selección opera conforme los individuos interactúan con su ambiente, ni respecto a su habilidad para adaptarse al cambio ambiental, dos aspectos relevantes a ser considerados por los programas de conservación (Meyers y Bull 2002, Van Tienderen *et al.* 2002, Crandall *et al.* 2000). En tal caso, puede ser valioso el analizar sistemas genéticos que se encuentran sujetos a selección (e.g. Cohen 2002, Koskinen *et al.* 2002), como los genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad (en adelante, *Mhc* por sus siglas en inglés).

Se considera que estos genes son indicadores de la historia natural de la población y de su prognosis futura, información valiosa para basar la implementación de planes de manejo y conservación de especies amenazadas (O'Brien 1994). Especialmente, porque existe una gran diferencia entre la variabilidad genética que se estima tradicionalmente y la variabilidad que es importante para un organismo. Por ejemplo, la heterocigozidad (H) es una medida de la diversidad genética y generalmente se estima mediante marcadores neutrales que reflejan la pérdida pasiva de variabilidad como resultado de la deriva genética ó depresión endogámica pero no son informativos acerca de la variabilidad que impacta directamente en la aptitud¹ de una especie (Falconer y Mackay 1996, Amos y Balmford 2001). Sin duda, numerosas mutaciones neutrales no tienen efecto en la respuesta

¹Aptitud: medida del éxito reproductivo de una especie (Futuyma 1998).

adaptativa de una población al cambio ambiental (Meyers y Bull 2002, Van Tienderen *et al.* 2002). En contraste, las mutaciones sujetas a selección tienen un impacto directo en la aptitud de una especie y su efecto neto es deletéreo (Futuyma 1998). En este sentido, surge entonces la necesidad de evaluar objetivamente el polimorfismo genético de las regiones genómicas que codifican proteínas sujetas a presión selectiva como aquellas involucradas en la respuesta inmune, de modo que la vulnerabilidad genética de una población natural pueda estimarse con mayor precisión para entonces desarrollar e implementar estrategias de conservación más sólidas. Tal enfoque justifica continuar los estudios encaminados a conocer el polimorfismo de los genes *Mhc* de *P. sinus*. Estos, juegan un papel reconocido y potencialmente importante en la genética de la conservación (Edwards y Potts 1996) y su diversidad extraordinaria ofrece nuevas perspectivas dentro de la genética e historia de poblaciones naturales (Takahata 1993).

El Complejo Principal de Histocompatibilidad.

En vertebrados modelo (e.g. *Homo*, *Mus*, *Rattus*) el *Mhc* es una familia de genes homólogos fuertemente ligados que codifican las clases I y II de proteínas antigénicas, que se expresan en la superficie celular y que son responsables de iniciar el proceso de inmunidad adaptativa, que consiste en el reconocimiento y eliminación de parásitos patógenos, Fig. 3 (Margulies y McCluskey 2003). Por lo tanto, el polimorfismo de estos genes y de las proteínas que codifican juega un papel crítico en la regulación de la respuesta inmune de todos los vertebrados (Hedrick 1994, Yuhki y O'Brien 1990). Al respecto, el MHC podría estar asociado con caracteres cuantitativos ligados a la aptitud y al comportamiento de los individuos de poblaciones naturales (Piertney y Oliver 2006).

La región genómica del *Mhc* varía en tamaño y complejidad entre especies (Klein *et al.* 1993). El número total de genes en la clase I incluye aquellos que codifican las moléculas clásicas (Ia) de expresión ubicuita y función presentadora de antígenos y las moléculas no clásicas (Ib) de expresión limitada y funciones alternativas. Otros genes clase I pueden ser fragmentos no funcionales o pseudogenes.



Figura 3. Mapa genético del Complejo Principal de Histocompatibilidad (HLA) localizado a lo largo del cromosoma 6 en humanos (*H. sapiens*). Se muestran los loci correspondientes a cada clase del MHC (I, II y III) y la longitud en kilobases de cada región (Margulies y McCluskey 2003).

Las moléculas de histocompatibilidad clase I (MHC-I) y clase II (MHC-II) difieren en su estructura, patrón de expresión en distintos tejidos y en el origen y destino de los péptidos que procesan (Kaufman *et al.* 1994). Las proteínas MHC-I son heterodímeros constituidos por dos cadenas polipeptídicas α y β_2 codificadas por siete exones separados e interrumpidos por seis intrones (Trowsdale 1995). El exón 1 codifica el péptido guía, los exones 3-4 codifican respectivamente tres dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, el exón 5 codifica la región transmembranal y los exones 6 y 7 codifican el dominio citoplasmático (Kupfermann *et al.* 1999, Fig. 4).



Figura 4. Diagrama de la estructura y organización de intrones (regiones no codificantes) y exones (regiones codificantes) de un gen Mhc y su correspondencia con los dominios de la proteína MHC clase I que codifican (Edwards *et al.* 2000).

Los exones 2 y 3 de los genes *Mhc*-I, codifican los dominios proteicos α 1 y α 2 los que a su vez integran una estructura conocida como "Región de Fijación del Péptido" (en adelante PBR, por sus siglas en inglés). La PBR se encarga de fijar péptidos propios y antigénicos (de entre 8 y 11 aminoácidos) y en consecuencia concentra la mayor variación funcional de aminoácidos de las proteínas clase Ia y Ib (Fig 5).



Figura 5. A) Esquema de la estructura tridimensional de una molécula MHC clase I que muestra los cuatro dominios extracelulares y la posición del péptido antigénico. B) Esquema de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ MHC-I vistos desde arriba, se muestra la hendidura de unión al péptido (PBR) y la superficie contactada potencialmente por el receptor de las células T. Ilustración tomada de Bjorkman y Parham (1990).

Es importante resaltar que en cetáceos existen contados estudios estructurales o análisis de ARN mensajero de genes histocompatibles; todos los estudios indican que estos genes codifican proteínas MHC muy similares a las de los mamíferos terrestres (e.g. Romano *et al.* 1992, Shirai *et al.* 1998, Heimeier *et al.* 2005, Sone *et al.* 2005).

Las proteínas MHC- I fijan péptidos lineales derivados de la degradación endógena de proteínas (e.g. proteínas propias y virales). Estos péptidos son presentados a las T

citotóxicas CD8⁺, las que de no reconocer al péptido en cuestión como propio, inician la respuesta inmune (Bjorkman y Parham 1990; Hughes y Nei, 1988).

Una función secundaria de las moléculas clase I (Ia y Ib) es interactuar con las células NK receptoras (del inglés, Natural Killer). En este sentido, Las células NK monitorean la integridad y estatus de otras células de manera que regulan la expresión del MHC-I (Trowsdale 2001).

Cuando se considera la gran diversidad de patógenos, a los que se enfrenta un vertebrado a lo largo de su ciclo de vida y que este vertebrado tiene que efectuar una respuesta inmune adaptativa contra los mismos, se percibe la gran importancia adaptativa y ecológica del polimorfismo de los genes histocompatibles. El MHC contiene los genes funcionales más variables descritos en los vertebrados. En la actualidad se han definido 243, 499 y 321 alelos de loci HLA-A, HLA-B y HLA-DRB1 respectivamente, en humanos (Gaudieri *et al.* 2000). A medida que son estudiados los genes *Mhc* en distintas especies de un amplio rango taxonómico, es aparente que su alta diversidad es un rasgo característico de este sistema (Piertney y Oliver 2006), por lo que su estudio es relevante en preguntas clásicas de ecología y evolución (Edwards y Hedrick 1998).

En la actualidad, se sabe que la selección natural mantiene el polimorfismo en loci *Mhc* y que dicha selección está relacionada directamente con el fenotipo de molécula MHC codificada particularmente, con arreglo de los péptidos antigénicos que fija (Garrigan y Hedrick 2003).

Una vez que se estableció la correlación entre el tipo de *Mhc* y la resistencia a ciertas enfermedades en vertebrados modelo, los estudios se enfocaron a entender los mecanismos que explicaran la diversidad elevada de proteínas MHC. Así se propusieron dos hipótesis:

- 1.- La hipótesis de la selección negativa dependiente de la frecuencia también llamada "ventaja de alelos raros". Esta propone que un alelo nuevo o raro puede tener ventaja selectiva cuando surge un nuevo patógeno. Si el alelo raro confiere ventajas sobre el alelo común, entonces su frecuencia aumentará. Conforme el alelo que da ventaja se va volviendo más común, la selección favorecerá a aquellas nuevas cepas de patógenos que no sean reconocidas por este alelo. Si el patógeno pasa desapercibido, aumentará en frecuencia y la selección favorecerá a un alelo diferente que pueda procesar y presentar a este patógeno (Takahata y Nei, 1990, Slade y Mc Callum 1992). Algunos modelos han demostrado que este tipo de selección puede mantener a un gran número de alelos *Mhc* en flujo (Borghans *et al.* 2004). Empíricamente este tipo de selección es difícil de detectar, dados los aspectos temporales de la relación entre alelos.
- 2.- La hipótesis de sobredominancia (Doherty y Zinkernagel 1975) propone que el reconocimiento y eliminación de de patógenos puede mejorarse por medio de la heterocigozidad de los loci *Mhc*, dado que los heterocigotos tendrán la capacidad de reconocer una variedad mas amplia de antígenos derivados de diversos patógeno y por ello tendrán una mayor inclusión adaptativa que cualquier homocigoto. Esta suposición depende en el grado de divergencia en la estructura de los grupos de péptidos que son fijados por distintos alelos, y por lo tanto, los individuos que muestren los haplotipos más divergentes serán favorecidos. Así la hipótesis de sobredominancia predice un polimorfismo estable; solo puede ser comprobada en su totalidad en sistemas donde se encuentren cepas múltiples de patógenos. Sin embargo, algunos modelos han demostrado que la sobredominancia solo puede retener altos niveles de variabilidad

Mhc en poblaciones naturales si todos los heterocigotos tienen inclusión adaptativa similar (De Boer *et al.* 2004), lo que es poco realista.

Además de los mecanismos de selección parasitaria que incluyen a la selección balanceadora y la selección dependiente de la frecuencia (Garrigan y Hedrick 2003), otras fuerzas evolutivas que actúan sobre el genoma de histocompatibilidad son recombinación, mutación puntual y conversión génica (Edwards y Hedrick 1998), así como la propia historia de la población (Yuhki y O'Brien 1990).

Es aparente que la variación genética acumulada en loci que determinan la interacción virus-hospedero es adaptativa para la población, puesto que los parásitos (y principalmente los virus) pueden evolucionar a tasas mucho mayores que sus hospederos, lo que genera una intensa presión selectiva que ha favorecido la evolución de distintos mecanismos de defensa inmune del hospedero; por ejemplo la diversidad genética elevada del *Mhc* (O'Brien y Evermann 1988).

Existe evidencia circunstancial que ha mantenido viable la hipótesis sobre la presión patogénica diversificadora. No obstante, ésta carece de confirmación empírica (Potts y Wakeland 1993, Hill 1998). Los patógenos no se consideran el único factor involucrado en el mantenimiento de la diversidad del *Mhc*. Se sugiere que algunos vertebrados utilizan señales que involucran al *Mhc* para detectar y algunas veces evitar aparearse con congéneres por lo tanto, la selección sexual también está involucrada (Brown y Eklund 1994, Penn y Potts 1999, Wedekind y Penn 2000, Amos y Balmford 2001).

La dinámica evolutiva del MHC ha adquirido relevancia en la ecología, biología de poblaciones y conservación de especies y se ha convertido en un paradigma importante de diversidad genética adaptativa (Piertney y Oliver 2006).

Estudio del Complejo Principal de Histocompatibilidad en P. sinus.

Existen varias razones que justifican los esfuerzos realizados para obtener evidencias que permitan entender mejor la variación de genes sujetos a selección en los cetáceos. Primero, por que muchas de estas especies han sufrido la disminución de sus poblaciones debido al impacto antropogénico. Segundo, por que una de las preocupaciones centrales de los encargados de administrar y manejar estas poblaciones es la de retener una diversidad genética adecuada para la salud futura de las poblaciones actuales. Y final, pero no exclusivamente, por que los cetáceos representan un grupo de mamíferos con una historia evolutiva y ecología únicos que ha experimentado una serie de presiones selectivas muy distintas a las de los mamíferos terrestres (Gaskin 1982).

La caracterización de los genes de histocompatibilidad en un contexto evolutivo permite evaluar la variación de marcadores moleculares en los que la variabilidad de los aminoácidos influya directamente la aptitud, elección de pareja y componentes de la historia de vida de una población (Edwards *et al.* 2000). Esta información es trascendental para la conservación de especies en peligro, como la vaquita. En especial si se considera que en la actualidad el avance de las técnicas y análisis moleculares permiten comparar la diversidad histocompatible entre especies cercanamente relacionadas y con historias demográficas contrastantes (e.g. *P. spinipinnis y P. sinus*) para evaluar si las especies amenazadas tienen un polimorfismo histocompatible reducido y si ello podría afectar su recuperación. Sobre todo si se considera que algunas especies que han permanecido reducidas por largo tiempo muestran escasa variabilidad histocompatible (Weber *et al.* 2004), lo que podría contribuir a su mayor susceptibilidad a enfermedades y por ello a extinguirse (e.g. Evermann *et al.* 1988, Yukhi y O'Brien 1990, Mikko *et al.* 1999). Dado el conocimiento sobre el papel crítico que desempeña el MHC en el reconocimiento antigénico y la defensa inmune de los vertebrados, es deseable aislar y caracterizar secuencias de histocompatibilidad clase I (*Mhc-I*) en *P. sinus*, para primero determinar si existe polimorfismo funcional entre las secuencias de un individuo en las regiones que contactan directamente al péptido antigénico, que a su vez permita reconocer loci candidatos para evaluar su polimorfismo de manera especifica en una muestra poblacional representativa de *P. sinus* (de la cual se generó un respaldo genómico en este estudio, ver Anexo I) y evaluar de forma indirecta la vulnerabilidad de la especie a enfermedades infecciosas.

El aislamiento y caracterización de genes histocompatibles en cualquier especie genera información valiosa sobre la evolución de loci *Mhc*, como sistema modelo para examinar las interacciones entre genes ligados, selección natural y deriva génica. Así mismo, permite examinar problemas relacionados con la evolución molecular a largo plazo y la evolución de familias multigénicas (Nei *et al.* 1997).

Se ha sugerido que la caracterización amplia de la diversidad genética del *Mhc* en poblaciones naturales incrementará considerablemente nuestra percepción del modo y tiempo de evolución de este sistema examinando explícitamente su relación con los procesos ecológicos responsables de la dinámica evolutiva (Edwards *et al.* 1995). En este sentido, la evolución molecular del sistema *Mhc* en *P. sinus* es de interés dada la historia evolutiva y demográfica de la especie.

Antecedentes sobre el estudio del MHC en mamíferos marinos.

El polimorfismo de los genes de histocompatibilidad ha sido documentado en mamíferos marinos. Los primeros trabajos al respecto, se efectuaron midiendo el polimorfismo de la Longitud de Fragmentos de Restricción (en adelante RFLP's por sus siglas en inglés) de secuencias Mhc - I y II en rorcuales comunes Balaenoptera physalus y de Sei B. borealis, y en el elefante marino del sur Mirounga leonina. Estos trabajos encontraron niveles de polimorfismo bajos que fueron atribuidos a una baja presión patogénica en el medio marino (Trowsdale et al. 1989 y Slade, 1992, respectivamente). En contraste, trabajos más recientes basados en secuenciación automática del locus DRB-Mhc II de belugas Delphinapterus leucas y narvales Monodon monoceros (Murray et al. 1995; Murray y White 1998) y en Otáridos (Hoelzel et al. 1999) revelaron niveles de polimorfismo susceptibles de medición, así como tasas de sustitución no sinónimas consistentes con el efecto que tendría la selección positiva. Además, encontraron que a pesar del nivel de variación alélica limitado observado entre cuatro especies de pinnípedos, el polimorfismo era mayor en el locus DOB Mhc-II del que se había observado en el estudio previo de Slade (1992). Esto se consideró como resultado de haber utilizado herramientas moleculares más informativas que permitieron una estimación del polimorfismo con mayor exactitud y por otro lado, que al igual que en otros vertebrados terrestres, el polimorfismo histocompatible en determinadas poblaciones de mamíferos marinos se relaciona estrechamente con su historia demográfica y evolutiva (Hoelzel et al. 1999).

Actualmente se ha incrementado el esfuerzo de caracterización de genes de histocompatibilidad en cetáceos. Se observó variabilidad reducida en el segundo exón *DQB Mhc*-II a través del Polimorfismo de la conformación de cadenas sencillas (SSCP's por sus

siglas en inglés) dentro de una población de *Balaenoptera physalus* (Nigenda-Morales 2005). La variabilidad observada en secuencias del segundo exón del locus *DQA* y *DQB Mhc*-II en el delfín de Héctor *Cephalorhynchus hectori hectori* está reportada dentro de las más bajas para mamíferos. También se aislaron cinco alelos de loci *Mhc*-I a partir de un individuo (Heimeier *et al.* 2005). Recientemente se aislaron y caracterizaron loci *DQB Mhc*-II en la ballena de esperma de la Antártica *Balaenoptera bonaerenses*, ballena cabeza de melón *Peponocephala electra*, Zifio de Stejneger *Mesoplodon stejnegeri* y se evaluó su diversidad genética dentro y entre especies. Los valores de heterocigozidad estimados sugieren una variabilidad amplia También se aislaron secuencias del mismo locus en la marsopa sin aleta *Neophocaena phocaenoides* (Sone *et al.* 2005).

Por otro lado, fue aislada una secuencia completa de los tres dominios extracelulares MHC-I en el delfín nariz de botella *Tursiops truncatus* a partir de cDNA, y mostró alta homología con secuencias de cetartiodáctilos (Shirai *et al.* 1998). La ballena gris *Eschrichtius robustus* reveló la existencia de un repertorio diverso en sitios de reconocimiento antigénico *Mhc-I* a través de secuenciación, lo que sugiere que la selección balanceadora mantiene la diversidad alélica de dicho gen en la especie (Flores-Ramírez *et al.* 2000; Flores Ramírez *et al.* 2004). Los estudios sobre histocompatibilidad de la vaquita *P. sinus* se mencionaron con anterioridad.

HIPÓTESIS

1. *Phocoena sinus* presenta secuencias nucleotídicas de histocompatibilidad clase I (*Mhc-I*) homólogas al resto de los Cetartiodáctilos.

2. *P. sinus* presenta secuencias que codifican el sitio de reconocimiento antigénico con características de moléculas MHC-I funcionales, que muestran un polimorfismo característico de secuencias histocompatibles clase I observado en otros mamíferos.

3. *P. sinus* presenta al menos tres loci *Mhc*-I potenciales como en el resto de los Cetartiodáctilos y el polimorfismo entre estos permitirá reconocer regiones candidatas para evaluar su polimorfismo específico.

OBJETIVO

Aislar y caracterizar secuencias nucleotídicas variables correspondientes a los dominios α 1 (exón 2) y α 2 (exón 3), que conforman la región de fijación del péptido (PBR), así como la región intrónica adyacente, de las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad clase I (MHC-I) a partir de ADN total en un individuo *Phocoena sinus* y explorar su polimorfismo genético.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Aislar secuencias nucleotídicas variables correspondientes a los exones 2 y 3 que codifican el sitio de reconocimiento antigénico, así como la región intrónica adyacente (intrón 2) de las moléculas MHC-I en un individuo *P. sinus*.

2. Caracterizar las secuencias *Mhc*-I de *P. sinus* para confirmar su naturaleza histocompatible y evaluar su funcionalidad con base en análisis comparativos de homología y patrones de sustitución nucleotídica de acuerdo a secuencias *Mhc*-I previamente caracterizadas.

3. Segregar las secuencias *Mhc*-I obtenidas de un individuo en linajes alélicos potenciales correspondientes a un locus específico, con base en sus afinidades evolutivas.

4. Detectar regiones de secuencias histocompatibles clase I en *P. sinus* para ser utilizadas como anclaje para oligonucleótidos iniciadores locus-específicos que permitirán evaluar el polimorfismo histocompatible clase I en la especie.

5. Explorar de forma preliminar el polimorfismo de loci *Mhc*-I potenciales en *P. sinus* con base en las afinidades evolutivas entre secuencias de exón 2 *Mhc*-I disponibles para la especie y evaluar el efecto de la selección diversificadora en éstas.

METODOS

Colección de tejidos y extracción de ADN.

Se obtuvieron biopsias de piel de aleta dorsal y de la parte ventral del pedúnculo caudal (Fig. 6) de dos vaquitas (*Phocoena sinus*, números de catálogos *Phsi25* y *Phsi26*) que murieron de forma incidental al enmallarse en redes agalleras de pesca. Los organismos fueron colectados por Lorenzo Rojas Bracho² en las aguas de San Felipe B.C., México, localizado en la región Noroeste del Alto Golfo de California (21°45'00", 20°50'00" N y 110°00'00", 98°50'00 " W). Después de colectados, dichos ejemplares se han mantenido en refrigeración a -70 ° C en el almacén de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California en Ensenada, Baja California. De las dos biopsias se aisló el ADN genómico total aplicando un protocolo de extracción estándar de fenol-cloroformo y precipitación con etanol (Sambrook *et al.* 1989).



Figura 6. Biopsia de piel de aleta dorsal de un individuo *P. sinus* rescatado de una red agallera de pesca en el Alto Golfo de California, México.

² Dr. Lorenzo Rojas Bracho. Instituto Nacional de Ecología. Programa de Investigación de Mamíferos Marinos. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, BC. Km. 107 Carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada, B.C., México. Irojas@cicese.mx.

Cuantificación de la concentración de ácidos nucleicos.

La presencia de ADN genómico se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando como amortiguador electroforético TAE (Tris-acetato 10 mM y EDTA (1X). El gel fue sometido a 80 V durante 1 h y posteriormente fue teñido con Bromuro de Etidio, EtBr (10 mg/l). La cuantificación aproximada del ADN total aislado se estimó utilizando un marcador estándar de masa molecular en el rango de 1Kb (Invitrogen, Co.) y un marcador de peso molecular (λ) en el rango de 100pb (Sigma-Aldrich). El alto peso molecular del ADN genómico extraído se verificó al exponer el gel a la luz ultravioleta (320 nm), siendo la intensidad de la banda proporcional a la cantidad y calidad de ADN total en relación a la estándar. Finalmente el gel fue fotografiado.

Amplificación de secuencias Mhc-I.

El ADN obtenido de los individuos *Phsi25* y *Phsi26* se utilizó en tres ensayos buscando amplificar la secuencia de mayor longitud posible con características *Mhc*-I, vía la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando distintas combinaciones de primers que la literatura indica que amplifican secuencias *Mhc*-I de Cetartiodáctilos (Tabla I).
Nombre	Secuencia	Longitud	Referencia
339 F	TACGTGGMCGACACGSAGTTC	21 pb	Flores-Ramírez et al. 2000
340 R	CTCGCTCTGGTTGTAGTAGCS	21 pb	Flores-Ramírez et al. 2000
Rad F	GGGTCTCACACSBTSCARHGGATGT	25 pb	Radtkey et al. 1996

Ellis et al. 1999

18 pb

GCCCTCCAGGTAGTTCCT

Boll R

Tabla I. Oligonucleótidos iniciadores utilizados en la amplificación vía PCR de secuencias *Mhc*-I en *P. sinus*.

Las condiciones de la reacción de PCR específicas para cada ensayo se muestran en la Tabla II. Las amplificaciones se llevaron a cabo utilizando un termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PCR System modelo 9700 bajo el siguiente perfil de temperaturas: un ciclo de desnaturalización de 94°C/5min; 30 ciclos de 94°C/40seg, Ta/1min, 72°C/10min; seguido de un ciclo final de extensión de 72°C/10min. La temperatura de anillamiento (Ta) correspondiente a cada par de primers (Forward, F y Reverse, R) así como los productos amplificados generados durante la PCR se muestran en la tabla III.

	Ensayo # 1	Ensayo # 2	Ensayo # 3
[ADN _{Total}]	50-100 ng	50-100 ng	50-100 ng
[Primers]	339 F - 340 R 0.5 μM c/primer	Rad F - Bo11 R 2 μM c/primer	339 F -Bo11 R 2 μM c/primer
[dNTP's]	0.2 mM	0.8 mM	0.8 mM
[Tris-HCl, pH 8.3]	5 mM	5 mM	5 mM
[KCl]	25 mM	25 mM	25 mM
[MgCl ₂]	3.5 mM	3.5 mM	2.5 mM
[Taq polimerasa]	0.5 unidad	0.5 unidad	1 unidad
Vol. final	25 µl	25 µl	50 µl

Tabla II. Condiciones de la reacción de PCR utilizadas para cada ensayo.

Los primers 339 F y 340 R amplifican 147 pb, correspondientes al exón 2 *Mhc*-I de cetartiodáctilos (Flores-Ramírez *et al.* 2000, Munguía-Vega 2002). Los primers Rad F y Bo11 R amplifican un fragmento de 198 pb que corresponde en parte al exón 3 *Mhc*-I, acorde al alineamiento de éstos primers con secuencias *Mhc*-I de cetartiodáctilos disponibles en GenBank (Números de acceso: AF149226, AY176122, BTAJ10867, BOVMHBOLA, AY459298, PIGMHCAAA, AY188821, AB098390, AB098405, AB008619, AF101498). Finalmente, los primers 339 F y Bo11 R amplifican un fragmento de 570 pb que corresponde a parte del exón 2, intrón 2 y exón 3, de acuerdo al alineamiento de éstos previamente).

Ensayos	Amplicon	Ta (°C)
339 F- 340 R	147 pb: 5'- exón 2 <i>Mhc</i> -I - 3'	55
Rad F- Bo11 R	198 pb: 5'- exón 3 <i>Mhc</i> -I - 3'	62
339 F- Bo11 R	570 pb: 5' - exon 2 , intrón 2 , exón 3 <i>Mhc</i> -I - 3'	53

Tabla III. Amplicones generados y temperaturas de anillamiento (Ta) durante la PCR.

La cuantificación de los productos amplificados en los distintos ensayos se llevó a cabo de la manera descrita anteriormente. Una vez visualizados y cuantificados los productos de PCR de cada ensayo (Tabla III), se purificaron utilizando columnas del Kit QIAquik PCR (QIAGEN^{MR}) siguiendo las indicaciones del proveedor, después de lo cual se les clonó para su análisis, descrito a continuación.

Clonación de secuencias Mhc-I.

Para analizar de forma exploratoria el polimorfismo de secuencias *Mhc*-I aisladas a partir del individuo *Phsi25*, su exón 2 *Mhc*-I amplificado con los primers 339 F - 340 R se clonó utilizando el kit TOPO TA Cloning (Invitrogen, Co.), siguiendo las instrucciones del kit. Brevemente: se tomó 1µl de producto amplificado y se ligó a un plásmido pCR 2.1-TOPO. El mismo se utilizó para transformar células súper competentes *Escherichia coli* TOP10F. Las células se incubaron durante la noche en placas con medio de agar LB (Luria-Bertani) y fueron tratadas con IPTG, ampicilina (100 µg/ml) y X-Gal (100 mM). De las placas que mostraron colonias recombinantes (conteniendo el inserto de interés) se muestrearon al azar

15 colonias recombinantes. Utilizando la punta de un palillo de madera estéril se tomó una pequeña muestra de cada colonia, con la que se inoculó un tubo de 96μl conteniendo 10μl de agua destilada y reactivos de PCR, además de una placa de agar LB para respaldar la colonia. El cóctel de PCR conteniendo los primers universales M13 F (-20) y M13 R -pUC (-40) que anillan en la regiones que flanquean el inserto del plásmido, una unidad de Taq polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen, Co.) para disminuir el riesgo de mutagénesis, así como el inóculo, se sometió al siguiente perfil de temperatura: 65°C/5min, 96°C/2min, 65°C/1min y 96°C/30seg, para lisar las células y proceder a la reacción de amplificación vía PCR acorde al protocolo recomendado por el proveedor.

Identificación de secuencias polimórficas Mhc-I en un individuo de P. sinus.

Para evaluar cualitativamente el polimorfismo de los productos *Mhc*-I amplificados, los productos de PCR de las clonas descritas se sometieron a un análisis de Polimorfismo Conformacional de Hebras Sencillas (SSCP por sus siglas en inglés, Orita *et al.* 1989), que permite diferenciar moléculas de ADN del mismo tamaño pero que difieren en su secuencia de nucleótidos (Fig. 8), utilizando el kit "DCodeTM Control Reagent Kit for SSCP" (BIO-RAD). Para ello, se tomaron 2µl de cada producto de PCR de las clonas seleccionadas y se mezclaron con 5µl de amortiguador (azul de bromofenol 0.05%, azul de xilenciaonl 0.05%, formamida 95%, EDTA 20 mM) y se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 min dentro de un termoblock y se les enfrió súbitamente a 0 °C dentro de un lab top cooler hasta el momento de ser cargadas en un gel de acrilamida al 12% preparado siguiendo las indicaciones del proveedor y ensamblado en un equipo electroforético de detección de mutaciones DCode (BIO-RAD). La cámara electroforética contenía amortiguador TBE a 4 °C y se le aplicó una

corriente constante de 500 V durante 6 horas. Para visualizar los productos en el gel, éste se tiñó con 50 ml de una solución SYBR gold 1X (Molecular Probes, Inc.) durante 30 min. en oscuridad, y se expuso a la luz UV empleando un transiluminador (UVITEC, Cambridge B4 4WS-England). Las imágenes se capturaron en una computadora. Los productos de PCR de cada clona, que presentaron distintos SCCP se cuantificaron y purificaron como se describió con anterioridad previo a su análisis por secuenciación automatizada.



Figura 7. Técnica molecular de detección de mutaciones puntuales "SSCP". Los ácidos nucleicos de cadena sencilla forman estructuras secundarias cuando están en solución. La estructura secundaria depende de la composición de sus bases nucleotídicas y puede ser alterada por tan solo una sustitución, lo que genera cambios en la movilidad electroforética del ADN bajo condiciones no desnaturalizantes. La detección de los fragmentos se realiza mediante métodos radioactivos o con tinción de plata.

Secuenciación automática de Mhc-I.

Se tomaron 20ng de los productos de PCR purificados de las clonas seleccionadas y se enviaron a la empresa Macrogen Inc., Corea del Sur, para ser secuenciadas en ambos sentidos (F y R) empleando un secuenciador automático Applied Biosystems 373.

La metodología descrita en este capítulo fue utilizada con algunas modificaciones para obtener secuencias Exón 3 *Mhc*-I y secuencias más extensas que comprendieran el Exón 2 - Intrón 2 - Exón 3 *Mhc*-I del individuo *Phsi25*, utilizando los primers y protocolos de PCR descritos (Tablas I y II).

Los productos amplificados de los tres ensayos realizados (Tabla III) se sometieron progresivamente a su análisis mediante clonación, SSCPs y secuenciación automatizada bajo los protocolos previamente detallados, con excepción del producto más extenso de 570 pb Exón 2, Intrón 2, Exón 3 *Mhc*-I. Este producto se clonó y se aislaron los plásmidos de 30 colonias *E. coli* escogidas al azar siguiendo el protocolo de extracción estándar descrito por Sambrook *et al.* (1989), seguido de una reacción de digestión enzimática utilizando *Eco*RI (10,000u/ml), con la finalidad de confirmar la presencia y orientación correcta del inserto. Para dicha reacción, se utilizó 5 unidades de la enzima para digerir aproximadamente 300ng de ADN de cada plásmido en un periodo de incubación de 37 °C/1h. Los productos obtenidos se visualizaron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con Bromuro de Etidio, siendo positivas aquéllas clonas que presentaron fragmentos correspondientes al tamaño esperado de aproximadamente 600pb, tomando como referencia un marcador de peso molecular en el rango de 100pb. Los plásmidos que presentaron el inserto de interés se secuenciaron directamente.

Análisis de las secuencias Mhc-I obtenidas para P. sinus

Caracterización de secuencias Mhc-I de P. sinus. Las secuencias nucleotídicas obtenidas se editaron con base al consenso de cromatogramas F y R de cada secuencia utilizando el programa Chromas Pro Versión 1.33 (Technelysium Pty Ltd). Posteriormente, las secuencias se alinearon utilizando el software Clustal X (Thompson *et al.* 1994) para determinar los sitios nucleotídicos variables y alelos únicos *Mhc-I* de *Phsi25*.

La naturaleza histocompatible clase I de las secuencias obtenidas de *Phsi25* se confirmó de acuerdo a un análisis de homología acorde a su similitud con otras secuencias *Mhc*-I de mamíferos depositadas en GenBank, utilizando la rutina *Blastn* del NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Para verificar la funcionalidad de las secuencias *Mhc*-I de *Phsi25* confirmadas, éstas se tradujeron a aminoácidos empleando el software Gendoc (www.psc.edu/biomed/genedoc/) y se verificó su correspondencia con los aminoácidos descritos para las siguientes secuencias polipeptídicas MHC-I funcionales de mamíferos: tursión *DoLA* (no publicada en Genbank, Shirai *et al.* 1998), ballena gris *Esro* (AF361229.1 y AF149224.1, Flores-Ramírez *et al.* 2000), oveja *Ovar* (AJ874677, Miltiadou *et al.* 2005), cerdo *Susc* (sumisión directa al Genbank, Ho *et al.* 2003), caballo *Eqca* (X79892, Ellis *et al.* 1995), rinoceronte *Dibi* (sumisión directa al Genbank, Worley y Misuraca 1998), vaca *Bota* (AB008621.1, Urakawa *et al.* 1998) y humano *HLA-A* (AJ871405.5, Mestrovic *et al.* 2005), con el fin de identificar los sitios variables característicos de éstas moléculas histocompatibles de acuerdo a la estructura cristalográfica de moléculas HLA clase I (Bjorkman *et al.* 1987, Bjorkman y Parham 1990).

Las propiedades físico-químicas de los residuos de aminoácidos variables observados en las secuencias histocompatibles clase I de *Phsi25*, fueron analizadas para comparar la estructura conformacional virtual entre éstas (Taylor 1986).

Con el objetivo de examinar las diferencias nucleotídicas entre los exones e intrones *Mhc*-I de las secuencias aisladas, se estimó el número de sustituciones por sitio (*d*) en el intrón 2 utilizando el método de Jukes y Cantor (1969) y el número de sustituciones sinónimas (*dS*) en los exones 2-3 acorde al método de Nei-Gojobori (1986) para todas las comparaciones pareadas entre las secuencias variables de *Phsi25* utilizando el programa MEGA (Kumar *et al.* 1993). Dicha comparación se realizó ya que las mutaciones sinónimas en los exones se espera que sean selectivamente neutrales y por lo tanto que no estén sujetas a la selección diversificadora que afecta los sitios no sinónimos en la PBR (Hughes y Hughes 1995, Hughes y Nei 1998).

Por otro lado, con el fin de reconocer si las secuencias *Mhc*-I de la especie cumplen con el patrón evolutivo "trans-específico" característico de las secuencias histocompatibles, se reconstruyó la historia evolutiva de estas respecto a los alelos *Mhc*-I de otros cetartiodáctilos disponibles en Genbank utilizando un método de Máxima Verosimilitud (en adelante ML, por sus siglas en inglés). Un modelo empírico de ML de sustitución nucleotídica se derivó a partir de las secuencias *Mhc*-I referidas utilizando el programa Modeltest (Posada y Crandall 1998). Este modelo y sus parámetros correspondientes se utilizaron para obtener un árbol filogenético de Neighbor Joining NJ (Saitou y Nei 1987) cuya robustez estadística se estimó con base en un análisis de Bootstrap (1,000 réplicas) utilizando el programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002). Dicho procedimiento se detalla más adelante.

Hecho lo anterior, se procedió a segregar las secuencias *Mhc*-I de *Phsi25* en linajes alélicos, considerando sólo aquéllas secuencias que por su longitud (Exón 2- Intrón 2- Exón 3) contenían la mayor cantidad de información de índole filogenético, como se describe a continuación.

Segregación de linajes alélicos en posibles loci Mhc-I. Las secuencias aisladas Mhc-I del individuo Phsi25 se analizaron de tres maneras: 1) Secuencias extensas: Exón 2, Intrón 2, Exón 3 Mhc-I; 2) las regiones codificantes: Exón 2, Exón 3 Mhc-I y 3) la región no codificante: Intrón 2 Mhc-I. Debido a que se ha observado que los alelos de distintos loci Mhc-I presentan mayor divergencia intra-específica que inter-específica (Lawlor et al. 1988, Trowsdale 1995, Vincek et al. 1997), se adoptó este criterio para segregar a las secuencias únicas Mhc-I aisladas a partir de Phsi25 en linajes alélicos que potencialmente pertenecerían a un locus Mhc-I específico. Esto con base en sus afinidades filogenéticas. Para ello, las secuencias extensas: Exón 2, Intrón 2, Exón 3 Mhc-I; las regiones codificantes: Exón 2 y Exón 3 Mhc-I y el Intrón 2 Mhc-I se alinearon independientemente utilizando el programa ClustalX (Thompson et al. 1994). Para cada uno de los tres alineamientos resultantes se determinó, utilizando el programa Model-Test, el modelo evolutivo que explica con mayor verosimilitud la sustitución de sus nucleótidos. Este modelo y sus parámetros correspondientes se utilizaron para alimentar la rutina de reconstrucción filogenética acorde al método de ML con base en un acercamiento analítico que emplea el algoritmo de análisis de distancia génica de NJ implementado en el programa PAUP* 4.0b10. La robustez estadística de cada reconstrucción filogenética se determinó con base en un análisis de Bootstrap de 1,000 réplicas utilizando el mismo programa.

NJ es un método algorítmico que permite reconstruir las afinidades evolutivas entre secuencias y explicarlas con un diagrama que representa un cladograma. Las operaciones involucradas analizan una matriz de distancia derivada de un alineamiento múltiple y calculan para cada par de secuencias la distancia ó la fracción de diferencias entre las dos secuencias, con Máxima Verosimilitud para después exportarla a una matriz (Hall 2001).

Análisis preliminar del polimorfismo Mhc-I en P. sinus. Una vez segregadas las secuencias Exón 2- Intrón 2- Exón 3 Mhc-I de Phsi25 en linajes alélicos de loci potenciales, se procedió a segregar entre éstos 7 secuencias Exón 2 Mhc-I (GenBank, números de acceso: AY170890 a 96), descritas previamente para la especie a partir de 3 individuos por Munguía-Vega (2002) con base en sus afinidades evolutivas para evaluar de forma muy preliminar el polimorfismo de cada loci potencial. Para ello, las secuencias referidas se alinearon y se analizaron filogenéticamente siguiendo los criterios descritos previamente. Una vez segregadas las secuencias en sus linajes alélicos potenciales, se analizaron las propiedades físico-químicas de sus residuos utilizando el programa Gendoc para identificar la naturaleza sinónima o no sinónima de cada sustitución y el cambio de las propiedades físico-químicas implícito en la misma.

Evaluación del efecto de la selección positiva en la divergencia de secuencias del Exón 2 Mhc-I. Al verificarse el cambio en las propiedades físico-químicas en la traducción a aminoácidos correspondientes a las secuencias *Mhc-I* exón 2 pertenecientes a linajes alélicos potenciales, se procedió a confirmar la presión de selección diversificadora, característica del sistema MHC dentro de cada locus *Mhc-I* potencial de *P. sinus*. Para ello, se estimaron las tasas de sustitución no sinónimas por sitio (d_N) contra las sinónimas por sitio (d_S), en todos los sitios del dominio α 1 así como sólo en aquellos de interacción directa con el péptido acorde a los análisis cristalográficos de HLA (Bjorkman y Parham 1990) a partir de la comparación entre pares de secuencias de cada loci *Mhc*-I potencial (intralocus) y entre todos estos (interlocus) utilizando el método de Nei y Gojobori (1986), aplicando la corrección de Jukes y Cantor (1969) utilizando el programa MEGA. El error estándar (ES) entre d_N y d_S se estimó dentro del mismo programa.

Marcadores de histocompatibilidad clase I locus-específicos en P. sinus. Una vez definidos los loci potenciales *Mhc*-I para *Phsi25*, se establecieron las regiones candidatas para el diseño de oligonucleótidos iniciadores para un sólo locus *Mhc*-I específico para la especie. Para ello, las secuencias nucleotídicas y proteicas clase I correspondientes a un linaje alélico determinado, se alinearon y compararon con el resto de los linajes alélicos con el fin de observar los sitios variables responsables de su diversificación, considerados como diagnósticos y las regiones conservadas que flanquean dichas sitios. Para el diseño de los primers a partir de las regiones candidatas se tomaron en cuenta las propiedades fisicoquímicas de los residuos involucrados con el fin de incrementar su eficiencia en el momento de ser sometidos a prueba.

La metodología descrita de forma detallada en este capitulo se resume en el diagrama de flujo de la Fig 8.



Figura 8. Diagrama de flujo que muestra la metodología que se utilizó para aislar y caracterizar secuencias nucleotídicas que codifican el sitio de reconocimiento antigénico de las moléculas de histocompatibilidad clase I en *P. sinus*.

RESULTADOS

Caracterización de las secuencias Mhc-I de Phsi25.

Aislamiento y secuenciación de las secuencias Mhc-I exón 2-intrón 2- exón 3 de Phsi25.

Se aislaron extractos de ADN a partir de piel de dos vaquitas (*Phsi*25 y *Phsi*26, Fig. 9). Ambos extractos presentaron una longitud mayor a 12000 pb y una concentración aproximada de 300 ng/µl.



Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con EtBr que muestra los extractos de ADN de dos individuos *P. sinus: Phsi*25 y *Phsi*26.

A partir del extracto de ADN total del individuo *Phsi*25 se aplicaron tres ensayos de PCR logrando obtener en cada caso productos amplificados de los tamaños esperados, correspondientes a distintas regiones de secuencias *Mhc*-I (Fig. 10). Los productos amplificados *Mhc*-I fueron clonados.

Es importante destacar que la amplificación de los fragmentos de interés se llevó a cabo por lo menos dos veces utilizando una polimerasa de alta fidelidad y que los fragmentos generados en todas las ocasiones se clonaron de forma paralela con el objetivo de optimizar su identificación según las reglas de nomenclatura de HLA (Bodmer *et al.* 1987).

Las clonas transformadas con plásmidos conteniendo fragmentos de tamaño correspondiente a secuencias *Mhc*-I exón 2 (\approx 147 pb, n=15 clonas) se sometieron a un análisis de detección de mutación conocido como SSCP's antes de ser secuenciadas. Comparativamente, las clonas transformadas con plásmidos conteniendo fragmentos de tamaño correspondiente a secuencias *Mhc*-I exón 3 (\approx 198 pb, n=15 clonas), y con plásmidos conteniendo fragmentos de tamaño correspondiente a secuencias *Mhc*-I exón 2 (\approx 198 pb, n=15 clonas), y con plásmidos conteniendo fragmentos de tamaño correspondiente a secuencias *Mhc*-I exón 2 (\approx 198 pb, n=15 clonas), y con plásmidos conteniendo fragmentos de tamaño correspondiente a secuencias *Mhc*-I exón 2 - intrón 2 - exón 3 (\approx 570 pb, n=30 clonas) fueron secuenciadas inmediatamente. Las reacciones de secuenciación en todos los casos se realizaron en ambas direcciones (Forward y Reverse).

La designación de las secuencias obtenidas a partir de las clonas analizadas de *Phsi*25 se muestran en la Tabla IV. Las secuencias que no mostraron consenso de secuenciación en ambas direcciones se omitieron en los análisis de resultados ya que se consideraron ambiguas (Anexo II).



Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con EtBr que muestra los fragmentos *Mhc*-I amplificados vía PCR en tres ensayos realizados a partir de ADN total de los individuos *Phsi*25 y *Phsi*26. Ensayo I: fragmentos de 147 pb del exón 2 *Mhc*-I, Ensayo II: fragmentos de 198 pb del exón 3 *Mhc*-I, Ensayo III: fragmentos de 570 pb del exón 2- intrón 2- exón 3 *Mhc*-I. El tamaño del marcador de peso molecular (λ) corresponde a 50, 50 y 100 pb para los ensayos I, II y II, respectivamente.

Tabla IV. Denominación de secuencias amplificadas, región amplificada y tipo de edición de las secuencias *Mhc*-I generadas a partir de las clonas analizadas del individuo de *Phsi*25. Los nombres asignados: las primeras letras (*Phsi*), se refieren a la abreviación del nombre científico de la especie, el primer número corresponde al número de individuo analizado (25), el número después del punto indica la clona correspondiente (.1, .2...,n). Los campos sombreados indican las secuencias de *Phsi*25 que se analizaron en este estudio.

Nombre	Amplicon Mhc-I	Edición	Nombre	Amplicon Mhc-I	Edición
Phsi25.1	Exón 2	Consenso	Phsi25.12	Exón2,Intrón2,Exón3	Rev
Phsi25.2	Exón 2	Consenso	Phsi25.13	Exón2,Intrón2,Exón3	Rev
Phsi25.3	Exón 2	Consenso	Phsi25.14	Exón2,Intrón2,Exón3	Rev
Phsi25.4	Exón2,Intrón2,Exón3	Consenso	Phsi25.15	Exón2,Intrón2,Exón3	Rev
Phsi25.5	Exón2,Intrón2,Exón3	Consenso	Phsi25.16	Exón2,Intrón2,Exón3	Rev
Phsi25.6	Exón2,Intrón2,Exón3	Consenso	Phsi25.17	Exón2,Intrón2,Exón3	Rev
Phsi25.7	Exón2,Intrón2,Exón3	Consenso	Phsi25.18	Exón2,Intrón2,Exón3	Rev
Phsi25.8	Exón2,Intrón2,Exón3	Consenso	Phsi25.19	Exón2,Intrón2,Exón3	Consenso
Phsi25.9	Exón2,Intrón2,Exón3	Consenso	Phsi25.20	Exón2,Intrón2,Exón3	Consenso
Phsi25.10	Exón2,Intrón2,Exón3	Rev	Phsi25.27	Exón2,Intrón2,Exón3	Consenso
Phsi25.11	Exón2,Intrón2,Exón3	Rev			

El alineamiento de las secuencias consenso de *Phsi*25 reveló la presencia seis secuencias nucleotídicas únicas (*Phsi*25.4, *Phsi*25.6, *Phsi*25.7, *Phsi*25.8, *Phsi*25.9 y *Phsi*25.20) con un total de 570 pb totales (171pb del exón 2, 201pb del intrón 2 y 198pb del exón 3) a partir de 30 clonas analizadas del mismo individuo (Fig. 11). El resto de las clonas analizadas presentaron secuencias idénticas a las descritas (Fig. 11), lo cual confirma su existencia como posibles alelos *Mhc*-I de *P. sinus* de acuerdo a las condiciones de

aceptación de nuevas secuencias como los genes de *Mhc* en perros (Kennedy *et al.* 2000), además de otras secuencias distintas (Anexo II) a las seis referidas, que no se incluyeron en el análisis debido a que no se logró hacer un consenso de sus secuencias en ambos sentidos, probablemente como resultado de artefactos durante el proceso de clonación. Exón 2

	99
Phsi25.2(0 GTGCGGTTTGACGGCGACGCCCCGAATCCGAGGGGTGAGCCGCGGGGGCGCGGGGGGGG
Phsi25.9	A.
Phsi25.7	A.
Phsi25.8	
Phsi25.4	CA
Phsi25.6	CAAAGA
Phsi25.3	

	2691 9
Phsi25.20	ACGCGGGAACTTCAAGGAAAACGCACAGTTTTACCGAGAGGACCTGAACACCCTGCGGGGGGGG
Phsi25.9	
Phsi25.7	
Phsi25.8	
Phsi25.4	ATCGCGT.AAT.
Phsi25.6	ATCGCGTAAT.
Phsi25.3	ATCCGCGT.AAA

	Intrón 2	98
Phsi25.20	CGCGGGGCCCGGGTCCGGGTCACGACCCTCATCCCCAGGGACGGGGCGGGGGGTCGGCGGGGGGTCCCGAGGGTTACCCCCAACA	ATTG
Phsi25.9		
Phsi25.7		:
Phsi25.8		:
Phsi25.4		•
Phsi25.6	E	

La secuencia Phisi25.3 corresponde únicamente al exón 2 Mhc-I del mismo individuo. Las letras individuales y los puntos debajo de la secuencia nucleotídica representan nucleótidos que son, respectivamente, distintos o idénticos a Phis25.20. Los Figura 11. Secuencias nucleotídicas que comprenden el Exón 2, intrón 2, Exón 3 MHC obtenidas a partir del individuo Phsi25. números corresponden a su posición dentro del gen. La región sombreada corresponde al intrón 2 Mhc-I de cada secuencia.

Phsi25.20	187 CGGGACCCGGCCCCGGCTCGGGAGGAAACGGCGGGGGAACTTTACCCGGTTTCATTTCGGTTTGGGTTTAATCGCTGCGGCTGGTC
Phsi25.9	
Phsi25.7	
Phsi25.8	
Phsi25.4	
Phsi25.6	

78	AC						
Aug.	H		:		0	U.	
	CAC	•	•	:	:	:	
	CAC	•	•	•	•	•	
	Ö						
	AC			:	:	•	
	E D			•	:		
	00	•		•	:	:	
	0 U	:	:	:	A.	A	
	20	•	:	:	:	:	
	Ę	:	:	:	:	•	
	U H		•	:		2 (9 2 (9	
	00		•		:	•	
	Ū	•	•	:	•		
	Eb		•	:		1	
	UD	•	•	•	•	•	
	AC	•	•	•	rn.	rn.	
	4D	:					
	00	•	•				
	Ü	•		•	:		
	00	;		:		- 1	
	БÐ	:		:	:	:	
	AC	:	:	:	:	:	
	50	:	:	:	:		
	UE	•		*	:		
m	SO			:		:	
Ő'n	BO) 		:			
IXC	E1	- 14		-	-	1	
щ	U	•		•	•	•	
	AF	-	-	•	÷	-	
	U				â	*	
	00		*	:	:	•	
	CP		•				
	E	÷	÷	:		÷	
	E	:	:	:	:	:	
	AC	:	:	:	:	:	
	AC	:	:	:	:	:	
	UE			:	:		
	UE		•				
	UU	÷	•	•	:	*	
-	50	•	•	:	:	:	
201	LC.	:	•	:	÷		
• •	U.	:	•	•			
	UD CO		•	•	•		
	U U	•	•	•	i		
	UD	:	•	:	4.	. I	
	99	:	•	:	:	:	
	0	~	2	m	्ना	5	
	5	5	5	ы. С	1.0	2.	
	2	2	2	2	2	2	
	DS.	50	28.	20.	20	DS.	
	Д	Ę	E	더	E	Ā	

80 U		•			
1 1		•		•	
Ē		•		•	•
C) •	•	:	:	:
D D D		•	- 25	•	3.8
L U	5.	•			(A) (A)
C E) •	•		A.	Å.
Ũ			•	:	
L L			•	•	۲
A C			:	:	:
C		•	:	:	:
U	•	•	•	•	•
Ľ					;
C C		•	;	A.	R.
U D					•
Ŭ	•	•			-
AC			:	:	:
0		:	:	:	:
Ŭ	•	•	•	:	÷
Ŭ	•			•	
0 0 0		•			
8	:	•			
A C	•		•	•	- 14
Ŭ U			•	•	÷
IJ	•	:	:	:	:
U L	:	:	•	:	•
Ŭ	•	•			8
AC		•	•		
U E					
0					
EA(•	-	3
U U	:	:	:	:	÷
GA	:		:	:	:
U	•	•		U	U.
EN	•				•
E E	•	•			
8	•	- 14 14			
Ŭ		- 14	-		÷
5	•		÷	•	•
ΤA			•	:	•
DG DG			•	:	:
턴	:			Ľ.	Ľ
:A(•				
8				:	:
AC		-	1	Ċ	Ċ
U U	:	:	:	:	:
ц С	•	÷			
PAT	:		:		
50				*	
LA		•	•	•	*
Ŋ			•	•	•
99	1		÷		
0	_				
2	0	1.	00	.4	.0
25	25	50	20	50	20
-H 10-	S1.	S1.	SJ.	5	51.
Чd	면	Чd	Чd	Ph	Чd
10.000	2.07.2012	0.000	2.10	-2 B	97 - BY

00	5					
0	in					
	E		100			
	2					
	7					
	E)			- 22		
	in					
	T					
	(5					
	in					
	ŏ					
	Õ				()	()
	Ē					
	Ö					
	U					
	E					
	E			a	- 34	
	U					
	C	٠	•	٠	•	٠
	U.	٠		٠	•	•
	A		٠	•	•	•
	Q	٠	•	•		•
	U.	٠		۰	•	٠
	A	•	٠	٠	•	•
	Q	•				
	S	•				
	A.	•	•	•		•
	<u>O</u>	٠		•	•	•
	Ū.	•	•			•
	E-1	•	•	•	•	•
	0	~	~			
	(A	O1	5	ω	4	W
	22	21			11	11
	50	10	10	10	10	
	2	2	2	C.	2	2
	5	d.	5	5	5	D.
	tend .	100	1-24	Prod	here	1-4

Continuación de la Figura 11.

El análisis de homología desarrollado con la herramienta BLAST X indicó que las secuencias descritas comparten la mayor similitud nucleotídica con secuencias exón 2 - intrón 2 exón 3 *Mhc*-I de *Bos taurus* (Tabla V). De manera consistente la secuencia *Phsi25.3* que solo comprendió 147pb del exón 2 *Mhc*-I (Fig. 11), fue similar a secuencias *Mhc*-I exón 2 de *Eschrichtius robustus*, (Tabla V).

El análisis de homología de las seis secuencias referidas respecto a la base de datos del GenBank indica que éstas comparten gran similitud nucleotídica con secuencias *Mhc*-I exón 2, intrón 2, exón 3 de *Bos taurus* (Tabla V).

Tabla V. Secuencias histocompatibles clase I homólogas a las secuencias exón 2 - intrón 2 - exón 3 *Mhc*-I de *P. sinus*. Se muestran las identidades (I), el porcentaje de homología de cada secuencia y el valor de E.

Clonas Phsi25	Valores de identidad y homología de secuencias nucleotídicas <i>Mhc</i> -I.	Valores de identidad y homología de secuencias de aminoácidos MHC-I		
Phsi25.4	Bos taurus, I = $469/540$, (86%) E= 9e - 132	Bos taurus, I = 94/122 (77%) E= 2e - 50		
Phsi25.6	Bos taurus, I = $468/540$, (86%) E= $2e - 129$	<i>Bos taurus,</i> I = 94/122 (77%) E= 2e - 50		
Phsi25.7	Bos taurus, I = 465/533, (87%) E= 4e - 137	Bos taurus, I = 92/115 (80%) E= 3e - 49		
Phs25.8	Bos taurus, I = 466/533, (87%) E= 2e - 139	Bos taurus, I = 93/115 (80%) E= 6e - 51		
Phsi25.9	Bos taurus, I = 466/533, (87%) E= 2e - 139	Bos taurus, I = 93/115 (80%) E= 2e -50		
Phsi25.20	Bos taurus, I = 465/533, (87%) E= 4e - 137	Bos taurus, I = 92/115 (80%) E= 2e -50		
Phsi25.3	<i>Estrichtius robustus,</i> 131/139 (94%) E= 2e- 52	<i>Estrichtius robustus,</i> 44/49 (89%) E = 1e - 19		

Secuencias de aminoácidos de los dominios a1 y a2 MHC-I de Phsi25.

La traducción de aminoácidos deducida a partir del segundo y tercer exón *Mhc*-I de las secuencias *Phsi25.4*, *Phsi25.6*, *Phsi25.7*, *Phsi25.8*, *Phsi25.9*, *Phsi25.20* así como la del segundo exón *Mhc*-I de *Phsi25.3* revelaron que todas éstas presentan marcos de lectura abiertos que codifican respectivamente 123 y 49 aminoácidos continuos, por lo que se consideraron secuencias funcionales.

Los aminoácidos codificados por el exón 2 y exón 3*Mhc*-I corresponden a las posiciones 34-90 del dominio α 1 y 91-156 del dominio α 2 MHC-I (Fig. 4), tomando como referencia moléculas HLA-I de humanos (Bjorkman y Parham 1990). Las secuencias polipeptídicas referidas compartieron gran homología con secuencias proteicas de la cadena pesada MHC-I de *Bos taurus* (Tabla V).

Los aminoácidos de *Phsi25.3* corresponden a la posiciones 34-82 del domino α1 (Fig. 12) con base en el criterio mencionado y resultó altamente homóloga a una secuencia proteica MHC-I de *Estrichtius robustus* (Tabla V).

El alineamiento generado para las secuencias nucleotídicas exón 2 - intrón 2 - exón 3 de *Phsi25* reveló un total de 40 sitios variables entre estas. De éstas, 6 se distribuyen en la región intrónica y, de manera interesante, 34 se distribuyen entre el segundo y tercer exón: 14 en la primera, 11 en la segunda y 9 en la posición de la tercera base de los codones de aminoácidos (Fig. 11). Los sitios variables de la PBR originaron 23 sustituciones de aminoácidos no sinónimas (Fig. 12). A lo largo de los 123 aminoácidos de los dominios α 1 y α 2 de las secuencias MHC-I de *Phsi*25 se observó un mayor número de sustituciones no sinónimas (23) con respecto a las sinónimas (100).

Dominio α_1

	34	40	50	60	70	80	90
		V		A\$ ¥ A \$ ¥			V
Consenso	VRFI	SDAPNPRG	eprapw <mark>v</mark> eqv	GPEYWEEEI	QI <mark>F</mark> KDAAQVY	RVNLNNLCG	YYNQSEA
Phsi25.4		• • • • • • • • • • •	<mark>.</mark>		<mark>.</mark>		
Phsi25.6		<mark>.</mark>	<mark>.</mark>		<mark>.</mark>		
Phsi25.20		.G	Е	DR	RN EN F.	.EDT.R.	
Phsi25.7		<mark>.</mark>	<mark>.</mark> E	RDR	RN.EN.F.	.EDT.R.	
Phsi25.8		<mark>.</mark>	<mark>.</mark> E	DR	RN EN F.	.EDT.R.	
Phsi25.9		<mark>.</mark>	<mark>.</mark> E	DR	RN. EN. FC	.EDT.R.	
Dola			T <mark>.</mark> E	DR	RVCTI.	RA	TD.
Bota		D <mark>T</mark>	R. <mark>.</mark> E	DR	RNL.GTF	DT.R.	
HLA-A		ASQ.M	<mark>I</mark> E	DQ	RNV. AQS. TD	D.GT.R.	
Ovar		DM	R. <mark>.</mark> E	DQ	R.YNF	.AT.R.	
Susc		<mark>E</mark>	<mark>I</mark> Q.Е	.QDRN.	<mark>Y</mark> .ETT.	T.R.	
Eqca		ASM	<mark>M</mark> Q.E	.QN.	R.V.GNID	DT.R.	
Dice		<mark>K</mark>	<mark>.</mark> E	R	R.S.ENIF	DR.	
Esro			<mark>М</mark> Е		<mark>S</mark> DTF	.AI.R	
Phsi25.3		<mark>K</mark>	<mark>М</mark> Е		<mark>S</mark>	K.R	

Dominio α_2

	91	100	110	120	130	140	150
	▼	• •	• •			▼ .	*** ****
Consenso	GSHTF	DAMFGCDVG	PDGRLLHGYAQH	AYDGADYIA	LNEDLSSWT	AADAEAQITKI	LKWKRTVAAEQC
Phsi25.4							
Phsi25.6							
Phsi25.20			.NY	T	.к		P
Phsi25.7			.NY	T	.K		P
Phsi25.8			.NY	T	.к		P
Phsi25.9			.NY	T	.к		P
DOLA	V	.W.Y	RS.Y		R	ERSS.I	HEAAGRY
Bota	NE	.G.Y	F.RR.D	R	R	TAI	REAADYSL
HLA-A	I	.I.Y	SF.RR.D	K	R	MAI	REAVHR
Ovar	L	c	R.FM.Y	GR	R	TAS.I	R.IEAAGGGH
Susc	I	.I.Y	LRR.D		R	TA	REAADVL
Eqca	I	.Y.Y	RR.D		R	TARI	REAAGVHD
Dice	DL	.W.Y	RRS.V	KS	R	TA SRI	REAAGERY
Esro		.E	QRR.I	.s	R	TA	EGSGERH
	*	* *	* 1	ť.			* *

Figura 12. Secuencias de aminoácidos de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ MHC-I de *P. sinus* (*Phsi25.3, Phsi25.4, Phsi25.6, Phsi25.7, Phsi25.8, Phsi25.9, Phsi25.20*) resultantes de la traducción de secuencias nucleotídicas correspondientes y su alineamiento con secuencias similares de tursión (*DoLA*), ballena gris (*Esro*), ganado vacuno (*Bota*), oveja (*Ovar*), cerdo (*Susc*), caballo (*Eqca*), rinoceronte (*Dibi*) y humano (*HLA*-A). *Phsi25.4*: secuencia consenso, identidades se designan con un punto (.). Los números superiores indican la posición de los aminoácidos correspondientes a la secuencias *HLA* clase I. Los residuos sombreados corresponden a sustituciones de aminoácidos no conservativas. El símbolo ($\mathbf{\nabla}$) indica la posición de los residuos que interactúan con el péptido, ($\mathbf{\Delta}$) indica la posición de los residuos que interactúan con el receptor de las células T, ($\mathbf{\Phi}$) indica la posición de los residuos y células HLA-A,B,C (Bjorkman y Parham 1990).

La comparación de secuencias protéicas MHC-I de *P. sinus* (vaquita) con secuencias similares de cetartiodáctilos (tursión, ballena gris, oveja y cerdo), perisodáctilos (rinoceronte, caballo) y primates (humano) reveló que la variabilidad de los aminoácidos coincide con algunos residuos específicos que interactúan con el péptido antigénico (posiciones 45, 66, 67, 70, 73, 74, 77, 80, 111 y 143) y otros que interactúan con receptores de células T (posiciones 61, 69, 65, 76 y 82) ó ambos (posición 62). Así mismo, que la variabilidad se concentra en los aminoácidos que corresponden a residuos de alta variabilidad (posiciones 45, 62, 67, 69, 70, 77, 80, 82 y 116), Fig. 4. Lo anterior, con base en el análisis de la estructura cristalográfica de las moléculas HLA clase I (Bjorkman *et al.* 1987, Bjorkman y Parham 1990).

El análisis del cambio de polaridad, carga y tamaño en las 23 sustituciones no sinónimas referidas mostró que 16 de éstas son sustituciones no conservativas, es decir que involucran un cambio en las propiedades físico-químicas del aminoácido (Tabla VI).

Es importante señalar que de las 16 sustituciones no conservativas a lo largo de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ MHC-I de *Phsi*25 (Fig. 12, residuos sombreados en gris), seis ocurren en posiciones de alta variabilidad mapeadas en moléculas clase I de humanos (62, 70, 77, 80, 82, 116), mismas que se propone interactúan directamente con el péptido antigénico, receptores de células T o ambos (Bjorkman *et al.* 1987; Bjorkman y Parham 1990). Por otro lado, a lo largo del dominio $\alpha 1$ de la secuencia *Phsi*25.3 se encuentran tres sustituciones no sinónimas, no conservativas (Fig. 12, residuos sombreados en amarillo) que resultaron ser distintas a los segundos exones del resto de las secuencias extensas del mismo individuo. De estas sustituciones, dos corresponden a las posiciones 45 y 67 de interacción con el péptido y alta variabilidad tomando como referencia el criterio mencionado.

Tabla VI. Propiedades físico-químicas de los aminoácidos con sustitución no sinónima en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ MHC-I de l individuo *Phsi25* (Leningher 1994).

Posición del Aminoácido residuo		Propiedad Físico-Química	Aminoácido	Propiedad Físico-Química
38	S	Polar (-)	G	No polar
45	G	No polar	K	Polar(+)
52	М	Polar (-)	V	No polar
55	V	No polar	Е	Aniónico
60	W	No polar	R	Polar (+)
61	Е	Aniónico	D	Aniónico
62	Е	Aniónico	R	Polar(+)
65	Q	Polar (-)	R	Polar(+)
66	I	No polar	N	Polar (-)
67	F	No polar	S	Polar (-)
69	D	Aniónico	Е	Aniónico
70	Α	No polar	N	Polar (-)
73	V	No polar	F	No polar
74	Y	Polar (-)	С	Polar (-)
76	V	No polar	Е	Aniónico
77	N	Polar (-)	D	Aniónico
80	Ν	Polar (-)	K	Polar(+)
82	С	Polar (-)	R	Polar(+)
106	D	Aniónico	N	Polar (-)
111	Н	Polar(+)	R	Polar(+)
116	Н	Polar(+)	Y	Polar (-)
121	Α	No polar	Т	Polar (-)
127	N	Polar (-)	K	Polar (+)
139	Е	Aniónico	А	No polar
143	Т	Polar (-)	S	Polar (-)
153	Α	No polar	Р	No polar

Diversidad nucleotídica en los exones 2-3 e intrón 2 Mhc-I de Phsi25.

En cuanto al patrón de polimorfismo observado a lo largo de cada una de las secuencias *Mhc*-I de *Phsi25*, se observó que la región intrónica 2 es altamente conservada entre estas. Los sitios variables están presentes únicamente en *Phsi25.4* y *Phsi25.6*, el resto de las secuencias son idénticas entre sí. No se observaron inserciones o deleciones, de manera que todas las secuencias intrónicas tienen la misma longitud de nucleótidos en los cuales predominan guanina y citosina.

En la tabla VII se muestra que la diversidad nucleotídica observada en la región del intrón 2 es considerablemente menor que en los exones 2 y 3 dentro de las mismas secuencias *Mhc*-I de *Phsi25*. La frecuencia relativa de las sustituciones no sinónimas (d_N) y sinónimas (d_S) dentro de los alelos exón 2-exón 3 *Mhc*-I de *Phsi25* se estimó como se describe en la metodología. Además se obtuvo la frecuencia relativa de las sustituciones *d* dentro del intrón 2 de las mismas secuencias, Tabla VII.

Tabla VII. Promedio general de las sustituciones nucleotídicas por sitio $(d) \pm ES$ en el intrón 2 y de las sustituciones sinónimas (d_S) y no sinónimas (d_N) por sitio en exones 2 y 3 de las secuencias extensas *Mhc*-I del individuo *Phsi25*.

Phsi25	d Intrón 2	ds Exones 2-3	d_N Exones 2-3	
Todos alelos (interlocus)	0.015±0.006	0.019±0.011	0.048±0.010	

Un análisis estadístico, reveló que el promedio de las tasas de sustitución no sinónima por sitio (d_N =0.048 ± E.S.=0.010) es significativamente mayor [K-W(1, 31)=5.8173, p=0.0159] al promedio de las tasas de sustitución sinónima por sitio (d_S =0.019 E.S.=0.011) en los exones 2 y 3 de las secuencias *Mhc*-I de *Phsi25*.

Para examinar las diferencias en la divergencia nucleotídica entre los intrones y exones *Mhc*-I aislados en *Phs*i25, se comparó el promedio de la tasa de sustitución nucleotídica (*d*) en el intrón 2 con el promedio de la tasa de sustitución sinónima por sitio (d_S) en los exones 2 y 3 entre las secuencias de loci *Mhc*-I referidas. Aunque el promedio (d_S) es mayor que (*d*) entre los alelos de loci *Mhc*-I de *Phsi*25, la diferencia no fue estadísticamente significativa [K-W (1, 30) = 1.5598, p= 0.2117).

Por otro lado, se realizó una prueba de selección exacta de Fisher bajo el modelo de sustitución de Nei-Gojobori, dentro del programa MEGA (tabla VIII), para probar la hipótesis de selección positiva (dN > dS) en los codones del sitio de reconocimiento antigénico (ARS), dentro de los exones 2 y 3 *Mhc*-I de *Phsi25*.

Tabla VIII. Prueba de selección exacta de Fisher en las secuencias del exón 2 y 3 *Mhc*-I del individuo *Phsi25*.

Phsi25.4	Phsi25.6	Phsi25.7	Phsi25.8	Phsi25.9	Phsi25.20
1.000					
0.063	0.063				
0.063	0.063	1.000			
0.046	0.046	0.770	0.770		
0.063	0.063	1.000	1.000	0.770	
	1.000 0.063 0.063 0.046 0.063	Phil23.4 Phil23.0 1.000 0.063 0.063 0.063 0.063 0.063 0.046 0.046 0.063 0.063	PASI23.4 PASI23.0 PASI23.7 1.000	Philipsi Philipsi	PASI23.4 PASI23.0 PASI23.7 PASI23.8 PASI23.9 1.000

Ha= $d_N > d_S$ p<0.05 para rechazar Ho con 95% de confianza

Las comparaciones pareadas entre las secuencias de los exones 2 y 3 de *Phsi25.4*, *Phsi25.6* y *Phsi25.9* mostraron ser significativamente diferentes (p<0.05).

Evolución de las secuencias de los exones 2-3 Mhc-I de Phsi25.

La reconstrucción de las relaciones filogenéticas de las secuencias *Mhc*-I exón 2- exón 3 de *P. sinus* respecto a las de otros cetartiodáctilos se muestra en la Fig. 13. Los valores más altos de ML correspondieron a un modelo GTR+I+G (Modelo general de Reversión en Tiempo + Proporciones de sitios invariantes + Distribución Gamma) en todas las secuencias *Mhc*-I referidas, con parámetros: -ln L = 3176.9977, P inv= 0.1543, γ = 0.5314. El filograma resultante mostró que las secuencias de *P. sinus* forman un linaje independiente respecto a la secuencia *Mhc*-I de tursión (*DoLA*) descrita por Shirai *et al.* 1998, así como del resto de los cetartiodáctilos analizados. Dicho linaje revela una escasa divergencia intra-específica, reflejada en la corta longitud de sus ramas y de manera interesante, no muestra evidencias de una evolución trans-especies, característica de los alelos histocompatibles También se observa que el linaje de *DoLA* es ancestral al de *Phsi25.* Claramente se muestra una gran divergencia (bootstrap 88) entre el linaje de de los cetáceos y los artiodáctilos (mamíferos terrestres a partir de los que evolucionaron e incursionaron al medio acuático).



Figura 13. Reconstrucción filogenética de Máxima Verosimilitud (ML) – Neighbor Joining (NJ) generada con el programa PAUP* 4.0 (Swofford 1993) de las secuencias exón 2 – exón 3 de P. sinus y otros cetartiodáctilos. El árbol se construyó bajo un modelo de sustitución nucleotídica GTR + I + G determinado con el programa ModelTest (Posada & Crandall 1998). La robustez del árbol se evaluó mediante 1000 iteraciones bootstrap. Los números de acceso del Genbank de las secuencias *Mhc*-I de cetartiodáctilos se muestran en cada una de las ramas.

La disposición de las secuencias Mhc-I de Phsi25 se mantiene igual, al incluir en el análisis

filogenético el intrón 2 de las mismas, aunque no se muestra en este estudio.

Segregación de secuencias *Mhc*-I del individuo *Phsi*25 en 4 loci *Mhc*-I potenciales, con base en sus afinidades evolutivas.

El análisis de razones de máxima verosimilitud efectuado con el programa Model Test (Posada y Crandall 1998) indicó que el modelo evolutivo que explica con mejor verosimilitud el patrón de sustitución nucleotídica de las secuencias Mhc-I exón 2-intrón2exón3 del individuo *Phsi*25, es el conocido como GTR + I + G. Los parámetros estimados fueron: verosimilitud $-\ln(L) = 1206.80377$; proporción de los sitios considerados como invariantes, P inv = 0.241055 y la distribución Gamma de variación entre sitios, $\gamma = 1$. GTR es un modelo de evolución de secuencias nucleotídicas que puede considerar distintas frecuencias de los cuatro nucleótidos (A, C, G, T ó U) bajo los siguientes supuestos: 1) La matriz de sustitución es simétrica (por lo que es reversible en tiempo) es decir. A cambia a T con la misma tasa que T cambia a A, 2) La tasa de sustitución es diferente para cada par de nucleótidos y 3) los nucleótidos pueden ocurrir en distintas frecuencias (Hillis et al. 1996). Con base en este modelo y los valores de sus parámetros estimados, se establecieron las afinidades filogenéticas entre las secuencias referidas mediante un análisis de máxima verosimilitud considerando distancias evolutivas de NJ. Esto condujo al reconocimiento de linajes alélicos (agrupaciones de secuencias) Mhc-I de Phsi25 consistentes y apoyados estadísticamente. Los árboles generados se enraizaron utilizando como grupo externo una secuencia Mhc-I del exón 2, intrón 2, exón 3 de Bos taurus (número de acceso en GenBank: AB008621) homóloga a Phsi25.4.

La reconstrucción filogenética de máxima verosimilitud con acercamiento NJ bajo los parámetros referidos segregó las secuencias *Mhc*-I exón 2 - intrón 2 - exón 3 de *Phsi*25 en tres linajes potenciales denominados Locus A, Locus B y Locus C (Fig. 5). Estos linajes presentan un patrón de distribución similar al de secuencias que pertenecen a un individuo heterocigoto, con tres loci *Mhc*-I. En otras palabras, se esperaría que dos secuencias *Mhc*-I de un solo locus estuvieran incluidas dentro del mismo linaje debido al alto grado de homología entre éstas.



Figura 14. Reconstrucción filogenética de Máxima Verosimilitud (ML) – Neighbor Joining (NJ) generada con el programa PAUP* 4.0 (Swofford 1993). Esta indica la segregación de las secuencias *Mhc*-I exón 2 - intrón 2 - exón 3 de *Phsi*25 en tres linajes (loci) potenciales (Locus A, Locus B y Locus C). El árbol se construyó bajo un modelo de sustitución nucleotídica GTR + I + G determinado con el programa ModelTest (Posada & Crandall, 1998). La robustez del árbol se evaluó mediante 1000 iteraciones bootstrap. Filograma rectangular con la topología de los nodos y la distancia genética representada por la longitud de las ramas. En ambos casos, el árbol fue enraizado utilizando una secuencia *Mhc*-I de *B. taurus* como grupo externo.

Por ejemplo en el inciso B de la Fig. 14, la homología alta entre las secuencias *Phsi*25.4 y *Phsi*25.6 permite su agrupación altamente robusta (bootstrap de 100%) en el linaje denominado Locus A; las secuencias *Phsi*25.7 y *Phsi*25.20 no fueron tan robustas en su agrupación (bootstrap de 66%) en el linaje denominado Locus B y finalmente, las secuencias *Phsi*25.8 y *Phsi*25.9 se agruparon (bootstrap de 77%) en el linaje denominado Locus C. No obstante de que la distancia genética observada entre las secuencias *Mhc*-I de *Phsi*25 es pequeña, fue suficiente para segregar éstas con robustez estadística en tres loci potenciales.

Por otra parte, considerando un modelo de sustitución nucleotídica GTR + I + G con parámetros: -ln (L) = 817.21410, P inv = 0.309133 y γ shape = 1, el patrón de segregación en tres linajes A, B, C, así como los valores de bootstrap correspondientes para cada uno éstos, demostró ser conservativo al excluir la región intrónica de las secuencias y analizando únicamente los 369 pb de la región codificante, segundo y tercer exón *Mhc*-I, de las secuencias (Fig. 15).



Figura 15. Reconstrucción filogenética de Máxima Verosimilitud (ML) – Neighbor Joining (NJ) generada en el programa PAUP* 4.0 (Swofford 1993) que indica la segregación de los alelos del segundo y tercer exón *Mhc*-I de *Phsi*25 en tres loci potenciales: Locus A, Locus B y Locus C. El árbol se construyó bajo un modelo de sustitución nucleotídica GTR + I + G determinado con el programa ModelTest (Posada & Crandall 1998). La robustez del árbol se evaluó mediante 1000 iteraciones bootstrap.

Las secuencias del intrón 2 *Mhc*-I de *Phsi*25 se segregaron en dos grupos (Fig. 16). El primero incluye las secuencias de *Phsi*25.4 y *Phsi*25.6 y el segundo muestra una politomía que incluye el resto de las secuencias de *Phsi*25.



Figura 16. Filograma construido a partir de una matriz NJ de las secuencias nucleotídicas del intrón 2 *Mhc*-I de *Phsi*25 en el programa PAUP* (Swofford 1993). La robustez del árbol se evaluó mediante 1000 iteraciones bootstrap.

Al incluir en el análisis filogenético la secuencia *Phsi*25.3 que comprende parte del segundo exón *Mhc*-I aislada a partir del mismo individuo (*Phsi*25), ésta diverge notablemente del resto indicando la presencia de otro posible linaje *Mhc*-I denominado Locus D (Fig. 17). Los valores de verosimilitud estimados para la reconstrucción filogenética de dichas secuencias bajo el modelo de sustitución nucleotídica GTR + I + G fueron los siguientes: $-\ln(L) = 401.44067$, P_inv = 0.485349 y γ shape=1.



Figura 17. Reconstrucción filogenética ML-NJ de las afinidades evolutivas entre alelos del segundo exón *Mhc*-I de *Phsi*25: *Phsi*25.4 y *Phsi*25.6; *Phsi*25.7 y *Phsi*25.20; *Phsi*25.8 y *Phsi*25.9, segregados entre loci potenciales A, B y C y una secuencia adicional divergente del segundo exón *Mhc*-I (*Phsi*25.3) sugiere la presencia de al menos cuatro loci *Mhc*-I en la especie. Este árbol se construyó de la misma manera que los anteriores.
En general, se observa que la distancia genética entre los alelos de un locus potencial es muy pequeña dado que a nivel nucleotídico las secuencias son muy parecidas. Sin embargo, la variabilidad de las secuencias entre loci es más grande. Las pruebas de máxima verosimilitud aplicadas a las secuencias *Mhc*-I de *Phsi*25 con el fin de utilizar el modelo de sustitución nucleotídica que más se ajuste a éstas, refuerza las reconstrucciones filogenéticas derivadas de las matrices de NJ en cada uno de los análisis descritos previamente.

Análisis preliminar del polimorfismo Mhc-I en P. sinus.

Una vez que se segregaron las secuencias de *Phsi25* en cuatro loci *Mhc*-I potenciales (Locus A, Locus B, Locus C y Locus D), se alinearon con secuencias alélicas del segundo exón *Mhc*-I de *P. sinus* previamente depositadas en GenBank (*Phsi1, Phsi2, Phsi3, Phsi4, Phsi5, Phsi6, Phsi7*). Estas últimas fueron generadas a partir de 3 individuos y referidas en Munguía-Vega (2002). Hecho lo anterior, el total de secuencias del segundo exón *Mhc*-I existentes para *P. sinus*, se segregaron entre los loci previamente definidos con base en un análisis filogenético de máxima verosimilitud con acercamiento NJ y bajo el modelo GTR + I + G con parámetros -ln (L) = 431.36835, P inv = 0.384187, γ shape = 1.

La secuencia *Phsi*25.8 del segundo exón *Mhc*-I resultó ser idéntica a la secuencia *Phsi*4 previamente aislada y reportada, lo que indica que corresponden al mismo alelo *Mhc*-I, por lo que ésta última se eliminó del análisis. La resolución de la reconstrucción filogenética de las secuencias nucleotídicas referidas no fue suficiente para segregarlas en los loci previstos con las secuencias extensas *Mhc*-I exón2- intrón 2- exón 3 *Phsi*25.

Para resolver lo anterior se realizó un alineamiento de los aminoácidos correspondientes a las secuencias referidas utilizando una matriz PAM 350 con el fin de analizar la filogenia de las proteínas acorde a las propiedades físico-químicas de los aminoácidos en su secuencia. Para ello se usó el software Clustal X (Thompson *et al.* 1994, Fig. 18).



Figura 18. Afinidades filogenéticas de las secuencias proteicas del dominio $\alpha 1$ *Mhc*-I descritas previamente (Munguía-Vega 2002; Números de acceso de Genbank: AY170890 a 96) y las que se aislaron en este estudio a partir de la vaquita *Phsi*25. Este resultado apoya la existencia de polimorfismo histocompatible en esta especie considerada monomórfica anteriormente. La reconstrucción filogenética se realizó considerando un algoritmo NJ bajo un modelo de matriz de sustitución de aminoácidos PAM 350 utilizando el programa Clustal X (Thompson *et al.* 1994). La robustez del árbol se evaluó mediante 1,000 iteraciones bootstrap.

Las secuencias proteicas *Phsi2*, *Phsi5*, *Phsi25.7* y *Phsi25.20* del dominio α1 se agruparon en el linaje correspondiente al locus B, aunque el valor de robustez estadístico fue bajo (564): lo que implica la existencia hasta el momento de 4 alelos divergentes para el locus B *Mhc*-I dentro de los 4 individuos analizados. Las secuencias *Phsi25.6* y *Phsi25.4* se agruparon de forma consistente en el linaje denominado Locus A con un valor de robustez estadístico alto (995): el locus A presenta 2 alelos en los individuos analizados. Las secuencias *Phsi25.8*, *Phsi1*, *Phsi7*, *Phsi6* y *Phsi25.9* se agruparon dentro del linaje locus C aunque el valor de robustez estadístico fue bajo (537).

En el filograma de la Fig. 7 se muestra que el alelo *Phsi*25.3 se segregó de forma divergente al Locus A por lo que se considera como un alelo del locus D asignado previamente. La secuencia protéica *Phsi*3 se consideró como un posible alelo divergente de *Phsi*25.3, designado previamente como un alelo del locus D, con base en un análisis de homología BLAST*p* utilizando una matriz PAM 70, restringida a 500 alineamientos. Dicho análisis mostró que la secuencia *Phsi*3 presentó la mayor homología (I = 37/49 (75%) y E = 7e - 22) con *Phsi*25.3 dentro de todas las secuencias del individuo *Phsi*25. Al respecto, las secuencias *Phsi*25.3 y *Phsi*3 se consideraron como posibles alelos del potencial locus D. La secuencia *Phsi*6 no se agrupó claramente en un linaje determinado.

En el Tabla IX se muestran los nombres de los posibles alelos del dominio $\alpha 1$ *Mhc*-I sugeridos para cada uno de los individuos analizados, así como los loci *Mhc*-I a los que potencialmente pertenecen.

Tabla IX. Alelos del dominio α 1 de moléculas MHC-I presentes en cuatro individuos *P*. *sinus*. Se muestran los loci a los que potencialmente pertenece cada uno de los alelos con base en un análisis filogenético NJ de las secuencias que representan los alelos referidos.

Loci <i>Mhc-</i> I	Individuo 25	Individuo 1	Individuo 2	Individuo 3
Locus A	Phsi25.4			
	Phsi25.6			
Locus B	Phsi25.7	Phsi2		
	Phsi25.20	Phsi5		
Locus C	Phsi25.8	Phsi25.8	Phsi25.8	Phsi25.8
	Phsi25.9	Phsi1	Phsi7	Phsi7
Locus D	Phsi25.3	Phsi3		
?			Phsi6	

El análisis preliminar del polimorfismo de las secuencias del dominio $\alpha 1$ de moléculas MHC-I sugiere que el individuo *Phsi*25 es heterocigoto para los loci A, B y C, el individuo 1 es heterocigoto para los loci B y C así mismo, los individuo 2 y 3 son heterocigotos para el locus C. Todos los individuos son heterocigotos para el locus C. Se observó que los cuatro individuos analizados presentan el alelo *Phsi*25.8. No todos los individuos muestran alelos para los loci *Mhc*-I sugeridos, esto no significa que no existan. Cabe mencionar que el esfuerzo de clonación para el individuo *Phsi*25 fue dos veces mayor que para el resto de los individuos en concordancia, podría sugerirse que también se duplica la probabilidad de encontrar alelos en *Phsi*25.

Diversificación en las secuencias del dominio a1 Mhc-I de P sinus.

Se estimaron las tasas de sustitución nucleotídica para las secuencias del dominio $\alpha 1$ correspondientes a cada uno de los loci *Mhc*-I potenciales en cuatro individuos de *P. sinus*

de acuerdo a Nei y Gojobori (1986) aplicando la corrección de Jukes y Cantor (1969) en el programa MEGA versión 3.1. En la Tabla X se muestran el promedio general y error estándar (ES) de la tasa de sustitución sinónima por sitio (d_S) y de la tasa de sustitución no sinónima por sitio (d_N) de las secuencias por locus y entre loci *Mhc*-I (A, B, C y D) sugeridos, con base en la comparación pareada y permutativa de las secuencias referidas. Se realizo un análisis estadístico de Kruskal-Wallis utilizando el programa Statistica 6.0 (Statsoft, Inc.) para determinar si había diferencias significativas entre d_S y d_N de las secuencias *Mhc*-I de los individuos analizados.

Tabla X. Comparación del promedio general de sustituciones nucleotídicas sinónimas (d_S) y no sinónimas (d_N) por sitio ± ES de las secuencias del exón 2 *Mhc*-I de cuatro individuos de *P. sinus*.

Locus Mhc-I	d_N	d_S	K-W
Locus A	0.000	0.000	
Locus B	0.023±0.012	0.034±0.025	H(1,12)=3.854, p=0.0496
Locus C	0.004±0.005	0.030±0.022	H(1,12)=4.986, p=0.0255
Locus D	0.149±0.046	0.055±0.038	
Todos los loci (interlocus)	0.077±0.018	0.036±0.020	H(1,132)=4.232, p=0.0397

El patrón de diversificación observado en todos los sitios de las secuencias exón 2 *Mhc*-I de *P. sinus* se describe a continuación. Los alelos del locus A son idénticos para el exón 2 *Mhc*-I de manera que no existe diferencia entre la frecuencia relativa de las sustituciones. A lo largo de todos los sitios del exón 2, el promedio (d_N) resultó ser significativamente

menor al promedio de (d_S) para los alelos exón 2 *Mhc-I* del locus B y el locus C. Para el locus D, (d_N) fue significativamente mayor que (d_S) , y finalmente, los alelos exón 2 de todos los loci *Mhc-I* (interlocus) presentaron un valor (d_N) significativamente mayor a (d_S) , (Tabla X).

Por otro lado, se realizó una prueba de selección exacta de Fisher bajo el modelo de sustitución de Nei-Gojobori, dentro del programa MEGA, para probar la hipótesis de selección positiva (dN > dS) en los codones del sitio de reconocimiento antigénico (ARS), de las secuencias del segundo exón *Mhc*-I de los cuatro individuos de *P. sinus*. En este caso, ninguna del las comparaciones pareadas entre las secuencias referidas arrojó diferencias estadísticamente significativas (p>0.05).

Regiones candidatas para el diseño de marcadores moleculares de histocompatibilidad clase I específicos para *P. sinus*.

El polimorfismo observado entre las secuencias histocompatibles clase I de *Phsi*25 y su segregación en linajes alélicos potenciales *Mhc*-I permitió detectar regiones candidatas para la generación de oligonucleótidos iniciadores específicos para un solo locus *Mhc*-I. En la tabla XI se muestran los sitios variables entre las secuencias de aminoácidos de *Phsi25*. Dentro de estos se observaron sitios polimórficos que sólo están presentes en un locus específico, con base en los resultados de segregación filogenética, por lo que se consideraron como sitios diagnósticos. El reconocimiento de éstos es la clave para el diseño de marcadores moleculares de cualquiera de los loci *Mhc*-I sugeridos para *P. sinus*.

Tabla XI. Sitios variables de los alelos *Mhc*-I de *Phsi25*. Los sitios sombreados indican la posición de posibles caracteres locus específicos a lo largo de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, así como en la región intrónica adyacente a los exones 2-3 *Mhc*-I. Los sitios idénticos a la secuencia consenso denotan con un punto. El número de la posición del sitio variable se lee de abajo hacia arriba.

		Sitios variables			
		Dominio al A.A	Dominio α2 A.A	Intrón 2 pb	
Loci <i>Mhc</i> I	Posición del sitio	452501256790346702 345566666667777788	61617933 01122345 1111111	5283 572589 381111	
	Consenso	SGVVWEEQIFDAVYVNNC	DHHANETA	CTGTTG	
Locus A	Phsi25.4 Phsin25.6			TCT.GA TCTCGA	
Locus B	Phsin25.7 Phsi25.20	ERDRRN.ENF.EDTR GE.DRRN.ENF.EDTR	NRYTKASP NRYTKASP		
Locus C	Phsin25.8 Phsin25.9	E.DRRN.ENF.EDTR E.DRRN.ENFCEDTR	NRYTKASP NRYTKASP		
Locus D	Phsin25.3	.KMESKR			

Con base en lo anterior, se propusieron las regiones nucleotídicas candidatas para diseñar primers locus-específicos para el exón 2 y 3 *Mhc*-I de *P. sinus* (tabla XII). Estas regiones se seleccionaron considerando los criterios recomendados para diseñar primers poniendo especial atención en las regiones codificadoras. Se consideraron las regiones del principio del exón 2 cuya traducción diera lugar a una sustitución no sinónima y que además esta fuera no conservativa.

Locus <i>Mhc-</i> I	Longitud (pb)	Posición de la base 5' en el exón 2	Posición de la base 3' en el exón 2	Posición del aminoácido involucrado.en dominio α1
A	16	150	166	55
D	14	99	112	38
в	21	168	189	60, 61, 62
D	20	117	136	45
D 20		224	243	80
		Posición de la base	Posición de la base	Posición del aminoácido
		5' en el exón 3	3' en el exón 3	involucrado.en dominio $\alpha 2$
A	19	152	160	140, 144

Tabla XII. Regiones nucleotídicas candidatas para el diseño de primers locus-específicos del segundo exón en *P. sinus*.

Discusión

Considerando que los genes de sistema *Mhc* son los más variables entre los vertebrados (Robinson *et al.* 2003) debido a su elevada tasa de sustituciones no sinónimas que cambian la secuencia de aminoácidos; las características fisicoquímicas de las proteínas MHC (Hughes y Nei 1988) y a que la evidencia colectada en numerosos vertebrados silvestres indica que el MHC representa el sistema mejor conocido para estudiar como la selección natural interactúa con otras fuerza evolutivas tales como la deriva para moldear la adaptación de las poblaciones a las condiciones locales (Bernatchez y Landry 2003). Se decidió continuar con el aislamiento y caracterización de secuencias histocompatibles clase I (*Mhc*-I) de *P. sinus* y, en su caso, aportar evidencias sobre su polimorfismo funcional.

La escasez de datos sobre genes con valor adaptativo y su variación en poblaciones de cetáceos se debe a lo difícil que es obtener muestras adecuadas, especialmente de individuos vivos pues la mayor parte de estas especies se encuentran fuertemente protegidas o clasificadas como amenazadas (e.g. NOM-059-ECOL-2001). El estatus de protección ha dado lugar al desarrollo de técnicas de muestreo poco invasivas (Lambersten 1987) que hasta ahora han tenido un alcance muy limitado para recuperar evidencias sobre la variabilidad de las proteínas MHC expresadas en tejidos de cetáceos y con ello evaluar las hipótesis sobre el modo de selección, dependiente de la frecuencia o sobredominancia, que opera sobre ésta variabilidad. El problema se ve intensificado por el tamaño de muestra, usualmente pequeño, que se obtiene de las poblaciones de vertebrados silvestres y en particular de las de cetáceos, aunado a nuestra ignorancia respecto a la naturaleza y diversidad de patógenos que desafían los sistemas inmunes de muchas de estas especies.

Una de las críticas más fuertes que ha enfrentado este estudio a lo largo de su desarrollo es que el mismo no aporta evidencia alguna sobre la expresión de proteínas histocompatibles clase I en la especie. Sin embargo al igual que en otros vertebrados considerados atípicos o "no modelo", este estudio se justifica como un esfuerzo exploratorio y de búsqueda de evidencia sobre la variabilidad de los genes *Mhc* clase I y su importancia en la determinación de las prácticas de conservación de especies amenazados como *P. sinus*.

Aislamiento de secuencias Mhc-I en Phocoena sinus.

Una vez establecido el valor de realizar este estudio, se decidió adoptar tres estrategias de biología molecular con el fin de aislar y caracterizar secuencias completas del segundo y tercer exón de genes *Mhc*-I de la marsopa endémica del Golfo de California, *Phocoena sinus (vaquita)*. Para ello se utilizó ADN genómico a partir del individuo *Phsi25*.

Se escogió amplificar y caracterizar la región de los exones 2 y 3, ya que codifican los dominios proteicos $\alpha 1$ y $\alpha 2$ que integran la región de fijación del péptido antigénico (PBR) y por lo tanto codifican la mayor parte de la variabilidad funcional de las proteínas histocompatibles clase I (Bjorkman y Parham 1990). En este caso se adoptó un enfoque similar al de trabajos previos que buscaban la genotipificación de loci histocompatibles clase I en cetáceos (e.g. Shirai *et al.* 1998, Flores-Ramírez *et al.* 2000, Munguía-Vega 2002, Heimeier *et al.* 2005). Se utilizaron distintas combinaciones de primers reportados en la literatura (Tabla I) diseñados para amplificar secuencias de distinta longitud que codifican parte o la totalidad de la PBR *Mhc*-I en otras especies de artiodáctilos (grupo filogenéticamente emparentado con los cetáceos, Irwin y Aranson 1994). Después se identificó y discriminó entre alelos de loci *Mhc*-I en *Phsi25* con base en su clonación y

detección de acuerdo a la conformación de sus hebras individuales de ADN (SSCP, e.g. Murray *et al.* 1995; Murray y White 1998, Nigenda-Morales 2005) que han demostrado ser exitosos para estimar el polimorfismo histocompatible de otros cetáceos.

De esta manera, se obtuvieron seis secuencias variables que incluyen fragmentos de los exones 2 y 3 que codifican el 76% de los dominios que conforman la PBR en moléculas MHC-I en cetartiodáctilos así como la región intrónica localizada entre dichos exones en el individuo *Phsi25*. Estas secuencias representan las regiones genómicas *Mhc*-I más extensas reportadas actualmente para cualquier cetáceo.

Por otra parte, la secuencia del intrón 2 *Mhc*-I aislado en *P. sinus* es de interés particular pues representa la primer secuencia intrónica histocompatible aislada y reportada para cualquier cetáceo, además de haberse obtenido una nueva secuencia *Mhc*-I exón 2 para la especie, de acuerdo a las secuencias *Mhc*-I previamente descritas por Munguía-Vega (2002).

Lo anterior hace única e innovadora la información generada en este estudio respecto a la información previa disponible en investigaciones similares, por lo que sienta una nueva frontera y aspiraciones para futuros estudios de histocompatibilidad clase I en *P. sinus* y otros cetáceos.

El aporte de estas nuevas secuencia histocompatibles pasará a ser parte de un acervo multiespecífico que permitirá desarrollar estudios más completos respecto a la evolución de loci *Mhc* en vertebrados silvestres y examinar las interacciones entre genes ligados, selección natural y deriva génica, así como explorar la evolución de familias multigénicas.

Particularmente, la genotipificación del *Mhc* en cualquier especie es el primer paso para identificar sustituciones en las secuencias indicativas de la relación filogenética que estas

mantienen con secuencias de linajes alélicos *Mhc*-I determinados (Vincek *et al.* 1997). En otras palabras, sustituciones indicativas de que estas y otras secuencias que integran el linaje descienden de un antepasado común. Una vez que se han identificado las secuencias en sus linajes respectivos, es posible asignarlas con confiabilidad estadística a loci determinados y en consecuencia identificar regiones consenso con las que se pueden diseñar primers para evaluar el polimorfismo de marcadores moleculares *Mhc*-I específicos para *P. sinus*. Lo anterior es de particular importancia para desarrollar estudios de inmunogenética a nivel poblacional para evaluar la vulnerabilidad de esta especie amenazada ante diferentes presiones biológicas (e.g. enfermedades infecciosas) y físicas (Lewin 1989).

Naturaleza histocompatible de las secuencias Mhc-I de Phocoena sinus.

La comparación de las secuencias *Mhc*-I aisladas en *Phsi25* con la base de datos del GenBank, reveló una alta homología con secuencias *Mhc*-I de *B. taurus* (Tabla V) y coincide con las observaciones en otros cetáceos como *T. truncatus* (Shirai *et al.* 1998) y *E. robustus* (Flores-Ramírez *et al.* 2000, Flores-Ramírez *et al.* 2004). Esta homología representa evidencia de su naturaleza histocompatible. Lo anterior es consistente con la descendencia evolutiva de los cetáceos a partir de los artiodáctilos (Milinkovitch *et al.* 1993, Gatesy *et al.* 1999).

Funcionalidad histocompatible de las secuencias Mhc-I de Phocoena sinus.

Todas las secuencias polipeptídicas de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ MHC-I en *Phsi25* (Fig. 12) deducidas a partir de su traducción revelaron marcos de lectura abiertos, la ausencia de

deleciones, inserciones y codones de paro; todo esto es evidencia de su funcionalidad histocompatible. Al respecto, podría objetarse que existe la posibilidad de que un codón de paro estuviera presente en alguno de los exones restantes (no aislados en este estudio) de los loci correspondientes a las secuencias aisladas de *Phsi25*. Sin embargo, la probabilidad de que aparezca un codón de paro en los exones 2 y 3 que son los más variables dentro de un locus *Mhc* clase I es mucho menor que en el resto de los exones ya que la baja variabilidad en éstos últimos es mantenida por selección purificadora al ser responsables de codificar partes estructurales de la molécula MHC-I (Bjorkman y Parham 1990).

Otra evidencia de funcionalidad de las secuencias proteicas MHC-I de Phsi25 se deriva de algunas características particulares, que las definen como moléculas funcionales captadoras de antígenos (de acuerdo al análisis de la estructura tridimensional de moléculas HLA-A2 clase I mediante técnicas de cristalografía con rayos X (Bjorkman y Parham 1990) y que además comparten con secuencias similares de otros mamíferos (Fig. 12). Al respecto, las sustituciones no sinónimas observadas en el dominio al de las secuencias MHC-I en P. sinus se concentra en posiciones de residuos que interactúan potencialmente con el péptido antigénico, de receptores de células T o de ambos (posiciones 60-84, Fig.12). Con respecto al dominio a2, se muestran solo dos sustituciones no sinónimas en posiciones de residuos de unión o captura de péptidos (residuos 111 y 143). Por otro lado, todas las secuencias MHC-I de Phsi25 mostraron una región conservada (NQS) para la glicolización en las posiciones 86-88 del dominio α 1 (Ploegh *et al.* 1981) y residuos de cisteína esperados en la posición 101 del dominio a2, involucrado en la formación del enlace disulfuro entre dominios, lo cual es característico de moléculas clase I en mamíferos terrestres (Garber et al. 1993).

Otra línea de evidencia sobre la funcionalidad de las secuencias MHC-I de *Phsi25* está dada por las propiedades fisicoquímicas de sus aminoácidos. Monos *et al.* (1984) observaron que las diferencias en los aminoácidos entre productos alélicos *HLA* clase I involucran diferencias en la carga del residuo del aminoácido. En este sentido, la mayoría de las sustituciones no sinónimas observadas en los dominios *al* y *a2* MHC-I de *Phsi25* no son conservativas, generan un cambio en las propiedades físico-químicas del aminoácido (Tabla VI). Las diferencias no sinónimas que ocurren promueven diversidad con respecto a la propiedad de interés. Considerando que los residuos cargados son de gran importancia en las interacciones entre polipéptidos, se sugiere que las diferencias en las cargas de los aminoácidos entre distintas moléculas de histocompatibilidad en *Phs25* son de gran importancia funcional. La explicación más parsimónica para el patrón observado es que la selección natural favorece la diversidad con respecto a la propiedad del aminoácido (Hughes y Hughes 1995).

Estos resultados en conjunto son consistentes con el patrón observado previamente en secuencias *Mhc*-I de *P. sinus* (Munguía-Vega, 2002), de ballena gris (*E. robustus*) y delfín nariz de botella (*T. Truncatus;* Shirai *et al.* 1998, Flores-Ramírez *et al.* 2000, Flores-Ramírez *et al.* 2004;) y coinciden con el patrón de variabilidad típico de una molécula de MHC observado en otros mamíferos (Hedrick 1994). A su vez, son consistentes con aquéllos que describen la generación de la diversidad en MHC-I a través de una selección balanceadora (Hughes y Nei 1988; Hughes *et al.* 1990). Dicha selección tiende a diversificar los residuos que interactúan directamente con el péptido de manera que logren expandir su capacidad de fijación hacia un espectro de péptidos antigénicos más amplio (Doherty y

Zinkernagel 1975), lo que implica un incremento en el potencial de la respuesta inmune de los vertebrados (Hughes y Nei 1988).

Otra evidencia importante sobre la funcionalidad de las secuencias MHC-I de *Phsi*25 se basa en el alto contenido de G (guanina) y C (citosina) observados en la posición del tercer codón en ambos dominios 5'. La pérdida de funcionalidad en los genes *Mhc*-I no clásicos y pseudogenes promueve una reducción en el contenido de G y C en moléculas MHC-I de muchas especies (Hughes y Nei 1988). De manera consistente, el contenido de G y C en la posición mencionada dentro de las secuencias del segundo y tercer exón *Mhc*-I de *Phsi25* fue muy similar al de genes *Mhc*-I clásicos de humanos y artiodáctilos (Fig. 11). Además, el contenido GC del intrón 2 en las secuencias referidas fue excepcionalmente alto, siendo consistente con las regiones codificadoras clase I que muestran una concentración de GC en la parte 5' del gen (Arnett y Pharham 1995).

Patrón de polimorfismo en la PBR de las secuencias MHC-I de Phocoena sinus.

Se observaron sustituciones tanto sinónimas como no sinónimas a lo largo de las secuencias *Mhc*-I exón 2-exón 3 de *Phsi25*, aunque es notable un polimorfismo mas grande concentrado en una región "hotspot" con respecto al dominio a1, mientras que en el caso del dominio a2, el polimorfismo es disperso y escaso (Fig. 12). Sachdev *et al.* (2005) observaron un patrón de sustitución muy similar en clonas de los dominios a1 y a2 de loci *Mhc*-I en leones asiáticos (*Pantera leo persica*) y sugieren que la razón de dicha observación podría estar relacionada desde el punto de vista estructural de la molécula MHC-I, en la que el dominio $\alpha1$ podría estar formando el surco donde el antígeno extraño

debe fijarse adecuadamente. Se ha observado en moléculas MHC-I de humanos y otros mamíferos que la variabilidad del dominio a^2 se concentra entre las posiciones de los residuos 140 y 170 (Bjorkman y Parham 1990). En este sentido, el fragmento del dominio α^2 aislado en *Phsi25* incluye hasta el residuo 157, esto implica que una tercera parte de la región hipervariable no está presente en las secuencias generadas y por lo tanto, se puede sugerir que el polimorfismo bajo observado en α^2 con respecto al dominio α^1 podría ser una consecuencia de estas diferencias en fijación de antígenos.

Las secuencias exón2-exón 3 que codifican los dominios que conforman la PBR de moléculas MHC-I en *Phsi25* revelaron un promedio de sustituciones no sinónimas por sitio (d_N) significativamente mayor al promedio de sustituciones sinónimas por sitio (d_S) .

Cabe señalar que las pruebas de los cambios d_N y d_S se efectúan comúnmente en los alelos de un solo locus (intralocus). Sin embargo, en este análisis la comparación incluye alelos de distintos loci relacionados entre sí. Aunque la prueba sigue siendo válida para comparaciones interlocus puede dar lugar a una subestimación de los valores d_N debido a que los cambios no sinónimos pueden incrementar conforme a la divergencia de las secuencias (Edwards et al. 1995).

Estos resultados son consistentes con el patrón de variabilidad típico en los codones que codifican la PBR de secuencias polipeptídicas MHC-I observado en otras especies de mamíferos que incluyen humanos, roedores, felinos, tamarino cabeza de algodón (*Saguinus oedipus*), ganado vacuno (*B. Taurus*) y cetáceos (Hughes y Nei 1988; Yuhki y O'Brien 1990a; Garber *et al.* 1993; Flores-Ramírez *et al.* 2000), y refuerzan la hipótesis de que la selección positiva (Darwiniana) ha actuado para incrementar las tasas de sustitución no sinónima en los codones de la PBR y por lo tanto, favorecer la diversidad de aminoácidos

en la PBR de secuencias proteicas MHC-I en estos vertebrados (Hedrick 1994; Hughes y Yeager, 1998), así como en *P. sinus*.

La región intrónica Mhc-I en P. sinus, demostró ser altamente conservada entre las secuencias de Phsi25 (Fig. 10) La diversidad nucleotídica observada en la región del intrón 2 es considerablemente menor que en los exones 2 y 3 dentro de las mismas secuencias. Esta distribución irregular de sitios polimórficos a lo largo de los exones y el intrón histocompatible es consistente con alelos Mhc-I clásicos de humanos y chimpancés (Cereb et al. 1997) y se ha considerado como un patrón teórico de selección balanceadora (Kreitman y Hudson 1991). Dicha irregularidad ocurre si el polimorfismo en los exones codifica aminoácidos importantes funcionalmente mantenidos por selección, mientras que en los intrones la selección no está presente. Por lo tanto, siempre y cuando exista recombinación entre exones e intrones, el polimorfismo en los intrones se ve reducido como resultado de la deriva génica promoviendo un patrón específico a un locus en las secuencias intrónicas. Tal es el caso del intrón 2 del locus A sugerido para P. sinus en este estudio (Tabla X) y mucho más evidente en genes clase I de humanos (Cereb et al. 1997). Aunque el promedio (d_S) es mayor que (d) entre los alelos de loci Mhc-I de Phsi25, la diferencia no es estadísticamente significativa. Este patrón es común en el caso de varios genes (Hughes y Yeager 1997) La explicación más simple de una divergencia menor en intrones que exones, radica en que los intrones han sido homogeneizados como resultado de eventos de recombinación interalélica en el pasado, promoviendo su fijación por la deriva génica mientras que la selección balanceadora ha continuado en mantener el polimorfismo en los exones (Cereb et al. 1997). Aunque la selección no actúa sobre los

intrones, éstos pueden presentar "hitch-hiking" con los exones. No obstante, sí la recombinación y deriva génica dan lugar a la pérdida de polimorfismo ancestral en un intrón, éste será selectivamente neutral. Por lo tanto, los intrones de los genes *Mhc* se espera que en promedio sean evolutivamente más jóvenes que los exones que codifican la PBR. Tanto d_s en los exones como d en intrones reflejan la tasa de mutación, ya que la mayoría de las mutaciones en sitios sinónimos de los exones y en sitios de los intrones son selectivamente neutrales. De acuerdo a los criterios mencionados, se esperaría que los intrones que están más cercanamente ligados a los exones 2-3 (que codifican la PBR) presenten niveles de polimorfismo más altos que aquéllos menos ligados la los exones 2-3 (Hughes y Yeager 1998). En este estudio, la mayoría de las secuencias (*Phsi25.7, Phsi25.8, Phsi25.9, Phsi25.20*) son idénticas en el intrón 2 mientras que el resto de la secuencia es divergente, lo cual indica que la recombinación dio lugar a la homogeneización del intrón 2 entre dichas secuencias.

Atendiendo a la crítica potencial sobre el haber establecido sin ambigüedad las líneas de evidencia descritas, surge la perspectiva de que los estudios futuros encaminados a caracterizar la variabilidad del *Mhc* en poblaciones de cetáceos deberán continuar tratando de hacerlo de la manera y con las técnicas más rigurosas a disposición. La facilidad relativa con que en este estudio se obtuvo información sobre la variación del *Mhc* sugiere que esta podría llegar a entorpecer el progreso encaminado a entender la dinámica evolutiva de este sistema. Así, es necesario que los esfuerzos que caractericen la variación de *Mhc* a partir de extractos de ADN genómico contemplen, hasta donde sea posible, el obtener información complementaria sobre: 1) la expresión real de estas secuencias, 2) el número de loci que se

están amplificando vía PCR y 3) establecer sí la variación detectada en las secuencias se relaciona a diferencias estructurales en regiones importantes de la molécula como la PBR. Existe otra fuente de problemas en los estudios que emplean técnicas mínimamente invasivas (colecta de heces) o de ADN antiguo para caracterizar la diversidad del *Mhc* en poblaciones actuales o históricas de vertebrados. Llegan a enfrentar errores de genotipificación o en la asignación de alelos *Mhc* debido a las cantidades tan pequeñas de ADN (potencialmente dañado) que estos análisis utilizan (Lukas y Vigilant, 2005).

Historia evolutiva de las secuencias Mhc-I exón 2-exón 3 de Phocoena sinus.

En cuanto a la historia evolutiva de las secuencias *Mhc*-I aisladas en *Phsi25* respecto a secuencias similares de cetartiodáctilos, las primeras no presentaron el patrón de evolución molecular trans-específico característico del *Mhc* (Hughes y Yeager 1998). Este patrón también ha sido reportado para secuencias similares clase I de ballena gris (Flores-Ramírez *et al.* 2000) así como del locus *DQB Mhc*-II en cuatro especies de pinnípedos (Hoelzel *et al.* 1999). Los resultados actuales son consistentes con el análisis filogenético previo de secuencias del exón 2 *Mhc*-I en la especie (Munguía-Vega 2002), el cual sugiere que las distancias cortas entre las ramas de los alelos de *P. sinus* con respecto al resto de las secuencias *Mhc*-I de otros cetartiodáctilos corresponden a un origen reciente del linaje alélico que podría estar relacionado a un cuello de botella histórico en la historia evolutiva de la especie (Norris y McFaraland 1958, Rosel y Rojas Bracho 1999). Este resultado es consistente con la ausencia de evolución trans-específica característica de linajes que han atravesado por cuellos de botella o tamaños efectivos reducidos a lo largo de su historia evolutiva (Clark, 1997).

No obstante, partiendo de la hipótesis del origen de *P. sinus* a partir de una población ancestral de *P. spinipinnis* que se desplazó hacia el norte del Golfo de California en alguno de los periodos glaciales del Pleistoceno, en los últimos 2 millones de años (Norris y McFaraland 1958, Rosel *et al.* 1995), y que la selección balanceadora mantiene el polimorfismos del *Mhc* durante largos periodos de tiempo evolutivo, incluso más que en alelos neutrales, (Takahata y Nei 1990), existe la posibilidad de observar evolución trans-específica en alelos *Mhc* clase I de *P. sinus* con *P. spinipinnis*. Sin embargo, para confirmar esto tendría que haber secuencias similares clase I disponibles de *P. spinipinnis* e incluirlas en el análisis filogenético. Esto no es posible ya que en la actualidad no existen estas secuenciaciones en ninguna otra especie de focénido.

Loci Mhc-I potenciales en Phocoena sinus.

En este trabajo no se busco demostrar la expresión de los genes *Mhc*-I en la especie dada la imposibilidad de obtener muestras frescas de individuos que permitieran aislar RNAm (el cual juega un papel importante durante la síntesis de proteínas, ya que su función es copiar el mensaje del ADN y llevarlo hasta los ribosomas, que es el sitio donde se sintetizan las proteínas). Una estrategia alternativa es utilizar anticuerpos monoclonales para verificar la presencia de proteínas MHC-I en superficie celular (ver Romano *et al.* 1992).

Considerando la evidencia presentada que indica que las secuencias *Mhc*-I aisladas de *P*. *sinus* son funcionales, se procedió a estimar el número de loci *Mhc*-I en la especie.

La presencia de siete secuencias variables *Mhc*-I observadas a partir de un espécimen *Phsi25* (Fig. 11) indica la existencia de al menos cuatro loci clase I en *P. sinus*.

Existen varios criterios para discriminar entre distintos loci histocompatibles a partir de la amplificación múltiple de loci *Mhc* vía PCR, como se hizo en estudio. Por ejemplo, con base en la amplificación de sus regiones intrónicas (Ono *et al.* 1993) o a través del análisis filogenético de las secuencias *Mhc* (Vincek *et al.* 1997). Sin embargo, estos criterios no funcionan en todas las especies (Edwards *et al.* 1998) y no es claro que tan amplio sea su uso. La divergencia observada entre loci clase I ha sido utilizada para segregar las secuencias en linajes alélicos potenciales de distintos taxa (Garber *et al.* 1993, Klein *et al.* 1997, Vincek *et al.* 1997).

Tomando en cuenta el criterio descrito, el análisis filogenético de las secuencias *Mhc-I* exón2-intron2-exón3 de *Phsi*25 segregó a estas en tres agrupaciones consideradas como linajes alélicos potenciales clase I en la especie (Fig. 14). Sin embargo, al incluir la secuencia novedosa *Mhc-I* exón 2, aislada a partir del mismo individuo, dentro del análisis filogenético, ésta refleja su gran divergencia al agruparse en un linaje alélico adicional a los tres anteriores (Fig. 17). Por lo tanto, las afinidades filogenéticas entre las secuencias *Mhc-I* aisladas en *Phsi25* así como la variabilidad entre éstas, sugieren la existencia de al menos cuatro loci clase I en la especie.

Estos resultados no coinciden con lo establecido previamente para la especie y otros cetáceos. Se ha reportado la existencia de al menos tres loci clase I con base en el número de alelos *Mhc*-I detectados para el segundo exón en un individuo de *P. sinus* (Munguía-Vega 2002). Así mismo se han sugerido tres loci *Mhc*-I en ballena gris con base en el análisis filogenético de alelos encontrados (Flores-Ramírez *et al.* 2000, Flores-Ramírez *et al.* 2004). El delfín de Héctor (*Cephalorhynchus hectori hectori*) mostró la presencia de cinco secuencias *Mhc*-I distintas a partir de un individuo, por lo que se consideran al menos

tres loci *Mhc*-I en esta especie (Heimeier *et al* 2005). Al respecto, el número de loci clase I observado en estos cetáceos es consistente con el número de loci *Mhc*-I clásicos encontrados en Artiodáctilos (Ellis *et al.* 1999, Garber *et al.* 1993) que representan el clado ancestral de los cetáceos.

El incremento en el número de alelos *Mhc*-I encontrados en *Phsi25* en este estudio podría ser resultado de un mayor esfuerzo que en los trabajos previos mencionados de clonación y muestreo de clonas positivas. Se ha observado en varias especies, como en ratones, ratas y caballos (*Mus musculus, Rattus rattus y Eqqus caballus, respectivamente*), que la composición de los haplotipos clase I es muy variable, (Wroblewski *et al.* 1994, Joly *et al.* 1996, Holmes y Ellis 1999). Un estudio de evolución del MHC en Cetartiodáctilos reveló entre cuatro y seis loci *Mhc*-I clásicos en vacas (*B. taurus*) y aunque ningún haplotipo clase I ha expresado mas de tres genes, es muy claro que existen más de tres loci discretos en esta última especie, los cuales se expresan en distintas y combinaciones (Holmes *et al.* 2003).

Otras pruebas que refuerzan la separación de las secuencias *Mhc*-I de *Phsi25* en distintos loci potenciales se describen a continuación. Existe una divergencia conspicua entre las secuencias de los loci *Mhc*-I A y C, la cual se refleja en la segregación filogenética de sus secuencias en dos grupos así como en la distancia genética entre las ramas que los separan (Fig. 18), además de los sitios de aminoácidos diagnósticos entre dichos loci (once y cuatro, respectivamente) y sus propiedades fisicoquímicas correspondientes (ocho y cuatro no conservativos, respectivamente, Tabla XI).

Todo esto indica que las propiedades físico-químicas de los residuos de aminoácidos referidos causan un cambio en el reconocimiento selectivo del péptido dentro de la "PBR". Todo lo anterior sugiere fuertemente que sean identificados en loci clase I separados.

Además, la región intrónica del locus A presenta seis sitios nucleotídicos diagnósticos que refuerzan su clasificación como un locus independiente.

La divergencia entre las secuencias de loci *Mhc*-I B y C respecto a los loci *Mhc*-I A y C es mucho menor, aunque estadísticamente robusta, y las distancias genéticas entre sus ramas son muy cortas (Fig. 17). Presentan respectivamente dos y un sitios de aminoácidos diagnósticos entre loci de los cuales sólo uno es no conservativo para el locus B (Tabla XI).

Estos resultados sugieren dos posibles escenarios. El primero, considera como dos loci Mhc-I distintos presentan características de recombinación interlocus la cual contribuye a la homogeneización de las secuencias entre loci de manera que la señal filogenética se va erosionado. Lo anterior es consistente con varios estudios que han encontrado evidencias de recombinación entre distintos loci (interlocus) Mhc clase I de bovinos (Garber et al. 1993), ganado vacuno (Holmes et al. 2003), felinos (Yuhki y O'Brien 1990a) así como en primates (Parham et al. 1989). La recombinación puede involucrar "cossing-over" o el intercambio de secuencias "mini-cassettes" mediante mecanismos de conversión génica. Si la tasa de recombinación entre alelos es alta, se esperaría que la identidad particular de los linajes alélicos fuera opacada (Yeager y Hughes 1999). Los eventos de recombinación están relacionados a la proximidad relativa entre los genes clase I, la frecuencia de duplicación genética y eventos de deleción dentro de una región. La relevancia funcional de la posible recombinación entre loci Mhc-I de P. sinus es difícil de predecir ya que no hay suficiente información disponible sobre como distintos loci varían en términos de polimorfismo y función, aunque es razonable asumir que incrementa la diversidad entre alelos en distintos loci (Holmes et al. 2003).

El segundo escenario considera como un solo locus *Mhc*-I duplicado. La duplicación genética ha sido revelada en varios loci *Mhc* de otros animales incluyendo cetáceos. Por ejemplo, el locus *DRB Mhc*-II parece duplicado en el delfín de río, *Lipotes vexillifer* (Yang *et al.* 2005) así como en los loci *DQA* y *DQB Mhc*-II de ganado vacuno (*B. taurus*). La duplicación genética en combinación con la diversidad alélica *Mhc* incrementan la diversidad de proteínas histocompatibles que codifican de manera que optimizan la respuesta inmune hacia varios patógenos. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para confirmar alguno de los dos escenarios sugeridos.

Polimorfismo preliminar y selección diversificadora en las secuencias del segundo exón *Mhc* I de *Phocoena sinus*.

El análisis preliminar de polimorfismo *Mhc*-I realizado con base en la segregación filogenética de las secuencias de aminoácidos del dominio α1 en cuatro individuos de *P. sinus* reveló la presencia de entre dos y cuatro alelos por posible locus de *Mhc*-I (Tabla IX). El alelo *Phsi25.8* estuvo presente en todos los individuos, lo que sugiere que podría estar fijado en la población. Una observación importante en el individuo 2 es que presenta aparentemente tres alelos clase I (*Phsi25.8, Phsi6 y Phsi7*) en el locus C (Fig. 18). El hecho de que los individuos de *P. sinus* son organismos diploides implica que el número de máximo de alelos presentes por locus sean sólo dos. Al respecto, se sugieren dos posibilidades. La primera es que alguno de los tres alelos no es verdadero y que éste sea resultado de un artefacto de la PCR (e.g. error de la *Taq* polimerasa), lo cual es probable ya que el alelo *Phsi7* y el *Phsi25.8* solo difieren en una base y el cambio es sinónimo, de manera que podrían ser el mismo alelo y entonces el locus D estar conformado por los

alelos *Phsi25.8* y *Phsi6*. La otra posibilidad es que el locus D esté duplicado, lo cual es común en loci *Mhc* en otros vertebrados. Sin embargo, cualquiera de las dos posibilidades requiere de más estudios para ser confirmadas

Es importante señalar que los resultados de polimorfismo clase I en *P. sinus* en este estudio son preliminares y que un tamaño de muestra representativo de la población deberá ser analizado para confirmar y validar estadísticamente los resultados de este análisis.

Estos resultados indican que los loci clase I sugeridos para P. sinus son polimórficos, reportándose por primera vez individuos de P. sinus heterocigotos en algunos loci de su genoma, lo cual es sumamente novedoso y alentador en cuanto a la genética de la especie. Hay que considerar que estudios previos de la población única de esta especie han reportado una variabilidad genética reducida (monomórfica para la región D-Loop ADNmit, Taylor y Rojas-Bracho 1999) y también para el segundo exón DQB Mhc-II (Munguía-Vega 2002) y únicamente dos alelos en el segundo exón DRB Mhc-II, (Esquer-Grarrigós, 2006). Por lo tanto, el polimorfismo potencial clase I en P. sinus tiene implicaciones importantes en la conservación de la especie. La variación genética en loci *Mhc* es importante para la supervivencia de las poblaciones a largo plazo, mientras que bajos niveles de variación pueden incrementar la susceptibilidad de la especie a patógenos (O'Brien y Evermann 1988). Varios estudios han reportado un incremento en la resistencia a patógenos entre heterocigotos MHC (Penn et al 2002); o un incremento en la susceptibilidad a patógenos en individuos endogámicos sin presentar un efecto relacionado a un haplotipo de MHC específico (Acevedo-Whitehouse et al. 2003). No obstante, la relación directa entre la disminución de una población mediada por patógenos y la baja

variabilidad del *Mhc* de dicha población ha sido difícil de demostrar en poblaciones naturales (Gutierrez-Espeleta *et al.* 2001). Por lo tanto, el problema de que tanta variación del *Mhc* se requiere para asegurar la viabilidad de una población a largo plazo permanece como una interrogante fundamental en la genética de conservación.

La selección natural opera a diferentes niveles. En este sentido, los análisis realizados para evaluar el efecto de la selección diversificadora en la secuencias *Mhc*-I de *P. sinus* comprendió distintos niveles. A nivel interlocus implica la divergencia entre distintos loci (genes) y a nivel intralocus implica la divergencia entre distintos alelos del mismo locus (gen).

En general, todas las secuencias *Mhc*-I analizadas a nivel interlocus presentaron tasas de sustitución sinónima significativamente mayores a las no sinónimas, lo cual es indicativo de selección purificadora. Estos resultados tienen que ver con que la variabilidad observada entre los alelos de cada uno de los loci *Mhc*-I sugeridos para *P. sinus* es muy reducida, por ejemplo, los alelos del locus A difieren en una sola base de la región intrónica. Estos resultados también pudieran estar influenciados por el reducido tamaño de muestra analizado.

El patrón observado puede explicarse en función de la historia de la población de *P. sinus* y se sugiere el siguiente posible escenario. De acuerdo al origen reciente de *P. sinus*, es probable que no haya pasado suficiente tiempo para que los genes de histocompatibilidad clase I en la especie reflejen el efecto de la selección positiva con base en las tasas de sustituciones sinónimas y no sinónimas de los dominios que codifican la PBR, que muestran moléculas típicas MHC-I como se ha observado otros mamíferos, esto aunado a

una baja presión patogénica en su hábitat que se relaciona con la distribución local y restringida de la especie. Lo anterior contrasta con poblaciones de mamíferos que presentan una distribución más amplia y por lo tanto están expuestas a una mayor presión patogénica por ejemplo, la ballena gris, que realiza migraciones a lo largo en su ciclo de vida y que por lo tanto muestra loci *Mhc*-I con tasas de sustituciones que indican el efecto de la selección positiva de moléculas típicas MHC-I.

Por otro lado, las secuencias referidas a nivel intralocus presentaron el patrón opuesto: tasas de sustituciones no sinónimas mayores a las sinónimas. La explicación más sencilla para este patrón es que se considera un mayor número de secuencias que provienen de distintos loci y que por lo mismo la divergencia entre estas es mucho más notable, aumentando así el valor de las tasas de sustitución.

De cualquier forma, los patrones de sustitución obtenidos en ambos niveles deben ser confirmados, analizando un tamaño de muestra adecuado que permita validar con robustez estadística estos resultados.

Marcadores moleculares de histocompatibilidad clase I específicos para *Phocoena* sinus.

Las secuencias exón 2-exón 3 de *Phsi25* mostraron un polimorfismo reducido con respecto a secuencias similares de otros mamíferos marinos y terrestres (Fig. 12). De acuerdo a la segregación filogenética de dichas secuencias en linajes alélicos clase I potenciales para *P*. *sinus*, el polimorfismo observado es mayor entre secuencias de distintos loci clase I que entre las secuencias de un solo locus. En este sentido, el polimorfismo entre loci permitió detectar sitios variables diagnósticos para cada uno de los loci *Mhc*-I sugeridos (Tabla XI). El diseño de primers locus-específicos clase I para *P. sinus* debería involucrar las regiones nucleotídicas que dan origen a los sitios diagnósticos en las secuencias MHC-I de *Phsi25*. La mayoría de estos sitios se encuentran en el dominio α 1 de la PBR, aunque la región intrónica del locus A presenta sitios variables diferentes al resto de las secuencias, lo cual refuerza su separación en un locus independiente.

Aunque el número de sitios diagnósticos entre las secuencias analizadas es pequeño, se sabe que dentro de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de otros vertebrados, los productos de un locus pueden diferir por un solo aminoácido o hasta 30 sustituciones, tal es el caso de HLA-I (Bjorkman y Parham 1990)

Se recomienda diseñar primers para el segundo exón de los loci A y C preferentemente; estos mostraron mayor divergencia interalélica respecto a los demás. Al respecto, es ventajosa la estimación del polimorfismo en varios loci ya que uno sólo no representa la variación total del *Mhc* (Murray & White, 1998). Por ejemplo, en el tamarino cabeza de algodón, *Saguinus oedipus*, se observaron bajos niveles de variación en ciertos loci clase I y clase II, mientras que en loci *DRB* se observaron altos niveles de variación.

Una de las ventajas de haber aislado la región intrónica adyacente a los exones 2-3 que codifican la PBR es que los intrones del *Mhc* son buenos indicadores de loci y la amplificación un solo locus utilizando primers enfocados a amplificar secuencias intrónicas ha sido exitosamente utilizada en especies de mamíferos (Edwards *et al.* 1997). Sin embargo, como se mencionó previamente, la variabilidad en el intrón 2 *Mhc*-I de las secuencias de *Phsi25* es muy baja y no permitió distinguir entre alelos de un locus

particular, con excepción del locus A, por lo que no se considera una región candidata para diseñar primers locus específicos clase I en *P. sinus*.

Un marcador molecular de histocompatibilidad clase I específico para *P. sinus* permitirá estimar el tamaño de su población fundadora ya que el tiempo de coalescencia (tiempo de su último ancestro común) en dicha región genómica es mucho mayor que en alelos neutrales (Klein *et al.* 1993, Takahata 1993, Ayala *et al.* 1994, Vincek *et al.* 1997, Hughes y Yeager 1998). Este marcador molecular ayudara a inferir sobre las fuerzas evolutivas que han impactado la historia demográfica de la población de *P. sinus* y reflexionar acerca de las hipótesis actuales sobre su historia evolutiva. La información generada permitirá estimar la diversidad genética en uno o distintos loci *Mhc*-I en una muestra poblacional representativa de *P. sinus* y evaluar de la única forma accesible su vulnerabilidad a enfermedades infecciosas.

CONCLUSIONES

- Las secuencias genómicas histocompatibles clase I aisladas y caracterizadas en este trabajo son hasta ahora las más completas descritas para los cetáceos en general y para *Phocoena sinus* en particular.
- Las secuencias *Mhc*-I aisladas en *P. sinus* son homólogas a secuencias correspondientes en Cetartiodáctilos, evidencia de su naturaleza histocompatible.
- Hasta el momento, es aparente que el patrón evolutivo de las secuencias *Mhc*-I de *P. sinus* con respecto a otros Cetartiodáctilos no muestra la trans-especificidad característica de secuencias *Mhc* observada en otros mamíferos. Este estudio sugiere que estas secuencias pertenecen a linajes alélicos que han evolucionado de forma independiente a partir de un pool remanente de una población que sufrió un cuello de botella demográfico drástico y remoto.
- La distribución irregular de variabilidad entre los exones 2-3 y el intrón 2 *Mhc*-I entre las secuencias de la muestra *Phsi25* es característica de proteínas presentadoras de antígenos. Dicho patrón sugiere que la selección actúa en la diversificación de residuos en los exones que son cruciales para el reconocimiento de antígenos.

- Las secuencias *Mhc*-I del segundo y tercer exón de *P. sinus* presentan evidencias de pertenecer a loci que codifican la PBR de moléculas funcionales MHC-I. Estas secuencias mostraron el patrón clásico de variabilidad esperado para moléculas clase I y observado en otros mamíferos. Este patrón revela que la selección natural actúa sobre residuos específicos que interactúan con el péptido antigénico.
- Las secuencias polipeptídicas MHC-I de *P. sinus* mostraron evidencias de funcionalidad biológica, sin embargo se requieren análisis más específicos para confirmarla.
- El número de secuencias variables *Mhc*-I aisladas a partir de un individuo de *P*. *sinus* y las afinidades evolutivas entre éstas, sugieren la existencia de al menos cuatro linajes alélicos discretos que corresponden potencialmente al número de loci clase I en la especie. Lo que sugiere que el individuo de *P*. *sinus* analizado es heterocitogo para los loci clase I potenciales.
- La segregación filogenética en linajes alélicos de las secuencias del segundo exón *Mhc*-I disponibles para *P. sinus* sugiere que los loci *Mhc* clase I potenciales son polimórficos en la población.

• El polimorfismo observado entre las secuencias *Mhc*-I de un individuo responsable de la segregación de éstas en loci *Mhc*-I potenciales, permitió reconocer sitios diagnósticos para la discriminación entre loci. De acuerdo a estos, se proponen regiones candidatas para el diseño de marcadores variables de histocompatibilidad clase I específicos para *P. sinus*. Esto conducirá a estimar el polimorfismo de un solo locus clase I en una muestra representativa de la población.

REFERENCIAS

- Acevedo-Whitehouse, K., F. Gulland, D. Greig y W. Amos. 2003. Disease susceptibility in California sealions. Nature 422:35.
- Aguilar A., G. Roemer, S. Debenham, M. Binns, D. Garcelon y R.K. Wayne. 2004. High MHC diversity maintained by balancing selection in an otherwise genetically monomorphic mammal. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 101:3490-3494.
- Amos, W. y A. Balmford. 2001. When does conservation genetics matter? The Genetics Society of Great Britain. Heredity 87:257-265.
- Anon. 1996. Opening statement by Mexico. IWC/48/OS Mexico. Forty Eight Meeting of the International Whaling Commission. May-June 1996. Available from IWG, The Red House, Station Road, Histon Cambridge UK.
- Arnett, K.L. y P. Parham. 1995. HLA class I nucleotide sequences. Tissue Antigens 46: 217-257.
- Avise J.C. 2000. Phylogeography. Harvard University Press, EUA 464p.
- Avise, J.C. 2004. Molecular Markers, Natural History and Evolution. 2a ed. Sinauer, EUA. 684p.
- Avise, J.C., A.G. Jones, D. Walker y J.A. DeWoody. 2002. Genetic mating systems and reproductive natural histories of fishes: lessons for ecology and evolution. Annual Reviews in Genetics 36:19-45.
- Ayala, F.J., A. Escalante, C. O'Huigin y J. Klein. 1994. Molecular genetics of speciation and human origins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 91:6787-6794.
- Barnes L. G. 1985. Evolution, taxonomy and antitropical distributions of the porpoises (Phocoenidae, Mammalia). Marine Mammal Science 1:149-165.
- Bernatchez L. y C. Landry. 2003. MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? Journal of. Evolutionary Biology 16:363-77.
- Bjorkman, P.J. y P. Parham. 1990. Structure, function and diversity of Class I Major Histocompatibility Complex molecules. Annual Review in Biochemistry 59:253-288.
- Bjorkman, P.J., M.A. Saper, B. Samraoui, W.S. Bennett, J.L. Strominger y D.C. Wiley. 1987. The foreign antigen binding site and T cells recognition regions of class I histocompatibility antigens. Nature 329:512-518.

- Bodmer, W.F., A.E. Bodmer, J.G. Dupont y B. Mach. 1987. Histocompatibility testing en: Immunobiology of HLA Dupont (Ed). Vol. 1. B. 72-79p. EUA.
- Borghans JAM, J.B. Beltman y R.J. De Boer. 2004. MHC polymorphism under hostpathogen coevolution. Immunogenetics 55:732-739.
- Brown, J.L. y A. Eklund. 1994. Kin recognition and the major histocompatibility complex: an integrative review. American Naturalist 143:435-461.
- Brownell Jr., R.L. 1986. Distribution of the vaquita, *Phocoena sinus*, in the Gulf of California. Scientific Consultation on marine mammals. FAO. Bergen, Noruega. 4p.
- Brownell Jr., R. L., L. T. Findley, O. Vidal, A. Robles y N. S. Manzanilla. 1987. External morphology and pigmentation of the vaquita, *Phocoena sinus* (Cetacea:Mammalia). Marine Mammal Science 3:22-30.
- Cereb, N., A.L. Hughes y S.Y. Yang. 1997. Locus-specific conservation of the HLA class I introns by intra-locus homogenization. Immunogenetics 47: 30-36.
- CIRVA (Comité Internacional para la Recuperación de la Vaquita). Scientific Reports of: First Meeting, 25-26 January 1997; Second Meeting, 7-11 February 1999; Third Meeting, 18-24 January 2004. Ensenada, Baja California, México.
- CITES (Convention of International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora). 1998. Checklist of CITES species. Compiled by World Conservation Monitoring Center, Cambridge, United Kingdom. 312p.
- Clark, A. G. Neutral behavior of shared polymorphism. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 94: 7730-7734.
- Cohen S. 2002. Strong positive selection and habitat-specific amino acid substitution patterns in MHC from an estuarine fish under intense pollution stress. Molecular Biology and Evolution 19:1870–1880.
- Crandall K.A., O.R.P. Bininda-Emonds, G.M. Mace y R.K. Wayne. 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. Trends in Ecology and Evolution, 15:290-295.
- D'Agrosa C, Lennert-Cody CE, Vidal O. 2000. Vaquita bycatch in Mexico's artisanal gillnet fisheries: driving a small population to extinction. Conservation Biology 14: 1110-1119.
- D'Argosa, C., O. Vidal y W.C. Graham. 1995. Mortality of the vaquita (*Phocoena sinus*) in gillnet fisheries during 1993-94. Report of the International Whaling Comission (Special Issue 16):282-291.

- De Boer RJ, J.A.M. Borghans, M. van Boven, C. Kesmir y F.J. Weissing. 2004. Heterozygote advantage fails to explain the high degree of polymorphism of the MHC. Immunogenetics 55:725-731.
- Doherty P.C. y R.M. Zinkernagel RM. 1975. A biological role for the major histocompatibility antigens. Lancet 1:1406-1409.
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 1994. Secretaría de Pesca, México, DF., febrero. 10, 47-50p.
- Edwards, S. V., J. Nusser y J. Gasper. 2000. Characterization and evolution of MHC genes from non-model organisms, with examples from birds. *En*: Baker, A. J. (ed) Molecular Methods in Ecology. Cambridge. Blackwell Scientific. 168-207p.
- Edwards, S.V. y P.W. Hedrick. 1998. Evolution and ecology of MHC molecules: from genomics to sexual selection. Trends in Ecology and Evolution 13:305-310.
- Edwards, S., V. Gaspar y M. Stone. 1998. Genomics and polymorphism of Agph-DAB1, an MHC class II B gene in red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). Molecular Biology and Evolution 15:236-250.
- Edwards, S. V., K. Chesnut, Y. Satta y E. K. Wakeland. 1997. Ancestral polymorphism of *Mhc* class II genes in mice: implications for balancing selection and the mammalian molecular clock. Genetics 146: 655-668.
- Edwards, S. V. y W. K. Potts. 1996. Polymorphism of MHC genes: implications for conservation genetics of vertebrates. 214-237 p. *En*: Smith, T. B. y R. K. Wayne (eds.) Molecular Genetic Approaches to Conservation. Oxford University Press. Oxford.
- Edwards, S.V., M. Grahn y W. K. Potts. 1995. Dynamics of MHC evolution in birds and crocodilians amplification of class II genes with degenerate primers. Molecular Ecology 4:719-729.
- Ellis, S.A., E.C. Holmes, K.A. Staines, K.B. Smith, M.J. Stear, D.J. McKeever, N.D. MacHugh y W.I. Morrison. 1999. Variation in the number of expressed MHC genes in different cattle class I haplotypes. Immunogenetics 50:319-328.
- Ellis, S.A., A.J. Martin, E.C. Holmes y W.I. Morrison. 1995. At least four MHC class I genes are transcribed in the horse: phylogenetic analysis suggests an unusual evolutionary history for the MHC in this species. European Journal of Immunogenetics 22 (3):249-260.

- Esquer-Garrigós, Y. 2006 Polimorfismo en el locus *DRB* 1 del Complejo Principal de Histocompatibilidad en la Vaquita *Phocoena sinus*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S.
- Evermann, J.F., J.L. Heeney, M.E. Roelke, A.J. McKeirnan y S.J. O'Brien. 1988. Biological and pathological consequences of feline infectious peritonitis virus infection in the cheetah. Archives of Virology 102:155-171.
- Fabiani A., A.R. Hoelzel, F. Galimberti y M.M. Muelbert. 2003. Long range paternal gene flow in the southern elephant seal. Science 299:676.
- Falconer, D.S. y F.C. Mackay. 1996. Introduction to Quantitative Genetics. Longman. Inglaterra.
- Flores-Ramírez, S., R.D. Miller y J. Urbán-Ramírez. 2004. Major Histocompatibility Complex I Polymorphism in a Cetacean: The Gray Whale (*Eschrichtius robustus*). Marine Mammal Science 20:262-273.
- Flores-Ramírez, S., J. Urbán-Ramírez y R.D. Miller. 2000. Major Histocompatibility Complex Class I Loci from the Gray Whale (*Eschrichtius robustus*). The American Genetic Association 91:279-282.
- Futuyma, D.J. 1998. Evolutionary Biology. 3rd. Ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, EUA.. 763p.
- Garber, T.L., A.L. Hughes, N.L Letvin, J.W. Templeton y D.I. Watkins. 1993. Sequence and evolution of cattle MHC class I cDnas: concerted evolution has not taken place in cattle. Immunogenetics 38:11-20.
- Garrigan, D. y P.W. Hedrick. 2003. Detecting adaptive molecular polymorphism: Lessons from the MHC. Evolution. International Journal of Organic Evolution 57:1707-1722.
- Gaskin, D.E. 1982. The Ecology of Whales and Dolphins. Heinemann Educational Books. RU. 434p.
- Gatesy, J., M. Milinkovitch, V. Wadell, y M. Stanhope. 1999. Stability of cladistic relationships between cetacean and higher level artiodactyls taxa. Systematic biology 48(1):16-20.
- Gaudieri S., R.L. Dawkins, K. Habara, J.K. Kulski y T. Gojobori. 2000. SNP profile within the major histocompatibility complex reveals an extreme and interrupted level of nucleotide diversity. Genome Research 10:1579-1586.
- Gerrodette, T., L.A. Fleischer, H. Pérez-Cortés y B. Villa-Ramírez. 1995. Distribution of the vaquita, *Phocoena sinus*, based on sightings from systematic surveys. Report of the International Whaling Commission, Special Issue 16:273-282.
- Gutierrez-Espeleta, G. A., P. W. Hedrick, S. T. Kalinowski, D. Garrigan y W. M. Boyce. 2001. Is the decline of bighorn sheep from infectious disease the result of low MHC variation? Heredity 86:439-500.
- Hall, B.G. 2001. Phylogenetic Trees Made Easy: a How-to manual for molecular biologists. Sinauer. EUA.179p.
- Hohn, A., A. J. Read, S. Fernandez, O. Vidal y T. Findley. 1996. Life history of the vaquita, *Phocoena sinus* (Phocoenidae, Cetacea). Journal of Zoology, London, 239:235-251.
- Hedrick, P.W., K.M. Parker y R.N. Lee. 2001. Using microsatellite and MHC variation to identify species, ESUs, and MUs in the endangered Sonoran topminnow. Molecular Ecology 10:1399-1412.
- Hedrick, P.W. 1994. Evolutionary genetics of the major histocompatibility complex. American Naturalist 143:945-964.
- Heimeier, D., R. Kirsty, D. Padraig, S. Greg, H. Alistair y B. Scott. 2005. Diversity of Expressed MHC Class I and Class II Genes in the Hector's Dolphin. (Presentación oral) The 16th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. San Diego, California, EUA. December 12-16.
- Hill, A.V.S. 1998. The immunogenetics of human infectious diseases. Annual Reviews in Immunology 16:593-617.
- Hillis, D.M., B.K. Mable, A. Larson, S.K. Davis y E.A. Zimmer. 1996. Sequencing and cloning, p. 321-378. *En:* Hillis, D.M., C. Moritz y B.K. Mable (eds.). Molecular Systematics. Sinauer, EUA.
- Ho,C.S., G.W. Martens, J.E. Baker y D.M Smith. 2003. Sumisión directa. Sin publicar. NCBI.
- Hoelzel, A.R., J.C. Stephens y S. O'Brien. 1999. Molecular genetic and evolution at the MHC DQB locus in four species of pinnipeds. Molecular Biology and Evolution 16:611-618.
- Hohn, A.A., A.J. Read, S. Fernández, O. Vidal y L.T. Findley. 1996. Life history of the vaquita, *Phocoena sinus* (Phocoenidae, Cetacea). Journal of Zoology of London 239:235-251.
- Holmes, E.C., A.F.C. Roberts, K.A. Staines y S.A. Ellis. 2003 Evolution of major histocompatibility complex class I genes in Cetartiodactyls. Immunogenetics 55:193-202.

- Holmes, E.C. y S.A. Ellis. 1999. Evolutionary history of MHC class I genes in the mammalian order Perissodactyla. Journal of Molecular Evolution 49:316-324.
- Hughes, A.L. y Yeager M. 1998. Natural Selection at Major Histocompatibility Complex loci of vertebrates. Annual Review of Genetics 32:415-435.
- Hughes, A.L. y Yeager M. 1997. Comparative evolutionary rates of introns and exons in murine rodents. Journal of Molecular Evolution 45:125-130.
- Hughes, A.L. y M.K. Hughes. 1995. Self peptides bound by HLA class I molecules are derived from highly conserved regions of a set of evolutionarily conserved proteins. Immunogenetics 41:257-262.
- Hughes, A., T. Ota y M. Nei. 1990. Positive Darwinian selection promotes charge profile diversity in the antigen-binding cleft of class I major histocompatibility complex molecules. Molecular Biology Evolution 7:515-524.
- Hughes, A.L. y M. Nei. 1988. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. Nature 335:167-170.
- Irwin, D. M. y U. Arnason. 1994 Cytochrome b gene of marine mammals: phylogeny and evolution. Journal of Mammalian Evolution 2:37-55.
- IUCN (Unión Mundial para la Naturaleza) 1996. Red Data Book. Vo. I. IUCN, Gland, Switzerland.
- Jaramillo-Legorreta, A., L. Rojas-Bracho y T. Gerrodette. 1999. A new abundance estimate for vaquitas: First step for recovery. Marine Mammal Science 15(4):957-973.
- Joly, E., L. Leong, J. Coadwell, C. Clarkson y G.W. Butcher. 1996. The rat MHC haplotype RTI expresses 2 classical class I molecules. Journal of Immunology 157:1551-1558.
- Jukes, T.H. y C.R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. 21-132 p. *En*:Munro, H.N.(ed.). Mammalian Protein Metabolism. EUA.
- Kaufman, J., J. Salomonsen y M. Flajnik. 1994. Evolutionary conservation of MHC class I and class II molecules-different yet the same. Seminars in Immunology 6:411-424.
- Kennedy, L.J., L. Altet, J.M. Angles, A. Barnes, S.D. Carter, O. Francino, J.A. Gerlach, G.M. Happ, W. Ollier, W. Thompson y J.L. Wagner. 2000. Nomenclature for factors of the dog major histocompatibility system (DLA), 1998: primer reporte de "ISSAG DLA Nomenclature comitee". Animal Genetics 31:52-61.

- Klein, J., F. Figueroa, D. Klein, A. Sato y C. O'Huigin. 1997. Major histocompatibility complex genes in the study of fish phylogeny. *En*: Kocher, T.D. y C.A. Stepien (eds.). Molecular Systematics of Fishes 271-283 pp. EUA..
- Klein J., C. O'Huigin, F. Figueroa, W.E. Mayer y D. Klein, 1993. Different modes of MHC evolution in primates. Molecular Biology and Evolution 10: 48–59.
- Koskinen M.T., T.O. Haugen y C.R. Primmer. 2002. Contemporary Fisherian life-history evolution in small salmonid populations. Nature 419:826–830.
- Kreitman, M. y R. R. Hudson, 1991. Inferring the evolutionary histories of the Adh and Ahd-dup loci in *Drosophila melanogaster* from patterns of polymorphism and divergence. Genetics 127:565-582.
- Kumar, S., K. Tamura y M. Nei. 1993. MEGA: Molecular evolutionary genetic analysis, version 1.01. EUA.
- Kupfermann, H., Y. Satta, N. Takahata, H. Tich, y J. Klein. 1999. Evolution of MHC-DRB introns: Implications for the origin of primates. Journal of Molecular Evolution 48:663-674.
- Lambertsen R.H. 1987. A biopsy system for large whales and its use in cytogenetics. Journal of Mammalogy 68:443-45.
- Lande, R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. Science 241:1455–1460.
- Lawlor D.A., F.E. Ward, P.D. Ennis, A.P. Jackson y P. Parham. 1988. HLA-A and B polymorphisms predate the divergence of humans and apes. Nature 335:268-271.
- Lehninger, A. L. 1994. Principios de Bioquímica. Omega. 3ª ed. España. 879p.
- Lewin, H.A. 1989. Disease resistance and immune response genes in cattle: strategies for their detection and evidence of their existence. Journal of Dairy Science 72:1334-48.
- Lukas, D. y L. Vigilant. 2005. Reply: Facts, faeces and setting standards for the study of MHC genes using noninvasive simples. Molecular Ecology 14:1601-1602.
- Lynch, M. y W. Gabriel. 1990. Mutation load and the survival of small populations. Evolution 44:1725-1737.
- Margulies, D.H. y J. McCluskey. 2003. The Major Histocompatibility Complex and Its Encoded Proteins. 571-612p. *En*: William E. P. (ed.). Fundamental Immunology. EUA.

- Mestrovic, N., O. Randig, P. Abad, M. Plohl y P. Castagnone-Sereno. 2005. Conserved and variable domains in satellite DNAs of miotic parthenogenetic root-knot nematode species. Gene 362:44-50.
- Meyers, L.A. y J.J. Bull. 2002. Fighting change with change: adaptive variation in an uncertain world. Trends in Ecology and Evolution 17:551–557.
- Mikko S., K. Roed, S. Schmutz, L. Andersson. 1999. Monomorphism and polymorphism at MHC DRB loci in domestic and wild ruminants. Immunological Reviews 167:169-178.
- Milinkovitch, M.C., G. Orti y A. Meyer. 1993. Revised phylogeny of whales suggested by mitochondrial ribosomal DNA sequences. Nature 361:346-348.
- Miltiadou, D., K.T. Ballingall, S.A. Ellis, G.C. Russell y D.J. McKeever. 2005. Haplotype characterization of transcribed ovine major histocompatibility complex (MHC) class I genes. Immunogenetics 57:499-509.
- Monos, D.S., W.A. Tekolf, S. Shaw y H.L. Cooper. 1984. Comparison of structural and functional variation in class I HLA molecules: the role of charged amino acid substitution. Journal of Immunology 132:1379-1385.
- Munguía-Vega, A. 2002. Estudio del Complejo Principal de Histocompatibilidad en la historia evolutiva y demográfica de la vaquita *Phocoena sinus*. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La Paz, B.C.S. 133p.
- Murray, B.W. y B.N. White. 1998. Sequence variation at the major histocompatibility complex DRB loci in beluga (*Delphinapterus leucas*) and narwhal (*Monodon monoceros*). Immunogenetics 48:242-252.
- Murray B.W., S. Malik, y B.N. White. 1995. Sequence variation at the major histocompatibility complex locus DQB in beluga whales (*Delphinapterus leucas*). Molecular Biology and Evolution 12:582-593.
- Nei, M. y T. Gojobori. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide subtitutions. Molecular Biology and Evolution 3:418-426.
- Nei M., X. Gu y T. Sitnikova. 1997. Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. Proceedings of the National Academy of Sciences or the USA 94:7799-7806.
- Nigenda-Morales, F. 2005. Polimorfismo del Complejo Principal de Histocompatibilidad DQB-1, en el rorcual común (*Balaenoptera physalus*) del Golfo de Califorina. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur, UABCS. La Paz, B.C.S. 59 p.

- NOM-059-ECOL-2001. Norma oficial Mexicana 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. SEMARNAT. Diario oficial de la Federación. México.
- Norris K. S. y W.N. .McFaraland 1958. A new harbor porpoise of the genus *Phocoena* from the Gulf of California. Journal of Mammalogy 39:22-39.
- O'Brien, S. J. 1994. A role for molecular genetics in biological conservation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 91:5748-5755.
- O'Brien, S. J. y J. F. Evermann. 1988. Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations. Trends in Ecology and Evolution 3:254-259.
- Ono, H. C., C. O'Huigin, H. Tichy y J. Klein. 1993. Major histocompatibility complex variation in two species of cichlid fishes from lake Malawi. Molecular Biology and Evolution 10:1062-1070.
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kanasawa, K. Hayashi y T. Sekiya. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 86:2766-2770.
- Ortega-Ortíz J.G., B. Villa-Ramírez y J.R. Gersenowies 2000. Polidactyly and other features of the manus of the vaquita *Phocoena sinus*. Marine Mammal Science 16:277-286.
- Paetkau D., L.P. Waits., P.L. Clarkson, L. Craighead y C. Strobeck. 1997. An empirical valuation of genetic distance statistics using microsatellite data from bear (Ursidae) populations. Genetics 147:1943–1957.
- Parham, P., D.A. Lawlor, C.E. Lomen y P.D. Ennis. 1989. Diversity and diversification of HLA-A, -B, -C alleles. I. Journal of Immunology 142:3937.
- Penn, D. J., K. Damjanovich y W. K. Potts. (2002). MHC Heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 99:11260-11264.
- Penn, D. J. y W. K. Potts. 1999. The evolution of mating preferences and major histocompatibility complex genes. American Naturalist 153:145-164.
- Pérez-Cortés, M. H. 1996. Contribución al conocimiento de la biología de la vaquita *Phocoena sinus*. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 68p.

- Perrin, W. F. 1972. Color patterns of spinner porpoises (*Stenella* cf. *longirostris*) of the eastern Pacific and Hawaii, with comments on delphinid pigmentation. Fishery Bulletin U.S. 70:983-1003.
- Piertney, S.B. y M.K. Oliver. 2006. The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. Heredity 96:7-21.
- Ploegh, H.L., H.T. Orr y J.L. Strominger. 1981. Major histocompatibility antigens: the human (HLA-A, -B, -C) and murine (H2-K, H-2D) class I molecules. Cell 24: 287-299.
- Posada, D. y K. Crandall. 1998. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. Bioinformatics Applications Note 14:817-818.
- Potts, W.K. y E. K. Wakeland. 1993. The evolution of MHC genetic diversity: a tale of incest, pestilence and sexual preference. Trends in Genetics 9:408:412.
- Radtkey, R., B. Becker, R. Miller, R. Riblet y T. Case. 1996. Variation and evolution of Class I in sexual and parthenogenetic Geckos. Proceedings of the Royal Society of London, Series B 263:1023-1032.
- Robinson, J., A. Malik, P. Parham, J. G. Bodmer y S. G. Marsh. 2000. IMGT/HLA Database- a sequence database for the human major histocompatibility complex. Tissue Antigens 55:280-287.
- Robinson, J., M.J. Waller, P. Store y S.G.E. Marsh. 2003. IPD the immuno polymorphism database. Nucleic Acid Research 33:523-526.
- Rojas-Bracho L. y B. Taylor. 1999. Risk factors affecting the vaquita (*Phocoena sinus*). Marine Mammal Science 15:974-989.
- Romano T.A., S.H. Ridgway y V. Quaranta. 1992. Mhc Class II Molecules and Immunoglobulins on Peripheral Blood Lymphocytes of the Bottlenosed Dolphin. Journal of Experimental Zoology 263:96-104.
- Rosel, P. E. y L. Rojas-Bracho. 1999. Mitochondrial DNA variation in the critically endangered vaquita *Phocoena sinus* Norris and Macfaraland, 1958. Marine Mammal Science 15:990-1003.
- Rosel, P. E., M. G. Haygood y W. Perrin. 1995. Phylogenetic relationships among true porpoises (Cetacea: Phocoenidae). Molecular Phylogenetics and Evolution 4:463-474.
- Sachdev, M., R. Sankaranarayan, P. Reddana, K. Thangaraj y L. Singh. 2005. Major histocompatibility complex class I polymorphism in Asiatic Lions. Tissue Antigens 66:9-18.

- Saitou N. y M. Nei 1987. The neighbor joining method: a method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4:406-425.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. EUA. 999p.
- Shirai, K., T. Saki y T. Oike. 1998. Molecular cloning of bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*) MHC class I cDNA. Journal of Veterinary Medicine and Science 60:1093-1096.
- Silber, G. K. y K. S. Norris. 1991. Geographic and seasonal distribution of the vaquita, *Phocoena sinus*. Los Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoológica 62:263-268.
- Silber, G. K. 1990. Occurrence and distribution of the vaquita *Phocoena sinus* in the Northern Gulf of California. Fishery Bulletin U.S. 88:339-346.
- Silber, G. K., M. W. Newcomer y G. J. Barros. 1988. Observations on the behavior and ventilation cycles of the vaquita, *Phocoena sinus*. Marine Mammal Science 4:62-67.
- Slade, R. 1992. Limited MHC polymorphism in the southern elephant seal: implications for MHC evolution and marine mammal population biology. Proceedings of the Royal Society of London, Series B 249:163-171.
- Slade R.W. y H.I. McCallum. 1992. Overdominant vs frequencydependent selection at MHC loci. Genetics 132: 861–862.
- Sommer. S. 2005. The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. Frontiers in Zoology 2:16.
- Swofford, D.L. 1993. PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony. Version 4. University of Illinois Natural History Survey, EUA.
- Sone, E., Y. Baba y H. Koike. 2005. Amplification of MHC loci from genome DNA and mRNA in Cetacean Species. (Presentación de Póster). The 16th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. San Diego, California, EUA. December 12-16.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony. Version 4.0b10 University of Illinois Natural History Survey, EUA.
- Takahata, N. 1993 Haldane's contribution to the understanding of the evolution of vertebrate immune system. 49-65 p. In: P.P. Majumder (ed.). Human Population Genetics: A centennial tribute to J. B. S. Haldane, Plenum Press, New York.

- Takahata, N. y M. Nei. 1990 Allelic genealogy under overdominant and frequencydependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci. Genetics 124:967-978.
- Taylor, W.R. 1986. The classification of aminoacid conservation. Journal of Theoretical Biology 119: 205-218.
- Taylor, B y L. Rojas-Bracho. 1999. Examining the risk of inbreeding depression in a naturally rare cetacean, the vaquita (*Phocoena sinus*). Marine Mammal Science, 15:1004-1028.
- Thompson J.D., D.G. Higgins y T.J. Gibson. 1994. Clustal-W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequences weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22:4673-4680.
- Torre-Cosío, J. 1995. Descripción del esqueleto, dimorfismo sexual y crecimiento alométrico en el cráneo de vaquita, *Phocoena sinus* (Cetacea:Phocoenidae). Tesis de Maestría, ITESM, Campus Gaymas. 183p.
- Trowsdale J. 1995. "Both man & bird & beast": comparative organization of MHC genes [Review]. Immunogenetics 41:1-17.
- Trowsdale, J. 2001. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. Immunity 15: 363-374.
- Trowsdale, J., V. Groves y A. Arnason. 1989. Limited MHC polymorphism in whales. Immunogenetics 29:19-24.
- Urakawa, T., M. Kodama, M. Morita y H. Ikeda. 1997. Diversity of Bovine MHC class I related sequences. Publicado únicamente en Base de datos (1998). Toyohiko Urakawa, STAFF Institute, 2nd Division.
- Van Tienderen P.H., A.A. de Haan, G. B. Van der Linden y B. Vosman. 2002. Biodiversity assessment using markers for ecologically important traits. Trends in Ecology and Evolution 17:577–582.
- Vidal, O., 1995. Population biology and incidental mortality of the vaquita, *Phocoena sinus*. Report of the International Whaling Commission Special Issue 16:247-272
- Vidal, O., R. L. Brownell, Jr. y L.T. Findley. 1999. Vaquita, *Phocoena sinus*, Norris and MacFaraland, 1958. *En*: Ridgway, S.H. y R. Harrison (eds.). Handbook of Marine Mammals, Vol. 6: The second book of dolphins and porpoises. Academic Press, San Diego, 357-378p.

- Vincek, V., C. O'Huigin, Y. Satta, N. Takahata, P. Boag, P. Grant, B. Grant y J. Klein. 1997. How large was the founding population of Darwin's finches. Proceedings of The Royal Society of London, Series B 264:111-118.
- Weber, D.S., B.S. Stewart, J. Schienman y N. Lehman. 2004. Major histocompatibility complex variation at three class II loci in the northern elephant seal. Molecular Ecology 13:711-718.
- Wedekind, C y D. Penn. 2000. MHC genes, body odours, and odours preferences. Nephrology Dialysis Transplantation 15:1269-1271.
- Worley, M.B. y A.C. Misurata. 1998. Analysis of black rhinoceros MHC class I cDNA clones. Sin publicar. NCBI.
- Wroblewsky, J.M., S.G. Kaminsky e I. Nakamura. 1994. Bat-1 genes and the origin of multiple class I loci in the H-2D region. Immunogenetics 39:276-280.
- Yang, G., J. Yan, K. Zhou y F. Wei. 2005. Sequence variation and gene duplication at MHC DQB loci of Baiji (*Lipotes vexillifer*), a Chinese river dolphin. Journal of Heredity 96:310-317.
- Yeager, M. y A.L. Hughes. 1999. Evolution of the mammalian MHC: natural selection, recombination, and convergent evolution. Immunolical Reviews. 167:45-58.
- Yuhki, N. y S.J. O'Brien. 1990a. DNA recombination and natural selection pressure sustain genetic sequence diversity of the feline MHC class I genes. The journal of Experimental Medicine. 172:621-630.
- Yuhki, N. y S.J. O'Brien. 1990b. DNA variation of the mammalian major histocompatibility complex reflects genomic diversity and population history. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 87:836-840.

ANEXO I

Amplificación genómica de los extractos de ADN total de una muestra poblacional de *Phocoena sinus*.

Al considerar el estatus de conservación de *P. sinus* y la dificultad de muestreo en su hábitat natural, el material biológico disponible en la actualidad tiene un gran valor para la investigación de mamíferos marinos y de esta especie en particular. Por consiguiente, fue necesario realizar un respaldo genómico de las 24 muestras de ADN existentes en ese momento (Tabla XIII) para optimizar su aprovechamiento. El origen e información inherente de los ejemplares analizados se puede consultar en Rojas-Bracho (1999) y Munguía-Vega (2002).

Tabla XIII. Clave interna y número de serie correspondiente a cada uno de los individuos de *P. sinus* utilizados para generar la amplificación genómica de su ADN total.

Clave Interna	Serie	Clave Interna	Serie
Vaquita 1	4382	Vaquita 13	4387
Vaquita 2	4384	Vaquita 14	4403
Vaquita 3	4388	Vaquita 15	4404
Vaquita 4	4389	Vaquita 16	1665
Vaquita 5	4390	Vaquita 17	1655
Vaquita 6	4391	Vaquita 18	1661
Vaquita 7	4392	Vaquita 19	1654
Vaquita 8	4393	Vaquita 20	1663
Vaquita 9	4394	Vaquita 21	1650
Vaquita 10	4396	Vaquita 22	1656
Vaquita 11	4395	Vaquita 23	1662
Vaquita 12	4397	Vaquita 24	1009
		. aquitte 2 i	1007

Para llevar a cabo el respaldo, los extractos de ADN total de 25 individuos de *P. sinus* fueron amplificados de forma exponencial utilizando un kit de amplificación genómica "GenomiPhi DNA Amplification Kit" (Amersham Biosciences). El método GenomiPhi utiliza ADN polimerasa del bacteriófago Phi29, altamente sensible durante la replicación para amplificar exponencialmente ADN linear de una o dos hebras durante una reacción de desplazamiento de hebra bajo una isoterma de 30°C. Como resultado se generan cantidades de microgramos de ADN a partir de nanogramos como materia inicial después de una noche de incubación.

Para lograr la amplificación genómica de los extractos de ADN de los 24 individuos, se siguió el protocolo recomendado por el proveedor. La electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados se muestra en la Fig.19. Sin embargo, para optimizar la reacción de amplificación fue necesario realizar una labor intensiva de estandarización debido a que la cantidad y calidad de cada uno de los extractos de ADN originales de *P. sinus* fue diferente. El principal problema y cambio en la metodología fue determinar el rango de diluciones de ADN inicial que produjera la mejor amplificación, tomando en cuenta que el ADN degradado representa un sustrato pobre para la reacción de GenomiPhi.



Figura 19. Geles de agarosa al 1% teñidos con EtBr que revelan la presencia de ADN genómico de alto peso molecular, amplificado a partir de los extractos de ADN originales de 24 individuos de *Phocoena sinus*. Los números sobre los pozos del gel corresponden el número de individuo.

Los respaldos genómicos de ADN presentaron un barrido vertical, lo que indica que el ADN está degradado. Únicamente los individuos 20a y 22 presentaron extractos de ADN relativamente conservados, Fig. 19. Estos respaldos podrán ser utilizados en adelante para su análisis genético, sin embargo, se debe considerar que son resultado de una reacción previa de amplificación por lo que están sujetos a presentar errores resultado de replicación por lo tanto, es recomendable hacer las pruebas adecuadas que descarten este tipo de errores.

ANEXO II

Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de las clonas *Mhc*-I exón2 -intrón 2-exón3 aisladas a partir del individuo *Phsi25* que no fueron incluidas en los análisis de este estudio, Fig. 20. Cada una de estas secuencias corresponde a un solo sentido (Fwd ó Rev) debido a que no se logró hacer el consenso entre ambos, por lo que se consideraron ambiguas, de manera que se reporta a continuación, la secuencia que presentó la mejor señal dentro de los cromatogramas analizados.

Al considerar algún error potencial en la incorporación de la Taq polimerasa, recombinación en la PCR, clonación, la secuenciación en una sola dirección, etc., puede originarse la presencia de polimorfismos inesperados por estos motivos. Las secuencias que no se utilizaron para su análisis en este estudio deben ser confirmadas en un futuro con el objetivo de clarificar la diversidad genética de los genes *Mhc*-I revelada en este estudio.

N Exón

50

Phsi25.10..... Phsi25.12.....T....T.....T.....T. Phsi25.21....A..T.....T....T Phsi25.14......C......A.GA.....A.T....A.GA.....A.GA.....A.T... Phsi25.15....A....A.......A. Phsi25.18.....C.....RGA.....A..T. Phsi25.27......C.....AGA.....AC.T..

2691

Phsi25.21.....A.....A.....A.....A. Phsi25.15. Phsi25.14.....CGC......G...a....T.A.....A....A.....A.....

Figura 20. Secuencias nucleotídicas que comprenden el Exón 2, intrón 2, Exón 3 MHC obtenidas a partir del individuo Phsi25. Las letras individuales y los puntos debajo de la secuencia nucleotídica representan nucleótidos que son, respectivamente, distintos o idénticos a *Phis25.9*. Los números corresponden a su posición dentro del gen. La región sombreada corresponde al Intrón 2

AACATTGCGGGACCCGGCCCGGCCCCCGGGCTCGG					·····.TT				H. H	E
GGCGTCGCCCGAGTCTCCGGGGTCCGAGGGTTACCCC	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••		*****	**********************************	***********************************	**********************************	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	*******	BBA.ACC.	C
sin25.9ACGACCCTCATCCCCAGGGACGGGCC	si25.17	si25.13.	si25.12	si25 11 b	si25.21.	si25.15.	si25.16.	si25.14. T	si25.18. T	·····

2011

hsi25.13. hsi25.12 hsi25.11 A. hsi25.21 hsi25.16 hsi25.16 hsi25.18 hsi25.18 hsi25.27
--

Continuación de la Figura 20.

Exón 3

[2		•	•							8 18
C	5					x					
E	-										a ar
Ū)	•	•	•		•					
Ũ)	•		•	•	•					•
E	4	•		÷ (•	•			•		
C)	•	•	a) (•	8 7	•	. (•		•
C	2	•) }	•	•	•	•	•	•	•	•	e 🐨
A	ł.	•	• 0	•	•	• : : :	•	•	•	e 8	- x
C)	8	÷	8 1		•? (•	 S 	•		•
F.	1	t 1	t –	8 (7		•	t (•	- 23	: •
2	<pre></pre>	•	1	1.1	1	•	1	•	•		
Y	1		1	8 S		1		8 8		1	•
T	1					2 - 1		4 B			
r r	5									. 8	1.1
ă	1										
it	;										
Ö)		ê	•					. ()	(7 (()
A				•		i i					<i>.</i>
R		•	•	•							
U)	8	• 3					6			
H	1	6 8 - 3	• 34	•	é 19	e 3		6 B		•	÷ 6
0) - S	6	• 0	•C - 9	 23 	6 S		6 B			•
0	3 3	•	•	9 2 - 9	1 (3)	2 2	•	0 0	•		
U D			1 8	8 8	<u>,</u> 41	11		8 3	•	s	
2			8 B		1 8	8 8	28	8 8	1	1	•
P						2. 1	1 - 85	8 8	1		
5		8		8.1	5 S	3 3		8 8		9 6	
23	8			10 ×		8	1 8	8 8		1.5	
A							20	E			1
E			6 9					N			
U	6		. 8	e i	8			E	i F	E	E
R			1			6	8 28	, R.		, Š.	-
U	с ў			6.	1	8		83		1	
C			6.8			3) i		•	٠
U.	6.9		2 3	10 A	() i	8 g			•	•	
A	8	•	8 8	· •	8 8	0 1	6 S 6	8	· U	U	U
Q	1		8 18		0	· •	8 80	5 B	•	•	
S			5 3		8 50	· •	8 - 29	e .	•	8 X	
2			5 B			- 5	÷ .*	ి. ి		r .	r >
2	8 8					- 1	1.1	1	0	0	0
10	88	- 0	1.1		1.1			8 8		1.0	
õ			8 B) į			
N			a - 6					s (
E		- 24		- 34	je	. Se					
\mathbf{O}	÷	- 19	s			- 24	. e				
Q		13	1	10	1	- 53				 • 	3 9))
Q	•	- 8			•	- 27		- 5	1	•	
2	- 1							1		•	•
2	1		8					- 5	75	15	1
in								- 2	Υ.	9	
T.		- 24									
U	•										
R.					•						
U					•		•				
U	•	•	•		•	•					
C)	•		•		٠		•		÷	•	•
P.	•				•		s ¥		•	•	
믎	•		•	٠	•						
8	•	•	•				•				•
S	1		•	•							•
R	- 3		1	- C			: ŝ	- 8			
čh	- 2				1.8		10		T	51	d.
Ŭ			•				1.				
U					•		- 4				
EH											
C			•			्व			•		
O	•	•	•	٠	•				٠		٠
E	•	•			2					•	٠
2	1				1			۰	•		÷.
rh.	- 3		- 1		- 0		- 0		:		
N.	- 2				- 2	- 2	- 2	1	- 8		÷.
Ē						4				200	
U)					•				•	100	
Ū						12					
C							- A.	12.1	•	350	
R	•		•				•				•
A,	٠	•	•	•	•		٠	٠	U	O	U
Q			•						•	٠	٠
Q			•	•	•		•	1.0	•	0.00	
Ch.			•		•		•	- 20			
X.									•		
rh.		- 9				- 3	- 1	- 27		100	
rh						- 2		- 6	6		÷.
Ľ		- 0				- 0	- 13	1	- 8		
to.		÷.									
Ŭ							3¥				
1					30		100	- 30		303	ю.
U			•				3 . •2	10			•
U			٠	۰	8.8.1		- 0 1 0	1.		25	
U	٠	•	٠	٠	٠		•	٠	•		
H	•	•	•		•	•	٠	_ 1	•	٠	
U.	٠	•		٠	٠	٠	٠	EH	•	•	•
S	-	~ ·	~	· ·				10	1	~	
5	0	17	(')	11	H	2	ц)	6	4	ω	~
c'	1	-			-		-	-	-	-	
N	5	LO.	ŝ	5	5	LQ.	5 D	5	5 L	5	ŝ
d	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
H.	·H	·H	٠Ĥ	-1	-H	-1	-1		-1	·	
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3	S
G	Å	L'	4	Å	Å	Å	q	H.	q	P	5
4	щ	H	H-I	HЧ	щ	14	HI.	щ	щ	щ	щ

198

U	5	i a	2		8						•
E							6 (* 6 (*		6 94 5 6		
A		- 3		- 2			6	- 24		•	
A		1	8 8		8		8	1.4			•
Ö											:
A					ŭ (6	•		•		
g	0. 4	1	· •				•	•			•
8	:	6 18 5 18			1	6 04 6 74		d	•		1
Ŭ		U	U				U		U	U	U
E				•	1.1	1	٠	1.		1	
Ch Ch	1						:	:	1	1	:
H			- 1		· ;		:				
H	٠	8 8		•			•	1	•		•
8				:	:			0.00 1.00			
ö								E			
A	•	•		•	- 8				1	•	
R			:	1	- 1		1		1	•	•
A								- 2	1		
U											•
A		•		•		•	•				÷ •
0	- 7										
Ö	•	•		•							•
H	٠	•	•	•	•		•	-			•
A		1					- 2	CD		- 1	1
A							(a)			- 00	
Q		•	•	•	•			A		30 0 (
5	1	1	:				•				
Ö								1			÷ .
N	•	•	•	•	•	•	U		•	٠	•
A									- 1	1	
ö	- 54				- 88					÷	
H					•	•		•	A	R.	R
S				1		:		1	•	•	1
A											
U	•	•	•	•		•		•		•	٠
A					•	: •	•		14		
H										-	-
U	19										•
U.	3			1			•				
8	÷.	:	:	1	:	1	:	1	d'	d'	Ť
Ŭ						•					
9			•	•		•	•	•	•	٠	
K	- 2			:				:			1
Ŭ											
A		•	٠	•	1		٠				
8		:		:	:			:		1	
Ŭ											•
U		•		•		•	•				•
8								•			
Ö	- 2		- 2		- 2			•			
Q		٠	•	•		•		•		. •	٠
SC		:	1	:	H	1	1		H	H	•
16	0	5	3	N	H	1	5	6	4.	8	2
	H	H	H	H	H	N	H	-	H	H	2
2											
D	N	N	2	N	N	2	N	N	2	N	2
-A	-1	-1	-1	-1	-H	-1	-1	·H	-H	·H	
13	1S	13	S	30	S	S	5	ß	50	S	12
겁	A	PL	A	E	A	A	E	A	E	A	A

Continuación de la Figura 20.