

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN
SUPERIOR DE ENSENADA**



PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS EN
ECOLOGÍA MARINA

**Polimorfismo en el gen *DQβ* del Complejo Principal de
Histocompatibilidad Clase II en tursiones *Tursiops truncatus*
del Golfo de México y Mar Caribe**

TESIS

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

Presenta:

JORGE EZEQUIEL MONTANO FRÍAS

Ensenada, Baja California, México

Diciembre de 2009

TESIS DEFENDIDA POR
Jorge Ezequiel Montano Frías
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Axayácatl Rocha Olivares
Director del Comité

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro
Miembro del Comité

Dra. Gisela Heckel Dziendzielewski
Miembro del Comité

M. en C. Eduardo Morteo Ortiz
Miembro del Comité

Dr. Axayácatl Rocha Olivares
*Coordinador del programa de
posgrado en Ecología Marina*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

10 de Diciembre de 2009

RESUMEN de la tesis de **Jorge Ezequiel Montano Frías**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en ECOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California, México. Diciembre de 2009.

Polimorfismo en el gen *DQβ* del Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase II en tursiones *Tursiops truncatus* del Golfo de México y Mar Caribe

Resumen aprobado por:

Dr. Axayácatl Rocha Olivares
Director de Tesis

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) es una familia multigénica que codifica glicoproteínas involucradas en el inicio de la respuesta inmune de los vertebrados. El nivel de polimorfismo de los genes MHC se encuentra estrechamente ligado a su función, por lo que niveles altos usualmente se asocian con una mayor capacidad inmune y protección del hospedero en contra de los patógenos. En esta tesis se analizaron secuencias del gen *DQβ* (exón 2) del MHC-II de 48 tursiones *Tursiops truncatus* procedentes de 5 localidades costeras del sur del Golfo de México y Mar Caribe. La amplificación parcial del exón 2 *DQβ* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) proporcionó secuencias de 172 pb que no exhibieron más de dos alelos en cada individuo genotipificado (genotipo diploide). Se detectaron 27 alelos *Tutr-DQB** utilizando PHASE 2.1.1, un algoritmo Bayesiano diseñado para la reconstrucción de haplotipos ambiguos en los individuos heterocigóticos. Estos alelos mostraron señales de homología con las secuencias *DQB1* de los cetáceos, especialmente con aquellos de las familias Delphinidae, Phocoenidae e Iniidae. Las secuencias mostraron un alto valor de diversidad nucleotídica ($\pi = 7\%$) y marcos de lectura ininterrumpidos, lo que es consistente con *loci* MHC-II analizados en otros mamíferos relacionados (*e.g.* rumiantes). La heterocigosidad encontrada en cada localidad varió entre 0.78 y 0.98, mientras que para todas las localidades fue 0.86. Los resultados sugieren la influencia de la selección estabilizadora (selección positiva Darwiniana) sobre este gen a través de largos periodos de tiempo evolutivo, reflejada en una alta proporción de sustituciones no sinónimas en los codones involucrados en la fijación del péptido antigénico (PBR $d_N = 28.5\%$, $p < 0.05$) y un alto valor promedio de la razón entre sustituciones no sinónimas y sinónimas ($d_N / d_S = 6.4$). Además, se observó un patrón de evolución trans-específico dentro del suborden Odontoceti (cetáceos dentados) al encontrar alelos compartidos entre taxa divergentes. En general, el nivel de polimorfismo encontrado en estas tursiones fue alto en comparación con otras poblaciones de cetáceos de hábitos costeros, lo que sugiere la exposición a una alta diversidad de patógenos en su hábitat.

Palabras clave: polimorfismo MHC, gen *DQβ*, *Tursiops truncatus*, resistencia a patógenos, selección estabilizadora, Golfo de México y Mar Caribe

ABSTRACT of the thesis presented by **Jorge Ezequiel Montano Frías** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in MARINE ECOLOGY. Ensenada, Baja California, México. December 2009.

**Major Histocompatibility Complex II *DQB* gene polymorphism in bottlenose dolphin
Tursiops truncatus from Gulf of Mexico and Caribbean Sea**

The Major Histocompatibility Complex (MHC) comprises a large multigene family coding for glycoproteins that play a key role in the induction of immune responses in vertebrates. The high level polymorphism observed in MHC loci is explained in terms of its protector function against a number of pathogens. In this study, the exon-2 of the *DQB* gene (MHC-class II) was analyzed for 48 bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* from five localities of the southern Gulf of México and Caribbean Sea. Partial amplification of the *DQB* locus (exon 2) comprising 172 bp sequences showed no more than two alleles per individual (diploid genotype). Overall, 27 *Tutr-DQB** alleles were detected using PHASE 2.1.1, a Bayesian algorithm for haplotype reconstruction in heterozygous individuals. These alleles showed shared homology with cetacean *DQB1* sequences, especially those of the Delphinidae, Phocoenidae and Iniidae. These sequences showed high within-species and between-species nucleotide diversity ($\pi = 7\%$) and uninterrupted reading frames consistent with functional class II *loci* found in related mammals (e.g. ruminants). Heterozygosity in each locality ranged from 0.78 to 0.98, and for all five localities was 0.86. Significantly higher nonsynonymous divergence at sites coding for peptide binding (PBR $d_N = 28.5\%$, $p < 0.05$) and a high overall ratio non-synonymous to synonymous substitutions ($d_N / d_S = 6.4$) suggested that this locus was subject to balancing (positive Darwinian) selection over a long evolutionary time period. This evidence was supported by a pattern of trans-specific allele sharing within the suborder Odontoceti (toothed whales). Overall, the level of polymorphism in the *DQB* gene of these bottlenose dolphins was high compared to other cetacean populations inhabiting coastal waters, suggesting exposure to a high diversity of pathogens in their habitat.

Key words: MHC polymorphism, *DQB* gene, bottlenose dolphin, pathogen resistance, balancing selection, Gulf of Mexico & Caribbean Sea

*En memoria de mi abuelo Manuel †
mi ángel y guía*

*con amor a mi madre y mi hermanita
mi inspiración y mi alegría*

*para mi estrella Abigail
por cada mágico instante y por ser mi luz,
única entre miles de millones...*

...a los delfines por esta gran aventura molecular



*Tursiops truncatus en la costa de Alvarado, Ver.
Fotografía: Jorge E. Montano Frías. Julio 2006.*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento otorgado para realizar los estudios de maestría durante mi estancia en Ensenada. Al Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE), a los investigadores, estudiantes, personal académico, técnico y administrativo que fueron un gran apoyo durante esta investigación.

A los miembros de mi comité de tesis por sus valiosas aportaciones en esta investigación. Al Dr. Axayácatl Rocha por darme la oportunidad de adentrarme en el campo de la ecología molecular, por abrirme las puertas de su laboratorio y por los desafíos científicos. Al M. en C. Eduardo Morteo por encontrar nuevas interrogantes que motivaron esta investigación, por confiar en mí a lo largo de mi formación e impulsar mis sueños desde que conocimos a los delfines veracruzanos. Al Dr. Alexei Licea por las apasionantes discusiones en el ámbito de la inmunogenética. A la Dra. Gisela Heckel por sus acertados comentarios para “aterrizar” de lo molecular a lo ecológico. A la M. en C. Iris Segura por inspirarme durante el estudio genético de mis delfines y por apoyarme en todo momento como una hermana mayor.

A la Dra. Carmen Bazúa Durán, el M. en C. Eduardo Morteo Ortiz, el Dr. Alberto Delgado Estrella y la M. en C. Valentina Islas Villanueva por invitarme a participar en este proyecto.

Al Fondo Mixto CONACyT-Gobierno del Estado de Campeche por el financiamiento otorgado a la Dra. Carmen Bazúa Durán a través del proyecto CAMP-2003-C01-9102 para la obtención de biopsias de piel de *Tursiops truncatus* dentro del Área de Protección de Flora y Fauna Laguna de Términos. Para este muestreo fueron requeridos los permisos de la Dirección General de Vida Silvestre de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales SGPA/DGVS/01064 del 17 de febrero de 2006, SGPA/DGVS/00870 del 21 de febrero de 2007 y SGPA/DGVS/01344 del 12 de marzo de 2008, otorgados a la Dra. Carmen Bazúa Durán. A la empresa Vía Delphi S.A. de C.V. por el financiamiento otorgado al Dr. Alberto Delgado Estrella para la obtención de muestras de sangre de los tursiones en cautiverio.

A los colegas del laboratorio de Ecología Molecular y Evolutiva y a los investigadores del CICESE por el apoyo y aportación de ideas durante la realización del proyecto. Al M. en C. Rodrigo Morteo por el apoyo con los algoritmos computacionales. Al Dr. Eric Lynn de la Southwest Fisheries Science Center NOAA por la donación de la polimerasa de ADN *Phusion*.

A mis amigos Luis y Moni, al Cristian, a mi estrellita Abi y al *piccolo* por estar siempre presentes y brindarme una sonrisa. A mi familia, por todo lo significan para mí.

CONTENIDO

RESUMEN	<i>i</i>
Dedicatoria.....	<i>iii</i>
Agradecimientos.....	<i>iv</i>
Tabla de Contenido	<i>v</i>
Lista de Figuras	<i>vii</i>
Lista de Tablas.....	<i>ix</i>
Lista de Abreviaturas	<i>xi</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 <i>Estructura y función del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC)</i>	3
I.2 Evolución del MHC y generación de polimorfismo	9
I.3 <i>Métodos para genotipificación del MHC</i>	10
I.4 Estudios sobre polimorfismo del MHC en los cetáceos.....	11
I.5 <i>Estudios genéticos de <i>T. truncatus</i> en el Golfo de México y Mar Caribe</i>	15
I.6 <i>Hipótesis</i>	17
I.7 <i>Objetivos</i>	17
II. MÉTODOLOGÍA	18
II.1 <i>Esfuerzo de muestreo y colecta de tejidos</i>	18
II.2 <i>Esfuerzo de laboratorio</i>	19
II.2.1 <i>Extracción y purificación de ADN</i>	19
II.2.2 <i>Amplificación y secuenciación del exón 2 DQβ (MHC-II)</i>	20
II.3 <i>Caracterización de secuencias exón 2 DQβ de <i>T. truncatus</i></i>	24
II.3.1 <i>Alineamiento y edición de secuencias de los genotipos</i>	24
II.3.2 <i>Análisis computacional para la reconstrucción de alelos</i>	25
II.3.3 <i>Análisis de homología entre secuencias DQβ</i>	26
II.4 <i>Evaluación del polimorfismo en el exón 2 DQβ de <i>T. truncatus</i></i>	27
II.4.1 <i>Diversidad molecular: de nucleótidos a aminoácidos</i>	27
II.5 <i>Efecto de selección en la divergencia de secuencias exón 2 DQβ</i>	28
II.6 <i>Relaciones filogenéticas y patrón evolutivo trans-específico</i>	29

CONTENIDO (continuación)

V. RESULTADOS	31
III.1 <i>Esfuerzo de muestreo y colecta de tejidos</i>	31
III.2 <i>Caracterización molecular del gen DQβ en Tursiops truncatus</i>	33
III.2.1 <i>Extracción, amplificación y secuenciación del exón 2 DQβ</i>	33
III.2.2 <i>Comparación de secuencias Taq vs Phusion HF</i>	35
III.2.3 <i>Inferencia de alelos exón 2 DQβ a partir de genotipos diploides</i>	37
III.3 <i>Polimorfismo en el exón 2 DQβ de Tursiops truncatus</i>	41
III.4 <i>Efecto de la selección en la divergencia de secuencias exón 2 DQβ</i>	49
III.5 <i>Reconstrucción filogenética y patrón evolutivo trans-específico</i>	52
 VI. DISCUSIÓN	 55
IV. 1 <i>Caracterización molecular del gen DQβ en T. truncatus</i>	56
IV.1.1 <i>Comparación entre secuencias Taq y Phusion HF</i>	56
IV.1.2 <i>Reconstrucción de alelos con base en el método bayesiano PHASE</i>	57
IV.2 <i>Polimorfismo en el gen DQβ de T. truncatus</i>	58
IV.3 <i>Evidencias de selección estabilizadora sobre el gen DQβ</i>	60
IV.4 <i>Reconstrucción filogenética y patrón evolutivo trans-específico</i>	62
IV.5 <i>Implicaciones para la conservación de la especie</i>	62
 VII. CONCLUSIONES	 64
 VIII. LITERATURA CITADA	 65
 IX. APÉNDICES	 74

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		<i>Página</i>
1	Mapa genómico del Complejo Principal de Histocompatibilidad humano (HLA) en el que destacan las clases MHC-I y MHC-II, involucradas en la presentación de antígenos ante los linfocitos T.	4
2A	Diagrama de la estructura de una molécula MHC-I y su conformación tridimensional estabilizada con el péptido antigénico (modificado de Abbas <i>et al.</i> 2007).	5
2B	Diagrama de la estructura de una molécula MHC-II y su conformación tridimensional estabilizada con el péptido antigénico (modificado de Abbas <i>et al.</i> 2007).	5
3	Esquema representativo de la ruta de presentación de antígenos intracelulares mediante moléculas MHC-I ante los linfocitos T CD8 ⁺ citotóxicos (modificado de Abbas <i>et al.</i> 2007).	6
4	Esquema representativo de la ruta de presentación de antígenos extracelulares mediante moléculas MHC-II ante los linfocitos T CD4 ⁺ cooperadores (modificado de Abbas <i>et al.</i> 2007).	7
5A	Diagrama de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ que conforman la c-I PBR en la molécula MHC-I, presentados desde una vista superior. Se muestran los aminoácidos que interactúan directamente con el péptido del antígeno (modificado de Abbas <i>et al.</i> 2007).	8
5B	Diagrama de los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ que conforman la c-II PBR en la molécula MHC-II, presentados desde una vista superior. Se muestran los aminoácidos que interactúan directamente con el péptido del antígeno (modificado de Abbas <i>et al.</i> 2007).	8
6	Esquema del fenotipo costero de tursión <i>Tursiops truncatus</i> desde una vista lateral (tomado de www.ascobans.org)	15

TABLA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
7	Fotografía tomada durante el procedimiento de obtención de biopsias de piel de tursión.	19
8	Esquema del mapa genómico <i>DQB</i> caracterizado para <i>T. truncatus</i> . (modificado de Yang <i>et al.</i> 2007).	21
9	Análisis de secuencias exón 2 <i>DQB</i> de <i>T. truncatus</i> con base en los cromatogramas (tomado de CodonCode Aligner). Se muestran los criterios empleados para detectar sitios polimórficos a partir de genotipos diploides y asignar un código degenerado.	25
10	Esquema de la reconstrucción de alelos en individuos heterocigotos a partir de alelos conocidos, con base en el método bayesiano empleado en PHASE (modificado de Stephens <i>et al.</i> 2001).	26
11	Diagrama de flujo que muestra la metodología utilizada para aislar y caracterizar las secuencias exón 2 <i>DQB</i> de <i>T. truncatus</i> .	29
12	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con EtBr que muestra la cantidad y calidad de los extractos de ADN genómico de tursiones de distintas localidades.	34
13A	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con EtBr que muestra los fragmentos MHC-II amplificados vía PCR con <i>Taq</i> .	35
13B	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con EtBr que muestra los fragmentos MHC-II amplificados vía PCR con <i>Phusion</i> HF.	35
14	Diagrama de variabilidad en las secuencias de aminoácidos traducidas de los alelos exón 2 <i>Tutr-DQB*</i> con respecto a las láminas β plegadas y la hélice α (modificado de Hayashi <i>et al.</i> 2003).	49
15	Reconstrucción filogenética de Máxima Verosimilitud (ML) – Neighbor Joining (NJ) entre las secuencias nucleotídicas exón 2 <i>Tutr-DQB*</i> inferidas para <i>T. truncatus</i> y otros odontocetos.	53-54

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla</i>		<i>Página</i>
I	Estudios de variabilidad en el gen <i>DQβ</i> MHC-II en diversas especies de cetáceos.	14
II	Características de los oligonucleótidos cebadores universales utilizados para la amplificación parcial del exón 2 del gen <i>DQβ</i> MHC-II de mamíferos.	22
III	Tasas de error en la incorporación de nucleótidos por parte de las polimerasas de ADN <i>Taq</i> y <i>Phusion</i> HF. Condiciones estandarizadas para la realización de reacciones de PCR comparativas.	22
IV	Perfiles de termociclado programados para la amplificación parcial del exón 2 <i>DQβ</i> mediante PCR con base en los requerimientos de cada polimerasa de ADN (<i>Taq</i> vs <i>Phusion</i> HF).	23
V	Colección de muestras de tursiones costeros procedentes del Golfo de México y Mar Caribe utilizadas para el análisis del gen <i>DQβ</i> MHC-II.	31
VI	Esfuerzo de muestreo y de laboratorio. Se muestra el número de muestras obtenidas por localidad y el éxito obtenido en la extracción de ADN, la amplificación del exón 2 <i>DQβ</i> con las polimerasas de ADN (<i>Taq</i> vs <i>Phusion</i> HF) y la secuenciación.	33
VII	Evaluación de la genotipificación de los tursiones con base en la proporción de nucleótidos distintos detectados en sitios polimórficos de secuencias <i>Taq</i> vs <i>Phusion</i> HF.	36
VIII	Resultado de la reconstrucción de alelos <i>Tutr-DQB*</i> a partir de genotipos diploides mediante la utilización del algoritmo computacional PHASE.	38-39

LISTA DE TABLAS (continuación)

Tabla		Página
IX	Frecuencia relativa de los 28 alelos <i>Tutr-DQB*</i> inferidos por localidad y promedio.	40
X	Alineamiento de secuencias nucleotídicas de los alelos exón 2 <i>Tutr-DQB*</i> inferidos por PHASE. Se señalan los codones que codifican aminoácidos involucrados en la c-II PBR.	42-44
XI	Resultados de la genotipificación de los tursiones con base en las secuencias de mayor calidad obtenidas del ensayo con <i>Phusion</i> HF. Se muestran valores de diversidad genética por localidad y promedio.	45
XII	Alineamiento de secuencias de aminoácidos traducidos de los alelos exón 2 <i>Tutr-DQB*</i> . Se muestra la localización de los aminoácidos c-II PBR en las láminas β plegadas y la hélice α que conforman el dominio β 1 de la molécula MHC-II.	46-47
XIII	Análisis de polimorfismo en las secuencias nucleotídicas de los alelos exón 2 <i>Tutr-DQB*</i> y en las secuencias de aminoácidos correspondientes por localidad y total.	48
XIV	Evidencia de selección estabilizadora sobre las secuencias nucleotídicas de los alelos <i>Tutr-DQB*</i> con base en la obtención de razones d_N/d_S de los codones PBR, no PBR y totales.	51
XV	Prueba de neutralidad D de Tajima	48

ABREVIATURAS

A	Adenina	PBR	Región de Fijación al Péptido (<i>Peptide Binding Region</i>)
aa	Aminoácidos	PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico	pH	Potencial de Hidrógeno
ADNg	ADN genómico total	SDS	Dodecil sulfato de sodio
ADNmt	ADN mitocondrial	seg	Segundos
APC	Células Presentadoras de Antígenos (<i>Antigen Presenting Cells</i>)	T	Timina
ARS	Sitio de Reconocimiento del Antígeno (<i>Antigen Recognition Site</i>)	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
bp	Pares de bases nucleotídicas (<i>Base pair</i>)	TCR	Receptor de Linfocitos T (<i>T Cell Receptor</i>)
BSA	Albúmina del suero vacuno (<i>Bovine serum albumin</i>)	TE	Buffer Tris/EDTA
C	Citosina	TBE	Buffer Tris/Borato/EDTA
dNTPs	Desoxirribonucleótidos	Tutr	<i>Tursiops truncatus</i>
EtBr	Bromuro de Etidio	U	Unidades
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético	UV	Ultravioleta
G	Guanina	V	Voltios
Hp	Caballos de fuerza (<i>Horse power</i>)	COI	Citocromo oxidasa I
HCl	Ácido clorhídrico	kb	Kilobases
HF	Alta fidelidad (<i>High fidelity</i>)	kD	Kilodaltons
HLA	Antígeno leucocitario humano (<i>Human Leucocyte Antigen</i>)		
Ig	Inmunoglobulina		
LiCl	Cloruro de Litio		
M	Molar		
min	Minutos		
MgCl₂	Cloruro de Magnesio		
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)		
μl	Microlitros		
μg	Microgramos		
mg	Miligramos		
mM	Milimolar		
NaCl	Cloruro de sodio		
nm	Nanómetros		