

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

01621
48

**Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**ESTUDIO DEL ORIGEN GENÉTICO
DEL BURRO CRIOLLO MEXICANO (*Equus asinus*)
A TRAVÉS DEL ANÁLISIS DE LA
REGIÓN D-LOOP DEL DNA MITOCONDRIAL.**

TESIS

presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista

PRESENTA: .

Cristina Doreen López López

Asesores:

Dr. Rogelio A. Alonso Morales

MVZ. Aline S. de Aluja

México, D.F.

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

- A mis padres **J. Xavier López Tenorio y Marina López Trujano** por su apoyo, consejos y enseñanzas que me han brindado en todos los momentos de mi vida, sobre todo a mi madre mi agradecimiento y reconocimiento a una mujer que sabe luchar en la vida. Mi amor y respeto para ti mamá, todo lo que soy te lo debo a ti.
- A mi hermana **Claudia López López** por todos los momentos buenos que hemos compartido y por su compañía. Mi vida estaría vacía sin ti.
- A mis abuelos **Fernando López Trejo y Dolores Trujano de López** por apoyarme en todos los momentos y por su gran cariño.
- A mi prima **Ericks Cortes López** por todos los momentos felices que vivimos, por su compañía y amistad.
- A mi amiga **Yuria Jaramillo Oscoy y a su familia** por el cariño y apoyo en los momentos buenos y malos, que me han enseñado el valor de una amistad.
- A mis amigos **Mariano, Enrique, Lissette, Ramón, Gerry, Ricardo M, Rebeca, Luis, Ana, Felipe, Alejandra, Nadia, Kimsi y Roxana** por su amistad incondicional y brindarme tantos momentos felices en mi vida.
- A mi amigo **Pablo Mata Agredano** por el gusto de haberte conocido, gracias por todo el cariño y la confianza que depositas en mí, tú me enseñaste que todo es posible en la vida.
- A mis amigas y compañeras de siempre **Maya y Tedy** que han llenado mi vida de felicidad.

AGRADECIMIENTOS

- A mi asesora **MVZ. Aline S. de Aluja** por su apoyo incondicional en todo momento y por brindarme la confianza y conocimientos para realizar este proyecto, mi admiración y gratitud para usted por ayudarme a cumplir uno de los logros más importantes de mi vida, Muchas Gracias.
- A mis amigos y compañeros del programa DS-ILPH-UNAM **MVZ. Horacio, MVZ. David, MVZ. Alfredo, MVZ. María Elena, MVZ. Jaime, Angel y Marco** por brindarme su amistad, ayuda y conocimientos.
- A mis amigas **MVZ. Nelly, Isabel y Maribel** por su amistad incondicional y apoyo en todos los momentos.
- A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Genética Molecular **Refugio, Noé, Addi, Felicitas, Raúl Ulloa, Dalila, Simoné, Mario** por su amistad, apoyo y orientación académica.
- A mi asesor **Dr. Rogelio A. Alonso Morales** por su apoyo y orientación académica
- A todos mis amigos, profesores y compañeros que convivimos en España, en especial a **Juan Vicente Delgado Bermejo**, por brindarme su amistad y los conocimientos necesarios para la realización de esta tesis.
- A la **Dra. Patricia de la Torre** del Instituto de Investigaciones Biomédicas por la disposición para la realización de la parte de secuenciación de este trabajo.
- A la **Dra. Patricia Passch** por la facilitarme la muestra del burro Panchito.
- A todos **los dueños de los burritos muestreados** por su buena disposición en facilitarme las muestras obtenidas.
- A todos **mis maestros, profesores, familiares, amigos y compañeros** que a lo largo de mi vida sembraron las bases del amor y respeto por los animales.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
<hr/> CAPITULO I <hr/>	
INTRODUCCION.....	2
1.1 Origen de los Equidos (Género <i>Equus</i>).....	2
1.2 Los animales domésticos y el Descubrimiento de América.....	4
1.2.1 La importancia de las Islas Canarias en la Exportación de animales a América.....	5
1.2.2 La llegada de Nuevas Especies a América.....	6
1.3 La Introducción del Burro a América: México.....	6
1.4 Descripción de las Características Fenotípicas de las Razas Oficiales de Burros.....	7
1.4.1 AFRICA: Razas de burros originarias de Africa.....	7
1.4.2 ASIA: Razas de burros originarias de Asia.....	8
1.4.3 ESPAÑA: Razas de burros Españolas.....	9
1.4.4 FRANCIA: Razas de burros Francesas.....	11
1.4.5 ITALIA: Razas de burros Francesas.....	12
1.4.6 U.S.A.: Razas de burros de los Estados Unidos Americanos.....	13
1.5 Características de los burros criollos mexicanos.....	13
1.6 Diversidad Genética y estudio del origen de una población a través de una región del DNA mitocondrial: D-loop.....	15
<hr/> CAPITULO II <hr/>	
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	19
2.1 Hipótesis.....	19

2.2 Objetivos	19
2.2.1 Objetivo General.....	19
2.2.2 Objetivos Particulares.....	19

CAPITULO 3

METAS	20
--------------------	----

CAPITULO 4

MATERIAL Y MÉTODOS	21
4.1 Obtención de muestras sanguíneas	21
4.2 Purificación de ADN total a partir de sangre de cada una de las muestras obtenidas	21
4.3 Selección de muestras para secuenciación de ADN	21
4.4 Amplificación <i>in vitro</i> de la región D-loop del ADN mitocondrial mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	22
4.5 Purificación de fragmentos por Perlas de Silica	23
4.6 Secuenciación	24
4.7 Edición de las Secuencias y obtención de un consenso	24
4.8 Identificación de haplotipos	25
4.9 Análisis filogenético de las variedades criollas	26

CAPITULO 5

RESULTADOS	28
5.1 Amplificación de la región D-loop mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa(PCR)	28
5.2 Purificación de fragmentos	29

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

5.3 Análisis de las secuencias.....	29
<i>CAPITULO 6</i>	
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	43
<i>CAPITULO 7</i>	
CONCLUSIONES.....	45
<i>CAPITULO 8</i>	
LITERATURACITADA.....	46
<i>CAPITULO 9</i>	
ANEXOS.....	52
9.1 Anexo 1	
Técnica utilizada para la obtención de muestras sanguíneas.....	52
9.2 Anexo 2	
Purificación de ADN a partir de sangre.....	52
9.3 Anexo 3	
Preparación de Geles de Agarosa al 1%.....	53
9.3.1 En TBE 1X.....	53
9.3.2 En TAE 1X*.....	54
9.4 Anexo 4	
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	54
9.4.1 Condiciones de Reacción.....	54
9.5 Anexo 5	
Purificación de fragmentos a partir de geles de Agarosa.....	55
9.6 Anexo 6	
Reacción de Secuencia.....	56
9.7 Anexo 7	
Paso por columnas de Sephadex G50.....	56
Lista de Abreviaturas.....	57

INDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ESQUEMAS

Página

CUADROS

1. Procedencia de las muestras sanguíneas obtenidas en las diferentes regiones de los Estados de la República Mexicana.....	22
2. Números de acceso al GenBank de las secuencias obtenidas.....	25
3. Haplotipos del D-loop del ADNmt encontrados en razas de burros españolas y africanas.....	26
4. Frecuencia de los haplotipos encontrados entre los burros criollos mexicanos.....	30
5. Frecuencia de los haplotipos encontrados en los individuos estudiados, considerando un fragmento de 325pb y similitud con haplotipos españoles africanos.....	31
6. Frecuencia con que los 7 haplotipos de razas españolas y africanas se presenta en las diferentes regiones.....	37
7. Frecuencia con que los haplotipos mexicanos encontrados se presentan en las diferentes regiones geográficas muestreadas.....	38
8. Distancias filogenéticas entre los haplotipos mexicanos encontrados.....	39

9. Distancias filogenéticas entre los haplotipos españoles y africanos y los haplotipos mexicanos encontrados.....39

FIGURAS

1. Amplificación de la región D-loop de diferentes especies.....28

2. Fragmentos correspondientes a la región D-loop de burros muestreados.....29

3. Posiciones nucleotídicas encontradas en los diferentes haplotipos estudiados.....36

4. Relaciones filogenéticas entre los burros criollos mexicanos muestreados, el burro Siciliano y el Caballo..... 41

5. Relaciones filogenéticas entre los haplotipos de burros criollos mexicanos encontrados y los 7 haplotipos de razas españolas y africanas, la secuencia del burro Siciliano y la del Caballo.....42

ESQUEMAS

1. Alineación de haplotipos encontrados de 541 pb de de burros criollos mexicanos31

2. Alineación que muestra las sustituciones nucleotídicas entre los 7 haplotipos de razas asnales españolas y africanas y los haplotipos de burros criollos mexicanos..... 34

RESUMEN

LOPEZ LOPEZ CRISTINA DOREEN: Estudio del origen genético del burro criollo mexicano (*Equus asinus*) a través del análisis de la región D-loop del DNA mitocondrial.

Bajo la dirección del Dr. Rogelio A. Alonso Morales y MVZ. Aline S. de Aluja.

Las poblaciones de burros criollos mexicanos se han encontrado sin programas de mejoramiento genético desde la introducción de estos animales domésticos a México, a través de los años se les ha incorporado a trabajos de campo, carga y transporte, entre otros quehaceres.

Han sido criados en forma tradicional, distribuidos por toda la República Mexicana, principalmente en áreas rurales y urbanas donde existen comunidades en extrema pobreza.

Actualmente son animales criados en condiciones extremas: mal nutridos, sobre-explotados y con jornadas de trabajo largas, pero las condiciones del campo mexicano requieren de sus servicios ya que la economía del campesino marginado no permite que sean reemplazados por maquinaria agrícola por lo que constituyen una ayuda valiosa. Son considerados animales de carga y sin valor para llevar a cabo estudios genéticos en nuestro país.

Los burros criollos mexicanos no se encuentran catalogados dentro de alguna raza, y en cualquier región geográfica se les conoce como criollos. Se desconoce que tanta diversidad genética existe entre las distintas poblaciones, además de no existir datos acerca de que tan parecidas ó distantes son las variedades con respecto a razas asnales establecidas en otros países, por lo mismo existen dudas sobre su origen genético.

El objetivo de éste trabajo fue analizar el origen genético del burro criollo mexicano, así como su diversidad genética, al compararlo con razas de burros españolas y africanas, por medio de la región D-loop del DNA mitocondrial. Para esto se purificó el ADN genómico de 68 burros criollos mexicanos de 8 regiones geográficas en 6 Estados de la República Mexicana y un burro Siciliano. Mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se amplificó un fragmento correspondiente a 541 pb correspondiente a la región más informativa del DNA mitocondrial: D-loop, posteriormente los fragmentos fueron secuenciados.

Las secuencias analizadas revelaron 10 haplotipos mexicanos nuevos y diferentes a los haplotipos de razas asnales españolas y africanas con los cuáles se compararon, indicando niveles altos de diversidad genética. El análisis de las relaciones filogenéticas en las diversas variedades criollas, determinaron una tendencia del origen hacia razas españolas, principalmente la raza Andaluza, Zamorano-Leonesa y Majorera de las Islas Canarias, y estas a su vez muestran un origen africano, por lo que se obtuvieron 7 haplotipos mexicanos y 3 haplotipos similares a los analizados por Aranguren *et al* (53) de razas españolas y africanas.

Este trabajo en una forma preliminar permite concluir que el origen de las poblaciones de burros criollos mexicanos en los diferentes Estados de la República Mexicana es de clara ascendencia ibérica, siendo la principal raza asnal española Andaluza la que dio origen a las poblaciones de burros criollos mexicanos, seguidas por las razas españolas Zamorano-Leonesa y Majorera de las Islas Canarias y que las poblaciones poseen altos niveles de diversidad genética.

CAPITULO 1

- INTRODUCCIÓN -

El burro (*Equus asinus*) ha estado en contacto con la humanidad a lo largo de su historia por ser uno de los primeros animales domesticados (1). Ha colaborado con el hombre en diferentes actividades como tracción de instrumentos agrícolas, tracción de vehículos, cabalgadura, carga, producción mulatera (2), hasta llegar a nuestros días a ser un animal de compañía y uso terapéutico para determinadas enfermedades psicomotoras, así como para acercar a la gente a la naturaleza y promover el respeto por los animales (3).

Se estima que en México existen 3,270,000 burros (4) dedicados a diferentes labores, distribuidos por toda la República Mexicana, habitando principalmente en áreas rurales y urbanas donde existen comunidades en extrema pobreza que necesitan de sus servicios. Son animales sumamente útiles, pero han sido ignorados en nuestro país. En México poco se conoce sobre su diversidad genética, no se sabe que tan homogéneos son los distintos grupos poblacionales de las diferentes regiones geográficas, ni se tienen datos de que tan parecidas ó distantes son las variedades criollas con respecto a razas establecidas en otros países. Por lo tanto se requiere conocer su diversidad y origen genético que presentan, tomando en cuenta que son un patrimonio único.

1.1- Origen de los Équidos (Género *Equus*) -

El burro es un vertebrado que pertenece a la Clase Mammalia (mamíferos), Subclase Placentarios, Orden Perissodactyla (Ungulados Perisodáctilos, grupo que también incluye a los caballos, cebras, rinocerontes y los tapires). Se incluyen en la familia Equidae (junto con el caballo y cebra).

Toda esta familia se caracteriza por tener un único dedo con un ancho casco en cada extremidad, del Género *Equus* y Especie *asinus* (5).

La familia de los équidos, entre los que se encuentra el burro, tiene a su más antiguo antecesor a *Hyracotherium* (antes conocido como *Eohippus*) derivado del griego *hyrax* que designa el dermán o marmota de las rocas y *thaer* que significa animal o mamífero. Tuvo su origen hace unos 60 millones de años (6,7) en Norteamérica, desde donde se extendió por tierra hasta Europa (en la época en que los continentes todavía no estaban separados por el Océano Atlántico) (8). Este animal tenía una alzada entre 25 a 50 cm de altura, con un peso aproximado de 5.5 Kg (7), con 4 dedos en las extremidades anteriores y tres en las posteriores (9,10), todos ellos provistos de fuertes uñas y una almohadilla semejante a la que tienen los perros actuales, ésta característica prevalece en el caballo moderno en forma de callosidad llamada cemeja, lo que sugiere que *Hyracotherium* vivió en un ambiente con suelos blandos muy similares a los que hay en las selvas tropicales o en las orillas de los pantanos, alimentándose de hojas blandas y carnosas (7). Los trastornos climáticos implicaron una evolución gradual de *Hyracotherium* y lo obligaron a adaptarse a las transformaciones del ambiente donde ahora sus miembros debían acostumbrarse a suelos más duros y rocosos, propios de un bosque con llanuras abiertas, diferentes al de suelo húmedo de su antiguo hábitat, por lo que sus miembros se alargaron y desarrolló más velocidad (8), ya que al tener planicies abiertas debían capacitarse para la huida de sus predadores (10). Cuando esto aconteció, sus dedos laterales 2° y 4° no tocaban el suelo por lo que lentamente se atrofiaron quedando apenas los huesos que los fijaban, permaneciendo un dedo único, 3° en posición central, el cuál creció y se reforzó (10). De igual forma su dentición se transformó debido a que los molares ejercían un trabajo más intenso, por lo tanto se desarrollaron, ya que su nutrición fue basándose en forraje más denso (7,8). Poco a poco, se desarrolló en un équido de un solo dedo, con un cuerpo más grande, extremidades más largas, de cabeza y mandíbulas más alargadas(8). Durante estos cambios pasó por diferentes

ancestros a lo largo del tiempo: *Orohippus*, *Epihippus*, *Mesohippus*, *Miohippus*, *Parahippus*, *Merychippus* (6) y fue hasta fines del Pleistoceno donde *Dinohippus* (8,11) el directo predecesor del actual caballo, aunque algunos autores lo mencionan como *Pliohippus* (6,7), desapareció tras una intensa época glaciaria en América y se refugió en Asia, Europa y África donde llegó a través del Estrecho de Behring, siendo los sobrevivientes los que posteriormente pondrían las raíces de la especie en todo el mundo (5,8,12).

El tipo de caballo de un solo dedo se conoce como *Equus* y es el antepasado del caballo actual y de sus parientes, el burro y la cebra (8).

No se conoce, de manera exacta, el momento en que en la familia de los équidos se origina el burro. Existe evidencia de una divergencia evolutiva entre el burro y el caballo entre 8 a 10 millones de años, pudiendo afirmar una relación más cercana entre el burro y la cebra que con el caballo (13).

El burro doméstico actual tiene dos ascendentes: el *Equus asinus africanus* (asno silvestre de África) del cual existieron 2 subespecies distintas: La Nubia originaria del Norte entre la costa del Mediterráneo y el desierto del Sáhara y la Somalia, originaria del Sureste del Mar Rojo. El otro antecesor es el asno silvestre de Asia también llamado hemion, el cual se extendió desde el Mar Rojo hacia el Norte de la India y el Tíbet y de los cuales se distinguen subespecies como el Sirio procedente del Noroeste de la India, el Onagro (*Equus hemionus onager*) procedente de Persia, el Kulán (*Equus hemionus hemionus*) de Mongolia y el Kiang (*Equus hemionus kiang*) procedente del Tíbet (14,15, 16), aunque otros autores mencionan su origen a partir únicamente de burros africanos: Nubia y Somalia (17). El burro fue domesticado alrededor de 3000 años a. C. en el Noreste de África (18).

1.2- Los animales domésticos y el Descubrimiento de América -

La gente de América no conocía nada acerca de los animales domésticos europeos. Con la llegada de los españoles todo cambió: los animales nuevos fueron rápidamente

dispersados, primero en las Antillas y después en el Continente, donde fue transformado un lugar libre de animales de granja en un lugar con gran variedad de especies y razas, hasta llegar en ciertas ocasiones a formar plagas. Esto fue el comienzo de los enormes cambios en la fauna del Nuevo Mundo.

Generalmente los nuevos productos españoles, como los animales domésticos, para su exportación a América siguieron dos principales rutas: La primera ruta fue de los puertos del Sur de España (Sevilla, Cádiz, Sanlúcar, Puerto de Santa María, etc.) haciendo una parada en las Islas Canarias y la segunda ruta fue de estos puertos llegando directamente a las Antillas, por lo que permite pensar que la mayoría de los animales exportados pertenecían a éstas regiones del Sur de España, aunque hay datos sobre animales de otras regiones que también fueron traídos a América, estos ocupaban áreas de descanso cercanos a los puertos donde esperaban para el embarque, pero predominaban sobre todo en los primeros años de conquista, animales del Sur de España (19,20).

1.2.1 La importancia de las Islas Canarias en la Exportación de animales a América.

Las islas Canarias fueron una parada necesaria en el viaje rumbo a América.

Los españoles encontraron habitadas estas Islas por gente llamada "Guanches" originaria de África. Los "Guanches" se dedicaban principalmente a la crianza de animales y se menciona que ahí ya existía la presencia de cabras, cerdos, ovejas y gran abundancia de perros, por lo que se le dio el nombre a estas Islas de Canarias proveniente del latín *canis*. Las características de ese ganado ya existente en esas islas mostraban claras raíces africanas.

La localización de este archipiélago como punto de cruce entre los continentes marcó un sitio muy importante en la historia de los animales domésticos ya que se tomó como punto de control y resguardo de varias especies para su posterior traslado a América, lo que hizo que existieran una serie de cruces entre las diversas razas mientras se realizaba el futuro embarque (19).

1.2.2 La llegada de Nuevas Especies a América

Desde el primer viaje de Colón, las Antillas fueron el punto de llegada. Éste archipiélago fue estratégicamente ocupado por las expediciones; se convirtió en el punto de entrada y salida, encuentro de barcos, de exploradores, animales y productos provenientes de España. Aquí fue el punto de introducción de ciertas razas de animales domésticos, como el ganado andaluz, donde fueron reproducidos e incrementados por primera vez en América.

Se sabe que Cristóbal Colón durante su segundo viaje a América llevó algunos animales domésticos provenientes de Cádiz. Esta expedición estuvo formada por 17 barcos y fue iniciada el 25 de Septiembre de 1493. Indudablemente llevó burros, pero durante este viaje, Colón hizo una parada en la Gomera donde permaneció 2 días tomando provisiones de varios animales domésticos, ya que él prefería llevar animales de Canarias y así evitar las pérdidas durante la navegación Cádiz- Canarias. De cualquier modo pocos animales llegaban vivos a su destino. América, principalmente por el espacio limitado en los barcos y por ser un viaje tan largo (2 meses), servían como fuente de alimento a los tripulantes.

Rápidamente toda la diversidad de especies fue distribuida y aumentada, debido a la gran adaptación que tuvieron las especies domésticas en América, desde las primeras crónicas de estos viajes se menciona la eficacia reproductiva de ellas (19,20,21).

1.3 - La Introducción del Burro a América: México -

Los burros fueron traídos desde España a América durante el segundo viaje de Cristóbal Colón en 1493 llegando a Las Antillas; esta introducción inicial fue incrementada durante el tercer viaje en 1494 teniendo como sitio de llegada Las Antillas y Orinoco (19,2).

La introducción de burros en México ocurrió en 1531, cuando se dispuso que se enviaran a México 12 borricas con 3 machos para padrear, *Ramírez Fuenleal*, por decreto de la reina Isabel, pedía 300 borricas al año siguiente para dárselos a los

indígenas ya que estos no tenían permiso de montar caballos, por lo que adquirirían burros. En 1538 se hizo otro embarque de burros a la Nueva España (2).

En un principio fueron utilizados solo con fines reproductivos, para generar mulas y a través de los años se han incorporado a los trabajos del campo mexicano como jalar arado, carretas, transporte, carga de agua, leña, entre otros quehaceres, principalmente en comunidades de extrema pobreza (22). En general, actualmente son animales mal nutridos, sobre-explotados y con jornadas de trabajo largas, sin embargo las condiciones del campo mexicano requieren de sus servicios, ya que ni la conformación de los terrenos ni la economía del campesino marginado permite que sean reemplazados por maquinaria agrícola por lo que constituyen una ayuda valiosa (23,24).

1.4 - Descripción de las Características Fenotípicas de las Razas Oficiales de Burros.-

En varios países existen razas establecidas de recursos genéticos asnales. En el caso de Inglaterra, Francia, España se han creado asociaciones para el cuidado y bienestar del burro (16), como por ejemplo ADEBO (Asociación para la Defensa del Borrico) en España, que trata de recuperar razas asnales en peligro de extinción, The Donkey Sanctuary en Inglaterra, que cuida y resguarda a burros, ADDA (Asociación para la Defensa de los Derechos del Animal) en España, que se involucra en bienestar y defensa de los burros, FNAR (Fédération Nationale Anes et Randonnées) en Francia, que da resguardo a burros lastimados, por mencionar algunas (25,26). Ya que han sido declarados como especie protegida y en peligro de extinción, debido a que se cuenta con un escaso número de animales de las razas existentes (27,28,29,30).

1.4.1 AFRICA

Razas de Burros originarias de Africa

El burro silvestre de Africa dio origen a la mayoría de razas asnales (27), se encuentra en Eritrea, Etiopía y Somalia en el continente Africano. Actualmente

quedan muy pocos de estos burros estimándose unos 3.000 individuos, ya que es cazado por habitantes locales para fuente de alimento y su piel es utilizada para fabricar un cuero especial llamado zapa (16).

Se conocen dos subespecies diferentes.

A) Burro Nubia (*Equus asinus africanus*)

Es originario del Norte de Africa entre la costa del Mediterráneo y el Desierto del Sahara, es de talla pequeña, llegando a medir 1.25 m de altura, el pelaje es de color gris durante el invierno y en verano es de color rojizo, además presenta una línea delgada que recorre el dorso sobre la columna y cae en ambos miembros anteriores semejando una cruz, no presenta rayas en los miembros (14,15).

B) Burro Somalense (*Equus asinus somaliensis*)

Su origen es al Sureste del Mar Rojo, es de talla pequeña llegando a medir entre 1.25 m de altura y 1.45 m, tiene orejas muy largas, su pelaje es gris con el hocico y las partes inferiores blancas, durante el verano su pelaje es color amarillo, tiene una crin de pelo corto y erecto, se caracteriza por tener franjas negras y blancas en las patas, no presenta cruz sobre el lomo (14,15,16).

1.4.2 ASIA

Razas de Burros originarios de Asia

Los burros silvestres asiáticos, también llamados hemiones, tienen orejas más pequeñas que las subespecies africanas. El pelaje suele ser pardo-rojizo pero también se pueden encontrar individuos amarillentos ó grises.

Se originaron en un área mucho mayor que los burros africanos, extendiéndose desde el mar Rojo hacia el Norte de la India y el Tíbet, teniéndose que adaptar a diferentes climas, altitudes y terrenos, por lo que no existe un tipo único de burro silvestre asiático. Se distinguen 4 subespecies (14).

A) Onagro (*Equus hemionus onager*) procedente de Persia, es de color claro, llegando a medir 1.22 m (15,16).

- B) **Kiang** (*Equus hemionus kiang*) procedente de la Altiplanicie del Tibet hasta el Norte de los Himalayas, sus características son semejantes a las del caballo, orejas cortas y cascos más redondeados, su altura es de 1.43 m (14,15,16).
- C) **Kulán** (*Equus hemionus hemionus*) procedente de Mongolia, mide 1.30 m, presenta únicamente una raya ancha y bien demarcada sobre el lomo (14,15,16).
- D) **Sirio** procedente del Noroeste de la India, su altura es de menos de 1 m (14,15,16).

1.4.3 España

Razas de Burros Españolas

Las razas asnales españolas derivan de dos ancestros: el burro Nubia (*Equus asinus africanus*) y el burro somaliense (*Equus asinus somaliensis*), quienes dieron origen a la mayoría de razas de burros europeas. (27,15), aunque se sustenta la teoría de dos ancestros diferentes: uno que corresponde al burro proveniente del Noreste de África (*Equus asinus africanus*) y el otro es el burro europeo (*Equus asinus europeus*) quien es originario del archipiélago español del Mediterráneo occidental, Islas Baleares (27).

Todas estas razas se encuentran en serio peligro de extinción (27,28,29,30).

A) Burro Zamorano- Leonés.

Se encuentra en la provincia de Zamora y norte de Salamanca, al oeste de España. Es un burro bien conformado y corpulento. Se caracteriza por el color oscuro de su capa (negra sucia), cabeza voluminosa y por su gran abundancia de pelo sobre la frente, contorno de las orejas, contorno de los ojos y parte inferior del vientre. Su perfil es recto y las órbitas de los ojos muy marcadas. Tiene una altura promedio entre 1.50 y 1.60 m. Se encuentra en serio peligro de extinción(16).

B) Burro Cordobés o Andaluz.

Originado a partir de *Equus asinus africanus*, pero influido genéticamente por el

onagro asiático. Proviene de Egipto y fue introducido a España por el Norte de Africa. Se encuentra principalmente en la provincia de Córdoba, al sur de España. De conformación armónica y robusta, tiene perfil subconvexo, cuello musculoso, cruz alta, tronco cilíndrico y grupa redondeada, su temperamento es tranquilo. El color de su capa es gris claro, con pelo corto y fino, cabeza con frente ancha y órbitas salientes. Son robustos y de gran alzada tanto en machos como en hembras, llegando hasta 1.60 m de alzada en machos y 1.50 m en hembras. Poseen rodillas amplias y es un burro muy aclimatado al calor y a la escasez de agua. Se encuentra en serio peligro de extinción (16,28,29).

C) Burro Catalán

Se encuentra en Cataluña, al noreste de España. Son animales fuertes, de gran talla, su tronco es alargado y el pelaje de tonalidad oscura. Alcanza una altura de hasta 1.62 m. Es muy utilizado para la producción de mulas (16).

D) Burro de las Encartaciones

Se encuentra en las Encartaciones, en la zona límite entre la provincia de Vizcaya y la de Santander, al norte de España. Son burros proporcionados, de pequeño tamaño que no supera los 1.20 m de alzada, el color de la capa es castaño y negro con degradaciones de color alrededor del hocico, alrededor de los ojos y vientre, además pueden presentar una línea que recorre la columna vertebral y las escápulas de color oscuro (que asemeja una cruz), poseen orejas menudas y cascos pequeños. Se encuentra en serios peligros de extinción (16).

E) Burro Majorero de las Islas Canarias

Procedente del Noroeste Africano que se adaptó a las Islas Canarias. Son animales muy rústicos, con pelaje grisáceo oscuro y claro, llegando a medir 1.10 m y un peso de 100 a 150 Kg (16).

F) Burro Mallorquín

Se encuentra en el archipiélago español de las Islas Baleares, principalmente en la capital Palma de Mallorca. Esta muy relacionada tanto histórica como

genotípicamente con la raza Catalana, por lo que muestran comunes ancestros (27). Es un burro de pelo largo fenotípicamente semejante al Zamorano-Leonés y al Poitou francés. Esta raza ha desaparecido ó esta muy cerca de hacerlo (16).

1.4.4 FRANCIA

Razas de Burros Francesas

A) Burro Poitou

Se distingue por su gran tamaño, su alzada esta por encima de 1.50 m, son de constitución pesada entre 350 a 450 kg. y su capa de pelo es café oscura. Son utilizados para la producción de mulas principalmente (14).

B) Burro de los Pirineos

Son burros con cabeza de gran tamaño, nariz afilada y arcos orbitales muy anchos. Su alzada es de 1.25 m en hembras y en machos es de 1.30 m, el pelaje es negro mal teñido, en ocasiones puede ser bayo pardo con zonas grises alrededor de los ojos, boca, entrepierna y bajo en vientre (11).

C) Burro Normando

Llegan a medir 1.10 m, su pelaje es de color claro a bayo pardo, presentan una línea que asemeja una cruz sobre el lomo (11).

C) Burro Provenza ó de Saboya

Miden entre 1.20 a 1.30 m, su pelaje es color gris rata claro con una coloración pelirroja ó rosada sobre la frente, orejas y alrededor de los ojos, el extremo de la nariz es blanco, el contorno de los labios es negro y las orejas son anchas, presenta una línea bien marcada de color oscuro que asemeja una cruz sobre el lomo (11).

D) Burro Cotentin

Miden de 1.20 a 1.35 m los machos y las hembras entre 1.15 a 1.30 m, su pelaje es gris fuerte, con partes claras en el vientre, tiene bien definida una cruz sobre el lomo y algunos presentan rayado sobre las extremidades (11).

E) Burro grande negro del Berry

Su altura mínima es de 1.35 m en machos y 1.30 m en las hembras, su pelaje es uniforme de bayo pardo a bayo oscuro, incluso negro, sin la línea de cruz sobre el lomo ni rayado en patas, el contorno de los ojos, el extremo de la nariz, su vientre junto con la ingle y el interior de los muslos es gris blanco (11).

1.4.5 Italia

Razas de Burros Italianos

A) Burro Martina Franca

Se encuentra en la región de Apulia, sus orígenes pueden partir de la raza de burro español Catalana, tienen una alzada entre 1.45 y 1.50 m, es de constitución pesada y su pelaje es color negruzco, muy usado para generar mulas (14).

B) Burro Ragusa

Es una raza que se encuentra en Sicilia, son de pelaje negro con el vientre café, tienen una alzada entre 1.40 a 1.45 m los machos y las hembras entre 1.35 a 1.38 m (14).

C) Burro Pantelleria

Su pelaje es negro ó café oscuro, la cabeza es pequeña y delgada, es un animal muy nervioso, tienen una alzada entre 1.25 a 1.30 m (14).

D) Burro Amiata

Se encuentra en las provincias de Toscana, su pelaje es gris con una cruz oscura sobre el lomo y rayas en las patas, tiene una alzada de 1.35 m, se encuentra en peligro de extinción (14).

E) Burro Asinara

Se encuentra en la Isla Asinara, la mayoría de estos burros son blancos y frecuentemente tienen ojos azules, son de alzada pequeña entre 80cm a 1 m (14).

F) Burro Siciliano ó de Sardinia

Es un burro nativo de las Islas Mediterráneas Sicilia y Sardinia, se conoce como Burro Mediterráneo Miniatura, es pequeño con una alzada entre 85 cm a 1.15 m, su peso se encuentra entre 90 a 130 Kg, su pelaje es gris con vientre blanco y tienen una raya negra sobre el lomo que descende sobre los miembros anteriores semejando una cruz, la mayoría tiene marcas negras en las orejas, en la punta de la cola y alrededor de los cascos (31.14).

1.4.6 U.S.A.

Razas de Burros de los Estados Unidos Americanos.

A) Burro American Mammoth Jack.

La influencia de las razas españolas en estos animales es notable, burros de gran tamaño comenzaron a introducirse a Norteamérica durante la presidencia de George Washington cuando le regalaron dos burros catalanes de parte de los Reyes de España, estos burros fueron parte integral del desarrollo de la raza American Mammoth Jack (21).

Es un burro de gran tamaño las hembras miden 1.50 m y los machos por encima de 1.60 m y pueden llegar a tener una alzada de hasta 1.80 m, son de conformación pesada, en el pasado eran de pelaje negro con algunas marcas blancas pero ahora podemos encontrar cafés y grisáceos. Se utilizan para la producción de mulas y para la monta, llegando a tener en el mercado un precio bastante elevado (21.31).

1.5 - Características de los burros criollos mexicanos -

En México los burros no se encuentran catalogados dentro de alguna raza, en todas las regiones se les conoce como burros criollos.

Se encuentran distribuidos por toda la República Mexicana, presentando buena adaptación a los climas cálidos y áridos (32,33), pero los encontramos principalmente en áreas rurales y urbanas donde existen comunidades en extrema pobreza.

Son criados en forma tradicional, alimentándose de rastrojo de maíz, paja de avena, salvado y/o trigo, y ocasionalmente alfalfa achicalada ó bajo un sistema de pastoreo poco tecnificado, es decir, dejándolos pastar en el campo sin supervisión alguna, esto es de acuerdo a la zona geográfica del país y a la economía de su dueño.

En las poblaciones de burros criollos mexicanos, los colores predominantes son el gris (pardo) en diferentes tonalidades, el café (canelo) el cuál es muy común y el ruano que es una mezcla de pelos blancos con pelos de otro color, además existen otros colores como blanco (palomo) y negro (prieto). Algunos pueden presentar "una cruz" (línea que recorre el dorso sobre la columna y cae en ambos miembros anteriores semejando una cruz) que es una característica del burro, aunque no la observamos en todos los animales.

La alzada es la medida que se toma desde el punto más alto del cuerpo, que es donde se une el cuello con el lomo, conocido como la cruz y se mide en manos, cada mano equivale a 4 pulgadas (10cm) (14,15).

La clasificación de burros criollos hecha por Metz *et al* (11), de acuerdo a su alzada es:

Burro grande su alzada promedio se encuentra entre 1.30 a 1.55 m

Burro mediano su alzada promedio es entre 1.10 a 1.30 m

Burro pequeño su alzada promedio se encuentra entre .90 a 1.10 m

Burros enanos en promedio no alcanzan una alzada de .90 m.

La alzada promedio de la mayoría de los burros mexicanos es entre 91 cm a 1.16 m y su peso promedio es de 150 Kg.

No tienen espejuelos en la patas, sus orejas son largas y erectas, de crin corta, su cruz es plana y más baja que la grupa (32,34). Cuentan con 21 pares de cromosomas(35).

1.6 - Diversidad Genética y Estudio del origen de una población a través de una región del DNA mitocondrial: D-loop.-

La diversidad genética se define como la variación en la constitución genética existente entre y dentro de las poblaciones, se debe a cambios en la secuencia de nucleótidos en el ADN que se dan por mutaciones tales como: deleciones (eliminación de nucleótidos), inserción (adición de nucleótidos), translocaciones (cambio en la posición de un segmento de un cromosoma dentro de él mismo ó con otro cromosoma) ó inversiones (inversión de un segmento en un cromosoma), así como sustituciones de nucleótidos como las transiciones(36) (intercambio de una purina (adenina ó guanina) por la otra ó una pirimida (citocina ó timina) también por la otra) y las transversiones (sustitución de una purina por una pirimida ó a la inversa) (37).

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

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

Una de éstas metodologías es el uso de marcadores genéticos que pueden ser morfológicos ó moleculares (36).

- **Los marcadores morfológicos** se basan en las características fenotípicas tales como el color, la forma, el tamaño, etc., pero no son confiables ya que pueden enmascarar el efecto del gen ó genes de interés debido a que son afectados por condiciones ambientales, además de que un gen puede enmascarar la acción de otro (36).

- o **Los marcadores moleculares** permiten la identificación de todos los posibles genotipos sin ser afectados por condiciones ambientales.

Se dividen en marcadores proteicos y marcadores de ADN.

- Los marcadores proteicos se basan en la evolución de enzimas activas que son separadas por electroforesis en geles no desnaturalizantes de agarosa y acrilamida. La diversidad de enzimas en los diferentes individuos puede ser observada ya que, debido a los cambios en la composición de aminoácidos y en su estructura alteran su movilidad electroforética. Estos marcadores tienen varias desventajas, ya que para cada sistema enzimático se requieren procedimientos de extracción y de tinción específicos, por lo que el número de marcadores que se obtiene es insuficiente porque presentan poco polimorfismo (36).
- Los marcadores de ADN pueden ser estudiados a partir de muestras pequeñas de ADN extraído de cualquier tejido y provenientes de animales de cualquier edad, además de que el ADN puede conservarse indefinidamente (38). Entre los marcadores de ADN se encuentran los RFLP'S ("Restriction Fragment Length Polymorphism"), minisatélites, microsátélites y el ADN mitocondrial (ADNmt). La variación natural de estos se puede detectar por medio de enzimas de restricción, ampliación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR ("Polymerase Chain Reaction") y secuenciación directa de los nucleótidos del ADN(36).

Para nuestro estudio es sumamente útil el ADN mitocondrial (ADNmt) que se localiza en el compartimento matricial de la mitocondria (39), que en el caso de los mamíferos es una molécula circular con aproximadamente 16.5 Kb (40,41), específicamente la secuencia completa de un burro es de 16,670 pb (42,13), en

comparación con el ADNmt de levaduras y plantas que van de cientos a miles de kilobases, ésta diferencia se debe a la variación en el número de secuencias repetidas(39).

El ADNmt es heredado de forma materna principalmente y no sufre recombinación genética, por lo que todos los descendientes de una hembra heredan la misma molécula de ADN mitocondrial, estableciéndose un linaje materno que permite trazar el origen de los individuos y de las poblaciones (40,41,42,43,44,45). Por otro lado se sabe que en el ADNmt de los mamíferos, la tasa de sustitución de nucleótidos es 10 veces más rápida que la del ADN nuclear (43), lo cuál incrementa el nivel de cambios en la secuencia nucleotídica, parámetros útiles para el estudio de la diversidad genética en una población (40,42,43,46). Además se sabe que las mutaciones en el ADN mitocondrial son una importante causa de enfermedades humanas como oftalmoplejia, Diabetes mellitus, fallas cardiacas, por lo que es una fuente importante de estudio (47).

El ADNmt contiene genes que codifican las subunidades del Citocromo C oxidasa (CO1,CO2,CO3), las subunidades 6 y 8 del complejo ATPasa, cinco subunidades para la NADH deshidrogenasa, genes que codifican varios tipos rRNAs, tRNAs y una región no codificante denominada región control, conocida como *D-loop* (13,36,46,48,49).

El *D-loop* es típicamente la región más variable del ADNmt (la tasa de sustitución nucleotídica en esta región es 10 veces mayor que en el resto de las regiones del ADNmt) (41). Las mutaciones en la región *D-loop* se han usado como marcadores para el estudio evolutivo de poblaciones en diversas investigaciones (40,42,43,45,48,50). Se encuentra situada entre los genes que codifican para el RNA de transferencia de prolina (tRNA^{pro}) y el RNA de transferencia de fenilalanina (tRNA^{phe}) y tiene una longitud de 1.3 Kb (46,36). La región *D-loop* del ADNmt en mamíferos, esta integrada por una serie de repetidos en tándem llamados RS1,RS2,RS3,RS4 y RS5, un sitio de origen de replicación de la cadena pesada, tres

bloques conservados (Conserved Sequence Blocks CSB1,CSB2,CSB3) y una región central conservada que se piensa esta involucrada con la regulación de la replicación(36,46,48,51).

Debido a la alta variabilidad en el ADNmt, este se ha usado como una herramienta importante para determinar el polimorfismo, origen y evolución de diferentes poblaciones de cerdos (40,42,43,48,36), búfalos, bovinos, caballos (41,44,45,46,50,52) y ahora de burros (13,27,53).

Considerando que no se conoce el origen genético de los burros criollos mexicanos, se emprendió el presente estudio con base en la secuenciación de la región *D-loop* del ADNmt.

CAPITULO 2

- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS -

2.1 - Hipótesis -

Debido a que las diversas poblaciones de burros criollos mexicanos (*Equus asinus*) han sido criadas sin programas de mejoramiento genético y sin programas de selección desde su introducción a México, se pueden encontrar niveles altos de diversidad genética así como determinar su posible origen genético.

2.2 - Objetivos -

2.2.1 Objetivo General

Estudiar la diversidad genética, las relaciones filogenéticas y el posible origen genético del burro criollo mexicano (*Equus asinus*) entre las diversas poblaciones, utilizando como marcador genético una porción de la región del D-*loop* del ADN mitocondrial y comparar esta misma región en razas de burros europeas y africanas.

2.2.2 Objetivos Particulares

- I. **Obtener la secuencia de nucleótidos de una región del D-*loop* del ADNmt en las variedades criollas del burro mexicano procedentes de diferentes regiones del país.**
- II. **Analizar las relaciones filogenéticas entre las diversas poblaciones de burros criollos mexicanos, algunas razas de burros españoles y africanas.**

CAPITULO 3

- METAS -

1. Obtener 69 muestras sanguíneas de 8 regiones de seis Estados de la República Mexicana, purificación de ADN total y cuantificación.
2. Amplificación de un segmento de 541 pb del D-*loop* en 4 muestras de cada región geográfica (N=27).
3. Purificación de la banda amplificada y secuenciación del segmento en las 2 cadenas.
4. Edición e integración de las secuencias en un consenso.
5. Identificación de haplotipos y análisis filogenético.

CAPITULO 4

- MATERIAL Y MÉTODOS -

4.1 - Obtención de muestras sanguíneas -

Se obtuvieron un total de 68 muestras sanguíneas de burros criollos mexicanos (Anexo1), escogidos aleatoriamente en 8 regiones geográficas de 6 Estados de la República Mexicana, así como una muestra sanguínea de un burro Siciliano(Cuadro 1)

4.2 - Purificación de ADN total a partir de sangre de cada una de las muestras obtenidas -

Se obtuvo el ADN total de las 69 muestras sanguíneas obtenidas mediante la técnica implementada en el Laboratorio de Genética Molecular (54), (Anexo 2). La integridad se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1%+TBE 1X, teñidos con Bromuro de etidio (Anexo 3). La cuantificación del ADN se determinó en un fluorómetro, de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

4.3 - Selección de muestras para secuenciación de ADN-

De las 69 muestras obtenidas, se escogieron aleatoriamente 4 muestras de ADN de cada región muestreada de los Estados de la República Mexicana, para obtener la secuencia de nucleótidos de la región D-loop, por lo que se trabajó con 26 muestras de burros criollos mexicanos y una muestra de un burro Siciliano, 27 muestras escogidas en total, (Cuadro 1). Debido a que solo se tenían 2 muestras del Estado de Veracruz, éstas se incluyeron en el estudio.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Cuadro 1. Procedencia de las muestras sanguíneas de burros criollos mexicanos obtenidas en 8 regiones de 6 Estados de la República Mexicana, así como las muestras seleccionadas para secuenciación.

Regiones de Procedencia		Identificación de la muestra	Fecha de colección	Identificación de las muestras seleccionadas
ESTADO	COMUNIDAD			
Xochimilco, D.F.	Sn. José Obrero	*BC1 - BC9	13-Feb-02	*BC1,BC3,BC5,BC6
Puebla	Sn. Mateo	BC10 - BC29	14-Feb-02	BC12,BC16,BC18,BC26
Edo. de México	Chiquispac	BC30 - BC42	04-Abr-02	BC30,BC32,BC35,BC36
Veracruz	Mtz. de la Torre	BC43 - BC44	13-Jul-02	BC43,BC44
Guanajuato	Aldama	BC45 - BC46	16-Jul-02	BC45
Guanajuato	El Salteador	BC47 - BC56	17-Jul-02	BC47,BC49,BC54
Tlaxcala	Capulac	BC57 - BC63	24-Jul-02	BC60,BC61,BC62,BC63
Puebla	Tehuacán	BC64 - BC68	07-Ago-02	BC64,BC65,BC66,BC68
	Raza Sicilia	Panchito	17-Ago-02	Panchito
	Total	69		27

* BC: Burro Criollo

4.4 - Amplificación *in vitro* de la región D-*loop* del ADN mitocondrial mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa- (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) consiste en la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de ADN, cada ciclo consta de tres pasos:

1. Desnaturalización – Separación de cadenas complementarias del ADN blanco.
2. Alineamiento - Se da la hibridación de los iniciadores con las cadenas simples del segmento de ADN blanco desnaturalizado.
3. Elongación - Se da cuando la ADN polimerasa adiciona deoxinucleótidos libres complementarios al ADN blanco, resultando nuevas cadenas (36,55).

Para la amplificación de la región completa del D-*loop* se ocuparon un par de iniciadores que amplifican esta región del ADNmt en cualquier mamífero, son

MitL3 forward 5'(CTGGTCTTGTAACC) 3' y

MitH4reverse 5'(TAGGCATTTTCAGTGCCTTG)3' que se localizan en el gen del RNA de transferencia para treonina (tRNA^{Thr}) y el gen del RNA de transferencia de fenilalanina (tRNA^{Phe}) respectivamente (54). La posición de los iniciadores dentro de la secuencia completa de nucleótidos del ADNmt del burro es, en el caso de MitL3 el sitio 15,351 y MitH4 en el sitio 27. Esta secuencia de nucleótidos del ADNmt del burro utilizada como referencia se encuentra depositada en el GenBank con número de acceso X97337 (13).

La reacción de amplificación de la región *D-loop* de 26 muestras de burros criollos mexicanos se realizó utilizando un paquete de reactivos para PCR (BIOTECSA) adicionando las cantidades recomendadas por la casa comercial (Anexo4) y genera un fragmento de 541 pb. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo a 94°C (3 min.), 30 ciclos a 94°C (30 seg.), 58°C (30 seg.), 72°C (1 min.) y 1 ciclo final de 72°C (3 min.) La amplificación se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1% + TAE 1X teñidos con bromuro de etidio (Anexo 3*), utilizando como marcador de peso molecular ADN del bacteriófago λ digerido con BstEII (λ / BstEII).

4.5 - Purificación de fragmentos por Perlas de Silica -

Los fragmentos amplificados de la región *D-loop* del ADN mitocondrial, se separan por electroforesis en geles de agarosa 1% en TAE 1X (Anexo 3*). Estos fragmentos se recortan del gel y se purifican con la técnica de Yoduro de Sodio (NaI) y Perlas de Silica (56) implementada en el laboratorio (Anexo 5). Los fragmentos purificados se cuantificaron por medio de un fluorómetro, de acuerdo a las instrucciones del proveedor y se verificaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% + TBE 1X.

4.6 - Secuenciación -

Una vez purificados los fragmentos de cada una de las 27 muestras, se secuenció una región de 541 pb del *D-loop* localizada entre el tRNA^{Pro} (RNA de transferencia de prolina) y la secuencia central larga conservada (41,44,45,50,52,53), específicamente entre los nucleótidos 15,372 y 15,912.

Para la secuenciación se utilizó el iniciador MitL3 forward 5'(CTGGTCTTGTAACC) 3' que se localiza en el gen del RNA de transferencia para treonina (tRNA^{Thr}) específicamente en el sitio nucleotídico 15,351. Para obtener la secuencia complementaria se diseñó un iniciador inverso BRIS'(ACAGTTATGTGTGAGCATGG)3' localizado en el sitio 15,930.

La reacción de secuencia se obtuvo por el método de terminación de la cadena de dideoxinucleótidos, usando un kit comercial (57) utilizando el protocolo recomendado por el proveedor con ciertas modificaciones (Anexo 6), en las siguientes condiciones: 25 ciclos de 96° C (10 seg.), 50° C (5 seg.), 60° C (4 min.). Después de la reacción las muestras se filtraron en columnas de Sephadex G50 (SIGMA St Louis MO, USA) (Anexo 7), fueron secadas y resuspendidas en Buffer desnaturante y la lectura se realizó en un secuenciador automático ABI PRISM 310.

4.7 - Edición de las secuencias y obtención de un consenso -

Para cada fragmento del *D-loop* del ADNmt proveniente de los 27 individuos se obtuvieron 2 lecturas: una para cada cadena.

Estas lecturas fueron inicialmente editadas corrigiendo la aparición de bases no definidas al verificar los electroferogramas. Posteriormente ambas secuencias fueron alineadas mediante la aplicación "Contig Manager" del paquete DNASIS v2.6 (58). Esta aplicación genera una secuencia consenso, que fue cortada en 2 tamaños para ser analizada posteriormente. Un fragmento A de 325 pb (entre las posiciones 15,387 y 15,711) y un fragmento B de 541 pb (entre los nucleótidos 15,372 y 15,912).

4.8 - Identificación de haplotipos -

Las 27 secuencias consenso A y B obtenidas de burros criollos mexicanos y la secuencia de un burro Siciliano se alinearon junto a la secuencia de referencia X97337 obtenida del GenBank (13), mediante el programa Align.exe v1.01 (MS-Dos). Esto permitió identificar aquellas secuencias iguales entre sí.

Con fines comparativos se recuperaron todos los haplotipos disponibles en el GenBank que correspondían a 7 haplotipos provenientes de razas de burros españolas y africanas (53) (Cuadro 2 y 3), de un tamaño de 325 pb localizados entre los sitios 15,367 y 15,711 del ADNmt.

Cuadro 2. Números de acceso del GenBank de los 7 haplotipos del D-loop del ADNmt encontrados en burros de razas españolas y africanas, la secuencia del caballo y la secuencia del burro utilizada como referencia.

Haplotipo	Número de Acceso al GenBank
AT11	AF416594
AT12	AF416593
AT13	AF416595
AT14	AF416596
AT15	AF416597
AT16	AF416598
AT17	AF416599
CABALLO	X79547
BURRO	X97337

Cuadro 3. Haplotipos del D-loop del ADNmt encontrados en razas de burros españoles y africanos.

Especies	Razas	Haplotipos
Españoles		
Andaluza	4	AT11, AT12, AT14, AT15
Catalana	2	AT11, AT13
Encartaciones	3	AT13, AT16, AT17
Mallorquina	2	AT11, AT13
Zamorano-Leonesa	2	AT11, AT12
Majoreña	3	AT11, AT12, AT15
Africanas		
Marruecos	2	AT11, AT13
Zimbabwe	2	AT11, AT13

Los haplotipos de las secuencias consenso A de 325 pb. se alinearon con los haplotipos recuperados del GenBank con la intención de identificar si los haplotipos encontrados en México son nuevos ó ya habían sido reportados.

Una vez realizados los alineamientos entre las secuencias de burros criollos mexicanos y comparadas con las secuencias de burros de razas europeas y africanas, se formaron grupos de acuerdo a similitudes y diferencias entre ellas.

4.9 - Análisis filogenético de las variedades criollas -

Las relaciones filogenéticas se analizaron con el programa de computación PHYLIPv3.57 (59) de la siguiente manera:

Las secuencias de una porción del D-loop de 541 pb de burros criollos mexicanos, del burro Siciliano y la secuencia de referencia del burro depositada en el GenBank con número de acceso X97337 (13), se alinearon en el programa de alineamiento múltiple Clustal W (60) y las distancias genéticas entre las diferentes secuencias fueron calculadas por el método de Kimura (61) empleando el programa "DNADIST".

Con estos valores se construyó un dendrograma por el método de "neighbour-joining" (62). La confiabilidad en la topología del árbol se calculó con 1000 réplicas generadas

por el método de bootstrapping (63), el árbol consenso se obtuvo por el método "Majority rule" (64). Finalmente, el dendrograma fue dibujado en el programa Tree View, v1.2 (65).

De la misma manera se compararon las variedades de burros criollos mexicanos obtenidas con los 7 haplotipos de burros de razas españolas y africanas y el burro Siciliano, teniendo como referencia la secuencia del burro depositada en el GenBank (13), en ambos análisis se utilizó la secuencia del caballo como grupo externo que permitió dar una orientación evolutiva al árbol.

CAPITULO 5

- RESULTADOS -

5.1 - Amplificación de la región D- loop mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa- (PCR)

A partir del ADN proveniente de muestras de burros, se amplificó un segmento de 1,300 pb conteniendo la región D-loop del ADNmt (Figura 1).

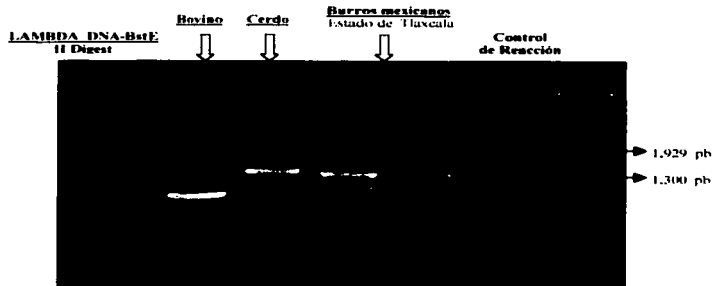
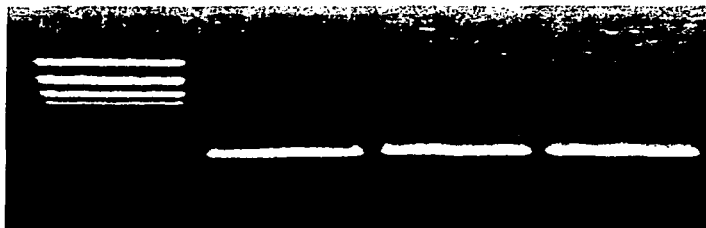


Figura 1. Electroforesis en un gel de agarosa al 1% + TBE 1X, de los fragmentos amplificados de la región D-loop en diferentes especies como Bovinos, Cerdo y Burros

5.2 - Purificación de fragmentos -

Los fragmentos amplificados de 1,300 pb correspondientes a la región D-loop fueron purificados a partir de geles de agarosa 1%+ TAE 1X, en las 26 muestras de burros criollos mexicanos de los diferentes Estados de la Republica Mexicana y en la muestra de burro Siciliano (Figura 2).



LAMBDA DNA-BstE
II Digest

Fragmentos con una longitud de 1.3 Kb
de Burros Criollos mexicanos del Estado de Puebla,
corresponden a la región completa del D-loop.

Figura 2. Fragmentos correspondientes a la región D-loop
Vistos en un gel de agarosa al 1%+ TAE 1X.

5.3 - Análisis de las secuencias -

Las secuencias de nucleótidos se compararon alineándose, formando grupos de acuerdo a similitudes y diferencias que presentan en sus sustituciones nucleotídicas. Se encontraron 10 haplotipos mexicanos diferentes de las 26 secuencias de burros criollos analizadas de un tamaño de 541 pb, los grupos que formaron las secuencias y como se acomodaron dentro de cada haplotipo se muestran en el Cuadro 4.

Los haplotipos HBurro1, HBurro2 y HBurro4 son semejantes a los haplotipos ATI1, ATI2, ATI4 de razas españolas y africanas, respectivamente, pero debido a que se secuenció mayor número de pares de bases (216 pb más) no pueden ser considerados iguales, ya que al secuenciar más parte de la región D-loop, se encuentran más sitios polimórficos (Figura 3).

Cuadro 4. Frecuencia de los diferentes haplotipos encontrados, en un fragmento de 541 pb del D-loop del ADNmt.

HBurro1	HBurro2	HBurro4	HBMex1	HBMex2	HBMex3	HBMex4	HBMex5	HBMex6	HBMex7
*BC1	BC5	BC36	BC6	BC12	BC44	BC60	BC54	BC64	BC49
BC3	BC35	BC47			BC45				
BC16	BC43	BC61							
BC26	BC65	BC18							
BC30	BC66								
BC32									
BC62									
BC63									
BC68									
n=9	5	4	1	1	2	1	1	1	1

* Identificación del individuo

Al comparar los haplotipos de razas españolas y africanas obtenidos del GenBank (Cuadro 2) conteniendo un menor número de pares de bases (325 pb) con los haplotipos de burros criollos mexicanos, los haplotipos mexicanos encontrados HBMex1, HBMex2 resultaron semejantes al haplotipo español y africano ATI1 y el haplotipo HBMex7 corresponde al haplotipo ATI2 (Cuadro 5), esto se debe a que las sustituciones nucleotídicas que los distinguen se encuentran más allá de las 325 pb que analizaron Aranguren *et al* (53).

Cuadro 5. Frecuencia de los haplotipos encontrados en los individuos estudiados, considerando un fragmento del D-loop de 325 pb y su similitud a haplotipos de burros españoles y africanos.

AT11	AT12	AT14	HBMex3	HBMex4	HBMex5	HBMex6
BC1	BC5	BC36	BC44	BC60	BC54	BC64
BC3	BC35	BC47	BC45			
BC16	BC43	BC61				
BC26	BC65	BC18				
BC30	BC66					
BC32	BC49					
BC62						
BC63						
BC68						
BC6						
BC12						

Para aclarar estas sustituciones nucleotídicas se presentan los esquemas 1 y 2.

La alineación se realizó basándose en una secuencia de un burro, obtenida del GenBank (X97337) (13). Cuando las bases son iguales con respecto a la secuencia de referencia se coloca un punto, cuando existen diferencias se anota la base que sustituye y si la base no esta presente se muestra un guión.

Esquema 1. Presenta la alineación entre los haplotipos encontrados de 541 pb de burros mexicanos, mostrando las diferencias. Se alinearon, igualmente, una secuencia de un burro de raza siciliana y una secuencia de caballo.

	10	20	30	40	50
BX97337	GGGGGAAACATTCCC	-CCCAAGGACTATCA	AGGAAGAAGCTCT	TAGCTCCACCATCAAC	AC
HBURR01
HBME X1
HBME X2
HBURR02
HBME X3
HBME X4
HBME X5
HBME X6
HBME X7
HBURR04
BSicilia
CABALLOA.....G.....T.....T.....

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

	60	70	80	90	100	110
HBURR01	* CCAAAGCTGAAATTCTACTTAAACTATTCCCTTGATTTCCTCCCTTAAACGACAGCAATTCC					
HBMEK1	*					
HBMEK2	*					
HBURR02	*					
HBMEK3	*					
HBMEK4	*					
HBMEK5	*					
HBMEK6	*					
HBMEK7	*					
HBURR04	*					
BAFRICANO	*					
CABALLO	*					
	120	130	140	150	160	170
HBURR01	* ATCCTCATGTGCTATGTCAGTATTAATAATACACCCCC-GCACAAACCCATATCAGCTCAA					
HBMEK1	*					
HBMEK2	*					
HBURR02	*					
HBMEK3	*					
HBMEK4	*					
HBMEK5	*					
HBMEK6	*					
HBMEK7	*					
HBURR04	*					
BAFRICANO	*					
CABALLO	*					
	180	190	200	210	220	230
HBURR01	* CATACAATCTCTATTAATACCCCTATGTACATCGTGCATTAAATTGTTGCCCCATGAAT					
HBMEK1	*					
HBMEK2	*					
HBURR02	*					
HBMEK3	*					
HBMEK4	*					
HBMEK5	*					
HBMEK6	*					
HBMEK7	*					
HBURR04	*					
BAFRICANO	*					
CABALLO	*					
	240	250	260	270	280	290
HBURR01	* AATAAGCATGTACATAATATATTTATCTTACATGAGTACATCATATTATGTATCGTACA					
HBMEK1	*					
HBMEK2	*					
HBURR02	*					
HBMEK3	*					
HBMEK4	*					
HBMEK5	*					
HBMEK6	*					
HBMEK7	*					
HBURR04	*					
BAFRICANO	*					
CABALLO	*					

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

```

300          310          320          330          340          350
*          *          *          *          *          *
HBURR01    TACCCCATCCAAGTCAAATCATTTCAGCCCAACAGGCATATCACCCACCCATATCCACGA
HBMEX1     .....
HBMEX2     .....
HBURR02     .....
HBMEX3     .....
HBMEX4     .....
HBMEX5     .....
HBMEX6     .....
HBMEX7     .....
HBURR04     .....
BAFRICANO  .....
CABALLO    .....

```

```

360          370          380          390          400          410
*          *          *          *          *          *
HBURR01    GCTTAATCACCAGCCGCGGGAAATCAGCAATCCCTCCAATTACGTGTCCCAATCCTCGC
HBMEX1     .....
HBMEX2     .....
HBURR02     .....
HBMEX3     .....
HBMEX4     .....
HBMEX5     .....
HBMEX6     .....
HBMEX7     .....
HBURR04     .....
BAFRICANO  .....
CABALLO    .....

```

```

420          430          440          450          460          470
*          *          *          *          *          *
HBURR01    TCCGGGCCCATCTAAACGTGGGGGTTCTACGGTGAAACTATACCTGGCATCTGGTTCTT
HBMEX1     .....
HBURR02     .....
HBMEX3     .....
HBMEX4     .....
HBMEX5     .....
HBMEX6     .....
HBMEX7     .....
HBURR04     .....
BAFRICANO  .....
CABALLO    .....

```

```

480          490          500          510          520          530
*          *          *          *          *          *
HBURR01    TCTTCAGGGCCAT-CCCACCCAACTCGCCATTCTTTCCCTTAAATAAGACATCTCGA
HBMEX1     .....
HBMEX2     .....
HBURR02     .....
HBMEX3     .....
HBMEX4     .....
HBMEX5     .....
HBMEX6     .....
HBURR04     .....
BAFRICANO  .....
CABALLO    .....

```

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

540

HBURR01 TGG
HBME1 ...
HBME2 ...
HBURR02 ...
HBME3 ...
HBME4 ...
HBME5 ...
HBME6 ...
HBME7 ...
HBUR04 ...
BAFRICANO ...
CABALLO ...

Esquema 2. Alineación que muestra las sustituciones nucleotídicas de los haplotipos de burros criollos mexicanos comparados con los 7 haplotipos de 325 pb de razas españolas y africanas.

	10	20	30	40	50	60
BX97337	CCCAAGGACTATCAAGGAAGAAGCTCTAGCTCCACCATCAACCCAAAGCTGAAATTCT					
ATI1					
ATI2					
ATI3					
ATI4					
ATI5					
ATI6					
ATI7		C			
HBME3					
HBME4					
HBME5					
HBME6					
BS1c11a					
CABALLO					
	70	80	90	100	110	120
BX97337	ACTTAAACTATTTCCTTGATTTCCTCCCTAAACGACAGCAATTTCATCCTCATGTGCTATG					
ATI1					
ATI2			A	T	C
ATI3			A	T	C
ATI4			A	T	C
ATI5					
ATI6			A	T	C
ATI7			A	T	C
HBME3			A	T	C
HBME4			A	T	C
HBME5			A	T	C
HBME6			A	T	C
BS1c11a			A	T	C
CABALLO		T	A	T	C

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

```

          130          140          150          160          170
BX97337 TCAGTATTA1AAATACACCCCC--GCACAACACCATATCAGCTCAACATACAATACTCTATT
  ATI1 .....
  ATI2 .....
  ATI3 .....
  ATI4 .....
  ATI5 .....
  ATI6 .....
  ATI7 .....
HBREX3 .....
HBREX4 .....
HBREX5 .....
HBREX6 .....
BSicilia .....
CABALLO .....
          180          190          200          210          220          230
          *          *          *          *          *          *
          C G T T A T C C A C T G G T C T C T G
          *          *          *          *          *          *
BX97337 AATACCCCTATGTACATCGTGCATTA1AAATTGTTACCCCATGAATAATAAGCATGTACATA
  ATI1 .....
  ATI2 ..G.....G.....TG.....G.....
  ATI3 .....
  ATI4 ..G.....G.....TG.....
  ATI5 .....
  ATI6 ..G.....G.....TG.....G.....
  ATI7 .....
HBREX3 ..G.....G.....TG.....
HBREX4 ..G.....G.....TG.....G.....
HBREX5 ..G.....G.....TG.....
HBREX6 ..G.....G.....TG.....CG.....
BSicilia ..G.....G.....G.....TG.....G.....
CABALLO ..GG.....TG.....G.....CTG.....
          240          250          260          270          280          290
          *          *          *          *          *          *
          C G T T A C A T G A G T A C A T C A T T A T T G A T C G T A C A T A C C C C A T C C A A G T C A
          *          *          *          *          *          *
BX97337 ATATTATTTATCTTACATGAGTACATCATATTTATTGATCGTACATACCCCATCCAAGTCA
  ATI1 .....
  ATI2 .....A.....T.....G.....
  ATI3 .....
  ATI4 .....A.....T.....G.....
  ATI5 .....
  ATI6 .....A.....T.....G.....
  ATI7 .....A.....T.....G.....
HBREX3 .....A.....T.....
HBREX4 .....A.....T.....G.....
HBREX5 .....A.....T.....G.....
HBREX6 .....A.....T.....G.....
BSicilia .....C.....A.....T.....G.....
CABALLO .....C.....A.....T.....G.....
          300          310          320
          *          *          *
          C A T T T C C A G C C A A C A C G C A T A T C
          *          *          *
BX97337 AATCATTTCCAGCCAACACGCATATC
  ATI1 .....
  ATI2 .....
  ATI3 .....
  ATI4 .....T.....
  ATI5 .....T.....
  ATI6 .....T.....
  ATI7 .....T.....
HBREX3 .....T.....
HBREX4 .....T.....
HBREX5 .....T.....
HBREX6 .....T.....
BSicilia .....T.....
CABALLO .....T.....

```

Figura 3. Posiciones nucleotídicas polimórficas encontradas en los diferentes haplotipos estudiados, de un segmento del D-loop del ADNmt.

* Posición Nucleotídica	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8			
4	4	4	4	2	2	2	2	2	2	2	4	4	4	4	5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2				
1	1	1	1	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
1	1	1	1	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
4	4	4	4	2	2	2	2	2	2	2	4	4	4	4	5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2				
BX97337	T	G	C	T	A	-	A	A	A	C	A	T	A	G	C	A	C	T	C	T	A	C	C	G	G	T	C				
AT11	G			
AT12	.	.	A	T	C	.	.	G	G	.	T	G	.	G	A	T	G	T			
AT13			
AT14	.	.	A	T	C	.	.	G	G	.	T	G	.	.	A	T	G	T			
AT15	G			
AT16	.	.	A	T	C	.	.	.	G	.	T	G	.	G	A	T	G	T			
AT17	.	.	C	A	T	C	.	.	G	.	T	G	.	G	A	T	G	T			
HBurro1	G			
HBurro2	.	.	A	T	C	.	.	G	G	.	T	G	.	G	A	T	G	T	C	T	T	T	A	A	-	
HBurro4	.	.	A	T	C	.	.	G	G	.	T	G	.	.	A	T	G	T	C	T	T	T	A	A	-
HBMex1	G	G
HBMex2	G	T
HBMex3	G	G	.	T	G	.	.	A	T	.	T	C	T	T	T	A	A	-	
HBMex4	.	.	A	T	C	T	.	G	G	.	T	G	.	G	A	T	G	T	C	T	T	T	A	A	-		
HBMex5	.	.	A	T	C	.	.	G	G	.	T	G	.	.	A	T	G	T	C	T	T	T	A	A	-		
HBMex6	.	.	A	T	C	.	.	G	G	.	T	G	C	G	A	T	G	T	C	T	T	T	A	A	-		
HBMex7	.	.	A	T	C	.	.	G	G	.	T	G	.	G	A	T	G	T	C	T	C	.	.	.	T	T	A	A	-		
BSiciliano	.	.	A	T	C	.	.	C	G	G	G	T	G	.	G	A	T	G	T	C	T	.	.	.	T	T	A	A	-		

* La posición de nucleótidos esta con relación a la secuencia de referencia con número de acceso X97337 en el GenBank

7* Inserción nucleotídica presente solo en Burro Siciliano.

En el Cuadro 6 se muestra la frecuencia de los 7 haplotipos de razas de burros españolas y africanas con respecto a los burros criollos mexicanos muestreados de las diferentes zonas geográficas de la República Mexicana utilizadas para este estudio se observa que los haplotipos más encontrados son AT11, AT12, AT14, mientras que los haplotipos AT13, AT15, AT16, AT17 no fueron encontrados en ninguna región de México muestreada.

Los 3 haplotipos más frecuentes AT11, AT12 y AT14 se encuentran juntos en la raza Andaluza (Cuadro 3), mientras que los haplotipos AT11 y AT12 están presentes en la

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

raza Zamorano- Leonesa y la Majorera. Cabe destacar que el haplotipo AT12 es propio de razas españolas y no se incluye en razas africanas.

El haplotipo AT11 el más encontrado en los burros criollos mexicanos muestreados, se encuentra principalmente en las razas africanas: Marruecos y Zimbabwe, además de algunas españolas como la Catalana y Mallorquina, mientras que el haplotipo AT17 de la raza Encartaciones no la encontramos en ninguno de los burros criollos mexicanos muestreados. En cuanto a la frecuencia por región geográfica, el haplotipo de razas españolas y africanas mas encontrado AT11, se encuentra principalmente en la región de San José Obrero, Xochimilco D.F., así como en San Mateo, Puebla, seguido de Chiquispac, Estado de México y Capulác, Tlaxcala. Mientras que el haplotipo AT12 de razas españolas se encuentra principalmente en Tehuacán, Puebla.

Cuadro 6. Frecuencia con que los 7 haplotipos encontrados en razas españolas y africanas se presentan en los diferentes burros criollos muestreados, en relación a su procedencia.

Regiones de Procedencia		AT11	AT12	AT13	AT14	AT15	AT16	AT17
ESTADO	COMUNIDAD							
Xochimilco, D.F.	Sn. José Obrero	3	1	0	0	0	0	0
Puebla	Sn. Mateo	3	0	0	1	0	0	0
Puebla	Tehuacán	1	2	0	0	0	0	0
Edo de México	Chiquispac	2	1	0	1	0	0	0
Veracruz	Mtz. de la Torre	0	1	0	0	0	0	0
Guanajuato	Aldama	0	0	0	0	0	0	0
Guanajuato	El Sañador	0	1	0	1	0	0	0
Tlaxcala	Capulác	2	0	0	1	0	0	0
Total= 21		11	6	0	4	0	0	0

En total 21 muestras de burros criollos mexicanos de diferentes regiones en la República Mexicana se ubican dentro de los 7 haplotipos encontrados en razas españolas y africanas obtenidos del GenBank, las 5 muestras restantes formaron

haplotipos mexicanos nuevos y diferentes dentro del tamaño de 325 pb de esta secuencia. (Cuadro 5)

Los 10 haplotipos de 541 pb de burros criollos mexicanos encontrados (Cuadro 4) se distribuyen en las diferentes regiones geográficas donde fueron muestreados los animales como lo muestra el Cuadro 7. El haplotipo HBurro1 es el más encontrado, seguido por el haplotipo HBurro2 y HBurro4, estos, son parecidos a los haplotipos AT11, AT12, AT14 de razas españolas y africanas que se recuperaron del GenBank, siendo San José Obrero en Xochimilco D.F., San. Mateo, en el Estado de Puebla, Chiquispac, Estado de México y Capulác, en el Estado de Tlaxcala, las regiones donde hay más frecuencia del haplotipo HBurro1 y en Tehuacán, Puebla donde se encontró con mayor frecuencia el haplotipo HBurro2.

Cuadro 7. Frecuencia de haplotipos de 541 pb de burros mexicanos encontrados en las diferentes regiones geográficas muestreadas.

ESTADO	Precedencia COMUNIDAD	HBurro1	HBurro2	HBurro4	HBMex1	HBMex2	HBMex3	HBMex4	HBMex5	HBMex6	HBMex7
Xochimilco, D.F.	Sn.José Obrero	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Puebla	Sn.Mateo	2	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Puebla	Tehuacán	1	2	0	0	0	0	0	0	1	0
Edo. de México	Chiquispac	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Veracruz	Mtz. de la Torre	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
Guanajuato	Aldama	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Guanajuato	El Salteador	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1
Tlaxcala	Capulác	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0
	Total=28	9	5	4	1	1	2	1	1	1	1

Los 7 haplotipos mexicanos identificados como HBMex son poco frecuentes en las regiones muestreadas, el haplotipo más encontrado es HBMex 3, con 2 individuos en las comunidades de Martínez de la Torre, Veracruz y Aldáma, Estado de Guanajuato.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Las distancias filogenéticas entre los diferentes haplotipos encontrados se presentan en el Cuadro 8 y 9.

Cuadro 8. Distancias filogenéticas entre los haplotipos mexicanos encontrados, junto con el burro Siciliano, el caballo y la secuencia de referencia de un burro depositada en el GenBank.

	HB Mex6	B Sicilia	HB Mex4	H Burro2	HB Mex7	H Burro4	HB Mex5	HB Mex3	B X97337	HB Mex1	HB Mex2	H Burro1	Caballo
HBMex6	0												
B Sicilia	0.0037	0											
HBMex4	0.0037	0.0037	0										
HBurro2	0.0019	0.0019	0.0019	0									
HBMex7	0.0037	0.0037	0.0037	0.0019	0								
HBurro4	0.0037	0.0037	0.0037	0.0019	0.0037	0							
HBMex5	0.0056	0.0056	0.0056	0.0037	0.0056	0.0019	0						
HBMex3	0.0112	0.0112	0.0112	0.0093	0.0112	0.0074	0.0093	0					
B X97337	0.0359	0.0359	0.0359	0.0339	0.0359	0.032	0.0301	0.0244	0				
HBMex1	0.0359	0.0359	0.0359	0.0339	0.0359	0.032	0.0301	0.0244	0.0037	0			
HBMex2	0.0359	0.0359	0.0359	0.0339	0.0359	0.032	0.0301	0.0244	0.0037	0.0037	0		
HBurro1	0.0339	0.0339	0.034	0.032	0.0339	0.0301	0.0282	0.0225	0.0019	0.0019	0.0019	0	
Caballo	0.0777	0.0777	0.0778	0.0758	0.0736	0.0736	0.0756	0.0736	0.0877	0.0878	0.0878	0.0858	

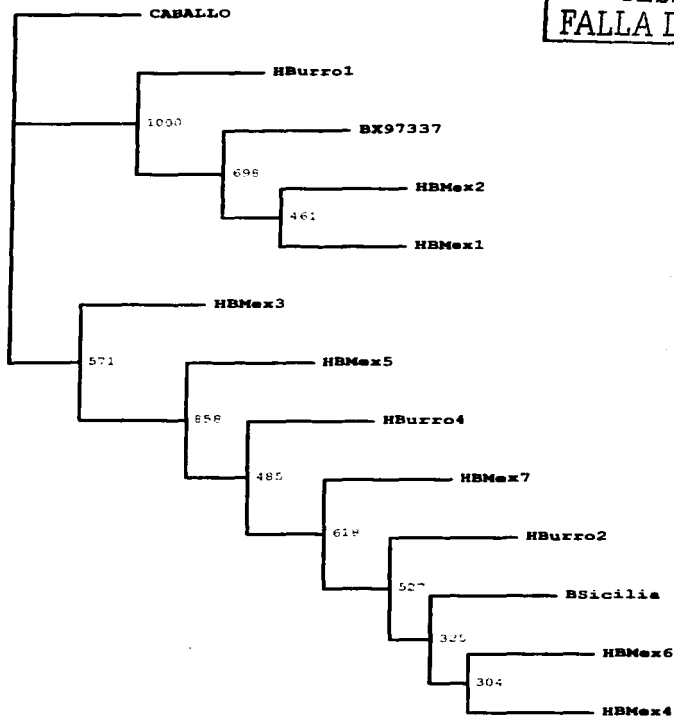
Cuadro 9. Distancias filogenéticas obtenidas entre los haplotipos españoles, africanos y los haplotipos mexicanos encontrados, junto con el burro Siciliano, el caballo y la secuencia de referencia del burro depositada en el GenBank.

	HB Mex6	B Sicilia	HB Mex4	AT12	AT6	AT17	AT14	HB Mex5	B X97337	AT13	AT11	AT16	HB Mex3
HBMex6	0												
B Sicilia	0.0062	0											
HBMex4	0.0062	0.0062	0										
AT12	0.0031	0.0031	0.0031	0									
AT6	0.0062	0.0062	0.0062	0.0031	0								
AT17	0.0093	0.0093	0.0093	0.0062	0.0031	0							
AT14	0.0062	0.0062	0.0062	0.0031	0.0062	0.0093	0						
HBMex5	0.0093	0.0093	0.0093	0.0062	0.0093	0.0124	0.0031	0					
B X97337	0.0409	0.0409	0.041	0.0377	0.0345	0.0377	0.0345	0.0313	0				
AT13	0.0409	0.0409	0.041	0.0377	0.0345	0.0377	0.0345	0.0313	0	0			
AT11	0.0377	0.0377	0.0378	0.0345	0.0313	0.0345	0.0313	0.0281	0.0031	0.0031	0		
AT6	0.0345	0.0345	0.0345	0.0313	0.0281	0.0313	0.0281	0.025	0.0062	0.0062	0.0031	0	
HBMex3	0.0187	0.0187	0.0187	0.0155	0.0187	0.0218	0.0124	0.0155	0.0218	0.0218	0.0187	0.0155	0
Caballo	0.0877	0.0877	0.0879	0.0843	0.0877	0.0911	0.0809	0.0843	0.1049	0.1049	0.1014	0.098	0.0809

Con el fin de evaluar el origen y las relaciones filogenéticas de los burros criollos mexicanos, se compararon las secuencias obtenidas y recortadas a un tamaño de 325 pb correspondientes a una parte de la región *D-loop* de los haplotipos encontrados, con secuencias del mismo tamaño de razas de burros españolas y africanas obtenidas del GenBank, así como la secuencia de un burro Siciliano que por la inserción encontrada lo hace un haplotipo diferente a todas las secuencias de burros estudiadas (Figura 3), y la secuencia del *D-loop* de un Caballo utilizada como grupo externo para dar una orientación evolutiva al árbol (Figura 4).

Y con este mismo fin se analizaron los 10 haplotipos encontrados en burros criollos mexicanos de un tamaño de 541 pb, la secuencia del burro Siciliano y la secuencia del *D-loop* de un Caballo utilizada como grupo externo, para dar una orientación evolutiva al árbol (Figura 5).

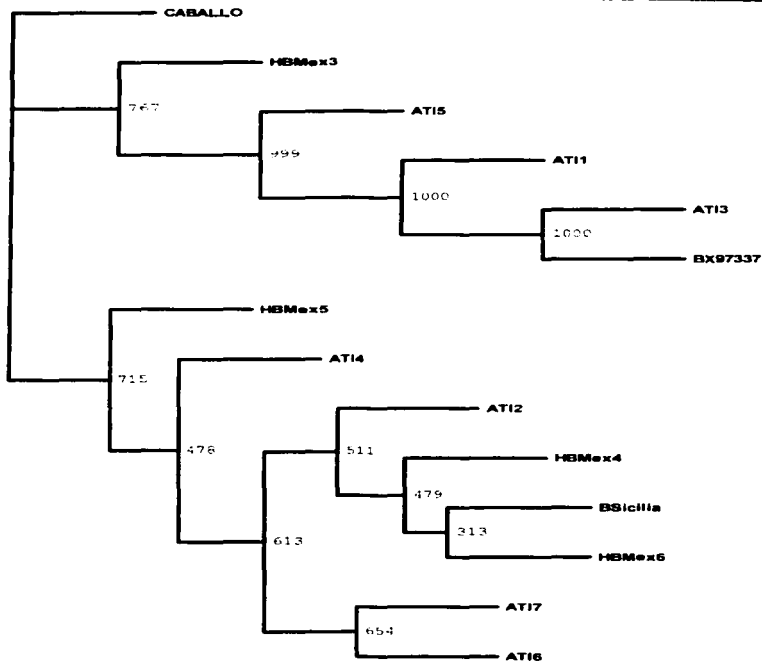
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



100

Figura 4. Relaciones filogenéticas entre los burros criollos mexicanos muestreados, el burro Siciliano y el Caballo, secuencia de 541 pb.

*Los valores en los nodos corresponden al porcentaje de veces que se repite la topología de la rama en 1000 réplicas.



100

Figura 5. Relaciones filogenéticas entre los haplotipos de burros criollos mexicanos encontrados y los 7 haplotipos de razas españolas y africanas obtenidos del GenBank, la secuencia del burro Siciliano y la secuencia del Caballo, secuencia de 325 pb.

*Los valores en los nodos corresponden al porcentaje de veces que se repite la topología de la rama en 1000 réplicas.

CAPITULO 6

- DISCUSIÓN -

El alineamiento entre las secuencias de 541 pb correspondientes a una parte de la región *D-loop* de burros criollos mexicanos, mostró 26 sitios polimórficos, estos cambios revelaron 10 haplotipos diferentes, de los cuales 7 fueron nuevos y se identificaron como HBMex y se encontraron en 8 burros criollos mexicanos estudiados. 3 haplotipos más, identificados como HBurro1, HBurro2 y HBurro4, se encontraron en 18 burros criollos mexicanos y fueron parecidos a los haplotipos encontrados en razas españolas y africanas previamente reportados por Aranguren *et al* (53), pero no son iguales ya que incluyen 216 pb más, con cambios polimórficos más allá de las 325 pb reportadas.

Las secuencias de burros criollos mexicanos al ser recortadas a un tamaño de 325 pb, a fin de compararlas con 7 haplotipos encontrados en burros de razas españolas y africanas (53), revelan solo 16 sitios polimórficos. Lo que muestra que al incorporar 216 pb más se ganaron 10 sitios polimórficos.

Los haplotipos HBMex1, HBMex2 al recortarse sus secuencias a 325 pb, resultaron iguales al haplotipo AT11 encontrado en razas españolas y africanas. Del mismo modo, el haplotipo HBMex7 resultó igual al haplotipo AT12 al recortar su secuencia, esto se debe a que las sustituciones nucleotídicas que los distinguen se encuentran más allá de las 325 pb analizadas.

El análisis filogenético realizado con las secuencias de burros criollos mexicanos y las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank de burros de razas españolas y africanas (Cuadro 2), reveló que existen 2 líneas maternas principales de descendencia: una línea donde se encuentran haplotipos (AT11, AT13) presentes principalmente en razas africanas, aunque también en casi todas las razas españolas,

principalmente en la Catalana y Mallorquina, con lo que supone un origen de las razas españolas a partir de un tronco común africano (53). Otra línea materna de descendencia donde se encuentran, parece ser, exclusivamente razas europeas entre ellas la raza española Encartaciones por la presencia del haplotipo AT17 presente solo en esta raza y la raza Siciliana.

En cuanto a los haplotipos de burros criollos mexicanos encontrados, la mayoría, tienen haplotipos encontrados en razas españolas (HBurro1, HBurro2, HBurro4) por lo que es clara su ascendencia ibérica, siendo el haplotipo AT11 el más común en los burros criollos mexicanos al igual que en las razas españolas. sin embargo, los haplotipos AT12 y AT14 han sido encontrados principalmente en las razas Andaluza, Zamorano-Leonesa y Majorera de las Islas Canarias, lo que sugiere que estas razas fueron las que dieron origen a los burros criollos mexicanos.

Al analizar 26 burros criollos mexicanos, se revelaron 10 haplotipos diferentes, mientras que en un estudio similar realizado por Aranguren *et al* (53) sobre razas de burros españolas y africanas donde se muestrearon 91 burros, se encontraron solo 7 haplotipos diferentes, lo que nos sugiere que la diversidad genética encontrada en este estudio es elevada.

La presencia de haplotipos mexicanos únicos, no descritos en burros españoles nos sugiere que la introducción de burros a México, consideró poblaciones que probablemente han desaparecido actualmente en la Península Ibérica.

Sería conveniente aumentar el número de muestras de burros criollos mexicanos y de regiones en los diferentes Estados a fin de conocer con más exactitud los niveles de diversidad genética del burro criollo mexicano en la República Mexicana.

CAPITULO 7

- CONCLUSIONES -

- De forma preliminar los resultados presentados en este trabajo permiten concluir que las poblaciones de burros criollos mexicanos presentan haplotipos encontrados en razas españolas (AT11, AT12 y AT14), por lo que es clara su ascendencia ibérica. Principalmente encontramos estos haplotipos en las razas españolas Andaluza, Zamorano-Leonesa y Majorera de las Islas Canarias, lo que sugiere que fueron las que dieron origen a los burros criollos mexicanos, datos que se comprueban históricamente por los relatos con relación a la introducción de nuevas especies domésticas a América y durante la conquista de México, debido a que fueron traídos principalmente de ciertas regiones de España, haciendo parada por las Islas Canarias (19).
- La presencia de haplotipos mexicanos únicos, no descritos en burros españoles, nos sugiere que la introducción de burros a México consideró poblaciones que probablemente han desaparecido actualmente en la Península Ibérica.
- Parece ser que las razas modernas españolas se originaron a partir de 2 grandes líneas de descendencia materna, aunque la raza Encataciones sugiere un solo origen materno, por la presencia de un haplotipo (AT17) exclusivo de esta raza.
- Este estudio da pauta a siguientes trabajos donde se estudien y analicen un mayor número de burros criollos mexicanos, así como de regiones en los Estados de la República Mexicana, con el fin de conocer con más exactitud los niveles de diversidad genética en México, ya que debido a su clara ascendencia ibérica en algún momento podrían servir como reservorios genéticos de razas asnales en peligro de extinción, como las españolas.

CAPITULO 8

- LITERATURA CITADA -

1. Pinzón E. Primero fue el Burro. *Revista Carta Ganadera*. Colombia, 1995; XXXII (8): 33- 39.
2. Cruz LA. Y sigue la yunta andando. Universidad de Chapingo. México. 2002.
3. García O, Morena de la E. Asociación Malagueña amigos del Burro: Orígenes [serie en línea] 2000. Disponible de: www.veterinaria.org/ asociaciones/ temas/ origenes.htm
4. Shunemann de AA, Bouda J, López CA, Chavira SH. Valores Bioquímicos en sangre de burros antes y después del trabajo. *Vet Méx* 2001; 32 (4): 271-276.
5. Lazo C, Monterde A. Zootecnia Equina. México: Ed. Trillas, 1996.
6. Bonguianni M. Guía das raças de Cavalos. Portugal (Lisboa): Colecção Habitat, 1995.
7. Sarmiento FM. El origen del Caballo. En: Busto H, Chávez O, Garfias L, Martínez CL, Sarmiento M, Solís F. La Historia del caballo en México. México: Jilguero, 1996:15-23.
8. McBane S, Douglas C. Caballos de Mundo. (Barcelona) España: Ed. Hispano Europea, 1997.
9. Capote J, Tejera A. Troncos Originarios de las Principales especies domésticas. Rutas migratorias y difusión de las especies. Razas destacadas. Colonización de América Latina. Formación de Razas Criollas. III *Curso Internacional de Especialización sobre la conservación y utilización de las razas de animales domésticos locales en sistemas de explotación tradicionales*; 2002 Septiembre- Octubre; (Córdoba) España: CYTED, 2002; Tema 1.
10. Smythe HR. A psique do cavalo. (Sao Paulo) Brasil, 1990.
11. Metz R, Pisani E. Conocer los asnos y mulas. (Barcelona) España: Ed. Vecchi, 1995.

12. UCDAVIS, editor. *Book of Horses*. Davis: University of California. 1997.
13. Xiufeng X, Gullberg A, Amason U. The complete mitochondrial DNA (mtDNA) of the donkey and mtDNA comparisons among four closely related mammalian species-pairs. *J Mol Evol* 1996; 43: 438-446.
14. Svendsen E. *The professional handbook of the donkey*. Compiled for the Donkey Sanctuary. Inglaterra: Ed. Wittet Books, 1997.
15. Svendsen E, Shunnemann de AA, Villalobos AN. *El Cuidado del burro*. Mexico: UNAM, 1989.
16. Asociacion de Amigos del Camino de Santiago en Internet AACSI: Asnos Originarios Africano y Asiático. Razas de España [serie en línea] 2000. Disponible de: www.intercom.es/mediant/santiago
17. Ivankovic A, Kavar T, Caput P, Mioc B, Pavic V, Dovc P. Genetic diversity of tree donkey populations in the Croatian coastal region. *Animal Genetics* 2002; 33:169-177.
18. Reed CA. *Comienzos de la Domesticación animal: Curso de Zootecnia* (Zaragoza) España: Ed. Acribia, 1997.
19. Rodero A, Delgado JV, Rodero E. Primitive andalusian livestock and their implications in the discovery of América. *Archivos de Zootecnia*. España 1992;(extra): 383-400.
20. Santos SA, Sereno B, Mazza M, Mazza A. Origin of the Pantaneiro Horse in Brazil. *Archivos de Zootecnia* 1992; 41 (extra):371-381.
21. Sponenberg DP. Colonial spanish sheep, goats, hogs and asses in the United States. *Archivos de Zootecnia* 1992; 41 (extra): 415-419.
22. Shunnemann de AA, López CA, Chavira SH, Oseguera MD. Condiciones Patológicas más frecuentes en los equidos de trabajo en el campo mexicano. *Vel Méx* 2000; 31(2):165-168.
23. Programa International Donkey Protection Trust (IDPT)-International League for the Protection of Horses (ILPH)-Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Información sobre el programa IDPT-ILPH-UNAM. México (D.F): FMVZ- UNAM, 2000.

24. Oseguera MD. Informe de Servicio Social premiado con la Medalla Gustavo Baz Prada en el X Concurso de Servicio Social multidisciplinario (Tesis de Licenciatura). México (D.F.): UNAM. FMVZ. 1996.
25. ADEBO, ADDA. "Primera Conferencia Internacional sobre el Burro Córdoba (Rute) España". *Eventos*; 1992: 27-31.
26. El burro, nuestro mejor amigo y compañero del camino. Diario de Andalucía. Córdoba España 1999; *Sec Especial Rute*: 10.
27. Aranguren MJ, Jordana VJ, Gómez M. Genetic diversity in spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. *Genet. Sel. Evol.* 2001; 33:433-442.
28. Crespo A, Jiménez J, Quicler C. Si el burro se extingue perderemos más de 3.000 años de historia. Diario de Sevilla 1999; *Sec Sevilla Información*: 34.
29. García A. SOS desde Rute. Publicación El País 1992; *Sec Rute (Córdoba) España*.
30. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Sistema de informaciones para la diversidad de los animales domésticos (DAD-IS). Disponible de: www.fao.org/DAD-IS.
31. The American Donkey and Mule Society [serial online] 2001. Disponible de: adams@juno.com.
32. Elwin, Hartley, Edwards. Enciclopedia del caballo, asnos, hemionos y cebras. (Barcelona) España: Ed. Blume, 1995.
33. McKenzie F. Aportaciones de los animales de trabajo, cuidado de rebaños, protección y placer. *Curso de Zootecnia*. Zaragoza España: Ed Acribia, 1995:121-135.
34. Nestle J. Donkeys. In: *The Book of the horse*. London: Ed. Hamlyn, 1971.
35. Hutt F. *Animal Genetics*. New York: Ed. Ronald Press Company, 1964.
36. Huerta B. Análisis del polimorfismo en la región D-loop del DNA mitocondrial y el posible origen del cerdo criollo mexicano (*Sus scrofa*) (Tesis de Licenciatura). México D.F.: UNAM Facultad de Ciencias, 1999.

37. Gardner, Eldon. Principios de Genética. México: Ed. Limusa, 1980.
38. Martínez A, Vega Plá J. Amplificación del DNA *in vitro*: Consideraciones Generales. III Curso Internacional de Especialización sobre la conservación y utilización de las razas de animales domésticos locales en sistemas de explotación tradicionales; 2002 septiembre- octubre; (Córdoba) España: CYTED. 2002.
39. Karp. Biología Celular. México: Ed Mc Graw Hill, 1987.
40. Hong L, Liming S. The Origin and Genetic differentiation of native breeds of Pigs in Southwest China: An approach from Mitochondrial DNA polymorphism. *Biochemical Genetics* 1993; 31 (1/2): 51-60.
41. Kim K, Yang Y, Lee S, Park C. Phylogenetic relationships of Cheju horses to other horse breeds as determined by mtDNA D-loop sequence polymorphism. *Animal Genetics* 1999; 30:102-108.
42. Watanabe T, Hayashi Y, Ogasawara N. Polymorphism of mitochondrial DNA in pigs based on restriction endonuclease cleavage patterns. *Biochemical Genetics* 1984; 23 (1/2):105-113.
43. Kim K, Lee J, Li K, Zhang P. Phylogenetic relationships of Asian and European pigs breeds determined by mitochondrial DNA D-loop sequence polymorphism. *Animal Genetics* 2002; 33: 19-25.
44. Marklund S, Chaudhary R, Marklund L, Sandberg K. Extensive mtDNA diversity in horses revealed by PCR-SSCP analysis. *Animal Genetics* 1995; 26: 193-196.
45. Bowling TA, Del Valle A, Bowling M. A pedigree-based study of mitochondrial D-loop sequence variation among Arabian horses. *Animal Genetics* 2000; 31: 1-7.
46. Ishida N, Hasegawa T, Takeda K. Polymorphic sequence in the D-loop region of equine mitochondrial DNA. *Animal Genetics* 1994; 25: 215-221.
47. Chinnery P. Modulating heteroplasmy. *Trends in Genetics* 2002; 18 (4):173-176.
48. Takeda K, Onishi A, Ishida n, Kawakami K. SSCP analysis of pig mitochondrial DNA D-loop region polymorphism. *Animal Genetics* 1995; 26:321- 326.
49. Lewin B. Genes VII. New York: Ed. Oxford, 2000.

50. Kavar T, Habe F, Brem G. Mitochondrial D-loop sequence variation among the 16 maternal lines of the Lipizzan horse breed. *Animal Genetics* 1999; 30: 423-430.
51. Clayton D. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 1982; 28:693- 705.
52. Bowling TA, Del Valle A, Bowling M. Verification of horse maternal lineage based on derived mitochondrial DNA sequence. *Journal of Animal Breed Genetic* 1998; 115:351-355.
53. Aranguren MJ, Jordana VJ. Caracterización y Relaciones filogenéticas de 5 razas asnales españolas en peligro de extinción mediante la utilización de marcadores de ADN : su importancia en los programas de conservación (*Tesis Doctoral*). Universidad Autónoma de Barcelona. (Bellaterra), España, 2002.
54. Alonso MR. Protocolos. Laboratorio de Genética Molecular- Depto. de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina UNAM, 1996.
55. Martínez A, Vega Plá J. Caracterización Genética. *III Curso Internacional de Especialización sobre la conservación y utilización de las razas de animales domésticos locales en sistemas de explotación tradicionales.* ; 2002 septiembre-octubre; (Córdoba) España: CYTED, 2002.
56. Boyle SJ, Lew MA. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends in Genetics* 1996; 11, 8.
57. ABI PRISM™, BigDye Terminator Cycle Sequencing v2.0. Protocolo de Secuenciación. Applied Biosystems Division, Perkin-Elmer, Foster City, CA USA, 2002.
58. DNASIS [computer program] v2.6 .Hitachi. Software Engineering; 1994-1998.
59. Felsenstein J. Phylogeny inference package PHYLIP [computer program] Version 3.57c. University of Washington, Seattle: Executables for PC; 1995.
60. Clustal W. EBML (European Molecular Biology Laboratory). ebi (European Bioinformatics). Available from: [www.ebi.ac.uk/ clustal w](http://www.ebi.ac.uk/clustal.w).
61. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *J Mol Evol* 1980; 16:111-120.
62. Saito N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4: 406-425.

63. **Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An Approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; 39, 573-791.**
64. **Margush T,McMorris F. Concensus n-trees.Buletin of Mathematical Biology 1981; 43:239-244.**
65. **Tree View for Windows (Win32) [computer program]. Version 1.2*. University of Glasgow: Division of Environmental and Evolutionary Biology; 1996.**
66. **Sambrook, Fritsh, Maniatis.Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd Ed. USA: Ed. Cold Spring Harbor. 1989.**

CAPITULO 9

- ANEXOS -

9.1 - Anexo 1 -

Técnica utilizada para la obtención de muestras sanguíneas

Se colectó en tubos vacutainer con anticoagulante EDTA (tapón lila) de 5 a 10 ml de sangre obtenida por vía intravenosa (vena yugular) de burros criollos de las diferentes regiones de la República Mexicana principalmente en los Estados que visitan los equipos de las clínicas ambulatorias miembros del programa IDPT-ILPH-UNAM (23).

Los burros son elegidos aleatoriamente en las diferentes regiones, la única limitante es que no sean individuos emparentados con el fin de aumentar la heterogeneidad de los individuos y que sean originarios del lugar ó región donde se tomaron las muestras, no se tomó en cuenta edades, ni sexo.

La muestra del burro Siciliano en casa particular.

9.2 - Anexo 2 -

Purificación de ADN a partir de sangre

A 500 µl de sangre se le agrega 1 ml de ddH₂O fría, centrifugar por 10 min. a 14 000 r.p.m., agregar nuevamente 500 µl de sangre + 1 ml de ddH₂O fría, centrifugar por 10 min. a 14 000 r.p.m., y realizar dos lavados más con 1 ml de dd H₂O fría.

Resuspender la pastilla en 500 µl de Solución de Lisis, se agrega 1 - 2 µl de ARNasa (10-20 µg/ml final), se incuba a 37° C durante una hora. Posteriormente se agrega 1-2 µl de Proteinasa K (50-100 µg/ml final) y se incuba toda la noche a 55° C.

Al siguiente día agregar 250 µl de 5M NaCl [2M final], agitar por 15 segundos en Bortex, centrifugar a 12,000 r.p.m. 10 min. , se recupera el sobrenadante, se cambia a un tubo nuevo y se agrega un volumen de Isopropanol ó dos volúmenes de Etanol frío,

se mezcla y se deja en reposo 30 minutos a -20° C, después centrifugar a 14,000 r.p.m. durante 5 minutos, se elimina el sobrenadante y se hacen 2 lavados con 500 μ l de Etanol al 70 % frío, y centrifugar a 14,000 r.p.m. 5 minutos.

Se decanta y se escurre al ADN y se seca a 55° C 25 minutos en bomba de vacío, agregar 150 μ l agua deionizada, cuantificar las muestras obtenidas en un fluorómetro y ver la integridad en geles de Agarosa al 1% + TBE 1X. (54)

Soluciones Utilizadas:

- *Solución de Lisis:* 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 400 mM NaCl, 20 mM EDTA, 0.5% SDS.
- *RNAasa:* 20 μ g/ml
- *Proteinasa K:* 75 μ g/ml.

9.3 - Anexo 3 -

Preparación de Geles de Agarosa al 1%

9.3.1 En TBE 1X

Colocar 1 gr de Agarosa en 100 ml de TBE 1X, calentar en baño María hasta que la Agarosa se disuelva. Posteriormente agregar Bromuro de Etidio a una concentración final de 0.5 μ g/ml.

Soluciones Utilizadas:

- *TBE 5X (Solución Stock Concentrada):* 54 grs. de Tris base, 27.5 grs. de ácido Bórico, 20 ml de EDTA 0.5M(pH 8.0) disolver y aforar a 1 litro con agua destilada(66).
- *TBE 1X:* 89Mm Tris-Borate, 2 Mm EDTA(pH 8.0)(66)
- *Bromuro de Etidio* 10 mg/ml: disolver 10 mg por cada ml de agua destilada(66).

9.3.2 En TAE 1X *

Se coloca 1 gr de Agarosa al 1 % en 100 de TAE 1X, calentar en baño María hasta que la Agarosa se disuelva. Posteriormente agregar Bromuro de Etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml.

Soluciones Utilizadas:

- TAE 50X (Solución Stock Concentrada): 242 grs. Tris- Base, 57.1 ml de ácido Acético, 100 ml de 0.5M EDTA (pH 8.0) disolver y aforar a 1 litro con agua destilada. (66)
- TAE 1x: 0.04 M Tris acetato, 0.001M EDTA (pH 8.0)(66)
- Bromuro de Etidio 10 mg/ml: disolver 10 mg por cada ml de agua destilada (66).

9.4- Anexo 4 -

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

9.4.1 Condiciones de Reacción

REACTIVOS	Concentración	Volumen Adicionado
Deoxinucleótidos dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	[2 mM] (10X)	2 µl
Mith4+ MitL3	10 µM	1µl
BSA	3 mg/ml	1µl
Tritón	2 %	1µl
Buffer C (1.5 mM MgCl ₂)	10 X	2 µl
Taq Polimerasa	5 U/µl	0.5 µl
ADN	50 ng/µl	4 µl
ddH ₂ O		cbp 20 µl

9.5 - Anexo 5 -

Purificación de fragmentos a partir de geles de Agarosa

Se corta la banda de interés a partir de un gel de Agarosa al 1% + TAE 1X. se pesa el fragmento y se adicionan 3 volúmenes de Yoduro de Sodio 6M, calentar a 55° C durante 10 minutos hasta que la Agarosa este completamente disuelta, agregar 20 µl de Perlas de Sílica, incubar 2 horas en hielo. Recuperar la pastilla centrifugando a 12,000 r.p.m. durante 10 min, lavar la pastilla 2 veces con 500 µl de Solución de New Wash 1X fría, centrifugando en cada lavado a 1,200 r.p.m. 5 minutos, secar la pastilla a 55° C por 10 min y resuspender en 50 µl de H₂O dd estéril, calentar a 55°C durante 10 minutos y centrifugar a 10,000 r.p.m. por 4 min, recuperar el sobrenadante (56). Cuantificarlo en un fluorómetro y correr en gel de Agarosa al 1 % + TBE 1X para verificar la integridad.

Soluciones Utilizadas:

- *Yoduro de Sodio (NaI) 6M: 89.93 g Yoduro de Sodio 1M en 50 ml de agua, calentar y aforar a 100 ml con ddH₂O.*
- *Perlas de Sílica (100 mg/ml): 10 g de Sílica (Sigma) (S-5631) en 100 ml de PBS, centrifugar, resuspender en 3 M NaI 100 mg/ml. (56)*
- *Solución de New Wash 10X: 50mM NaCl, 10 mM TrisHCl pH 7.5, 2.5mM EDTA, 50% v/v Etanol. (56)*
- *Solución de New Wash 1X: 5 ml New Wash 10X, 25 ml Etanol 100%, 20 ml H₂O.*

9.6 - Anexo 6 -

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Reacción de Secuencia (57)

Mezcla de Reacción (0.5 X)	4 μ l
ADN (20 ng/ μ l)	de acuerdo a la cuantificación de cada fragmento.
Iniciadores * (3.2 pM)	1.6 μ l
H ₂ O deionizada	cbp 10 μ l

* Preparar una reacción para cada iniciador (MitL3 y BRI)

9.7 - Anexo 7 -

Paso por columnas de Sephadex G50

Se coloca en un tubo colector 800 μ l de Sephadex G50, se centrifuga a 2,700 r.p.m. por 3 min para eliminar las burbujas de aire, se lava la resina con 50 μ l de H₂O deionizada centrifugando bajo las mismas condiciones hasta lograr equilibrar dichas columnas, después colocar 25 μ l de la reacción de secuencia obtenida, centrifugar a 2,700 r.p.m. durante 3 min y recuperar. Posteriormente se secan en una bomba de vacío(66).

Soluciones Utilizadas:

- ◆ *Sephadex G50 DNA Grade: 10 mg de Sephadex por cada 160 ml de agua.*

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido Desoxirribonucleico
ADNmt	Acido Desoxirribonucleico mitocondrial
pb	pares de bases
cbp	cuanto baste para
pH	Potencial de Hidrogeno
min.	minutos
ml	mililitro
μ l	microlitro
ng	nanogramo
r.p.m.	revoluciones por minuto
ddH ₂ O	Agua destilada
TBE	Tris-borato
TAE	Tris-acetato
μ g	microgramos
mM	milimoles
M	Molar
Kb	Kilobases

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se les ve orgullosos,
fogosos,
con aire despierto,
bien rectas las grandes orejas, observando...
sin arrogancia ni modestia.

Ha hecho maravillas en caminos,
donde colocadas las albardas y cargado,
sube pendientes sin dudar,
sin desfallecer,
sin dar pasos en falso.

¿Por qué sigue sufriendo la comparación
con el caballo por parte de la gente?
Porque es más modesto, menos arrogante, menos exigente,
Porque es un animal de carga y no de desfiles,
Porque sirve al intendente y no al guerrero.

Recuerda que nunca decepciona,
nunca te rechaza
y con frecuencia asombra,
incluso te emociona.

Se trata de un buen compañero,
al que hay que conocer y al que hay que cuidar,
es una especie que debe ser protegida y salvaguardada.,
Que ha sabido adaptarse a todas las situaciones gracias a lo poco
exigente que es con respecto a sus condiciones de vida,
de alimentación y de cuidados.

Y por mucho más tiempo aún sabrá hacernos felices,
nos hará grandes servicios por su robustez,
su gentileza sin igual,
su docilidad
y sumisión.

Edgard Pisani
Ex ministro de Agricultura de España.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

