

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**“CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA
POBLACIONAL DELFINES EN MEXICO MEDIANTE CURVAS DE
DISOCIACIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN (HRM)”**

T E S I S

QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Q.F.B. MARICELA SARITA MONTAÑO VALDÉZ

DIRECTORES DE TESIS:

DR. JOEL ARMANDO VÁZQUEZ PÉREZ

DRA. EVANGELINA MUÑOZ SORIA





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 8:00 horas del día 10 del mes de diciembre del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M para examinar la tesis titulada:

“Caracterización de la Diversidad Genética Poblacional de Delfines en México Mediante Curvas de Disociación de Alta Resolución (HRM)”

Presentada por la alumna:

Montaño
Apellido paterno

Valdéz
Apellido materno

Maricela Sarita
Nombre(s)

Con registro:

A	0	9	0	6	4	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

M. en C. Evangelina Muñoz Soria

Dr. Joel Armando Vásquez Pérez

Dr. José Leopoldo Aguilar Faisal

Dra. Norma Estela Herrera González

Dr. Ángel Millar García

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Eleazar Lara Padilla



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
I.P.N.
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION
CONTROL ESCOLAR



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 10 del mes diciembre del año 2010, el que suscribe Montaño Valdéz Maricela Sarita alumna del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud con número de registro A090646 adscrito a La Escuela Superior De Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de M. en C. Evangelina Muñoz Soria y cede los derechos del trabajo intitulado “Caracterización de la Diversidad Genética Poblacional de Delfines en México Mediante Curvas de Disociación de Alta Resolución (HRM)”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección sheccid_1931@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Montaño Valdéz Maricela Sarita

Nombre y firma

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE GRÁFICAS	iv
RESUMEN	v
SUMMARY	vi
I. ANTECEDENTES	1
II. INTRODUCCIÓN	3
2. La genética de poblaciones	3
2.2 Ley de Hardy-Weinberg	3
2.3 polimorfismos genéticos	4
2.3.1 Polimorfismos basados en el DNA repetitivo	5
2.4 Estructura y función del DNA	6
2.4.1 DNA repetitivo disperso	8
2.4.2 DNA repetido en tándem	8
2.4.3 Minisatélites	9
2.4.4 Microsatélites	10
2.4.4.1 Aplicaciones de los microsatélites	14
2.5. Análisis de polimorfismos de DNA por PCR	14
2.6 Reacción en cadena de la polimerasa	15
2.7 HRM	15
2.7.1 Colorantes de unión al DNA	16
2.8 Diversidad Poblacional de <i>Tursiops truncatus</i>	19
2.8.1 Problemática de delfinarios en México	19
2.9 Características Generales	20
2.10 Descripción	20
2.11 Distribución y hábitat	21
2.12 Comportamiento	22
2.13 Reproducción	22
2.14 Alimentación	23
2.15 Amenazas	24
2.16 Estatus y conservación	24
III. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	28
IV. JUSTIFICACIÓN	29
V. META	30
VI. OBJETIVO GENERAL	31
VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
VIII. TIPO DE ESTUDIO	32
IX. MATERIALES Y MÉTODOS	33
9.1 Extracción de DNA	33

9.2 Cuantificación de DNA	33
9.3 Reacción en cadena de la polimerasa	33
9.4 Geles de agarosa	35
9.5 Preparación de TBE 5X	35
9.6 Purificación de los amplicones para secuenciación	35
9.7 Reacción de secuencia	35
9.8 Purificación de la placa de secuenciación	35
9.8 Estandarización de HRM	37
9.9 Clonación	37
9.10 Purificación del plásmido	38
X. RESULTADOS	39
10.1 Estandarización de iniciadores	39
10.2 Estandarización de HRM	40
10.3 Iniciador TexVet4	41
10.4 Iniciador Ev37Mn	44
10.5 Iniciador TexVet1	49
10.6 Iniciador TexVet2	52
10.7 Iniciador TexVet9	55
10.8 Iniciador D22	59
XI. DISCUSIÓN	62
XII CONCLUSIONES	68
XIII. BIBLIOGRAFÍA	70

NDICE DE FIGURAS

Nº		Pág.
Fig. 1	Clasificación de las secuencias de DNA repetitivo	7
Fig. 2	Clasificación de los microsátélites	13
Fig. 3	Unión de colorante EVA green	17
Fig. 4	<i>Tursiops truncatus</i>	20
Fig. 5	Curva de disociación diferenciada	40
Fig. 6	Alineamiento de secuencias	43
Fig. 7	Electroferograma de la muestra cinco analizada con el iniciador Ev37Mn	48
Fig. 8	Fotografía de un gel de agarosa al 2% de los iniciadores TexVet1 y TexVet2	49
Fig. 9	Alineamiento TexVet1	52
Fig. 10	Electroferograma de la muestra 2-3	55
Fig. 11	Alineamiento de TexVet2	55
Fig. 12	Electroferograma de las muestras 9-3 y 9-9	58
Fig. 13	Alineamiento de las secuencias 9-3, 9-6, 9-9 y 9-10	59

ÍNDICE DE TABLAS

Nº		Pág.
Tab. 1	Clasificación taxonómica de <i>Tursiops truncatus</i>	20
Tab. 2	Iniciadores utilizados para el desarrollo de la PCR	39
Tab. 3	Condiciones de iniciadores	39
Tab. 4	Tm de nueve muestras de delfines <i>Tursiops truncatus</i> del iniciador TexVet4	43
Tab. 5	Tm de nueve muestras de delfines <i>Tursiops truncatus</i> del iniciador Ev37Mn	47
Tab. 6	Secuencias de regiones microsátélites	48
Tab. 7	Tm de nueve muestras del iniciador TexVet1.	51
Tab. 8	Tm de las muestras 2-1 a 2-10 del iniciador TexVet2	54
Tab.9	Tm de las muestras9-1 a 9-10 del iniciador Texvet9	57
Tab.10	Secuencias del Iniciador Texvet9	58
Tab.11	Tm del iniciador D22 de las muestras 1 al 10	60
Tab.12	Secuencias de las muestras analizadas con el iniciador D22.	61
Tab.13	Resumen de la región microsatélite de los iniciadores analizados	69

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Nº		Página
Gráfica 1	Curva de disociación	41
Grafica 2	Curva TM	42
Gráfica 3	Curva de disociación del iniciador Ev37Mn	44
Grafica 4	Curva de disociación d ela muestra uno analizada con Ev37Mn	45
Grafica 5	Curva de disociación dela muestra ocho analizada con Ev37Mn	45
Grafica 6	Curva de disociación dela muestra cinco analizada con Ev37Mn	46
Grafica 7	Curva TM del iniciador Ev37Mn	46
Grafica 8	Gráfica de disociación de DNA TexVet1.	50
Gráfica 9	Curva de disociación diferenciada de la muestra 1-3	50
Grafica 10	Curva TM del iniciador TexVet1	51
Grafica 11	Curva de disociación de DNA TexVet2.	53
Grafica 12	Curva de disociación diferenciada de la muestra 2-3	53
Grafica 13	Curva Tm del iniciador Texvet2	54
Grafica 14	Curva de disociación de DNA de TexVet9	56
Grafica 15	Curva de disociación diferenciada de la muestra 9-3	56
Grafica16	Curva de disociación diferenciada de la muestra 9-9	56
Grafica17	Curva Tm del iniciador TexVet9.	57
Grafica18	Curva de disociación del iniciador D22	59
Grafica19	Curva Tm del iniciador D22	61

GLOSARIO

μ L: Microlitro

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: deoxinucleótido trifosfato

dsDNA: DNA de doble cadena

HRM: Curvas de disociación de alta resolución

Kb: Kilobases

LINEs: Elementos nucleares largos dispersos

Loci: plural de locus

LOCUS: posición determinada de un gen en un cromosoma

mM: Milimolar

nm: Nanómetros

Pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

QTL's: Loci de caracteres cuantitativos

RFLPs: Polimorfismos de restricción en número variable

RNA: Ácido ribonucleico

SINEs: Elementos nucleares cortos dispersos

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido

STRs: Repetiones cortas en tándem

TM: Temperatura de fusión

VNTRs: Repeticiones en tándem de número variable

RESUMEN

La diversidad genética poblacional sin lugar a dudas es una herramienta indispensable en el desarrollo de huella genética, sin embargo las metodologías empleadas en el desarrollo de ésta hacen complicado el análisis de los resultados por lo cual en este trabajo se propone desarrollar huella genética mediante el desarrollo de curvas de disociación de alta resolución (HRM) la cual es una metodología de punta y altamente sensible, capaz de detectar cambios en un solo nucleótido, además se reduce el riesgo de contaminación ya que el análisis se realiza en un tubo de PCR convencional cerrado. En el presenta trabajo se analizaron nueve muestras pertenecientes a nueve delfines *Tursiops truncatus*, el análisis se realizó con seis marcadores microsatélites: TexVet1, TexVet2, TexVet4, TexVet9, D22 Y Ev37Mn, donde los marcadores, TexVet1, TexVet2, D22 Y Ev37Mn resultaron ser polimórficos, el iniciador TexVet4 no resultó ser polimórfico por lo cual no se recomienda utilizar en trabajos posteriores con este fin, el marcador TexVet9 contrario a lo reportado fue capaz de diferenciar entre individuos aunque no en la secuencia consenso del microsatélite si no, río arriba de la secuencia consenso se detecto un cambio en un solo nucleótido, lo cual confirma la especificidad del empleo de curvas de disociación de alta resolución, además de la capacidad de este marcador para diferenciar entre individuos y así poder emplearlo en el desarrollo de huella genética. Una de las principales ventajas del empleo de curvas de disociación fue, que una vez estandarizado el método se realizó una matriz de TM de acuerdo al patrón de repeticiones, por lo cual ya no fue necesario secuenciar todas las muestras para confirmar el número de repeticiones.

SUMMARY

Population genetic diversity is undoubtedly an essential tool in the development of genetic fingerprinting, but the methodologies used in developing this make it difficult to analyze the results in this paper which aims to develop genetic fingerprinting by developing dissociation curves of high-resolution (HRM) which is a cutting-edge methodology and highly sensitive, capable of detecting single nucleotide changes also reduce the risk of contamination because the analysis is performed in a conventional PCR tube closed . In this paper we analyzed nine samples from nine dolphin *Tursiops truncatus*, the analysis was performed with six microsatellite markers: TexVet1, TexVet2, TexVet4, TexVet9, D22 and Ev37Mn, where markers, TexVet1, TexVet2, D22 and found to be polymorphic Ev37Mn , the initiator was not to be polymorphic TexVet4 therefore not recommended for use in subsequent work to this end, the score TexVet9 contrary to what was reported was able to differentiate between individuals but not in the consensus sequence of the microsatellite or not, upstream of the consensus sequence was detected a change in one nucleotide, confirming the specificity of the dissociation curves using high resolution, plus the ability of this marker to differentiate between individuals and thus be able to use it in the development of genetic fingerprinting. One of the main advantages of using dissociation curves was once standardized the method performed an array of TM according to the pattern of repeats, so it was no longer necessary to sequence all samples to confirm the number of repetitions.

I. ANTECEDENTES

Los microsatélites son marcadores moleculares frecuentemente utilizados en genética de poblaciones, el principal objetivo que se persigue es estudiar, determinar y medir la variación existente entre y dentro de los individuos de una población esto se realiza midiendo polimorfismos, se han reportado diferentes técnicas en el análisis de microsatélites, las cuales son típicamente desarrollados en geles de poliacrilamida o convencionalmente por electroforesis capilar y secuenciación. Curva de disociación de alta resolución (HRM) es un método novedoso en el estudio de microsatélites que combina un análisis detallado de las secuencias en un tubo cerrado en PCR en tiempo real.

Mader *et al.*, (2008), utilizaron microsatélites de la planta *Origanum vulgare* y demostraron que HRM es una técnica altamente sensible para el análisis de microsatélites incluso es capaz de detectar SNP's (Polimorfismos de un solo nucleotido).

Mackay *et al.*, (2008), realizaron curvas de disociación en regiones microsatélites para diferenciar especies de uva y concluyen que HRM es un método sensible, proporciona beneficios significativos en la secuencia y especificidad de resolución; además reduce al mínimo la contaminación ya que el análisis se realiza en un tubo cerrado. Proponen este novedoso método para el análisis de microsatélites sobre todo en laboratorios donde no se tiene acceso inmediato a un secuenciador capilar.

Con base en estas investigaciones y tomando en cuenta el tiempo empleado en el desarrollo y el bajo costo que genera realizar identificación de individuos con esta novedosa técnica se decidió realizar identificación de delfines nariz de botella por medio de HRM.

II. INTRODUCCIÓN

2.1 La Genética de poblaciones

La genética de poblaciones es el estudio de la aplicación de las leyes de Mendel, paralelo al estudio de los cambios de las frecuencias génicas y como tal se relaciona estrechamente con la genética evolutiva. El objetivo fundamental de la genética de poblaciones es analizar las consecuencias de las leyes de la herencia mendeliana sobre la composición genética de las poblaciones y la influencia que ejercen procesos como la mutación, selección, migración y deriva genética sobre las frecuencias genéticas de las mismas. El estudio se centra en poblaciones y no en el individuo aislado, ya que éste no puede ser considerado como unidad evolutiva puesto que a lo largo de su existencia no sufre cambios genéticos o evolutivos, en cambio, la conformación genética de una población puede cambiar y evolucionar de generación en generación.

La genética de poblaciones se basa en el estudio de una población ideal que se define como un grupo de individuos que se reproducen entre sí de manera aleatoria y que pueden presentar diferencias en las frecuencias génicas con respecto a otras poblaciones vecinas.

2.2 Ley de Hardy-Weinberg

Esta ley es el principio básico de la genética de poblaciones, fue postulada en 1908. De acuerdo con esta ley en toda población de gran tamaño en la que los apareamientos se dan al azar y presenta ausencia de fuerzas evolutivas como: mutación, selección y migración, las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación.

Una población que cumpla satisfactoriamente estas características se dice que está en equilibrio de Hardy- Weinberg y sus frecuencias genotípicas se determinarán por sus frecuencias génicas. En el caso de un locus con dos alelos codominantes cuyas frecuencias génicas son p y q respectivamente, la frecuencia de equilibrio para los tres genotipos se establece por la siguiente fórmula:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

La finalidad de los estudios poblacionales es definir las poblaciones analizadas mediante frecuencias génicas utilizando marcadores genéticos los cuales permiten la identificación de cada alelo por locus, la obtención de datos poblacionales, y el cálculo de las frecuencias alélicas, de esta manera podemos estimar las distancias genéticas entre poblaciones o entre individuos (Bowcock, 1994).

La genética de poblaciones representa un área donde los microsatélites han sido ampliamente utilizados, ya que permiten estudiar los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y analizar las relaciones genéticas existentes entre las mismas. Este tipo de estudio es de gran interés para realizar estimaciones de la diversidad genética y de la consanguinidad existente en poblaciones de animales domésticos en peligro de extinción.

2.3. Polimorfismos genéticos

En genética, se dice que existe un polimorfismo de DNA cuando en una población existen dos o más alelos para un determinado locus, de tal forma que su frecuencia no pueda ser debida a una mutación recurrente. Los polimorfismos son diferencias genéticas que crean

variación dentro de una especie. Todos los polimorfismos reflejan, en última instancia, alteraciones en la secuencia del DNA. Dichas alteraciones pueden producir cambios en la estructura de diversas proteínas, los cuales pueden demostrarse por cambios en su actividad enzimática, en la termoestabilidad o en la movilidad electroforética. Algunos polimorfismos se producen, sin embargo, en regiones del DNA que no son codificadoras, de manera que no tienen una expresión fenotípica. Los polimorfismos de DNA son considerados hoy en día una herramienta indispensable en el estudio de poblaciones.

El creciente desarrollo de la biología molecular y las nuevas herramientas estadísticas permiten identificar y analizar estas variaciones. Desde el punto de vista molecular estas variaciones se denominan “polimorfismos”, los cuales son derivados de cambios espontáneos en el DNA que hoy en día se pueden medir, a través de diferentes técnicas disponibles. Los cambios van desde la substitución de un solo nucleótido, que es el tipo más común de mutación y que puede ser detectado a través del estudio y análisis de los polimorfismos de base única (SNP), hasta mutaciones que involucran mayores números de sitios dinucleotídicos (Dodgson *et al.*, 1997).

2.3.1. Polimorfismos basados en el DNA repetitivo

Solo 30-40% del DNA se transcribe y de este sólo un 10% codifica proteínas (Sambrook *et al.*, 2001). La gran mayoría del DNA no es codificante. Este DNA puede existir como única copia de DNA y actuar, por ejemplo, como un espaciador entre regiones de DNA codificante, o puede estar presente en múltiples copias a lo largo del genoma, este último es denominado DNA repetitivo. Este DNA, que puede llegar a constituir el 30% de todo el

genoma, no se transcribe en ARN ni se expresa como productos génicos. Sin embargo, posee la capacidad de amplificar su número de copias y de distribuirse por todo el genoma (Luque y A. Herráez., 2001). Antes de profundizar en el estudio de polimorfismos vamos a referir algunos aspectos básicos del DNA.

2.4. Estructura y función del DNA

El DNA es la molécula que contiene toda la información genética del individuo, el conjunto de esta información presente en las células se denomina genoma; dependiendo de su localización podemos identificar un genoma complejo nuclear y un genoma mitocondrial simple (Lewin, 2008).

En el genoma existen dos tipos de DNA:

DNA Codificante (30%). Este tipo de DNA, tiene una función conocida, por ejemplo la expresión de un gen cuyo producto final es una proteína.

DNA no codificante (70%). Comprende secuencias de DNA transcripcionalmente inactivas de funciones diversas, un ejemplo son los promotores de la transcripción. En muchos casos este DNA es de función desconocida o sin función aparente, cabe mencionar que este tipo de DNA por ser altamente polimórfico es de gran interés y lo podemos clasificar en:

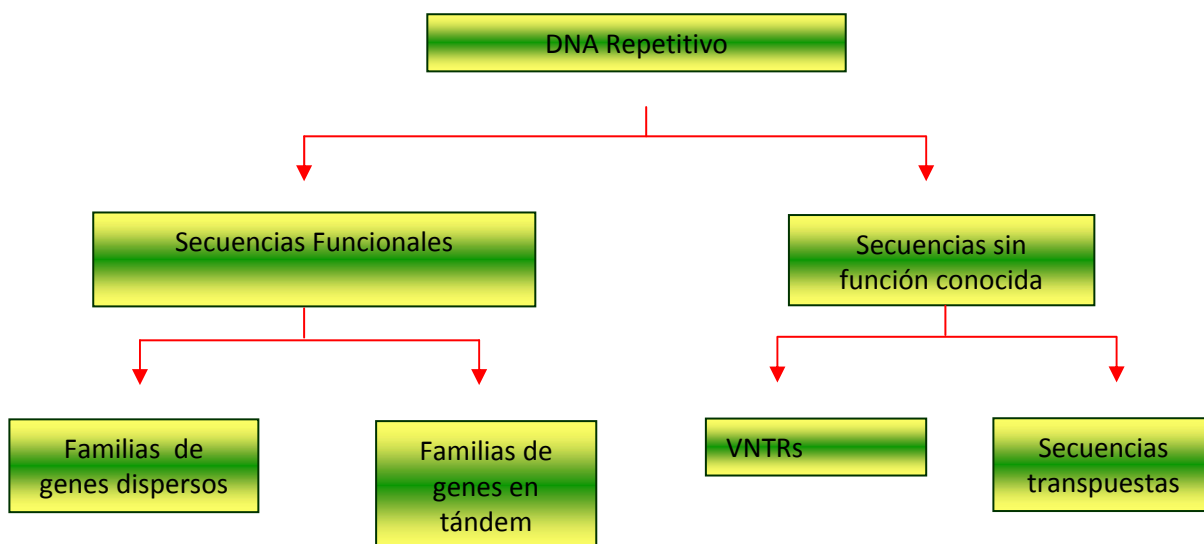
DNA de copia única. Está compuesto por secuencias que se encuentran representadas una o muy pocas veces en el genoma. Se cree que puede actuar como espaciador entre regiones codificantes de DNA.

DNA de copia múltiple. Consta de secuencias presentes en más de una copia en cada genoma. Las secuencias de este tipo de DNA, también denominado DNA repetitivo, se clasifica a su vez con base en sus características de disposición en el genoma y el tamaño de la unidad de repetición (fig. 1).

>**DNA Repetitivo disperso (15-20% del genoma).** Las unidades de repetición no se agrupan si no que aparecen dispersas a lo largo del genoma. Está representado por 2 familias : SINEs (Short interspersed nuclear elements) y LINEs (Long interspersed nuclear elements).

>**DNA Repetitivo en tándem (10% del genoma).** Se compone de bloques de secuencias repetitivas agrupadas en tándem. De acuerdo a tamaño de la unidad se subdivide en tres tipos: DNA satélite, DNA minisatélite y DNA microsatélite

.Figura 1. Clasificación de las secuencias de DNA repetitivo (Griffiths *et al.*, 2000).



2.4.1 DNA repetitivo disperso

Está representado por dos familias que se diferencian en el número de nucleótidos que constituyen la unidad de repetición. Algunos componentes de estas familias pueden ser considerados como transposones, que son fragmentos inestables de DNA con capacidad migratoria, pueden transportarse a sí mismas a otras localizaciones dentro del genoma, es posible que constituyan la principal causa de mutación en el genoma (Luque y A. Herráez., 2001; Lewin, 2008).

SINEs (Short Interspersed Nuclear Elements). Representan alrededor del 10% del genoma. Los constituyen repeticiones menores de 500 pb. La familia más representativa y mejor estudiada es la *ALu*, así llamada por presentar un lugar de reconocimiento para la enzima de restricción *Alu I* (Slagel *et al.*, 1987).

Las secuencias *Alu* son las más abundantes en el genoma humano aproximadamente 300 000 miembros en el genoma haploide y tienen una secuencia muy conservada de unos 300 pb relativamente rica en GC. Se localizan en las regiones eucromáticas, las cuales son regiones de cromatina que permiten la transcripción debido al nivel relajado de compactación, las secuencias *Alu* se localizan preferentemente en las llamadas bandas “R” ó bandas reversas (de repetición precoz), que son las regiones cromosómicas más activas a nivel transcripcional (Singer, 1982).

Existen otras familias como la NTS (Non Transcribed Spacer) que se localizan en primer lugar en la región homónima del DNA ribosomal (Singer, 1982).

LINEs (Elementos nucleares dispersos largos). Constituyen del 2 al 5% del genoma, están constituidos por secuencias repetitivas mayores de 500pb. El *LINE-1* o familia *LI*, llamada también *Kpm*, es el *LINE* más abundante en humanos, presentando un número elevado de repeticiones. Los elementos *LI* se localizan principalmente en la eucromatina, al igual que la familia *Alu*, pero en este caso a nivel de las bandas “G” (de replicación tardía) obtenidas al teñir los cromosomas con Giemsa (Singer, 1982).

2.4.2 DNA repetido en tándem

Este tipo de secuencias se denomina genéricamente satélites y se caracterizan por presentarse como bloques de nucleótidos, en número variable que se repiten en tándem ampliamente distribuidos por el genoma. El DNA satélite se localiza en las regiones centroméricas de los cromosomas (Fowler *et al.*, 1988).

En función del tamaño, número de pares de bases, de las secuencias repetitivas el DNA satélite se divide en:

- Minisatélite.
- Microsatélite.

2.4.3 Minisatélites

Los minisatélites son polimorfismos constituidos por una secuencia de nucleótidos que se repite en tándem un número determinado de veces. El número de veces que se repite la secuencia puede variar de una persona a otra, esto se da, aumentando ó disminuyendo el

número total de unidades de repetición. Los bloques de secuencias de este DNA poseen un tamaño aproximado entre 0.1 y 40 Kb y la unidad de repetición, es de 10-100 pb (Lewin, 2008; Litt y Luty., 1989).

Estos loci (varios locus) son regiones de DNA no codificante y no están sujetos a una presión evolutiva intensa, por lo tanto tienen niveles de variación en su secuencia muy grandes. Esto se traduce en un gran número de secuencias de diferentes tamaños para un mismo locus, el cual es la posición específica que ocupa un gen en un cromosoma. El descubrimiento de los minisatélites como secuencias polimórficas fue realizado por Jeffreys *et al.*, 1985a, ellos encontraron una secuencia de 33 pares de bases que se repetía 4 veces en un intrón del gen de la mioglobina humana. Posteriormente denominaron a estos loci VNTRs (*variable number of tandem repeat*) aludiendo a la variación en el número de unidades de repetición. Tomado en sentido estricto, este término podría aplicarse a cualquier tipo de DNA repetitivo y no exclusivamente al minisatélite, al hacer referencia sólo al número de repeticiones, los minisatélites monomórficos, es decir que la unidad de repetición es constante en toda la población, no podrían incluirse (Armour *et al.*, 1994). En el genoma humano los minisatélites no se distribuyen al azar, se localizan preferentemente en las regiones subterminales de los cromosomas (Armour *et al.*, 1994).

2.4.4 Microsatélites

Son secuencias de DNA repetitivo en tándem en las que el número de nucleótidos de la unidad de repetición es muy pequeño, de dos a cinco pares de bases, por esta razón también se les denomina STR (*short tandem repeats*). Los STR son secuencias muy

polimórficas, con una alta frecuencia de distribución en el genoma humano, un STR cada seis kilobases (Luque y A. Herraéz., 2001; Tautz, 1989).

El elevado polimorfismo que presentan estos marcadores y la posibilidad de detectar ambos alelos, los hace muy útiles para identificaciones individuales, ya que resulta muy poco probable que dos individuos elegidos al azar, sin ser analizados para una serie de marcadores microsatélites compartan todos sus alelos. Para seleccionar los microsatélites a utilizar, estos deben presentar alta variabilidad, herencia estable (baja tasa de mutación), elevada reproducibilidad y precisión, la no presencia de alelos nulos, ser un procedimiento fácil, rápido, económico, potencialmente automatizable, que la información del genotipo pueda ser transferida rápidamente, que la fuente de DNA no esté limitada únicamente a muestras sanguíneas frescas ni a grandes cantidades de DNA y por último, presente una segregación independiente con otros marcadores al ser combinados en la prueba (Araguen, 2005; Powell *et al.*, 1996).

Los marcadores moleculares se caracterizan por estar bien distribuidos en todo el genoma por su versatilidad y gran número, y resultan adecuados en la identificación de especies, los marcadores moleculares que se utilizan para diferenciar individuos, aún aquellos que son muy afines entre sí, los “microsatélites o STR (*short tandem repeats*)”, presentan alto grado de polimorfismo y son codominantes (pueden distinguirse los dos alelos de un mismo locus) cada STR examina una sola porción del genoma y, por lo tanto, se requiere de varios de ellos para hacer una estimación válida (Torales *et al.*, 2005).

Estos marcadores consisten en regiones del genoma que contienen secuencias simples repetitivas que son amplificadas a través de PCR utilizando un par de primers específicos

(de 20 a 30 bases), complementarias a secuencias únicas que flanquean al microsatélite. Estas regiones son altamente polimórficas entre los individuos, ricas en formas alélicas, posibilitando un análisis genético preciso (Jeffreys *et al.*, 1985).

En la década de los ochenta, el desarrollo de sistemas muy sensibles de análisis del material genético y el descubrimiento de marcadores genéticos variables en las poblaciones han permitido con éxito la utilización de la tecnología del DNA recombinante en la identificación de individuos (Jeffreys *et al.*, 1985a, 1985b, 1985c, 1986; Hagelberg *et al.*, 1991; Honma *et al.*, 1989). La especificidad de esta tecnología se le conoce como Huella digital del DNA (DNA fingerprinting) la cual ha sido clave del éxito para la identificación de individuos. Estos marcadores genéticos o también llamados polimorfismos genético-moleculares son caracteres estables que se transmiten por herencia mendeliana simple y constituyen una expresión de la diversidad genética entre individuos de la misma especie (Ferreira y Gattapaglia, 1998).

De acuerdo al número de nucleótidos de la unidad de repetición se pueden distinguir cuatro tipos de STR: diméricos, triméricos, tetraméricos y pentaméricos. Los STR tetraméricos son los más frecuentes (The UTHA marker development group, 1995); Sin embargo, Chambers y MacAvoy (2000) proponen que los términos puro o complejo se utilicen para especificar uno o más motivos presentes en la secuencia consenso del microsatélite, e interrumpido se refiere a una o más bases no repetitivas en el interior de la secuencia del microsatélite (Fig. 2).

Tipo de microsatélite	Ejemplo
STR Puro	(CA) ₈
STR Interrumpido puro	(CA) ₃ CG (CA) ₆
STR compuesto	interrumpido (CA) ₄ TA (CA) ₂ CC (CA) ₂

Figura 2. Clasificación de microsatélites.

Los microsatélites han demostrado ser útiles dadas sus características de alto polimorfismo y amplia distribución en el genoma de todos los organismos. Algunas características de estos marcadores que le confieren ventaja *versus* otros como los minisatélites, RFLPs, etc son: un elevado grado de polimorfismos, su herencia es mendeliana simple, son codominantes (pudiendo diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos), son fáciles de medir y analizar, tienen una confiabilidad del 100%. Estos marcadores se encuentran generalmente en regiones no codificantes del genoma y distribuidos uniformemente (Araguen *et al.*, 2005).

Debido a estas ventajas, el uso de microsatélites ha tenido un gran impacto en el estudio de la genética tanto de animales como plantas, desde su descubrimiento en 1985. El análisis con microsatélites involucra la detección de fragmentos específicos de DNA y nos da la medida de los alelos (en pares de bases) en cada una de las regiones analizadas (Jeffreys *et al.*, 1986).

2.4.4.1. Aplicaciones de los microsatélites

Algunas de las aplicaciones de los microsatélites es en la identificación de individuos y en pruebas de paternidad: El principio de las pruebas de paternidad utilizando marcadores genéticos consiste en la comparación del genotipo y/o fenotipo de la descendencia con el de sus progenitores. Como principio “mendeliano”, uno de los alelos que presenta un individuo proviene del padre y el otro de la madre. En dicho análisis al igual que la identificación individual, la identificación de los testigos tanto a nivel fenotípico como genotípico debe ser perfectamente conocida y concordante con la información obtenida en los análisis realizados al individuo (Jeffreys *et al.*, 1985; Chakraborty y Kidd, 1991).

2.5. Análisis de polimorfismos de DNA por PCR

La introducción de la Reacción en Cadena de la Polimesara (PCR) vino a solucionar en gran medida muchas dificultades técnicas como el empleo de grandes cantidades de muestra y el tiempo de análisis. Esta técnica ha introducido un avance metodológico de enorme repercusión en genética, ya que nos permite trabajar con cantidades pequeñas de DNA aún estando degradado. Otras ventajas adicionales de la PCR son la rapidez, sencillez, facilidad de interpretación y un menor costo de la determinación, además de proporcionar una buena sensibilidad y especificidad.

2.6. Reacción en cadena de la polimerasa

La PCR es una técnica de amplificación de pequeñas secuencias de DNA que permite sintetizar millones de copias idénticas a partir de una cadena única. Se basa en la facilidad que posee el DNA para desnaturalizarse y renaturalizarse.

Para iniciar la síntesis de DNA se utilizan dos iniciadores o primers específicos, (secuencias de aproximadamente 20-30 nucleótidos de longitud complementarias a los extremos 5' del fragmento que se desea amplificar) en combinación con una DNA polimerasa termoestable que incorpora dNTPs.

La técnica más utilizada en la identificación de individuos es electroforesis en geles de poliacrilamida, este método consiste en una reacción de pcr, donde uno de los iniciadores se marca con un colorante fluorescente, posterior a esto los amplicones son visualizados en geles de poliacrilamida (Sumiyama *et al.*, 2008), la interpretación de los resultados consume mayor tiempo, la preparación de los reactivos y las altas probabilidades de contaminación comparado con las curvas de disociación de alta resolución (HRM); el cual es un método novedoso y altamente sensible, además este método reduce la probabilidad de contaminación ya que el análisis se realiza en un tubo cerrado (Mader *et al.*, 2008).

2.7 HRM

Análisis de disociación de DNA de alta resolución (HRM), una de las principales aplicaciones han sido en la determinación de SNP's (Wu *et al.*, 2008) donde la sensibilidad del método ha sido ampliamente demostrado. También ha sido utilizado en valoración de

metilación del DNA (Wojdacz *et al.*, 2007), recientemente se ha utilizado para detección de mutaciones desconocidas en regiones de baja complejidad (Price *et al.*, 2007) y para análisis de microsatélites (MacKay *et al.*, 2008).

HRM es una técnica que mide el decremento de la fluorescencia del colorante intercalado en el proceso de disociación de la doble cadena de DNA (dsDNA) durante la PCR. Al final de la PCR la señal de la fluorescencia es alta debido a la gran cantidad de dsDNA que se intercala con el colorante fluorescente acumulado en el proceso. Esta tecnología es tan sensible que es capaz de detectar dímeros de primers y otros productos inespecíficos debido a la fusión del colorante con el dsDNA sin embargo la distancia entre valores de T_m permite la discriminación de los amplicones y productos no específicos (Mader *et al.*, 2008). La curva T_m es característica para cada amplicon, depende del contenido GC, de los amplicones y la longitud de la secuencia (Ririe *et al.*, 1997).

2.7.1 Colorante de unión al DNA

Los colorantes de unión al DNA se han utilizado extensamente en desarrollo de técnicas de biología molecular para el análisis directo de cuantificación de ácidos nucleicos, estos colorantes tienen la propiedad de unirse al DNA de doble cadena mejorando la fluorescencia (figura 3). El bromuro de etidio es usado convencionalmente para teñir geles de agarosa, también se ha utilizado en PCR tiempo real (Higuchi *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1993). Otros como sondas moleculares (Yo Pro® y Yo Yo®) también se han reportado (Ogura *et al.*, 1994) donde la señal de fluorescencia es monitoreada en el final de la etapa de extensión.

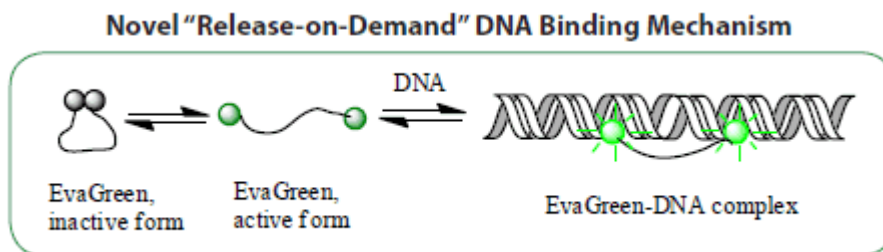


Figura 3. Unión del colorante EVA Green®. Tiene la propiedad de unirse sólo al DNA de doble cadena emitiendo fluorescencia, lo cual es visible en curvas de disociación en HRM en tiempo real.

Eva-Green®, es un colorante de saturación que se intercala en el surco menor del dsDNA, estos colorantes usualmente muestran un aumento en la fluorescencia del dsDNA de 20 a 100 y son comúnmente usados por su emisión máxima semejante a la fluoresceína y la óptica en la mayoría de los instrumentos comerciales de tiempo real se establecen para la detección de ésta (cerca de 520nm) longitud de onda. El colorante SYBER-Green® es popular para la detección de tiempo real debido que están fácilmente disponibles y su uso requiere poco diseño experimental adicional (Edwards *et al.*, 2005).

El análisis de curvas de disociación puede realizarse en instrumentos comerciales de tiempo real, usualmente en la parte final de la amplificación de PCR. La medida de la fluorescencia se realiza mientras la temperatura aumenta lentamente en los productos de reacción con una rampa de temperatura de 50°C a 95°C; en el caso del equipo Rotor Gene® la medida se realiza cada 0.1°C. A medida que aumenta la temperatura el dsDNA se disocia, como resultado de esto el colorante intercalante en este caso Eva-Green® es liberado por lo tanto en la curva mostrará un decremento en la fluorescencia. La mayoría de los instrumentos proveen un análisis de estos datos con un gráfico de la primera derivada de la fluorescencia respecto a la temperatura. Esta grafica puede mostrar uno o más picos representando la temperatura máxima a la cual la mitad del producto esta disociado y es

específico para cada fragmento de dsDNA analizado. Los productos de reacción generalmente se disocian a altas temperaturas y es tan específica que muestra dímeros de primers y otros productos inespecíficos. La temperatura de fusión está en función del contenido de GC y de la longitud del producto (Edwards *et al.*, 2005).

2.8. Diversidad Poblacional de *Tursiops truncatus*

2.8.1 Problemática de los delfinarios en México

En México existen 22 delfinarios sumando en total 223 delfines que viven en cautiverio, uno de los principales problemas de estos ejemplares es que al morir, los dueños de los delfinarios no reportan la muerte del delfin, simplemente consiguen otro ejemplar que tome el lugar del fallecido lo cual se considera un delito (LGEEPA Art. 79 fracc.II; LGVS Art.55; CPF Art. 417,420) contribuyendo así al tráfico de esta especie. El objetivo de este estudio es precisamente evitar esta situación en el país, por medio de el desarrollo de huella genética de cada delfin en los 22 delfinarios existentes, es importante mencionar que el método por el cual se desea desarrollar esta huella genética es altamente sensible al mismo tiempo es barato y rápido de realizar.

Existe un creciente desarrollo de actividades comerciales en diversas partes del mundo, a partir de la década de los setentas se inició de manera comercial y empírica la captura de delfines y lobos marinos para exhibición. A partir de entonces esta actividad creció sin ninguna regulación hasta el grado de representar un motivo de preocupación para científicos y grupos conservacionistas (*Pasini y Ortega., 2007*). Sin embargo hoy en día existen normas encargadas de regular la captura de ejemplares sujetas a protección especial (NOM-EM-135-SERMARNAT-2004; CITES Art.5; CDB, 1992; CPF Art.420; LGEEPA Art.79 Frac. I).

2.9 Características generales

El delfin *Tursiops truncatus* comúnmente conocido como delfin nariz de botella es una especie cosmopolita, se encuentra alrededor del mundo donde el clima es tropical. Los delfines nariz de botella presentan gran variación en el tamaño, incluso son muy diferentes en cuanto a la forma y coloración, aún cuando viven en el mismo grupo; algunos de los delfines de mayor longitud viven en las aguas del Reino Unido (Nichols *et al*; 2007). Existen dos tipos principales de delfines nariz de botella: los delfines que habitan cerca de las costas (costeros) y los delfines oceánicos, los primeros son pequeños y delgados, los delfines oceánicos son grandes y robustos, su tamaño depende de la temperatura del agua en la que viven (Nichols *et al*; 2007). *Tursiops truncatus* se describe taxónicamente en la tabla 2.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Tursiops truncatus*

Familia	Delphinidae
Orden	Cetacea
Suborden	Odontoceti
Clase	Mammalia
Género	<i>Tursiops</i>
Especie	<i>truncatus</i>



Figura 4. *Tursiops truncatus*

2.10 Descripción

Tiene la cabeza y el cuerpo ancho, el pico corto y recio, largas las aletas pectorales y una aleta dorsal falciforme medianamente alta. Tiene un pliegue muy marcado entre el pico y la frente. En la mayoría de las áreas donde se ha estudiado se han identificado dos variantes: una costera y otra de alta mar, que difieren en morfología. Los delfines de alta mar suelen ser más grandes y oscuros, con las aletas pectorales más pequeñas. En ambas variantes, los machos superan a las hembras en longitud, anchura y volumen corporal. Los dientes son grandes; hay de 20 a 26 pares en el maxilar superior y de 18 a 24 en el maxilar inferior (Reeves *et al.*, 2005; Shirihai y Jarret., 2006).

Predominan los tonos grises con un contrasombreado muy acentuado (el dorso más oscuro y la parte ventral más clara), pero sin delimitaciones claras entre los distintos tonos. Tienen una capa dorsal oscura que suele extenderse desde el ápice de la frente hacia atrás hasta sobrepasar el borde posterior de la aleta dorsal. A veces, presentan un destello claro en la parte anterior de la capa. Una sobrecapa de color gris más pálido cubre los costados, y el vientre suele ser blancuzco, color hueso o rosado. Hay una franja clara de un color apagado que une el ojo con la aleta pectoral homolateral. Las aletas pectorales, la cola y la aleta dorsal suelen ser de un gris oscuro o intermedio (Reeves *et al.*, 2005; Shirihai y Jarret., 2006).

2.11 Distribución y hábitat

Es una especie cosmopolita en los océanos y mares periféricos de latitudes tropicales y templadas. Ocupa una gran variedad de hábitats y es tal vez el cetáceo más adaptable. Hay poblaciones en las áreas costeras continentales y en las inmediaciones de la mayoría de las

islas y atolones. Frecuentan a menudo y en algunos casos residen en bahías, estuarios y el curso bajo de los ríos. Además, hay poblaciones pelágicas más alejadas de la costa, como en la corriente del golfo del Atlántico Norte y en el Pacífico oriental tropical. En el Atlántico, las poblaciones costeras migran anualmente al sur entre Nueva Jersey y Carolina del Norte (Reeves *et al.*, 2005; Shirihai y Jarret., 2006).

2.12 Comportamiento

Forman grupos que varían mucho en tamaño, en función del hábitat. En las bahías, son más pequeños que en alta mar. Las bandas de hembras emparentadas pueden permanecer juntas muchos años, recibiendo breves visitas de machos adultos. Los vínculos diádicos que establecen algunos machos entre sí pueden perdurar 20 años o más. Estos delfines se asocian a menudo con otros cetáceos, sobre todo con calderones. Les encanta saltar en la proa y se acercan a las embarcaciones a motor. También practican surf entre las olas provocadas por grandes ballenas o por una tormenta y en los rompientes de las playas. Pueden establecer vínculos duraderos con pescadores, submarinistas y bañistas. Pueden ser agresivos con otros cetáceos y a menudo desplazan a otros delfínidos que pretenden saltar en la proa de los barcos (Reeves *et al.*, 2005; Shirihai y Jarret., 2006).

2.13 Reproducción

El sistema y el ciclo reproductor del delfín nariz de botella se conocen mejor que la de ningún otro cetáceo. La gestación dura aproximadamente un año. Las crías pueden nacer en cualquier estación, pero muy pocas nacen en los meses fríos de invierno en las regiones

templadas. La lactancia dura al menos un año y las crías no se suelen destetar del todo hasta los 18 a 20 meses y es posible que permanezcan con sus madres varios años más. El intervalo medio entre nacimientos consecutivos es al menos de tres años. En estado salvaje, hay hembras de 45 años que han dado a luz y criado a su prole hasta el destete (Reeves *et al.*, 2005; Shirihai y Jarret., 2006).

2.14 Alimentación

Tienen una dieta muy versátil, se alimentan de una gran cantidad de organismos en función del hábitat. Los costeros tienden a alimentarse de peces invertebrados que viven en el fondo del mar mientras que los que viven en alta mar suelen consumir peces y calamares pelágicos o mesopelágicos. La presencia de peces de aguas profundas en los estómagos de los delfines que viven en alta mar sugiere que se sumergen a más de 500 m. En las plataformas soterias, se alimentan típicamente de roncadores, lampreas marinas, caballas y salmonetes. Se suelen sentir atraídos por las actividades pesqueras y aprenden a alimentarse de los restos alimenticios que dejan los barcos rastreadores de camarón. Se alimentan tanto en grupos como individualmente. Entre las técnicas de caza más comunes cabe citar el apaleamiento (golpear a un pez con la cola sacándolo fuera del agua) y guiar los bandos de peces hacia las marismas, dejándoles casi varados en la arena para capturarlos (Reeves *et al.*, 2005; Shirihai y Jarret., 2006).

2.15 Amenazas

Estos ejemplares se ven amenazados por cacería furtivas, cacerías de ballena donde imprudencialmente se ven amenazados, la contaminación química es uno de los principales problemas aunado a esto la pérdida de hábitat, además de la pesca con redes en las cuales quedan atrapados, una de las amenazas principales es la industria del cautiverio (Pasini y Ortega., 2007).

2.16 Estatus y conservación

El delfín nariz de botella está ampliamente distribuido por todo el mundo. Las perspectivas de futuro generales para esta especie son en principio razonablemente buenas, pero algunas poblaciones locales y regionales están en peligro de extinción debido a la degradación de su hábitat, los conflictos con los pescadores, la contaminación y las matanzas incontroladas. Las muertes en masa de delfines en la costa atlántica de EE.UU y el Golfo de México se han relacionado con epidemias víricas y con la exposición a toxinas. Se especula que la excesiva acumulación de contaminantes en el cuerpo de estos animales en el cuerpo haya podido debilitar su sistema inmune. En el mar mediterráneo, la contaminación, la excesiva explotación de los recursos pesqueros y los riesgos asociados a las redes de malla fina amenazan seriamente a las poblaciones locales de delfines nariz de botella. Los pescadores japoneses matan con arpón cientos de delfines nariz de botella cada año para destinarlo a consumo humano o para utilizarlos como cebo en muchas otras áreas como las Antillas, Venezuela, Perú, Chile, Filipinas y Sri Lanka (Reeves *et al.*, 2005; Shirihai y Jarret., 2006).

2.17 Uso de los mamíferos marinos en cautiverio

En México son tres las actividades fundamentales que se realizan con delfines:

Espectáculo. Este se realiza en los delfinarios del país, se realiza de una a tres veces al día y consiste en actos como imitar a sus entrenadores, capturar aros al vuelo, aplaudir, bailar etc. La característica de esta actividad es que el delfín obedece ordenes de su entrenador, pero no interactúa con el público (Pasini y Ortega., 2007).

Nado con delfines. Es la actividad más extendida y se realiza en todos los delfinarios en México. También es económicamente más productiva, el costo de la sesión por persona puede ir de los 850 a 1500 pesos, dependiendo del delfinario.

La característica principal de esta actividad es la interacción entre delfines y humanos, en donde el público toca acaricia a los animales, además de realizar los actos de entrenamiento (Pasini y Ortega., 2007).

Delfinoterapia. Esta actividad se inicia en México desde 1991. Consiste en sesiones de quince minutos cada una durante dos semanas tras las cuales se argumenta que hay cambio en los pacientes. Los padecimientos que de acuerdo a los delfinarios son susceptibles de ser modificados por esta actividad son: Autismo, Síndrome de Down, bulimia, anorexia, depresión, ansiedad, déficit de atención e hiperactividad, así como trastornos del sueño. A pesar de la propagación de esta actividad no existen datos concluyentes sobre la eficacia de estas terapias. (Marino *et al.*, 1998; Nathanson *et al.*, 1997; Pasini y Ortega., 2007).

Se argumentan que los delfines curan mediante los pulsos de ultrasonido, sin embargo, Sin embargo estudios recientes han demostrado, para que el ultrasonido emitido por los delfines tenga algún efecto sobre los tejidos debe emitirse por tiempos suficientes, lo cual no se puede controlar, además en los padecimientos para los que se aplica la delfinoterapia

se asocian con trastornos cerebrales, por lo tanto se debe emitir el ultrasonido de manera directa sobre la cabeza del paciente, lo cual no sucede, ya que la cabeza del paciente se mantiene siempre por encima de la superficie del agua. Esto hace cada vez menos realista la hipótesis de que los delfines curen a través del ultrasonido (Brensing *et al.*, 2003).

III. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Debido a la problemática que se vive en los delfinarios del país, la cual es causada por la suplantación y tráfico de delfines, es necesario desarrollar una metodología rápida, confiable y barata que nos permita identificar con certeza a cada individuo de dicha población con la finalidad de controlar y regular el ingreso y colocación de nuevos ejemplares dentro del país.

IV. JUSTIFICACIÓN

Existen diferentes metodologías empleadas para obtener la huella genética de un organismo, sin embargo, el poco poder de resolución y el tiempo empleado en el desarrollo de estas técnicas nos hacen proponer un nuevo método con el cual se reducirá el tiempo de obtención además de ser altamente sensible. Las curvas de disociación de alta resolución (HRM) ofrecen una alternativa para desarrollar huella genética de delfines, disminuyendo el tiempo y los consumibles, sin embargo no existen estudios empleados en la obtención de huella genética.

V. META

Establecer los parámetros necesarios para obtener la huella genética de *Tursiops truncatus* para optimizar reactivos y tiempo de desarrollo al mismo tiempo desarrollar una técnica eficiente, rápida y precisa para emplearla en la identificación de individuos.

VI. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar mediante curvas de disociación de alta resolución (HRM) un patrón único que nos permita identificar individuos, para emplearlo como método de rutina en obtención de huella genética.

VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar si el empleo de curvas de disociación establecen un patrón único que permita identificar a individuos

- Comprobar si el empleo de HRM reduce el tiempo, costo y dificultad para el desarrollo de huella genética comparado con métodos convencionales y aprobados

- Determinar si el empleo de curvas de disociación optimiza el número de iniciadores para el desarrollo de huella genética

VIII. TIPO DE ESTUDIO

Observacional

Transversal de periodo

Descriptivo

Tamaño de la muestra: 9 muestras de sangre periférica de delfines nariz de botella

IX. MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de 223 delfines procedente de 22 delfinarios de México, dos muestras de sangre por delfin, una con heparina y otra sin anticoagulante, la muestra fué procesada de inmediato en el laboratorio de medicina de conservación del instituto politécnico nacional, donde se separaron los elemento formes de la sangre y para este análisis se extrajeron los leucositos.

9.1 Extracción de DNA

El DNA génomico fue extraido con el quit DNAeasy (Quiagen), el procedimiento fué el indicado por el proveedor.

El DNA se guardó a -20°C hasta su uso.

9.2 Cuantificación de DNA.

Para cuantificar las muestras de DNA se utilizó el equipo nanodrop Thermo Scientific 3300 con el software Nucleic acid Quantitation.

9.3 Reacción en cadena de la polimerasa.

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó utilizando 12 pares de iniciadores (Rooney *et al.*, 1999, Sumiyama *et al.*, 2008) los cuales se muestran en el cuadro 2.

Tabla 2. Indicadores utilizados para el desarrollo de la PCR.

Locus	Tamaño De la repetición	Primer secuencias (5'-3')	Tamaño de alelos
TexVet1	(CA) ₄ TA(CA) ₂ CC(CA) ₂	GAGTGAACATCAGTATCAAGAGGTGA TGTCAAGGTTTGAATTTGTGTGAG	165-166
TexVet2	(CA) ₈	GCGTCACCATGATTTCTGTAGG CCAAGGTACTTTCAAGTTAGCCAC	188-192
TexVet3	(CA) ₂₆	GCCCTCACGTTTCATTCATGTTGTT CCGTGTTCACTCCAGCATTATTTCCACA	207-267
TexVet4	(CA) ₈	CAGACTGTGGACCTCCAGTTTCT GCGGTTTTCCCTTTTGTGTTG	164
TexVet5	(CA) ₂₄	GSTTGTGCAAATGGAGACA TTGAGATGACTCCTGTGGG	236-260
TexVet6	(CA) ₉	CGCACAGAAACGAAGACCCAAC AAAAGCTGAAGGCTAGACACTGGTC	192-193
TexVet7	(CA) ₁₂	TGCACTGTAGGGTGTTCAGCAG CTTAATTGGGGGCGATTTAC	155-163
TexVet8	(CA) ₅ CG(CA) ₅	CCCTTCCTTTTAGCCAGAGGTG CGCTGTACGTACACACCCATG	217-218
TexVet9	(CA) ₃ CG(CA) ₆	TTTTCTTAGTACCAGAATCTTGTCAG TCCAGTTGCCTTTCAAGTCTAG	124
D-18	(CA) ₃ TA(CA) ₂₁	CCCAAACCGACAGACAGAC GATCTGGGGATGCAGG	90
D-22	(CA) ₃ TA(CA) ₂₁	GGAAATGCTCTGAGAAGGTC CCAGAGCACCTATGTGGAC	135
EV37Mn	(AC) ₂₄	AGCTTGATTTGGAAGTCATGA TAGTAGTGCCGTGATAAAGTGC	178-224

9.4 Geles de Agarosa

Los geles de agarosa utilizados para la visualización de los amplicones se realizaron al 2% para lo cual se pesaron 200g de agarosa y se disolvieron en 100 ml de buffer TBE 1x,

posteriormente se llevó a microondas para disolver la agarosa y lograr una mezcla homogénea y transparente, se vertió en una base para geles utilizando un peine de 20 pozos se dejó gelificar, posteriormente se colocó en una cámara de electroforesis para depositar las muestras en los pozos y así separar el DNA, el tiempo de corrimiento del gel fue de cuarenta y cinco minutos, a 90 volts, posteriormente el gel se tñió con bromuro de etidio para su visualización en una cámara de luz uv.

9.5 Preparación de TBE 5X

Se pesaron 54g de tris-base, se agregó 27.5g de ácido bórico más 20 ml de EDTA 0.5M, y se aforó a 1000 ml con agua destilada.

9.6 Purificación de los amplicones para secuenciación

La purificación de los amplicones se realizó de acuerdo al protocolo de Qiagen : QIAquick purification kit protocol

9.7 Reacción de secuencia

Una vez purificado el DNA el siguiente paso es preparar la reacción de secuencia la cual consiste en un microlitro de agua, un microlitro de amplicones (puros), un microlitro de primer, y un microlitro de buffer de secuenciación (BigDye® Terminator V.3.1 Cycle Sequencing), se preparan dos pozos por muestra, uno contiene el primer forward quedando el reverse en el pozo restante.

Las condiciones de la reacción son las siguientes:

Un ciclo a una temperatura de 96°C por 1 min, seguido de 25 ciclos a una temperatura de 96°C durante 10s, 25 ciclos a 50°C durante 10s, 25 ciclos a 60°C durante 4 min y finalmente 4°C posterior a la reacción de secuenciación se procede a purificar la placa de secuenciación.

9.8 Purificación de la placa de secuenciación

Se agregó etanol grado biología molecular 2.5 veces el volumen inicial (en este caso fueron 12.5 ya que el volumen inicial fue de 5µl), se agregó 0.5 µl de acetato de sodio por pozo, se centrifugó a 2000g durante 20 minutos, se agregó CH₃COONa y C₂H₆O₂ para eliminar el exceso de etanol, se centrifugó a 150g durante un minuto, se adicionaron 35 µl de C₂H₆O₂ al 70% y se centrifugó a 2000g durante 5 minutos, se centrifugó a 150g durante un minuto para eliminar el exceso de etanol se adicionaron 20 µl de formamida a cada pozo y se homogenizó suavemente, finalmente se colocó la placa en el secuenciador ABI PRISM 3100 Avant genetic analyzer Applied Biosystems.

9.9 Estandarización de HRM

Para obtener curvas de disociación óptimas y reproducibles fue necesario estandarizar la reacción de HRM (high resolution melting), la cual se realizó en el equipo Rotor Gene[®] (Rotor-Gene Q Series software 1.7). La reacción de HRM se realizó con HRM PCR Kit(100) Qiagen[®] para lo cual fue necesario tomar 10µl de amplicones adicionando 10 µl del Colorante Eva-Green; con una rampa de temperatura de 75°C a 90°C midiendo cada

0.1°C de incremento en la temperatura para visualizar la gráfica de disociación con resolución óptima.

9.10 Clonación

Se utilizó el kit de clonación TOPO TA Cloning® kit PCR®2.1-TOPO®Vector de Invitrogen. El procedimiento fue el siguiente:

Se agregó a un tubo de 0.2 1 µl de solución de sal, 1 µl de TOPO® vector y 3 µl de amplicones frescos esta mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 5µl* de la mezcla anterior a un vial de One Shot® Electrocompetentes *E. coli* y se mezcló cuidadosamente (el vial de One Shot® Electrocompetentes *E. coli* se transportó en hielo), se incubó durante 30 min en hielo, inmediatamente después, se colocaron en baño maria a 42°C durante 90*s sin agitación para inducir choque termico, posteriormente los viales se transfirieron a hielo,se agregaron 250 µl de medio S.O.C a temperatura ambiente, los viales se cerraron e incubaron a 60 minutos a 37°C, se colocó 50 µl de cada transformación a las placas con medio LB previamente en incubación a 37°C conteniendo 100 µg de X-gal, las placas se incubaron por una noche a 37°C. Una clonación eficiente produce ciento de colonias. Aislar aproximadamente 10 colonias blancas para el análisis.

*Modificaciones

9.11 Purificación de plásmido

Se aisló una colonia blanca de la placa y se transfirió en 1ml de medio LB con antibiótico en este caso utilizamos ampicilina a una concentración de 50mg/ml, se incubaron durante 12 a 16 horas a 37°C a 200 g. Posteriormente se realizó la obtención del plasmido.

La purificación del plasmido se realizó con el kit QIAprep® Spin Miniprep kit de Qiagen®. Se centrifugó cada uno de los viales a 8000 g durante 5 minutos, el pellet formado se resuspendió en 250µl de buffer P1, se adicionaron 250 µl de buffer P2, se homogenizó por inversión del tubo de cuatro a seis veces, se agregaron 350 µl del buffer N3, la mezcla se homogenizó inmediatamente por inversión del tubo de cuatro a seis veces, la mezcla anterior se centrifugó por 10 minutos a 13000 g, el sobrenadante se aplicó en el centro de la columna y se centrifugó durante un minuto a 13 000 s, el sobrenadante se desechó, se agregaron 0.5 ml de buffer PB para lavar la columna, se centrifugó durante 60 s, el sobrenadante se desechó, se adicionaron 0.75 ml de buffer PE, se centrifugó un minuto a 13000 g, se descartó el sobrenadante y se centrifugó durante un minuto adicional para remover los residuos del buffer de lavado, se colocó la columna en un tubo ependorf de 1.5. para eluir el DNA se agregaron 30 µl del buffer EB en el centro de la columna, se centrifugó un minuto a 13000 g. El plásmido puro se guardó a -20°C para posterior secuenciación.

X. RESULTADOS

10.1 Estandarización de iniciadores

Las condiciones óptimas para cada iniciador se obtuvieron realizando una curva de cloruro de magnesio y un gradiente de temperatura, las condiciones óptimas finales se muestran en la tabla 4.

Tabla 3. Condiciones de iniciadores. Se muestran las condiciones óptimas de cada uno de los iniciadores utilizados para realizar huella genética en delfines.

	Buffer 10x	MgCl ₂	Primer F	Primer R	DNTP'S	Taq polimerasa	DNA	Agua
Texvet 1	2.5	2.5 mM	1	1	1	0.2	100ng	Cbp 20µl
Texvet 2	2.5	1.5 mM	1	1	1	0.2	100ng	Cbp 20µl
Texvet 4	2.5	1.8 mM	1	1	1	0.2	100ng	Cbp 25µl
Texvet 9	2.5	1.5 mM	1	1	1	0.2	100ng	Cbp 25µl
D22	2.5	1.5 mM	1	1	1	0.2	100ng	Cbp 25µl
Ev37Mn	2.5	1.8	1	1	1	0.2	100ng	Cbp 25µl

Para cada iniciador fue necesario aplicar un gradiente de cloruro de magnesio además de un gradiente de temperatura con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas y así obtener un rendimiento óptimo de la PCR. Para el iniciador TexVet1 fue necesario agregar 2.5 µl de buffer a una concentración de 10 x, 0.8 µl de cloruro de magnesio 50 mM, 1 µl de TexVet1 sentido 5' a 3' y 1 µl de iniciador TexVet1 sentido 3' a 5', 1 µl de DNTP'S concentración 10 mM, 0.2 unidades de Taq Polimerasa platinum Invitrogen®, 100 ng de DNA molde, y finalmente agua, lo que basta para 20 µl.

Posterior a la estandarización de iniciadores se procedió a realizar la estandarización de la reacción de HRM la cual se explica a continuación:

10.2 Estandarización de HRM

Se realizó la estandarización de HRM, las condiciones óptimas para la reacción fue una mezcla de 10 μ l de amplicones y 10 μ l del colorante de saturación EVA-green®, con una rampa de temperatura de 75 a 90°C.

El equipo Rotor Gene® proporciona principalmente dos resultados: una curva de disociación y una curva TM, opcionalmente contruimos curvas de disociación diferenciadas que se realizan a partir de una muestra con secuencia conocida que se utiliza como patrón para inferir sobre las muestras con secuencia desconocidas, las curvas que se encuentre horizontalmente cerca a la muestra patrón (horizontal en línea recta) son las que tienen el mismo tipo de secuencia, las que se encuentren a mayor distancia de la muestra patrón son las que tienen menor parecido en la secuencia (figura5).

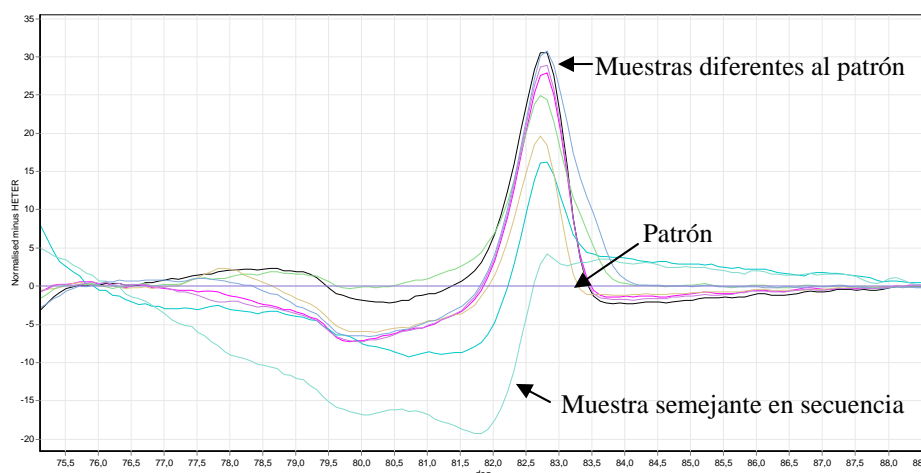
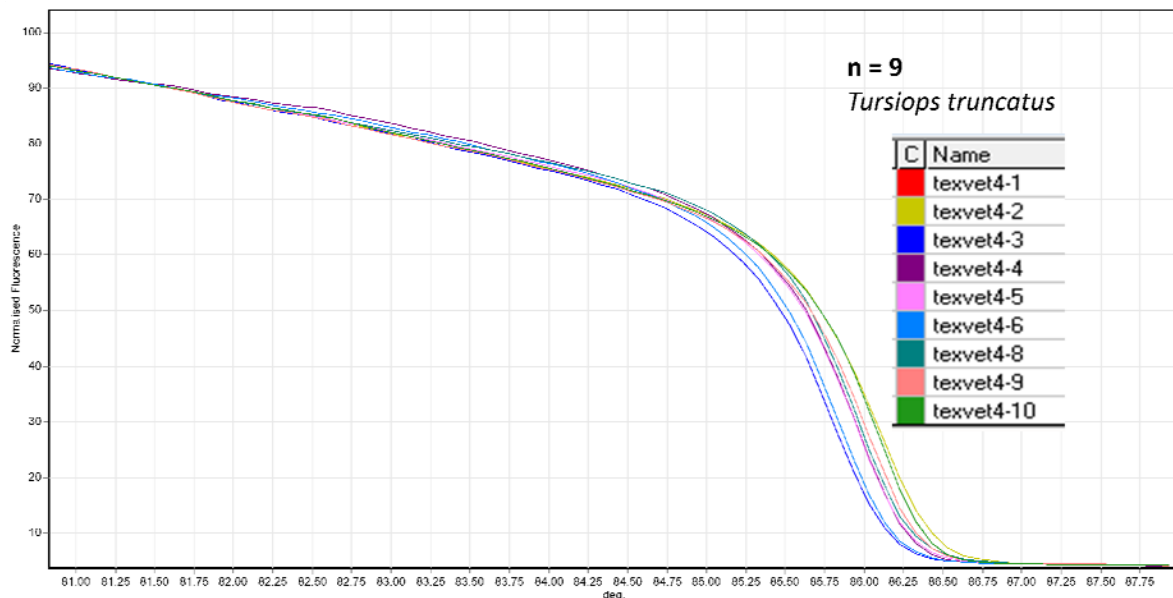


Figura 5. Curva de disociación diferenciada.

10.3 Iniciador Texvet 4

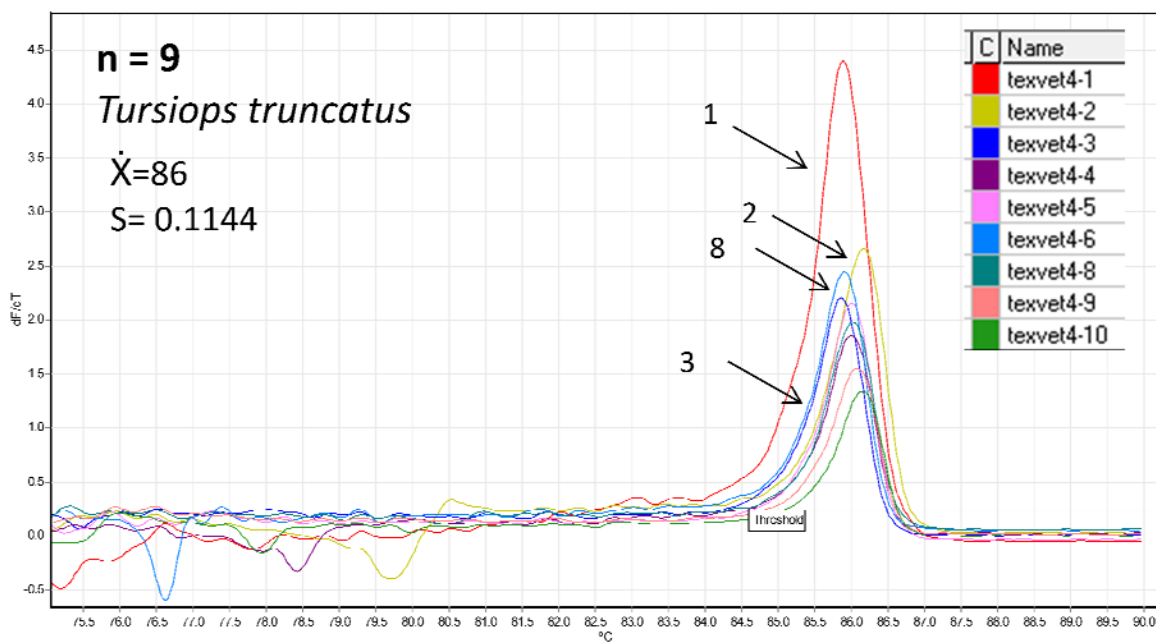
A continuación tenemos la gráfica de disociación de las nueve muestras analizadas con el iniciador TexVet4.



Gráfica 1. Curva de disociación. Patrón de disociación de nueve muestras de DNA de delfines *tursiops truncatus* con el iniciador TexVet4 a la derecha de la gráfica se encuentra un recuadro que indica el color de la muestra en la curva de disociación.

Curva de disociación, en el eje de las X tenemos la temperatura en grados centígrados, en el eje de las Y la fluorescencia normalizada, al inicio de la gráfica en el eje de la Y, a una temperatura aproximada de 80°C, observamos la fluorescencia máxima debido a que el colorante EVA-green® se intercala específicamente en el DNA de doble cadena, los 10µl de amplicones agregados para realizar HRM se encuentran en doble cadena, lo cual se ve reflejado en la fluorescencia máxima, conforme va aumentando la temperatura, el colorante se separa del DNA, debido a que la hebra de DNA se va disociando. En esta curva de disociación observamos un patrón similar entre las muestras, todas las muestras presentan una sola curva de disociación, observamos que las muestras 4-3 y 4-6 se separan

ligeramente del resto. Posterior a la curva de disociación obtenemos la curva TM que nos indica en valor de TM de cada una de las muestras, la gráfica se muestra a continuación:



Gráfica 2. Curva Tm. Observamos curvas TM de nueve muestras de delfines *tursiops truncatus* con el iniciador TexVet4, la media de Tm para estas muestras fue de 86 con una desviación estandar de 0.1144.

En la curva TM las muestras tienen una media en la TM de 86 y una desviación estandar de 0.1144 lo que nos indica que las muestras tienen poca diferencia entre ellas, en el eje de las X tenemos la temperatura en grados centígrados, en el eje de las Y la primera derivada de la fluorescencia respecto a la temperatura, en la curva TM el punto máximo indica cuando la mitad de las hebras de DNA se encuentran disociadas y la otra mitad se encuentra en dsDNA este punto nos da una lectura de TM específico de cada muestra y esta directamente relacionado con el tamaño y tipo de secuencia. De acuerdo al patrón en la curva de disociación y al patrón en TM de las muestras analizadas, se seleccionaron 4 muestras para confirmar por secuenciación el número de repeticiones, las muestras son: 4-1, 4-2, 4-3 y 4-8 las cuales se señalan con flechas negras, los resultados de la secuenciación se encuentran

en la figura 6. En la tabla cinco se muestran los valores de TM de cada una de las muestras analizadas con este iniciador.

Tabla 4. TM de nueve muestras de delfines *Tursiops truncatus* del iniciador TexVet4

Muestra	TM	Muestra	TM
TexVet4-1	85.88	TexVet4-6	85.90
TexVet4-2	86.17	TexVet4-8	86.02
TexVet4-3	85.85	TexVet4-9	86.08
TexVet4-4	86.00	TexVet4-10	86.15
TexVet4-5	86.00		

En la tabla cuatro se observan las TM de cada una de las muestras analizadas, la media de la tm para estas muestras fue de 86°C, la primer y tercer columna indican la muestra analizada, la segunda y la cuarta columna contienen el valor de TM de las muestras.

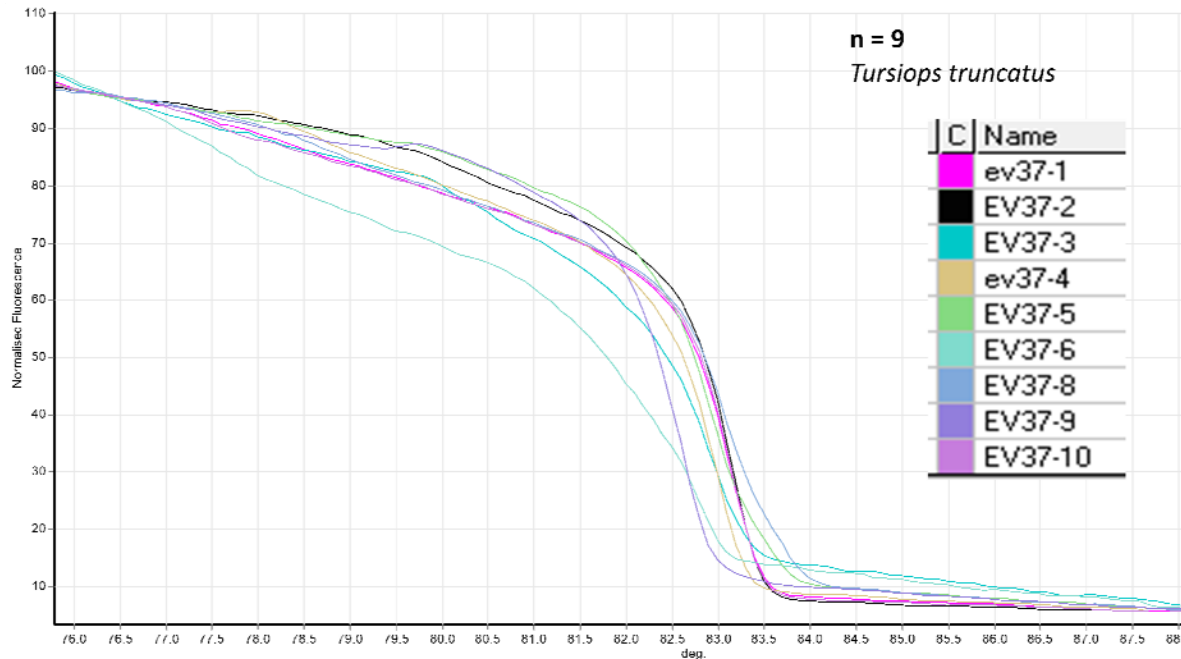
Texver4-2	AAAGGGTTTGGGGAGGGCCGGTCACCTGGTAACTAATGAGCCACAAACACACACACACACACTGCCCC
Texvet4-3	AAAGGGTTTGGGGAGGGCCGGTCACCTGGTAACTAATGAGCCACAAACACACACACACACACTGCCCC
TexVet4-8	AAAGGGTTTGGGGAGGGCCGGTCACCTGGTAACTAATGAGCCACAAACACACACACACACACTGCCCC
Texvet4-1	AAAGGGTTTGGGGAGGGCCGGTCACCTGGTAACTAATGAGCCACAAACACACACACACACACTGCCCC

Figura 6. Alineamiento de secuencias. Se alinearon las secuencias de las muestras: 4-1, 4-2, 4-3 y 4,8.

El alineamiento de las secuencias se realizó en el programa Clustal X . La secuencia consenso de locus Texvet4 es CA₈. En la primer línea tenemos la secuencia correspondiente a la muestra 4- 2, misma que tiene ocho repeticiones CA, (las repeticiones se encuentran en el recuadro negro), en la segunda fila la secuencia de la muestra 4-3 tiene ocho repeticiones CA, la tercer fila tenemos la secuencia correspondiente a la muestra 4-8 la cual tiene ocho repeticiones CA y en la última fila tenemos la secuencia de la muestra 4-1 con ocho repeticiones CA.

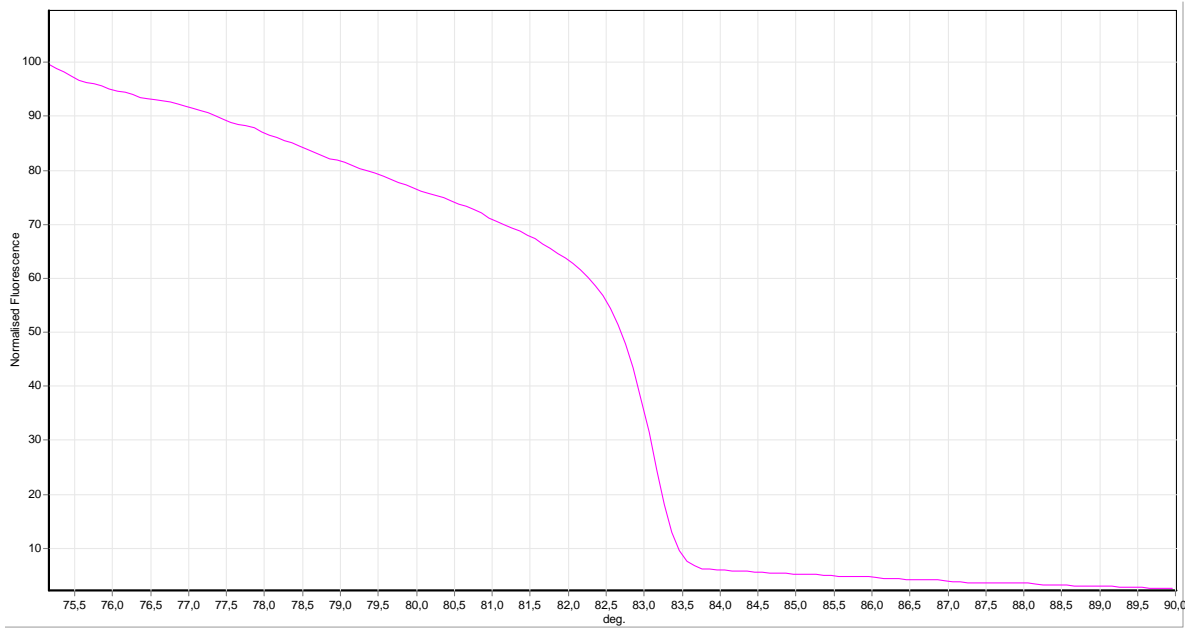
10.4 Iniciador Ev37Mn

A continuación tenemos la curva de disociación de las nueve muestras analizadas con el iniciador EV37Mn

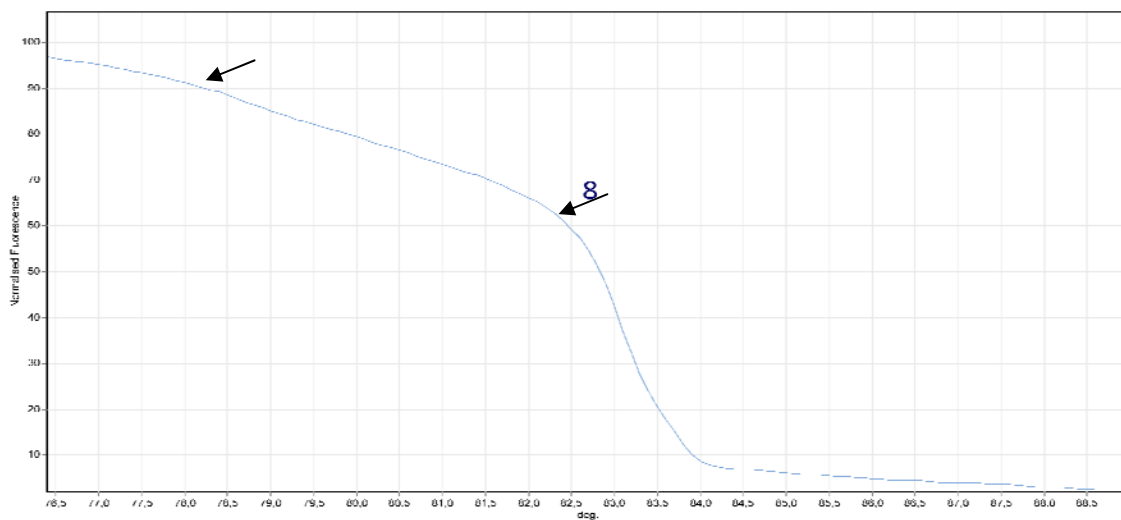


Gráfica 3. Curva de disociación del iniciador Ev37Mn. Se analizaron nueve muestras de DNA de delfines *tursiops truncatus*, a la derecha de la gráfica observamos un recuadro que indica la muestra según el color en el patron de disociación de la gráfica.

Se observa patrón de disociación diferente entre las nueve muestras analizadas, por lo cual se esperaría que algunas muestras tengan diferente número de repeticiones de la secuencia consenso del iniciador Ev37Mn. A la derecha de la gráfica observamos un recuadro, que indica el color de la línea de disociación para cada muestra, de tal manera que la muestra uno es la correspondiente a la curva de disociación color rosa. Observamos que la muestra cinco y ocho poseen dos picos en la curva de disociación, para observarlo claramente a continuación se comparan las graficas de la curva ocho y cinco que se muestran en la gráfica 5 y 6 respectivamente, con la curva de la muestra uno que posee sólo un pico en la curva de disociación (gráfica 4).



Gráfica 4. Curva de disociación de la muestra uno analizada con Ev37Mn. Se observa una sola curva de disociación bien diferenciada en la muestra uno. En el eje de las X tenemos la temperatura en °C, en el eje de las Y la fluorescencia normalizada.

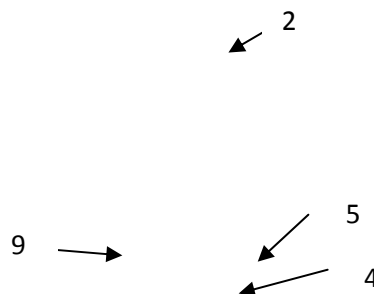


Gráfica 5. Curva de disociación de la muestra 8 analizada con Ev37Mn. Se observan dos pequeñas curvas en la curva de disociación, las cuales se señalan con flechas de color negro, en el eje de las X se grafica la temperatura en grados centígrados, en el eje de las Y la fluorescencia normalizada.



Gráfica 6. Curva de disociación de la muestra cinco analizada con Ev37Mn. En el eje de las X se grafica la temperatura en grados centígrados, en el eje de las Y la flourescencia normalizada. Se observa en la curva de disociación dos curvas las cuales se señalan con flechas en color negro.

Posterior a las gráficas de disociación se muestra la gráfica TM (Gráfica7) donde podemos observar como la muestra cinco y ocho poseen dos picos en la TM lo que coincide con la gráfica de disociación.



Gráfica 7. Curva TM del iniciador Ev37Mn. Se analizaron nueve muestras con el iniciador Ev37Mn, la media para la TM fue de 82.97 con una desviación estandar de 0.21. a la derecha se observa un recuadro en el cual indica el color de la curva decada una de las muestras.

La curva de TM en el punto mayor de cada una de las muestras nos indica la temperatura a la cual la mitad del DNA se encuentra disociado y la otra mitad se encuentra en doble cadena, la media para la TM de estas muestras fue de 82.97°C, el valor de TM de cada una de las muestras se puede observar en la tabla 6, la desviación estandar fue de 0.21 lo cual indica que las curvas muestran diferencia lo cual es visible a simple vista en esta curva, las muestras cinco y ocho tienen dos curvas tm, el resto de las muestras posee sólo una curva, además la muestra nueve se separa del resto de las muestras en el patron de TM, en base al patron de la curva de disociación y al patron de la curva TM se seleccionaron cuatro muestras para confirmar mediante secuenciación, las muestras seleccionadas fueron Ev37Mn 2, EV37Mn 4, Ev37Mn 5 y Ev37Mn 9, el resultado de la secuenciación se encuentra en la tabla7.

Tabla 5. TM de nueve muestras de delfines *Tursiops truncatus* del iniciador Ev37Mn

Muestra	TM	Muestra	TM
Ev37Mn1	83.15	Ev37Mn 6	82.78
Ev37Mn 2	83.17	Ev37Mn 8	83.08
Ev37Mn 3	82.92	Ev37Mn 9	82.62
Ev37Mn 4	83.00	Ev37Mn 10	83.15
Ev37Mn 5	82.95		

En la tabla cinco se observan las TM de cada una de las muestras analizadas con el iniciador Ev37Mn, la media de la TM para estas muestras fue de 82.97°C, la primer y tercer columna indican la muestra analizada, la segunda y la cuarta el valor de TM correspondiente.

Tabla 6. Secuencias de regiones microsatélites.

Muestra	EV37Mn(AC)24
Ev37Mn -2	(AC)26
Ev37Mn -4	(AC)25
Ev37Mn -5	(AC)23 *
Ev37Mn -9	(AC)26

En la tabla seis se localizan las secuencias de las muestras Ev37Mn, la secuencia consenso de este marcador son 24 repeticiones (AC), la muestra dos tubo 26 repeticiones AC, la muestra cuatro 25 repeticiones AC, la muestra cinco 23 repeticiones AC, la muestra nueve 26 repeticiones AC, analizando la secuencia de la muestra cinco se encontró un cambio en un solo nucleótido. A continuación se muestra el electroferograma de la muestra cinco.

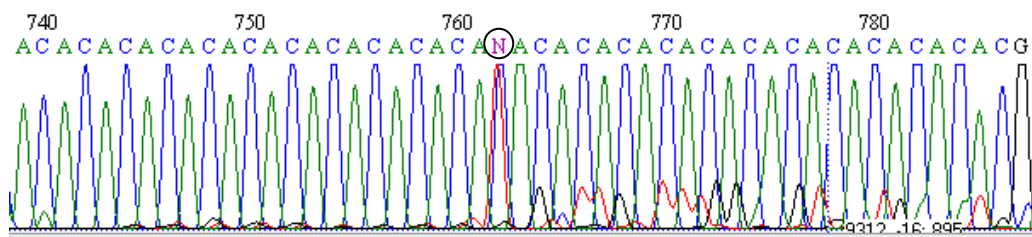


Figura 7. Electroferograma de la muestra cinco analizada con el iniciador Ev37Mn. Se observa claramente la presencia de dos diferentes nucleótidos C Y T que el equipo reconoce como “N” en una misma posición lo que indica que el individuo es heterocigoto en este alelo.

10.5 Iniciador TexVet1

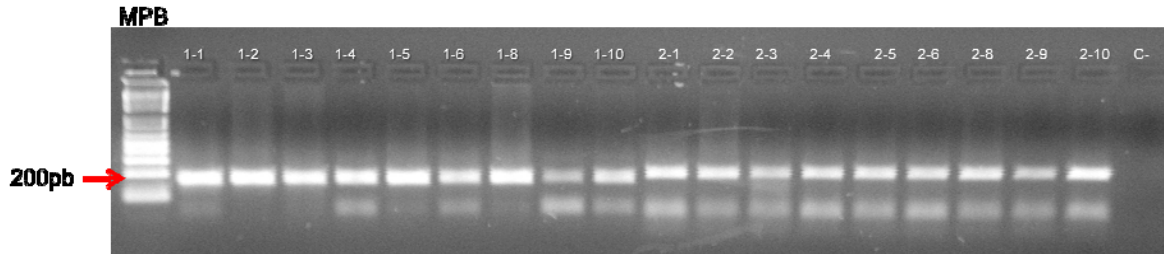
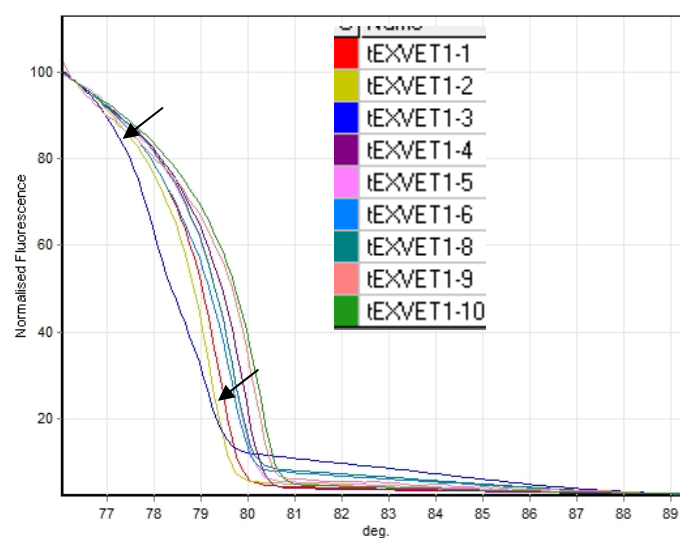


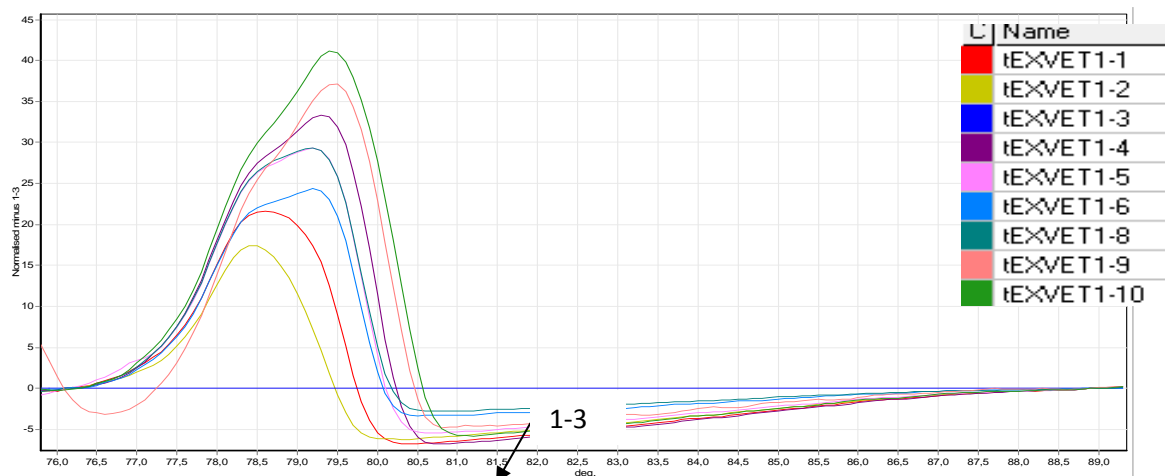
Figura 8. Fotografía de un gel de agarosa al 2% de los iniciadores TexVet1 y TexVet2. MPM) marcador de peso molecular. Carril) 1-1 a1-10 muestras del iniciador Texvet1, del carril 2-1 a 2-10 muestras del iniciador Texvet2. C-) control negativo. Longitud esperada del iniciador texvet1=165-166pb, longitud esperada del iniciador texvet2= 188-192pb.

Se realizó PCR de nueve muestras de DNA de delfines los cuales se visualizaron en un gel de agarosa al 2%, en el carril uno se encuentra el MPM (marcador de peso molecular), la longitud del fragmento esperado para el iniciador uno es de 165-166pb, las cuales se encuentran desde el carril 1-1 al carril 1-10, la longitud del fragmento esperado con el iniciador dos es de 188-192 pb, las cuales se encuentran desde el carril 2-1 al 2-10, en el último carril se encuentra el control negativo (c-). Se observa que la muestra 1-9 y 2-9 tienen cantidad menor de DNA en el amplificado. Posterior a la reacción de punto final se realizó la reacción de HRM los resultados se muestran a continuación, el primer resultado que obtenemos son las curvas de disociación que se muestran en la gráfica 8, posteriormente construimos la gráfica de disociación diferenciada de la muestra 1-3 que se observa en la gráfica 9 y finalmente la curva de TM que observamos en la gráfica 10.

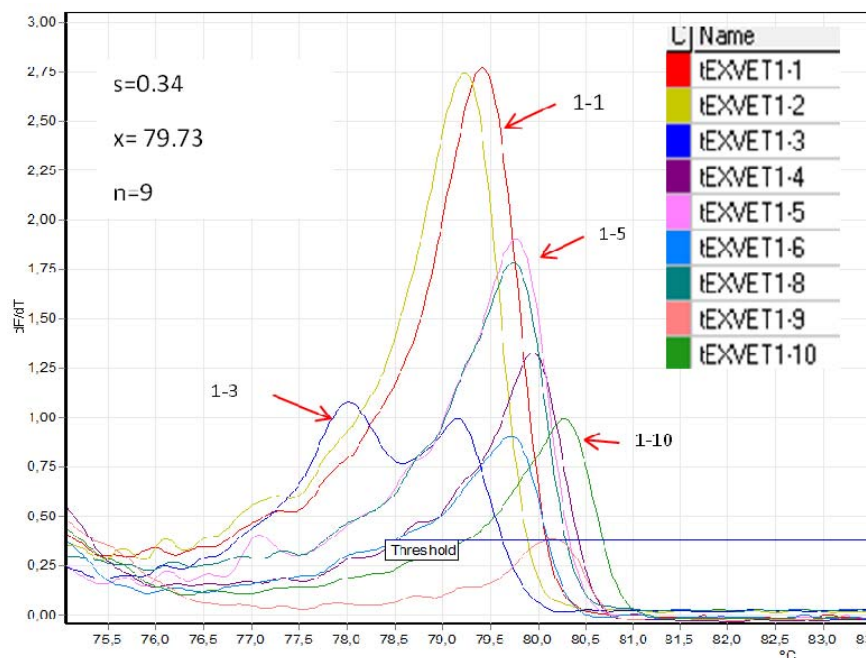


Gráfica 8. Curva de disociación de DNA TexVet1. Se observan las gráficas de disociación correspondientes a las 9 muestras del iniciador Texvet1.

Observamos en la curva de disociación de nueve muestras con el iniciador TexVet1 un patrón relacionado, a la derecha de la gráfica se encuentra un recuadro donde se indica la muestra correspondiente a cada color. Se observa claramente como la muestra 1-3 se separa del resto, notamos que posee dos pequeñas curvas que son señaladas con flechas negras.



Gráfica 9. Curva de disociación diferenciada de la muestra 1-3. El patrón en la curva de disociación diferenciada es la muestra 1-3, las ocho muestras restantes están alejadas de la muestra patrón lo que indica que la secuencia de la muestra 1-3 es completamente diferente del resto.



Gráfica 10. Curva TM del iniciador TexVet1. Se observa un patrón de T_m variable en cuanto a tamaño y desplazamiento de las 9 muestras analizadas, la desviación estándar fue de 0,66, y la media en la T_m de 79,46, notamos que la desviación estándar es alta, lo cual es visible en la gráfica ya que las muestras se encuentran separadas entre sí, se observa claramente como la muestra 1-3 posee dos curvas pronunciadas en esta gráfica.

Tabla 7. T_m de las 9 muestras del iniciador TexVet1.

Name	Peak 1	Peak 2
tEXVET1-1	79,42	
tEXVET1-2	79,23	
tEXVET1-3	79,15	
tEXVET1-4	78,8	79,95
tEXVET1-5	79,77	
tEXVET1-6	79,72	
tEXVET1-8	79,75	
tEXVET1-9	80,15	
tEXVET1-10	80,28	

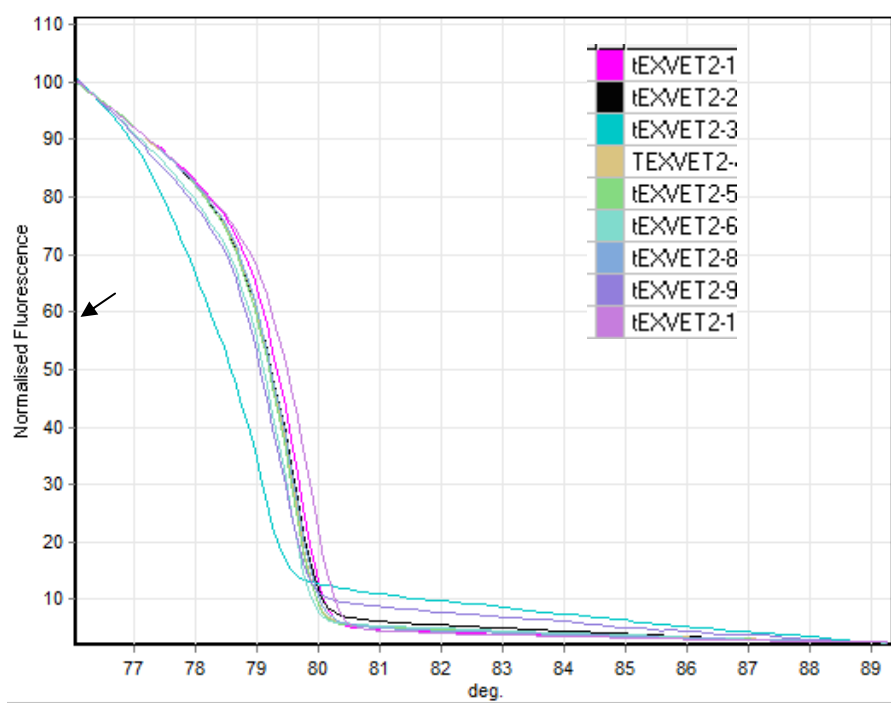
La primera columna de la tabla siete indica la muestra analizada, la segunda la T_m de las muestras y en la tercera la T_m del segundo pico de la gráfica para las muestras que poseen más de una curva.



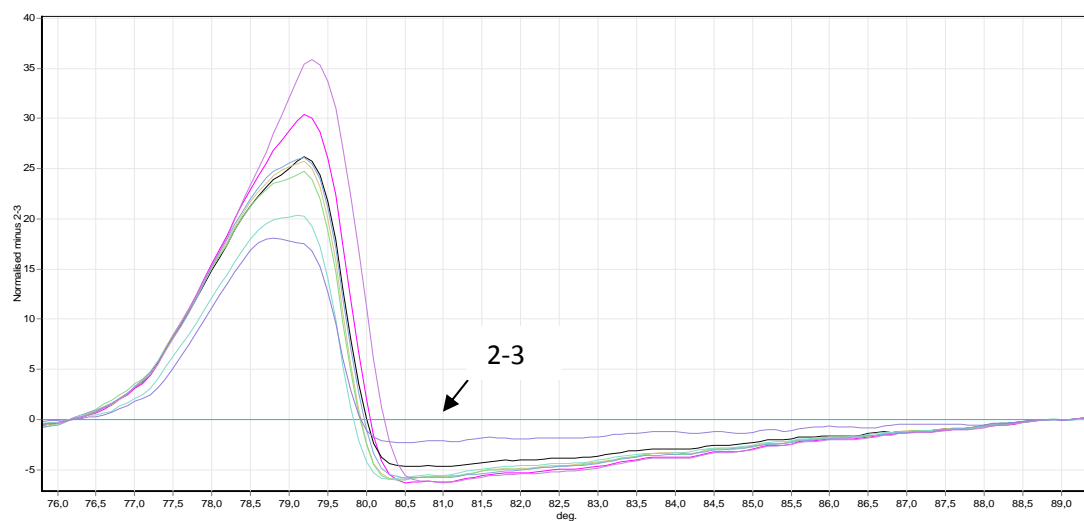
Figura 9. Alineamiento TexVet 1. Correspondiente a las muestras: 1-1, 1-3, 1-5 y 1-10 del iniciador TexVet1. La secuencia consenso de este iniciador es: $(CA)_4TA (CA)_2CC (CA)_2$, las muestras 1-1, 1-5 y 1-10 no muestran cambio en la región microsatélite, sin embargo la muestra 1-3 tiene la siguiente secuencia: $(CA)_4TA (CA)_2CC (CA)_3$.

10.6 Iniciador TexVet 2

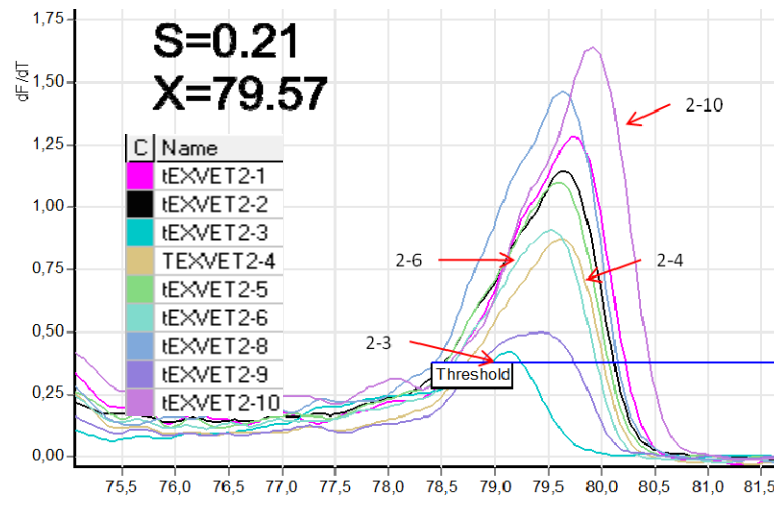
Los resultados de este iniciador se muestran a continuación, el primer resultado que obtenemos es la curva de disociación de las nueve muestras analizadas que se muestra en la gráfica 11, posteriormente se construyó una curva de disociación diferenciada para la muestra 2-3 se muestra en la gráfica 12, finalmente obtenemos una curva TM (gráfica 13) para observar el patrón TM de cada una de las muestras, los valores de TM se muestran en la tabla 9, la secuenciación de la muestra 2-3 se obtuvo empleando un vector de clonación, el electroferograma se muestra en la figura 9 y el alineamiento de las cuatro muestras seleccionadas para secuenciación se muestra en la figura 10.



Gráfica 11. Curva de disociación de DNA de TexVet2. Se observa un patrón de disociación semejante entre las muestras excepto la muestra 2-3 la cual se señala con la flecha, se encuentra separada del resto hacia la derecha.



Gráfica 12. Curva de disociación diferenciada de la muestra 2-3. El patrón en la curva de disociación diferenciada es la muestra 2-3, las ocho muestras restantes son diferentes al patrón lo que indica que la muestra 2-3 es completamente diferente del resto de las muestras.



Gráfica 13. Curva Tm del iniciador Texvet2. Se analizaron nueve muestras con el iniciador TexVet2, la media para la TM fue de 79.57 con una desviación estandar de 0.21. a la derecha se observa un recuadro en el cual indica el color de la curva de cada una de las muestras. De acuerdo al patron de disociación se seleccionaron cuatro muestras para confirmar por secuenciación la región microsatélite de este iniciador.

Tabla 8. Tm de las muestras 2-1 a 2-10 del iniciador TexVet2.

Name	Peak 1
tEXVET2-1	79,75
tEXVET2-2	79,65
tEXVET2-3	79,12
TEXVET2-4	79,62
tEXVET2-5	79,6
tEXVET2-6	79,53
tEXVET2-8	79,63
tEXVET2-9	79,43
tEXVET2-10	79,9

La tabla ocho contiene los valores de TM de cada una de las muestras analizadas con el iniciador TexVet2, la primera columna indica la muestra analizada y la segunda el valor de TM de cada muestra.

La secuencia de la muestra 2-3 se obtuvo empleando un vector de clonación, el electroferograma se muestra en la figura 9 y el alineamiento de cuatro muestras secuenciadas se muestra en la figura 10.

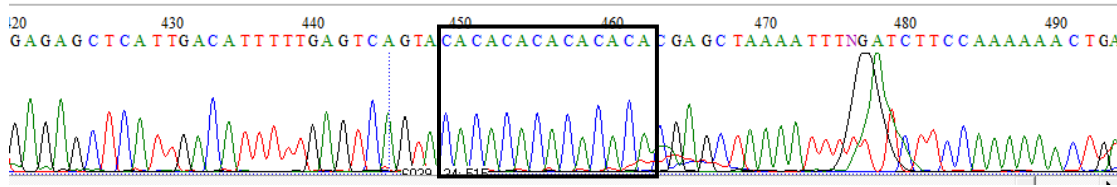


Figura 10. Electroferograma de la muestra 2-3. La secuencia de la muestra 2-3 se obtuvo empleando un vector de clonación, se observan siete repeticiones del dinucleótido CA, el cual se señala en el recuadro negro.

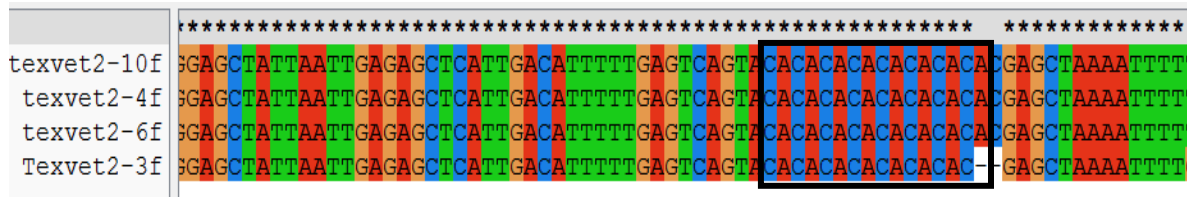
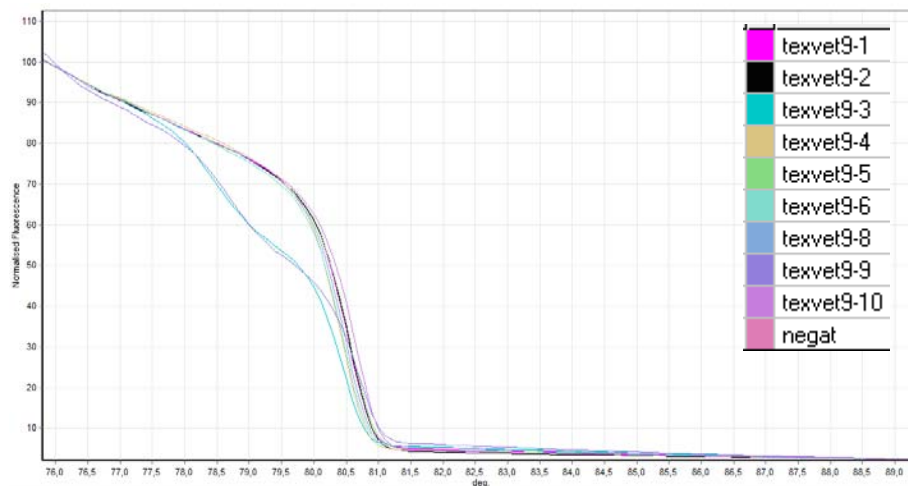


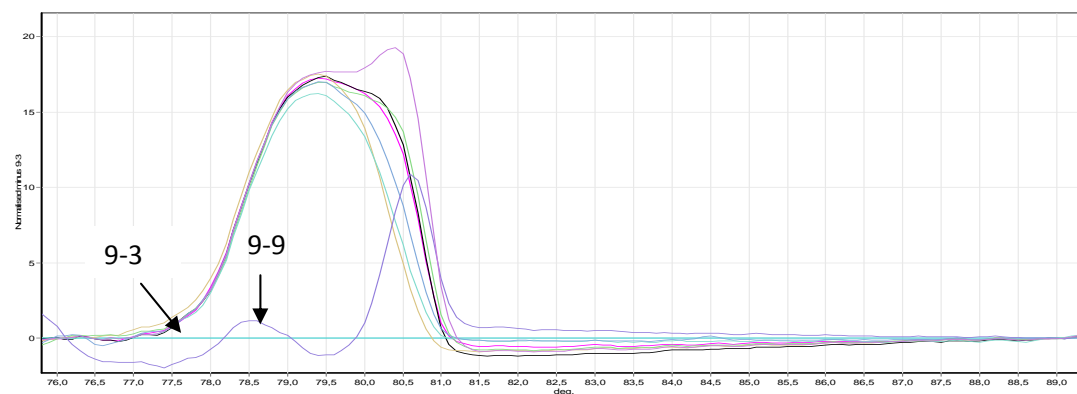
Figura 11. Alineamiento TexVet 2. Resultado de la secuenciación de las muestras: 2-3, 2-4, 2-6 y 2-10. La secuencia consenso del TexVet 2 es (CA)₈, la secuencia de la muestra 2-3 se obtuvo mediante clonación y posterior secuenciación.

10.7 Iniciador TexVet 9

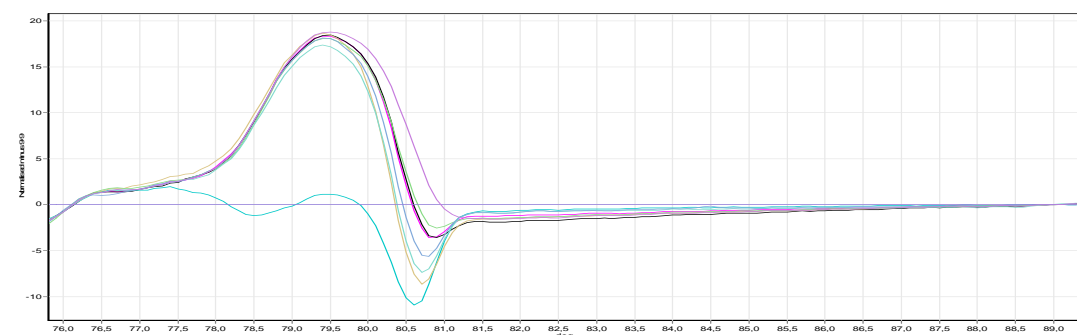
Los resultados del iniciador TexVet 9 se muestran a continuación, el primer resultado que obtenemos es la curva de disociación de las nueve muestras analizadas que se muestra en la gráfica 14, posteriormente se construyó una curva de disociación diferenciada para la muestra 9-3 se muestra en la gráfica 15 y una curva de disociación diferenciada para la muestra 9-9 (gráfica 16), posteriormente tenemos la curva TM que observamos en la gráfica 17, los valores de TM se muestran en la tabla 10, en la tabla 11 tenemos las secuencias de cuatro muestras, en la figura 11 se muestran los electroferogramas de las muestras 9-3 y 9-9 y finalmente en la figura 12 el alineamiento de las secuencias.



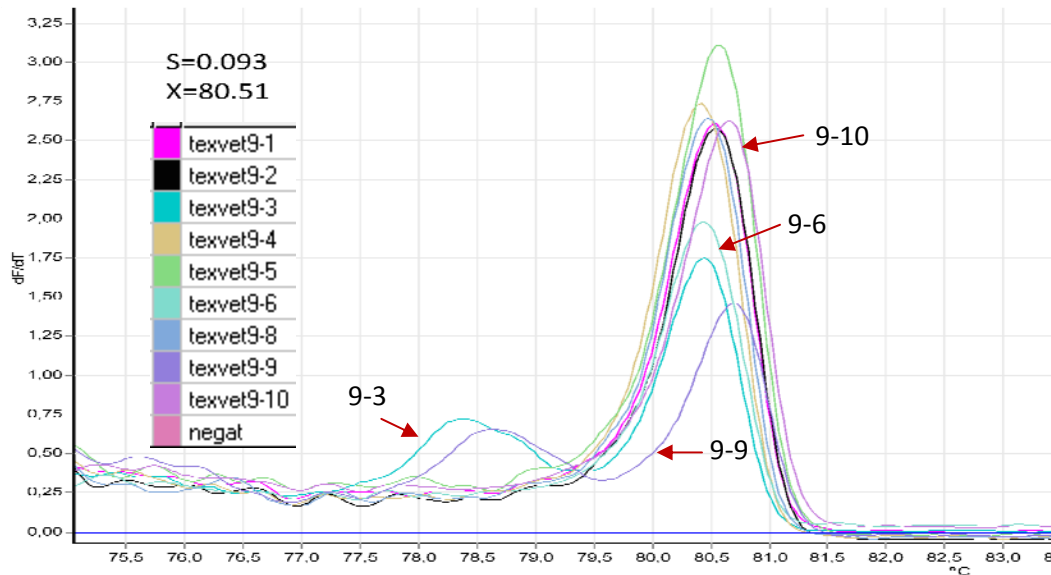
Gráfica 14. Curva de disociación de DNA de TexVet9. Se observan las gráficas de disociación correspondientes a las 9 muestras del iniciador Texvet9.



Gráfica 15. Curva de disociación diferenciada de la muestra 9-3. El patrón de disociación es la muestra 9-3, la muestra que en secuencia es parecida es la muestra 9-9, el resto de las muestras es diferente.



Gráfica 16. Curva de disociación diferenciada de la muestra 9-9. El patrón de disociación es la muestra 9-9, la muestra 9-3 es parecida al patrón ya que se encuentra cerca de la línea del patrón, el resto de las muestras es de secuencia diferente.



Gráfica 17. Curva Tm del iniciador TexVet9. Se analizaron 9 muestras con el iniciador TexVet9, la media de la TM es de 80.51 y la desviación estándar es de 0.093 a la izquierda se encuentra un recuadro indicando el color de la curva de cada una de las muestras. Se observa un patrón de TM similar excepto las muestras 9-3 y 9-9 las cuales poseen dos curvas pronunciadas. De acuerdo al patrón de disociación se seleccionaron cuatro muestras para confirmar por secuenciación la región microsatélite de cada una de las muestras.

Tabla 9. Tm de las muestras 9-1 a 9-10 del iniciador Texvet9.

Muestra	Peak1	Peak 2
Texvet9-1	80.53	
Texvet9-2	80.55	
Texvet9-3	78.38	80.45
Texvet9-4	80.40	
Texvet9-5	80.57	
Texvet9-6	80.45	
Texvet9-8	80.48	
Texvet9-9	78.63	
Texvet9-10	80.05	80.70
Negativo		

En la tabla nueve se observan las TM de cada una de las muestras analizadas con el iniciador TexVet9, la media de la TM para estas muestras fue de 80.51. De izquierda a derecha la primer columna contiene la muestra analizada, la segunda la TM y en la tercera se observa el valor de TM del segundo pico de TM de aquellas muestras que poseen dos curvas.

Tabla 10. Secuencias del Iniciador Texvet9. Se analizaron las muestras: 9-3, 9-6, 9-9 y 9-10.

TEXVET9	(CA) ³ CG (CA) ⁶
TEXVET9-3	(CA) ³ CG (CA) ⁶
TEXVET9-6	(CA) ³ CG (CA) ⁶
TEXVET9-9	(CA) ³ CG (CA) ⁶
TEXVET9-10	(CA) ³ CG (CA) ⁶

La tabla diez contiene las secuencias de cuatro muestras del iniciador TexVet9, la primera fila contiene en iniciador y la secuencia consenso, la primera columna indica la muestra y la segunda el número de repeticiones de la región microsatélite. La secuencia consenso de este marcador es (CA)³ CG (CA)⁶, las muestras analizadas, 9-3, 9-6, 9-9 y 9-10 no muestran diferencia en la secuencia, analizando la secuencia de las muestras 9-3 y 9-9 se encontró un cambio río arriba de la secuencia consenso, a continuación se muestra el electroferograma de las muestras 9-3 y 9-9.

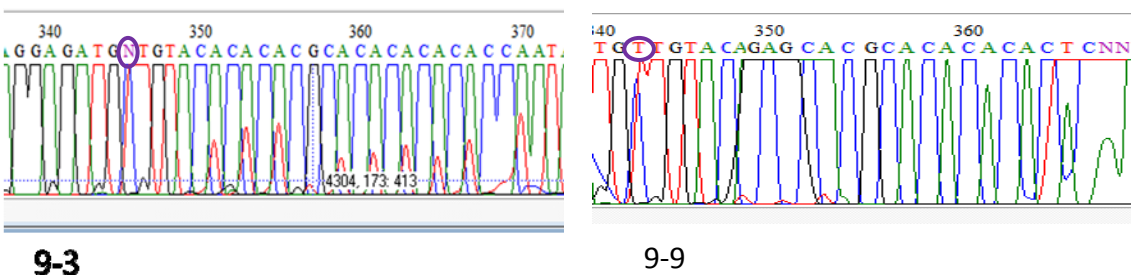
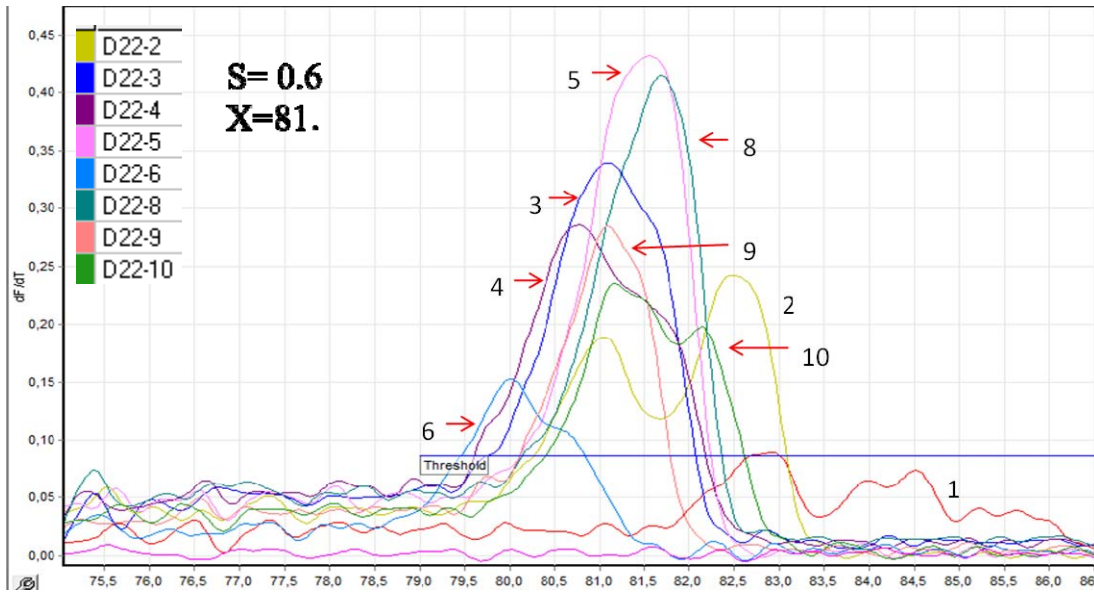


Figura 12. Electroferograma de las muestras 9-3 y 9-9. Río arriba de la secuencia consenso se encuentra un cambio de un solo nucleótido el cual se encuentra en el círculo morado.



Gráfica 19. Curva TM del iniciador D22. Se observan las muestras D22-1 a D22-10, la media en la TM fue de 81 y la desviación estándar fue de 0.6, a la izquierda se encuentra un recuadro que indica el color que corresponde a cada una de las muestras. Se observa un patrón de TM diferente entre las muestras por lo cual se secuenciaron ocho de las nueve muestras analizadas.

Tabla 11. Tm del iniciador D22 de las muestras 1 al 10.

Muestra	Pico 1	Pico 2
D22-1	82.92	
D22-2	81.05	82.47
D22-3	81.08	
D22-4	80.77	
D22-5	81.55	
D22-6	80.00	
D22-8	81.68	
D22-9	81.10	
D22-10	81.17	82.15

La tabla anterior contiene la TM de las nueve muestras analizadas pertenecientes al iniciador D22, la media de la TM fue de 81. La primera columna contiene la muestra, la segunda el valor de TM del primer pico y la tercera el valor de TM del segundo pico de TM.

Tabla 12. Secuencias de las muestras analizadas con el iniciador D22

D22	CA3 TA CA21
D22-1	CA3 TA CA16
D22-2	CA3 TA CA21
D22-3	CA3 TA (CA)19
D22-4	CA3 TA CA17
D22-6	CA3TA CA18
D22-8	CA3 TA CA19
D22-9	CA3 TA CA18
D22-10	CA3 TA CA17

La tabla anterior contiene las secuencias de ocho muestras del iniciador D22, la primera fila contiene el iniciador y la secuencia consenso, la primera columna indica la muestra y la segunda el número de repeticiones de la región microsatélite. La secuencia consenso de este marcador es CA3 TA CA21, la muestra uno tiene 16 repeticiones CA, la muestra dos 21 repeticiones CA, la muestra tres y ocho 19, la muestra cuatro y diez 17 repeticiones CA, la muestra seis y nueve 18 repeticiones CA. La única muestra que no se secuenció fue la muestra cinco debido a que posee el mismo patrón tanto de disociación como en la curva Tm que la muestra ocho.

XI. DISCUSIÓN

Los resultados del iniciador TexVet4 en la gráfica 1, nos indican que no hay diferencia entre las secuencias de las muestras analizadas ya que todas tienen el mismo patrón tanto en la curva de disociación como en la grafica 2 que muestra la curva TM, la media en la TM para estas muestras fue de 86 y la desviación estándar fue de 0.1144 por lo tanto podemos decir que las curvas TM no se encuentran separadas lo cual es visible a simple vista, para confirmar se seleccionaron cuatro de las muestras y se secuenciaron, las muestras seleccionadas fueron: la muestra uno, dos, tres y ocho, los resultados de la secuenciación se muestran en la figura 6, la secuencia consenso del iniciador TexVet4 es CA₈, las cuatro muestras secuenciadas con este marcador no muestran diferencia en el número de repeticiones todas poseen ocho repeticiones CA, lo cual coincide con las gráficas uno y dos donde el patron de disociación no muestra diferencia alguna y en la gráfica TM la poca diferencia que hay en cuanto al tamaño de la curva es debido a diferencias de concentración de DNA al inicio de la reacción.

Los resultados para el iniciador EV37Mn son los siguientes, en la curva de disociación que muestra la gráfica 3, observamos un patrón de disociación diferente entre las muestras, por lo cual esperamos que el número de repeticiones de la región microsatélite sea diferente, la gráfica cuatro muestra una curva de disociación con una sola curva misma que se compara con la muestra ocho y cinco que poseen dos curvas y se muestran en las gráficas 5 y 6 respectivamente, de acuerdo con esto esperamos que la muestra cinco y ocho sean diferentes del resto en la gráfica de TM como en secuencia. La gráfica 7, muestra la curva de disociación de este marcador, donde podemos observar que efectivamente la muestra

cinco y ocho poseen dos picos en la curva TM, las muestras dos, uno y diez tienen el mismo patrón en la curva TM, la muestra seis posee la curva más pequeña y la muestra nueve se encuentra separada hacia la izquierda del resto de las muestras. La media en la TM fue de 82.97 y la desviación estándar fue de 0.21, lo que indica que la TM de las muestras están separadas como observamos tanto en la curva de disociación como en la TM. De acuerdo al patrón de las muestras en las gráficas tres y siete se seleccionaron cuatro muestras y se secuenciaron, las muestras seleccionadas fueron: la muestra dos, cuatro, cinco y nueve, los resultados de la secuenciación se muestran en la tabla 7, la secuencia consenso del iniciador EV37Mn es AC₂₄, los resultados de la muestra dos son (AC)₂₆, la muestra cuatro (AC)₂₅, la muestra cinco (AC)₂₃ analizando la secuencia de la muestra cinco se encontró un cambio en un solo nucleótido el cual se puede observar en la figura 7, este cambio genera la doble curva tanto en la curva de disociación como en la TM indicando que el individuo es heterocigoto, inferimos que la muestra ocho posee este cambio ya que muestra el mismo patrón tanto en la curva de disociación como en la curva TM y la muestra nueve posee (AC)₂₆.

Los resultados para el marcador TexVet1 son los siguientes: En la curva de disociación que se observa en la gráfica 8, se muestra como la mayoría de las muestras posee un patrón de disociación similar, excepto la muestra 1-3 que se separa de las muestras y se observa que posee dos picos en la curva de disociación por lo cual esperamos que esta muestra sea diferente en el número de repeticiones de la región microsatélite, así como en la Curva TM, se construyó una curva de disociación diferenciada que se observa en la gráfica nueve, observamos como el patrón que en este caso es la muestra 1-3 es diferente del resto de las muestras, se observa como las muestras se alejan de la línea horizontal, lo que indica que

todas las muestras son diferentes a la muestra 1-3. La curva TM muestra efectivamente que la muestra 1-3 es diferente del resto ya que ésta posee dos curvas en el patrón de TM, la media en la TM para estas muestras analizadas con el iniciador TexVet1 fue de 79.73 y la desviación estándar fue de 0.34 lo que indica que la TM de las muestras se encuentran separadas, de acuerdo al patrón en la curva de disociación y en la curva TM se seleccionaron cuatro muestras para secuenciar, las muestras seleccionadas fueron: la muestra 1-1,1-3, 1-5 y 1-10, la secuencia consenso del iniciador TexVet1 es (CA)₄TA (CA)₂CC(CA)₂, las muestras 1-1,1-5 y 1-10 no muestran cambio alguno respecto a la secuencia consenso, estas muestras poseen la misma unidad de repeticiones, sin embargo la muestra 1-3 obtuvo la siguiente secuencia: (CA)₄TA (CA)₂CC(CA)₃, esta muestra tiene una repetición más del dinucleótido CA, es este último el que genera la doble curva en las gráficas de disociación y en la Curva TM. El tamaño de la curva de la muestra 9, es debido a la baja concentración al inicio de la reacción lo cual concuerda con el gel de agarosa al 2% donde se observa claramente que la muestra 1-9 tiene menor cantidad de DNA.

TexVet 2, los resultados en la curva de disociación que se muestra en la gráfica 11, muestran que la mayoría de las muestras tiene el mismo patrón de disociación excepto la muestra 2-3 que se encuentra hacia la izquierda del resto de las muestras, por lo cual se construyó una curva de disociación diferenciada que se observa en la gráfica 12 donde efectivamente se comprueba que la muestra 2-3 es diferente al resto de las muestras, se observa claramente como las muestras se separan de la muestra patrón lo que indica que las muestras son diferentes en secuencia de la muestra 2-3, la gráfica 13 muestra el patrón de la curva TM donde nuevamente observamos la muestra 2-3 diferente al resto de las muestras,

es la que posee la curva de TM más pequeña, también posee el valor de TM menor, la media en la TM con este marcador fue de 79.57 y la desviación estándar fue de 0.21 lo que indica que los valores en la TM de las muestras se encuentran ligeramente alejados, de acuerdo al patrón de disociación y la curva TM se seleccionaron cuatro muestras para confirmar el número de repeticiones por secuenciación, las muestras seleccionadas fueron: la muestra 2-3, 2-4, 2-6, y 2-10, la secuencia consenso de este iniciador es (CA)₈, de acuerdo a la secuenciación las muestras 2-4, 2-6 y 2-10 tuvieron ocho repeticiones del dinucleótido CA y la muestra 2-3 siete repeticiones CA, lo que coincide con la curva de disociación que se encuentra desplazada hacia la izquierda, coincide también con la gráfica de disociación diferenciada que indica la muestra 2-3 diferente de las ocho muestras restantes y finalmente con la curva TM donde la muestra 2-3 es menor y se encuentra desplazada hacia la izquierda lo que se refleja en el valor menor de TM.

La gráfica de disociación para las nueve muestras analizadas con el iniciador TexVet 9 muestran que las muestras 9-3 y 9-9 poseen un mismo patrón de disociación y se separan de las seis muestras restantes que muestran un patrón de disociación igual entre ellas, observamos que las muestras 9-3 y 9-9 tienen dos picos en la curva de disociación por lo cual esperamos que sean diferentes al resto de las muestras y en la curva TM esperamos que muestren dos curvas, para probar que son diferentes se construyó una curva de disociación diferenciada para la muestra 9-3 se muestra en la gráfica 15, observamos que la única muestra que es parecida es la muestra 9-9, para confirmar se realizó una curva de disociación diferenciada donde el patrón en este caso es la muestra 9-9, los resultados se observan en la gráfica 16, donde efectivamente se muestra que la única muestra con

secuencia parecida es la muestra 9-3, las siete muestras restantes son diferentes, en la gráfica 17 se muestra el patrón de la curva TM para las muestras analizadas, se observa que la muestras 9-3 y 9-9 poseen dos curvas pronunciadas y el resto de las muestras poseen sólo una curva por lo tanto poseen un solo valor de TM, y son parecidas entre sí, la media en la TM sin tomar en cuenta las muestras 9-3 y 9-9 es 80.51 y la desviación estándar fue 0.093, estos resultados indican que las siete muestras son muy parecidas en secuencia para confirmar estos resultados se seleccionaron cuatro muestras y se secuenciaron, los resultados se muestran en la tabla 11, las muestras seleccionadas para secuenciación fueron la muestra 9-3, 9-6, 9-9 y 9-10, la secuencia consenso de este iniciador es (CA)₃CG (CA)₆, los resultados de secuenciación no muestra ningún cambio en la secuencia consenso, lo que coincide con lo reportado, la heterocigocidad esperada para este iniciador es 0.00 por lo que no es capaz de diferenciar individuos, sin embargo analizando la secuencia se encontró que río arriba de la secuencia consenso hay un cambio en un solo nucleótido en las muestras 9-3 y 9-9, el electroferograma se muestra en la figura 11, es este cambio el que genera el doble pico tanto en la curva de disociación como en la curva TM, el alineamiento de las secuencias se observa en la figura 12, donde notamos que la región microsatélite no tiene cambio alguno (recuadro amarillo) 5pb río arriba de la secuencia consenso se encuentra un cambio en un solo nucleótido en las muestras 9-3 y 9-9 mismo que se señala con la letra N, por lo tanto con este marcador contrario a lo reportado se puede identificar individuos basándonos en los resultados de este polimorfismo, ya que la secuencia microsatélite no es capaz de diferenciar entre individuos, sin embargo observando las curvas tanto de disociación como la curva TM observamos que es sencillo identificar individuos con este marcador basándonos en los resultados de este polimorfismo.

Las muestras analizadas con el iniciador D22 fueron nueve, en la curva de disociación (gráfica 18) observamos como las muestras poseen un patrón de disociación diferente entre sí, por lo tanto esperamos que las muestras sean diferentes en la secuencia, la curva de TM coincide con la curva de disociación la desviación estándar para la TM fue de 81 y la desviación estándar fue de 0.6, lo que confirma la naturaleza diferente de las secuencias de las muestras, para confirmar estos resultados se secuenciaron ocho de las nueve muestras, la muestra cinco no se secuenció debido a que presenta el mismo patrón que la muestra ocho en la curva de disociación y en la curva TM, los valores de TM se encuentran en la tabla 12, los resultados de la secuenciación se encuentran en la tabla 13, efectivamente muestra como las muestras son diferentes, la secuencia consenso del iniciador D22 es $(CA)_3TA (CA)_{21}$, el resultado de la muestra uno es $(CA)_3TA (CA)_{16}$ la muestra dos $(CA)_3TA (CA)_{21}$, la tres y la ocho tienen el mismo número de repeticiones $(CA)_3TA (CA)_{19}$, la muestra cuatro y diez poseen el mismo número de repeticiones $(CA)_3TA (CA)_{17}$, la muestra seis y nueve $(CA)_3TA (CA)_{18}$ inferimos que la muestra cinco posee el mismo número de repeticiones que la muestra ocho por lo tanto la secuencia de la muestra cinco es $(CA)_3TA (CA)_{19}$, la heterocigocidad esperada para este marcador es alta, lo que coincide con nuestros resultados la heterocigocidad observada fue de 0.644, notamos que entre más alta sea la heterocigocidad reportada, se dificulta el análisis por este método ya que es altamente sensible.

XII CONCLUSIONES

- El iniciador TexVet 4 no es capaz de diferenciar individuos por lo cual no se recomienda en estudios futuros, estos resultados coinciden con los reportados, la heterocigocidad esperada es 0.00 y la observada en este estudio fue de 0.00.
- El iniciador Ev37Mn, es capaz de diferenciar entre individuos, se observa una heterocigocidad de 0.125, se logro identificar cuatro diferentes genotipos, los resultados se muestran en la tabla 14, por lo que se recomienda para estudios futuros como marcador en huella genética.
- El iniciador TexVet1 tiene una heterocigocidad esperada de 0.032, la heterocigocidad observada fue de 0.05, se identificaron dos diferentes genotipos, por lo tanto se recomienda utilizar este marcador para realizar huella genética de delfines en estudios futuros.
- El iniciador TexVet2 tiene una heterocigocidad esperada de 0.193, la heterocigocidad observada fue de 0.05, con este marcador se identificaron dos genotipos diferentes, por lo que se recomienda para realizar huella genética en delfines en estudios posteriores.
- El iniciador TexVet9 no mostró diferencia en la región microsatélite lo que coincide con lo reportado, sin embargo se encontró un cambio de un solo nucleótido rio arriba de la secuencia consenso con el cual es posible realizar huella genética con este marcador y se recomienda utilizarlo para diferenciar individuos basándose en los resultados de este polimorfismo.
- El iniciador D22 muestra una alta heterocigocidad esperada, la observada fue de 0.644, en este estudio fue posible identificar cinco diferentes genotipos, la alta heterocigocidad que muestra este marcador dificulta el análisis de huella genética por este método debido a la alta sensibilidad que presenta HRM, por lo tanto se recomienda para estudios posteriores con un minucioso estudio de la secuencia.

En la tabla 14 se muestra un resumen de las secuencias analizadas y las secuencias esperadas para cada una de las muestras, los resultados se realizaron haciendo inferencia en las muestras secuenciadas y conforme al patrón de disociación y al patrón en la curva Tm debido a la alta sensibilidad del método HRM fue posible realizar estas inferencias, con esto uno de los resultados más importantes para estudios futuros no se necesitará secuenciar las muestras sólo se analizaran las curvas tanto de disociación como la curva TM.

Tabla 13. Resumen de la región microsatélite de los iniciadores analizados.

Muestra	TexVet4	Ev37Mn	TexVet1	TexVet2	TEXvet9	D22
1	8/8	26/24	1/1	8/8	6/6	16/21
2	8/8	26/24	1/1	8/8	6/6	21/21
3	8/8	25/24	2/1*	7/8	6*/6	19/21
4	8/8	25/24*	1/1	8/8	6/6	17/21
5	8/8	23*/24	1/1	8/8	6/6	19/21
6	8/8	25/24	1/1	8/8	6/6	18/21
8	8/8	23*/24	1/1	8/8	6/6	19/21
9	8/8	26/24*	1/1	8/8	6*/6	18/21
10	8/8	26/24	1/1	8/8	6/6	17/21
He	0	*	0.032	0.193	0	*
Ho	0	0.125	0.05	0.05	0.05	0.644

XIII. BIBLIOGRAFÍA

Aranguren, J. A., R. Román-Bravo., W. Isea, Y. Villasmil, y J. Jordana. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 2005. 13(1): 30-42.

Armour, J. A., R. Neumann, S. Gobert y A. Jeffreys. 1994. Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. Human Molecular Genetics. 32: 599-605.

Bowcock, A.M., A.Ruiz-Linares, J.Tomfohrde, E. Minc, J. R. Kiddy L. L. Cavalli-Sforza. 1994. High resolutions of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. Nature. 368: 455-457.

Breising Karsten, Linke Katrin, Todt Dietmar, 2003. Can dolphins heal by ultrasound? Journal of theoretical biology 225(2003) pp 99-105.

Chakraborty, R., Kidd, K. 1991. The utility of DNA typing in forensic work. Science, 254:1735-9.

Chambers, G., MacAvoy, E. 2000. Microsatellites: consenso and controversy. Comparative Biochemistry and physiology. Part B 126 (2000) 455-476.

Código Penal Federal, 2002. Artículo 147. www.diputados.gob.mx

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos. Marco jurídico del congreso de los Estados Unidos Mexicanos. Edición especial de la Cámara de diputados. 2000. México, DF.

Convención de las Naciones Unidas sobre el Derecho del Mar, 1995. Artículo 65.

Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de flora y fauna silvestres (CITES), 1992. www.cites.org

Convenio Sobre Diversidad Biológica, 1992. www.biodiv.org

Diario Oficial de la Federación.13 de diciembre de 1996. Decreto por el que se reforman, adicionan y derogan diversas posiciones de la Ley General de Equilibrio Ecológico y la protección del medio ambiente.

Ferreira, M., Grattapaglia, D.1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1 ed. Brasilia. Embrapa-Cernagen pp 220.

Fowler, J., Borgoyne, L., Scott, A., Harding, H. 1988. Repetitive deoxyribonucleic acid (DNA) and human genome variation. A concise review relevant to forensic biology. J Forensic sci 33:1111-1126.

Griffiths, A., Miller, J. and Suzuky, D. 2000. An introduction to genetic analysis. 7th edition. New York, W.H. Freeman.

Hagelberg, E., Gray, I.C. y Jeffreys, A.J., 1991. Identificación of skeletal remains of a murder victim by DNAanalysis. Nature. 352:427-9.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R.1993. kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. BioTechnology. 11:1026-1030.

Higuchi, R.,Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffirith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of especific DNA sequences. Biotechnology. 10:171-417.

Honma, M., Yoshii, T., Ishiyama, I., Mitani, K., Kominiami, R. and Maramatsu, R., 1989. Individual identification from semen by the deoxyribunucleic acid (DNA) fingerprint technique. Journal of Forensic Science. 34:222-7.

Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAP. 2000. Ley General de Vida Silvestre. Primera edición. México, DF.

Jeffreys, A., Bookfield, J. and Semenov, R., 1985a. Positive identification of an immigration test case using human DNA fingerprints. *Nature*. 317:818.

Jeffreys, A.J., Wilson, V.,Thein, S.L., 1985b. Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. *Nature*. 314: 67-73.

Jeffreys, A.J., Wilson, V.,Thein, S.L., 1985c. Individual-specific fingerprints of human DNA. *Nature*. 316: 76-9.

Jeffreys, A.J., Wilson, V.,Thein, S.L., Weatherall, D.J. and Ponder, B.A., 1986. DNA fingerprints and segregation analysis of multiple markers in human pedigrees. *Am. J. Hum. Genet.* 39:11-24.

Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA), 1988. Diario Oficial de la Federación, 28 de Enero de 1988.

Litt, M., Luty, J. 1989. An hypervariable revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum. Genet* 44: 397-401.

Luque C. J., y A. S. Herráez. 2001. Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la Salud. Harcourt.

MacKay JF, Wright CD and Bonfiglioli RG. 2008. A new approach to varietal identification in plants by microsatellite high resolution melting analysis: application to the verification of grapevine and olive cultivars. *Plant Methods* 4.

Mader E, Lukas B and Novak J. 2008. A strategy to setup codominant microsatellite analysis for high-resolution-melting-curve-analysis (HRM). *BMC Genetics*. 9:69.

Marino, Lori and Lilienfeld, S. 1998. Dolphins-assisted Therapy: Flawed data, flawed conclusions. *Anthozoos*, 11(4) 194-2000.

Nathanson, D.E., de Castro, D., Friend, H., y Mc Mahin, M. 1997. Effectiveness of short-term dolphin assisted therapy for children with severe disabilities. *Anthozoos*, 6(1):17-29.

Nichols C, Herman J, Ganggiotti O, Dobney K, Parsons K and Hoelzel R. 2007. Genetic isolation of a now extinct population of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) Proceeding of the royal society B. 274: 1611-1616.

Norma Oficial Mexicana de Emergencia. NOM-EM-135-SERNARNAT-2004. Diario de la Federación. 27 de Agosto del 2004.

Ogura, M., and Mitsuahahi, M. 1994. Screening Method for a large Quantity of Polymerase Chain Reaction Products by Measuring YOYO-1 Fluorescence on 96-well Polypropylene plates. *Anal. Biochem*. 218: 458-459.

Pasini A., Ortega R. 2007. Delfinarios. Comarino pp 1-341.

Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalsky, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP, AND SSR (microsatellite) markers for germoplasm analysis. *Mol. Breed* 2:225-238.

Price EP, Smith H, Huygens F, Giffard PM. 2007. High resolution DNA melt curve analysis of the clustered, regularly interspaced short-palindromic-repeat locus of *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 73: 3431-3436.

Reeves, R., Stewart, B., Clapham, P., and Powell, J. 2005. Guía de los mamíferos marinos del mundo. Ed. Omega. Pp 359-361.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 245:154-160.

Rooney A. P., D. Merritt. And J. Derr. 1999. Microsatellite Diversity in captive Bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *The journals of heredity* 1999:90 (1) 228-231.

Shirihai, H., y Jarret, B. 2006. Whales, dolphins and other marine mammals of the world. Ed. Princeton University. Pp 154-159.

Singer, M. 1982. SINES and LINES: highly repeated short and long interspersed sequences in mammalian genomes. *Cell* 28:433-434.

Sumiyama D., S. Kitamura., F. Terasawa., Y. Hori., K. Murata., J. Kulsky and H. Inoko. 2008. Paternity determination of captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) Using Microsatellite DNA analysis. *J. Vet. Med. Sci* 70(7): 711-713.

Tauz D. 1989. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Rev.* 17:6463-6471.

The UTAH marker development group.1995. A collection of ordered tetranucleotide-repeat markers from the human genome. *Am J. Hum. Genet.* 57:619.

Torales. S., y. P. 1995. Identificación genética de clones utilizando microsatélites. C. Instituto de recursos Biológicos., Ed. IdiaXXI.

Wojdacz TK and Dobrovic A. 2007. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): A new approach for sensitive and high-throughput assessment of metilation. Nucleid acids research: 35.

Wu SB, Wirthensohn MG, Hunt P, Gibson JP and Sedgley M. 2008. High resolution melting analysis of almond DNPs derived from ESTs. Theoretical and Applied Genetics

Zane, L., Bargelloni, L., Partanello, T. 2000. Strategies for microsatellite isolation a review. Molecular Ecology 11:1-16.