



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S. C.

Programa de Estudios de Posgrado

**ESTUDIO DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE
HISTOCOMPATIBILIDAD EN LA HISTORIA EVOLUTIVA
Y DEMOGRÁFICA DE LA VAQUITA *Phocoena sinus***

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biología Marina)

P r e s e n t a

A d r i á n M u n g u í a V e g a

La Paz, B.C.S., Diciembre del 2002

RESUMEN

La Vaquita, *Phocoena sinus*, es una marsopa endémica del Alto Golfo de California, México. Es uno de los cetáceos más pequeños y de distribución más restringida, y actualmente se le reconoce como una especie críticamente amenazada. Su única población se estima en menos de 600 individuos, y ha estado sujeta a una mortalidad incidental por enmallamiento en redes de pesca al menos desde 1940. Lo anterior motivó el interés de investigar el riesgo de depresión por endogamia y el potencial adaptativo presente en la especie, y sus implicaciones en la extinción.

Las moléculas del Complejo principal de histocompatibilidad (*Mhc*) son cruciales para generar la respuesta inmune en vertebrados al capturar péptidos extraños y presentarlos en la superficie celular a los linfocitos T. La selección natural ha favorecido el gran polimorfismo de estos genes, lo que ha fomentado gran interés en su estructura, función, y su aplicación como marcadores moleculares para estudiar la historia y viabilidad de poblaciones silvestres y en cautiverio.

Se clonaron y secuenciaron fragmentos de ADN correspondientes a la Región de Unión del Péptido (exon 2) de genes del *Mhc* en una muestra de 3 individuos. Se encontraron 7 secuencias únicas muy poco divergentes entre sí y provenientes de al menos 3 loci *Mhc* clase-I, así como una sola secuencia en el locus *DQB* del *Mhc* clase-II. Las secuencias fueron depositadas en el GenBank, y su caracterización y comparación con secuencias similares de otras especies demostró que se trata de genes que codifican moléculas histocompatibles funcionales que muestran evidencias de la influencia de la selección natural en posiciones específicas de aminoácidos que son importantes en la unión de péptidos.

Asimismo se determinó el polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) del locus *DQB* en 25 individuos, los que fueron homocigotos para el único alelo (*Phsi-DQB*01*) aislado anteriormente. Con tal información se simuló distintos escenarios demográficos recientes e históricos empleando modelos analíticos y computacionales que permitieran explicar la fijación de dicho alelo en la población, bajo un régimen de deriva genética. Los resultados indicaron un tamaño efectivo histórico en la vaquita de probablemente $N_e \sim 500$ durante al menos unos 10,000 años, y que corresponde a unas dos o tres veces su valor actual ($N_e \sim 250$). Su polimorfismo genético habría sido prácticamente nulo antes de su mortalidad incidental. Tal población históricamente pequeña podría haber purgado los alelos deletéreos de mayor efecto, lo que podría evitar que la especie sufriera de depresión por endogamia a diferencia de especies naturalmente abundantes y diezmadas recientemente. No obstante, debido a que paralelamente a la deriva genética la selección natural se torna ineficaz en poblaciones pequeñas, algunos alelos ligeramente deletéreos se habrían acumulado a lo largo del tiempo, lo que explicaría la presencia de ploidictilia y malformaciones vertebrales en la especie. El monomorfismo de la región control mitocondrial, y del locus *DQB* indican la uniformidad genética de la vaquita, sugiriendo una gran vulnerabilidad y muy limitada capacidad para adaptarse a ambientes cambiantes. La información genética y evolutiva ahora disponible no sugiere que la vaquita sea una especie condenada a la extinción, por lo que un plan destinado a su recuperación y conservación está plenamente justificado. Así, la vaquita constituye una especie rara con una historia evolutiva y demográfica extraordinarias, merecedora de convertirse en un modelo de estudio único.

Palabras clave: Vaquita, *Phocoena sinus*, Complejo principal de histocompatibilidad, *Mhc*.

ABSTRACT

The Vaquita, *Phocoena sinus*, is an endemic porpoise of the Upper Gulf of California, Mexico. It is one of the smallest cetaceans, one of the most restricted in distribution and presently recognized as a critically endangered species. The unique population is estimated to be less than 600 individuals, and has been subject of an incidental mortality by entanglement in fishnets at least since the 1940'. This raised the concern to investigate the risk of inbreeding depression and the adaptive potential present in the species, and its implications for extinction.

Molecules of the Major histocompatibility complex (Mhc) play a key role in the immune response of vertebrates by recognizing foreign peptides and presenting them on the cellular surface to T lymphocytes. Natural selection has promoted a high polymorphism of this genes, raising increasing interest in its structure, function, and application as molecular markers to study the history and viability of wild and captive populations.

DNA fragments corresponding to the Peptide Binding Region (PBR) of the second exon of *Mhc* genes were cloned and sequenced from 3 individuals. Seven unique sequences with a low degree of divergence and coming from at least 3 *Mhc* class I loci were found. A unique sequence was present at the locus *DQB* from *Mhc* class II. The sequences were registered in GenBank and a characterization and comparison with analogous sequences from other species demonstrated they code for functional Mhc molecules that show evidences of the influence of the natural selection at specific positions of aminoacids functionally involved on peptide binding.

Moreover, we studied the single stranded conformation polymorphism (SSCP) of the *DQB* locus in 25 individuals, all being homozygous for the single allele (*Phsi-DQB*01*) previously isolated. Based on this information, different analytic and computer demographic scenarios were simulated to explain the fixation of such an allele under genetic drift. Results indicated a likely historic effective population size of $N_e \sim 500$ for at least some 10,000 years, that is only about two or three times the actual value ($N_e \sim 250$). The polymorphism had already been nearly zero before incidental mortality. Such an historically small population might have already purged those deleterious alleles of higher effect, which might prevent the species to suffer from inbreeding depression in contrast to a naturally abundant species that were reduced recently. Nevertheless, because in parallel with genetic drift natural selection becomes less efficient in small populations, some slightly deleterious alleles might have accumulated over time, which could explain the presence of polydactyly and vertebral malformations in the species. The monomorphism of the mitochondrial control region and the *DQB* locus indicate the genetic uniformity of the species, suggesting a high vulnerability and a very limited capacity to adapt to changing environments. The genetic and evolutionary information currently available do not suggest that the vaquita is a species doomed to extinction and therefore an appropriate recovery plan for its recovery and conservation is well justified. Thus, the vaquita constitutes a rather rare species with an extraordinary evolutive and demographic history, worthy of becoming an excellent and unique model of study.

Key words: Vaquita, *Phocoena sinus*, Major histocompatibility complex, *Mhc*.

DEDICATORIA

A mi Familia, a las personas que creen en mí.

((Un mundo pequeñito, inmerso en un infinito voraz de estrellas y luces relampagueantes, creadas por dioses que no conocemos, y a quienes no sabría qué preguntarles. Hombres creando maravillas, perfecciones, sentimientos desbordándose hacia un lugar que aún no puedo ver, más lo siento. Me maravillo y me sorprende más de lo que me nace preguntar. Se forman estructuras, de madera, de piedra, y ahora de egoísmo y desamor, más yo paso tan solo observando, sin tocar nada, sin llevar algún recuerdo que no pueda guardar en el ala de un colibrí. Nada ni nadie me ha dicho de donde soy, pero yo lo sospecho al voltear al infinito, ver estrellas y galaxias bailando una danza momentánea, y sentirme como en casa. Los ojos observan y creen verlo todo, ¿será que el amor ha sido siempre sólo cuatro letras? Las paredes de nuestro infinito aún son insalvables, los dioses siguen dando vueltas cada noche en el cielo de este a oeste, y yo sigo encontrándome siendo un sentimiento frágil, indefenso, vulnerable, que se sacude de vez en cuando el polvo cotidiano de los ojos, no para ver, sino para cerrar los ojos y soñar tranquilo con lo imposible))

AMV.

AGRADECIMIENTOS

Muchas personas y situaciones debieron coincidir para que un estudio de genes del *Mhc* se realizara en la vaquita. Hacia finales de mis estudios profesionales en la UABCS, Sergio Flores me introdujo al fascinante mundo de los genes del *Mhc*, y me dió cuerda y dirección para hacer esta investigación. Los estudios de Lorenzo Rojas me inspiraron para continuar estudiando la historia única de la vaquita, y su participación en el desarrollo del trabajo ha sido crucial. Este estudio se materializó también gracias a Ricardo Vázquez, a quien agradezco su dedicación y amistad. A cada uno de mis tutores les agradezco su participación y sobre todo su confianza.

Además, quiero agradecer la hospitalidad en los laboratorios de Eugenio Carpizo (UABC), Felipe Ascencio (CIBNOR), Norma Hernández (CIBNOR) y Ricardo Pérez (CIBNOR), a quien también agradezco comentarios clave en el trabajo. A Peggy Turk del CEDO por brindarme recientemente un panorama amplio sobre la conservación en el Alto Golfo de California, y a Jorge Urbán de la UABCS por su apoyo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su soporte a través de la beca No. 158622 para estudios de Maestría. Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por contar con la infraestructura necesaria para realizar este trabajo, y por el apoyo recibido a través del proyecto GEA-13. Al área de Posgrado del CIB agradezco la ayuda durante los últimos meses. A la Fundación Telmex agradezco la ayuda que se prolongó durante varios años.

Agradezco a mi tío Enrique Zepeda el apoyo invaluable que brindó al inicio. A mi familia agradezco el apoyo incondicional que siempre me han brindado para hacer realidad mis anhelos. Gracias a ustedes estoy hoy aquí. A mis mejores amigos,

CONTENIDO

Resumen	i
Abstract	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de Figuras	vii
Lista de Tablas	viii
Lista de Anexos	viii
Abreviaturas	viii
Introducción General	1
Historia Natural y Estado Poblacional de <i>P. sinus</i>	1
Origen e Interés de la Investigación	6
Capítulo I. Clonación, Caracterización y Filogenia Molecular de Secuencias del	
Complejo Principal de Histocompatibilidad de la Vaquita <i>Phocoena sinus</i>	10
I.1. Introducción al Complejo Principal de Histocompatibilidad	10
I.2. Hipótesis	17
I.3. Objetivos	17
I.4. Métodos	18
I.5. Resultados	21
I.6. Discusión	29
Capítulo II. Polimorfismo del Complejo Principal de Histocompatibilidad	
e Historia Demográfica de la Vaquita <i>Phocoena sinus</i>	35
II.1. Introducción	35
II. 1.1. La Pérdida de Variabilidad Genética en Poblaciones pequeñas	35
II.1.2. El Papel de la Selección Natural en Poblaciones Pequeñas	39
II.1.3. Antecedentes del Monomorfismo en el D-loop Mitocondrial de <i>P. sinus</i>	43
II.1.4. El <i>Mhc</i> como Marcador Molecular en Estudios de Conservación	

y Modelado Demográfico de la Historia de <i>P. sinus</i>	45
II.2. Hipótesis	50
II.3. Objetivos	51
II.4. Métodos	51
II.4.1. Análisis SSCP del locus <i>DQB</i>	51
II.4.2. Simulaciones de la Pérdida de Variabilidad Genética por de Deriva	54
II.4.2.1. Escenarios Recientes	56
II.4.2.2. Escenarios Históricos	58
II.5. Resultados	59
II. 5.1. Polimorfismo SSCP de secuencias histocompatibles <i>DQB</i>	59
II. 5.2. Simulaciones del Proceso de Deriva Genética	61
II. 5.2.1. Escenarios Recientes	64
II. 5.2.2. Escenarios Históricos	65
II.6 Discusión	72
II.6.1. Pérdida Reciente de Variación Genética por Deriva	73
II.6.2. Pérdida Histórica de Variación Genética por Deriva	76
II.6.3. Evaluando la Depresión por Endogamia en <i>P. sinus</i>	79
II.6.4. Variación Genética Adaptativa en <i>P. sinus</i>	81
II.6.5. Variación Genética Detrimental en <i>P. sinus</i>	83
II.6.6. Variación Genética Neutral en <i>P. sinus</i>	88
II.6.7. ¿Cuál es el riesgo de Depresión por Endogamia en <i>P. sinus</i>?	89
II.6.8. Implicaciones de la Uniformidad Genética en <i>P. sinus</i>	92
II.6.9. <i>P. sinus</i> Como una Especie Rara	95
Conclusiones Generales	99
Perspectivas	100
Referencias	101
Anexos	118

FIGURAS

1. Vista lateral de <i>P. sinus</i>	1
2. Mapa de la distribución de <i>P. sinus</i> en el Alto Golfo de California.....	2
3. Estructuras de una molécula <i>Mhc</i> clase I y de la PBR.....	12
4. Diagramas de la estructura y organización genética del <i>Mhc</i> Clase I y II.....	13
5. Ocurrencia de las secuencias del segundo exón del <i>Mhc-I</i> de <i>P. sinus</i> en 3 individuos.....	21
6. Filogenia de las secuencias de ADN del <i>Mhc</i> aisladas de <i>P. sinus</i>	28
7. Selección natural vs. deriva genética en poblaciones pequeñas.....	41
8. Gel SSCP del segundo exón del locus <i>DQB</i> de <i>P. sinus</i>	59
9. Ejemplos de la variación observada alrededor de los valores promedio de heterocigosidad en las simulaciones de deriva genética.....	62
10. Ejemplos de la variación observada alrededor de los valores promedio en el número de alelos en las simulaciones de deriva genética.....	63
11. Simulaciones de la pérdida Reciente de heterocigosidad por deriva genética en poblaciones pequeñas.....	66
12. Simulaciones de la pérdida Reciente en el número promedio de alelos por deriva genética en poblaciones pequeñas.....	67
13. Simulaciones de la pérdida Histórica de heterocigosidad por deriva genética en poblaciones pequeñas.....	70
14. Simulaciones de la pérdida Histórica en el número promedio de alelos por deriva genética en poblaciones pequeñas.....	71
15. Polidactilia en <i>P. sinus</i>	85

TABLAS

1. Comparación de las secuencias de nucleótidos del segundo exón del <i>Mhc-I</i> de <i>P. sinus</i> con la base de datos GenBank.....	22
2. Comparación de las secuencias de aminoácidos del segundo exón del <i>Mhc-I</i> de <i>P. sinus</i> con secuencias similares de otras especies.....	23
3. Cambio en las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos entre las secuencias del segundo exón del <i>Mhc-I</i> de <i>P. sinus</i>	24
4. Comparación de la secuencia de nucleótidos del segundo exón del locus <i>DQB PhsiDQB*01</i> con la base de datos GenBank.....	25
5. Comparación de la secuencia de aminoácidos del alelo <i>PhsiDQB*01</i> con secuencias similares de otras especies.....	26

ANEXOS

1. Límite de la influencia de la Selección Natural sobre la Deriva Genética en Poblaciones donde $N_e < 500$	118
2. Ejemplares de <i>P. sinus</i> analizados.....	119
3. Notas sobre la estandarización y desempeño de la técnica SSCP.....	120
4. Resultados de las simulaciones de deriva genética.....	122

ABREVIATURAS

Ne	Número efectivo
Mhc	Complejo principal de histocompatibilidad
Ma	Millones de años
s	Coefficiente de selección
h	Coefficiente de dominancia
PBR	Región de unión del péptido
SSCP	Polimorfismo de conformación de cadena sencilla

INTRODUCCIÓN GENERAL

Historia Natural y Estado Poblacional de *P. sinus*

Conocida comúnmente como Vaquita, *Phocoena sinus*, es un cetáceo pequeño perteneciente a la familia Phocoenidae, que agrupa a las marsopas que junto con ésta son seis especies de distribución principalmente antitropical (Fig. 1).

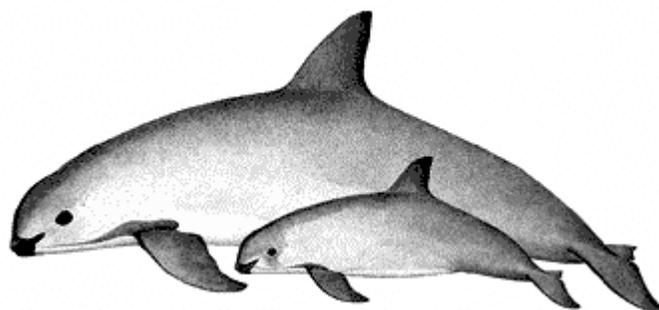


Figura 1. Vista lateral de la Vaquita (*Phocoena sinus*), marsopa endémica del Alto Golfo de California.

Phocoena sinus, fue descrita en 1958 por Norris y McFarland (1958) a partir de 3 cráneos colectados en 1950 y 1951 en la costa Noroeste de Punta San Felipe, Baja California Norte, México (Fig. 2), y a excepción del resto de las marsopas, es una especie subtropical, endémica del Alto Golfo de California, donde presenta la distribución geográfica más restringida de todos los cetáceos marinos del mundo, restringiéndose a un área en las cercanías de San Felipe, El Golfo de Santa Clara y Puerto Peñasco, (Fig. 2), donde se presenta en todo el año, posiblemente realizando movimientos estacionales restringidos (Silber, 1990; Silber y Norris, 1991).

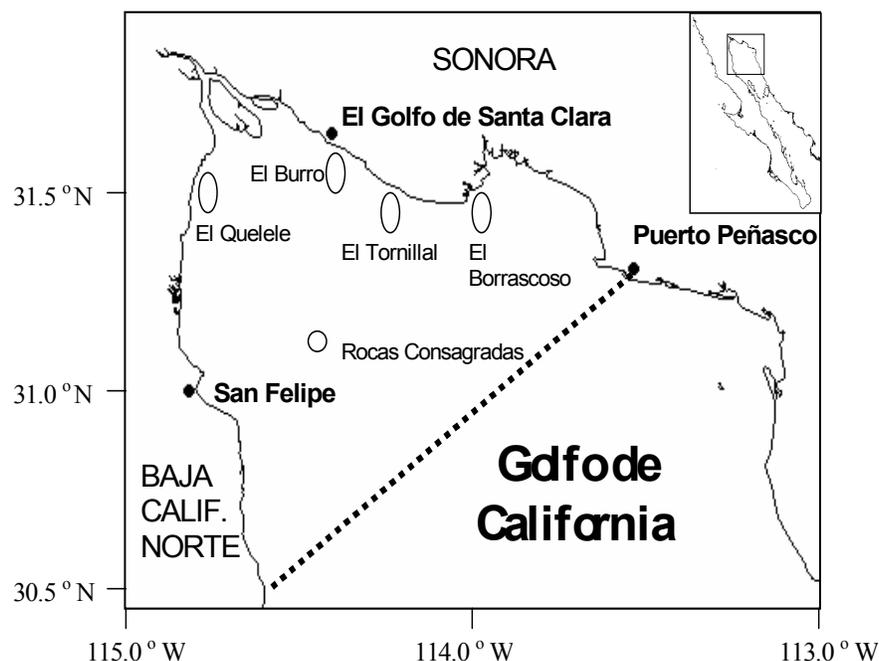


Figura 2. Mapa de la Provincia del Alto Golfo de California, mostrando los límites de distribución de *P. sinus* (Al Norte de la línea punteada) y las localidades de pesca donde fueron recuperados los ejemplares utilizados en este estudio. Basado en Rosel y Rojas-Bracho (1999).

Con una excepción (L. Rojas-Bracho, Com. Pers.), todos los registros confirmados de *P. sinus* se localizan al Norte de una línea imaginaria que une Puertecitos (Baja California Norte) con Puerto Peñasco (Sonora) (Fig. 2), al Norte de los 30° 30' N (Vidal, 1995; Brownell, 1986; Jaramillo *et al.* 1999). La población parece concentrarse en la costa Oeste del Alto Golfo: al Oeste de los 114° 20' W, y en las cercanías del islote rocoso "Rocas Consagradas" (Gerrodette *et al.* 1995; Jaramillo-Legorreta *et al.* 1999), donde la especie prefiere aguas someras de entre 20 y 50m de profundidad, los fondos arcillosos-limosos y las aguas turbias (0.5 a 1.9 m de visibilidad) (Gallo-Reynoso y Torre-Cosío, 1997), alimentándose de unas 17 especies de peces y algunos calamares abundantes (Vidal *et al.* 1999). De acuerdo con el número de presas encontradas en los contenidos estomacales se trata de una especie no selectiva (Findley *et al.* 1995; Pérez-Cortés, 1996).

Al igual que el resto de las marsopas, *P. sinus* presenta dientes espatulados y cuerpo robusto. A diferencia de los delfínidos, sus mandíbulas son cortas, por lo que el rostro no es alargado como en los delfines, sino casi ausente. Su aleta dorsal es baja y triangular y presenta una serie de caracteres craneales derivados que la separan junto con otros focénidos del resto de la superfamilia Delphinoidea, que comprende además de Phocoenidae a las familias Delphinidae (Delfines) y Monodontidae (Beluga y Narval) (Barnes, 1985). Por otra parte, en contraste con otras marsopas, los apéndices de *P. sinus* son más grandes. Sus aletas pectorales son proporcionalmente más largas y cóncavas en su margen anterior, y la aleta dorsal es más alta y falcada comparada con los otros miembros de su familia. Su coloración es gris oscuro en el dorso, con campos laterales gris claro y vientre blanco. Presenta además manchas en los labios y anillos en torno a los ojos (Brownell *et al.* 1987) (Fig. 1).

En el reducido número de ejemplares examinados hasta ahora, se han contado 17 a 21 pares de dientes en la mandíbula superior y 17 a 20 en la inferior (Jefferson y Leatherwood, 1995). La mayoría de los individuos analizados presentan fusionadas las tres primeras vértebras cervicales. Las hembras alcanzan hasta 150 cm de longitud y parecen ser de mayor talla que los machos, para los cuales se ha registrado un máximo de 145 cm, siendo uno de los cetáceos más pequeños que se conocen (Vidal *et al.* 1999). Los individuos de *P. sinus* son tímidos y elusivos y se alejan de las embarcaciones cuando estas se acercan, por ejemplo, a distancias menores a 913 m en promedio (Jaramillo-Legorreta *et al.* 1999). Como otros focénidos, son solitarios o forman grupos pequeños (2 individuos en promedio), pero también llegan a ser gregarios (Silber, 1990; Jaramillo-Legorreta *et al.* 1999). Un tamaño grande de los testículos (casi 5% de la masa corporal, n= 12), un dimorfismo sexual caracterizado por hembras de mayor talla que los machos, y un tamaño de grupo pequeño sugieren que el sistema de reproducción de la especie es poliándrico y con competencia de esperma (Hohn *et al.* 1996; Vidal *et al.* 1999). En general, los mamíferos con testículos grandes relativo a su tamaño corporal presentan sistemas

poliándricos (Kenagy y Trombulak, 1986; citado en Hohn *et al.* 1996), y un sistema similar ha sido propuesto para la marsopa común (*P. phocoena*) (Fontaine *et al.* 1991).

Con información limitada (56 individuos muertos incidentalmente en redes de pesca) se realizó el único estudio que existe sobre su historia de vida (Hohn *et al.* 1996), en el cual se estimó que los nacimientos ocurren entre finales de febrero y principios de abril y que la producción de crías podría ser bianual. Aparentemente, la especie presenta una proporción de sexos de 1:1. Un aspecto llamativo en este estudio fue una estructura de edades inusual (bimodal): 62% de los individuos entre los 0 y 2 años, ausencia de individuos de 3 a 6 años, pocos individuos de 7 a 10 años y 31% individuos entre 11 y 16 años. El individuo más viejo fue una hembra de 21 años. Todos los individuos menores a tres años eran inmaduros sexualmente y aquellos mayores a seis maduros (Hohn *et al.* 1996).

La población de *P. sinus* es muy pequeña. Las primeras estimaciones informales (no estadísticas) de su abundancia varían entre 50 y 1,000 animales (Villa-Ramírez, 1976; Barlow, 1986; Barlow *et al.* 1993; Vidal, 1995). La primera estimación formal estimó la existencia de 224 individuos (I.C._{95%}= 106 a 470) (Barlow *et al.* 1997). La estimación más reciente cubriendo todo el hábitat potencial de *P. sinus* en el Alto Golfo indicó 567 individuos (I.C._{95%}= 177 a 1073) (Jaramillo-Legorreta *et al.* 1999).

El factor que ha contribuido a que esta especie presente una población tan reducida ha sido su captura incidental en redes agalleras y de enmalle. Probablemente, la mayor captura se diera en redes de luz de malla grande (20-30.5 cm) destinadas a la totoaba (*Totoaba macdonaldi*), un sciáenido de gran talla también endémico del Alto Golfo de California y en peligro de extinción por sobreexplotación (Cisneros-Mata *et al.* 1995). No obstante, *P. sinus* es susceptible de enmallarse en cualquier tipo de red de pesca, como las de luz de malla menor para la captura de tiburones, rayas, macarelas, sierra, chano, corvina, y ocasionalmente en redes de arrastre camaroneras (Vidal *et al.* 1999). Las redes agalleras de nylon comenzaron a emplearse en la zona del Alto Golfo alrededor de 1940 (Villa-Ramírez, 1976; Barlow, 1986; Robles *et al.* 1987; Taylor y Rojas-Bracho, 1999), no obstante otras redes elaboradas con fibras naturales podrían haber causado una mortalidad previa a esa

fecha. Aunque se sabe que éstas redes capturaban pequeños cetáceos (Brownell, 1976), no se tuvieron registros detallados al respecto hasta que el Gobierno Mexicano declaró en 1975 el cierre total de la pesquería de totoaba, al caer la captura de 2,261 toneladas en 1942 a 59 toneladas en 1975 (Vidal *et al.* 1999).

A pesar de regulaciones publicadas en el Diario Oficial de la Federación en 1955, 1975, 1992, 1993 y 1994 que prohibían la pesquería de la totoaba y el uso de redes de luz de maya grande (D'Agrosa *et al.* 2000), la pesquería continuó al menos hasta inicios de 1994 (D'Agrosa *et al.* 1995; Vidal, 1995; Vidal *et al.* 1999), y otras pesquerías empleando luz de maya pequeña (<20 cm) surgieron o se expandieron (D'Agrosa *et al.* 2000). Las primeras estimaciones de mortalidad incidental sugirieron que decenas a centenas de individuos morían anualmente (Brownell, 1976). Estimaciones posteriores indicaron tasas de 32.5 (Turk y Silber, 1994) y 35 (Vidal, 1995) vaquitas/año. Por su parte Barlow *et al.* (1997), estimó una tasa de disminución de la especie del 17.7% anual (I.C._{.95%} = -43.2% a 19.3%), que considerando su estimación de 224 individuos, se traduce en $\cong 40$ individuos/año. La estimación más reciente realizada por D'Agrosa *et al.* (2000) tan sólo para uno de los tres principales campos pesqueros del Alto Golfo (El Golfo de Santa Clara) indicó un promedio de 39 individuos/año.

Debido a su distribución restringida, baja abundancia, y mortalidad incidental en redes de pesca, *P. sinus* ha sido considerada en México y el extranjero como una especie en peligro desde 1978 (Villa, 1978; Goodwin y Holloway, 1978), y actualmente está clasificada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza como “Críticamente Amenazada”, al ser una población única, menor a 250 individuos y en declive continuo (IUCN, 2002). La Convención Internacional para el Tráfico de Especies en Peligro de Fauna y Flora Silvestres (CITES, 1998) la clasifica en su Apéndice I como “En Peligro”, al igual que el gobierno mexicano en su Lista de especies de vertebrados raros y en peligro de acuerdo a la NOM-ECOL-059 (Diario Oficial de la Federación, 1994). En Junio de 1993, el gobierno de México estableció la Reserva de la Biosfera Alto Golfo de California y Delta del Río Colorado, con el objetivo principal de proteger la vaquita, la

totoaba y su hábitat (Diario Oficial de la Federación, 1993). Lo descrito determinó la necesidad de regular estrechamente el esfuerzo pesquero y procesar la pesca ilegal en el Alto Golfo de California (D'Agrosa *et al.* 2000), factores que se ha señalado podrían haber determinado el desplome de esta población.

Origen e Interés de la Investigación

Conforme una población disminuye su tamaño, el papel del azar se vuelve cada vez más importante y predominante por sobre los factores determinísticos (selección natural) que actúan en poblaciones grandes. Entre las principales fuerzas que pueden contribuir al proceso de extinción de una población reducida se encuentra la estocasticidad demográfica (fluctuaciones aleatorias en la sobrevivencia y nacimiento de cada individuo), la estocasticidad genética (deriva genética) y la estocasticidad ambiental (variación aleatoria en la capacidad de carga del sistema que afecta a todos los individuos) (Lande, 1988). La sinergia entre estos factores exacerba su efecto en detrimento de la población, reduciéndola cada vez más, incrementando la influencia negativa del azar y estableciendo lo que se denomina un "Vórtice de Extinción" que podría determinar la desaparición de la especie (Soulé, 1986; Primack, 1998).

Respecto al aporte que la estocasticidad genética podría tener en la susceptibilidad de *P. sinus* a la extinción, un estudio previo abordó el análisis de la variabilidad genética de *P. sinus*, analizando el polimorfismo de secuencia de la región control del ADN mitocondrial (ADNmt) en 43 individuos colectados entre 1985 y 1993 (Rosel y Rojas-Bracho, 1999). Los resultados mostraron la presencia un solo haplotipo, lo que constituye un caso excepcional respecto al resto de las especies de marsopas (Rosel *et al.* 1995), así como dentro de los mamíferos marinos y terrestres que en general muestran un polimorfismo moderado a alto en esta región neutral hipervariable. Tal resultado sugirió que la especie sufría de un alto grado de endogamia y motivó a evaluar el riesgo de depresión por endogamia en la especie y como este factor contribuía al riesgo de extinción de *P. sinus*. Para ello, Taylor y Rojas-Bracho (1999) realizaron simulaciones del proceso de deriva

genética empleando modelos demográficos para los últimos 10,000 años, y concluyeron que la ausencia de variabilidad en las vaquitas muy probablemente era el resultado de un Número Efectivo (N_e) poblacional reducido en la historia de la especie, después de que se fragmentó o se fundó. También indicaron que el desplome en número de esta población por captura incidental en las últimas décadas no habría afectado su ya depauperada variabilidad genética producto de eventos históricos, y que los alelos deletéreos que podrían empujar a la especie a un vórtice de extinción habrían sido purgados de esta población, a lo largo de los cientos o miles de años en que mantuvo números reducidos.

Al respecto, estudios recientes han mostrado que la tasa de mutación de la región control del ADNmt obedece a diferencias inherentes de cada especie, como su tasa metabólica (Awise *et al.* 1992; Martin y Palumbi 1993; Bromham *et al.* 1996; Pesole *et al.* 1999), mientras que al menos en otro odontoceto (el cachalote, *Physeter macrocephalus*) con poblaciones notablemente más grandes, se presenta una variabilidad exigua en la región control (Hyde *et al.*, 2001), que podría estar relacionada con procesos selectivos de buceo a grandes profundidades en esta especie. Por lo anterior, sería obligado investigar si la ausencia de variación en *P. sinus* se extiende a otros genes o si es tan sólo restringida a la región control mitocondrial analizada previamente. Sería recomendable por lo tanto analizar otro tipo de marcador molecular que ampliara el panorama respecto al polimorfismo genético en genes nucleares de la especie, esto con base a la obtención de resultados consistentes y coincidentes (Haig, 1998). Además, considerando que el ADN mitocondrial es heredado sólo por vía materna, y que en cada hembra está presente sólo una copia (haploide), el número efectivo (N_e) de genes mitocondriales es tan sólo un cuarto del de los nucleares, por lo que la fijación de genes en las mitocondrias se realiza en promedio cuatro veces más rápido que en el núcleo (Page y Holmes, 1998). El análisis de un gen nuclear por lo tanto brindaría además información antigua sobre la historia demográfica de la población.

Por otro lado, es importante reconocer que en poblaciones silvestres es poco probable que la adecuación de un genotipo sea constante, pues las condiciones ambientales cambian

en el tiempo. Un número importante de estudios ha documentado en especies silvestres y domesticadas que los niveles de variación genética, tanto a nivel individual como poblacional, determinan una mayor capacidad de adaptación (mayor adecuación) al cambio ambiental (Falconer y Mackay, 1996; Allendorf y Leary, 1986; Ledig, 1986; Coltman *et al.* 1998; Patterson *et al.* 1998; Hedrick, 2001). Al respecto, un marcador molecular de carácter neutral como la región control mitocondrial, no brinda información sobre la capacidad de la especie para adaptarse al cambio ambiental, por lo que sería muy interesante evaluar genes que impactaran sobre la adecuación, como podrían ser los responsables de la defensa inmune contra patógenos.

Lo descrito motivó el desarrollo de un estudio del polimorfismo en genes del Complejo principal de histocompatibilidad (*Mhc* por *Major Histocompatibility Complex*), una familia de genes nucleares sumamente diversos que en los vertebrados juegan un papel crucial para desencadenar una respuesta inmune contra parásitos (virus, bacterias, macroparásitos), y que además pueden estar sujetos a otras fuentes de selección (sobredominancia, selección de parentela o *Kin selection*, interacciones materno-fetales (Ej. Edwards y Hedrick, 1998). De manera reciente, los genes del *Mhc* han sido utilizados como marcadores moleculares para el estudio de la viabilidad e historia de especies en peligro silvestres (Ej. O'Brien, 1994) y en cautiverio (Ej. Hedrick *et al.* 1999; Hedrick *et al.* 2000a; Hedrick *et al.* 2000b).

El Complejo principal de histocompatibilidad ofrece varias ventajas como marcador genético para el estudio de especies en peligro como *P. sinus*: 1) Un elevado polimorfismo y heterocigosidad, debido al equilibrio en la frecuencia de sus alelos, que favorece proporciones máximas de heterocigotos en la población mayores a las predichas por selección neutral (Hedrick *et al.* 1991; Salamon *et al.* 1999). Genes del *Mhc* humano, por ejemplo, como el *HLA-A* cuenta con 67 alelos, el *HLA-B* y *HLA-C* cuentan con 149 y 39 alelos respectivamente, mientras que otros como *DQB1*, *DRB1*, *DPB1* y *DQAI* presentan 25, 135, 65 y 15 alelos, respectivamente (Gu y Nei, 1999); 2) Su codominancia, que determina que un individuo heterocigoto exprese mayor número de moléculas *Mhc* que uno

homocigoto (Doherty y Zinkernagel, 1975; Hughes y Nei, 1998, 1989); 3) Su longevidad evolutiva (Ej. 55 Millones de años- Ma., para el *HLA-DRB1*), reflejada en su polimorfismo transespecífico, que implica que alelos *Mhc* de especies distintas puedan ser más similares entre sí, que aquellos de una misma especie, manteniéndose en éstas excediendo el tiempo de coalescencia de genes neutrales y trascendiendo procesos de especiación (Klein *et al.* 1998); y 4) el reconocimiento de los procesos selectivos asociados principalmente a su capacidad para generar respuestas inmunes, que permiten inferir el grado de variabilidad genética nuclear funcional y relacionarla a la historia natural y capacidad de generar respuestas inmunes de las especies (O'Brien y Evermann, 1988; Edwards y Hedrick, 1998).

De tal perspectiva derivó el presente estudio, que se desarrollo en dos fases, la primera de las cuales consistió en describir y reconocer la funcionalidad de las primeras secuencias de genes histocompatibles aisladas de un focénido (Capítulo I, también Munguía-Vega *et al.* 2001), y a la que siguió una segunda fase que consistió en aplicar metodologías electroforéticas de detección de mutaciones para determinar el polimorfismo de dichas secuencias histocompatibles en la especie, y finalmente utilizar tal información para alimentar modelos retrospectivos con los cuales se simuló la historia demográfica de *P. sinus* acorde a distintos escenarios definidos por el número efectivo poblacional que permitieran explicar el polimorfismo actual observado (Capítulo II).

En concordancia se busco dar respuesta a las siguientes interrogantes: 1) ¿Presenta esta especie secuencias de ADN correspondientes a genes histocompatibles que codifican proteínas capaces de generar respuestas inmunes?; 2) ¿Dichas secuencias muestran evidencias de estar sujetas a la selección natural?; 3) ¿Cual es el polimorfismo histocompatible en la especie?; 4)¿En que grado, los procesos históricos y la reciente captura incidental han determinado la perdida del polimorfismo adaptativo de *P. sinus* ?; 5) ¿Sufre esta especie de depresión por endogamia?; 6) ¿Cómo se relacionan sus niveles de variación genética con su viabilidad y riesgo de extinción en el futuro?

CAPITULO I

CLONACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y FILOGENIA MOLECULAR DE SECUENCIAS DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE LA VAQUITA *Phocoena sinus*

I.1. Introducción al Complejo Principal de Histocompatibilidad

En los vertebrados, el Complejo principal de histocompatibilidad (*Mhc* por *Major Histocompatibility Complex*) es una familia de genes numerosa y particularmente polimórfica que codifica proteínas involucradas en reconocer moléculas (polipéptidos) propias y extrañas, y en generar respuestas inmunes contra éstas últimas (Edwards y Hedrick, 1998). Secuenciado recientemente en su totalidad, la región del *Mhc* humano (*HLA* por *Human Leucocyte Antigen*) consiste de aproximadamente 4,000 kilobases de ADN localizadas en el brazo corto del cromosoma 6, donde se identificaron 224 genes de los cuales se predice que 128 son expresados y el resto constituyen pseudogenes (MHC Sequencing Consortium, 1999).

Las frecuencias alélicas y de heterocigosidad de los loci *Mhc* muestran desviaciones, respecto a los valores esperados bajo un esquema de evolución neutral, indicando la existencia de distintas fuerzas selectivas que estabilizan, o promueven la diversificación del polimorfismo del *Mhc* (Ohta, 1998), como son: 1) Sobre dominancia, cuando los individuos heterocigotos poseen mayor adecuación que los homocigotos, siendo este el factor más evidenciado (Hughes y Nei, 1988, 1989; Paterson, 1998; Slatkin, 2000); 2) Selección dependiente de la frecuencia, cuando surge un nuevo alelo en baja frecuencia y brinda mejor protección contra patógenos que aquellos alelos comunes, contra los que los patógenos pudieran haber desarrollado resistencia (Bodmer, 1972); 3) Presión patogénica diversificadora, dada las diferencias en la eficiencia de distintos alelos *Mhc* para generar respuestas inmunes contra varios patógenos como los causantes de la malaria, la hepatitis y el VIH, entre otros (Briles *et al.* 1977; Xu *et al.* 1993; Hill *et al.* 1991; Klein y O’Huigin,

1997; Thurz *et al.* 1997; Carrington *et al.* 1999); 4) Interacciones materno-fetales, que favorecen el desarrollo de fetos con alelos HLA distintos a los de la madre (Thomas *et al.* 1985); 5) Selección de Parentela (*Kin selection*), basada en el apareamiento selectivo entre individuos con alelos *Mhc* distintos, evitando la endogamia (Brown y Eklund, 1994).

Las proteínas histocompatibles se dividen en dos clases (I y II), y aunque presentan una estructura tridimensional similar (Fig. 3A), difieren en su función, organización y patrón de expresión. Ambas constan de una porción transmembranosa inserta en la membrana celular, dos dominios de tipo inmunoglobulina próximos a la membrana y dos dominios distales, que forman la Región de Unión del Péptido (PBR por *Peptide Binding Region*) (Hedrick, 1994). Tal región semeja un canal: presenta en su parte inferior ocho placas- β (que constituyen el fondo), sobre las que descansan lateralmente una hélice- α a cada lado, formando así un surco donde péptidos patogénicos y propios son capturados al interactuar con residuos específicos de la PBR (Fig. 3B) (Edwards y Hedrick, 1998).

La estructura de las moléculas Mhc-I y Mhc-II es producto de distintos procesos. Por ejemplo, en humanos cada gen *Mhc*-I consta de 8 exones con sus respectivos intrones (Fig. 4A). Existe una correspondencia directa exon-dominio: los dominios α_1 , α_2 y α_3 son codificados por los exones 2, 3 y 4, respectivamente; el exón 5 codifica la porción transmembranosa, mientras que los exones 6, 7 y 8 codifican la región citoplásmica (Hughes y Nei, 1988). Así, tres de los cuatro dominios extracelulares están formados por una cadena α . Los dominios distales α_1 y α_2 conforman la PBR, mientras que el dominio α_3 se une de manera no covalente con una β_2 -microglobulina codificada fuera del *Mhc* (Hughes *et al.* 1997), integrando los dos dominios proximales seguidos de un péptido conector, una región transmembranosa y una región citoplásmica (Kaufman *et al.* 1994).

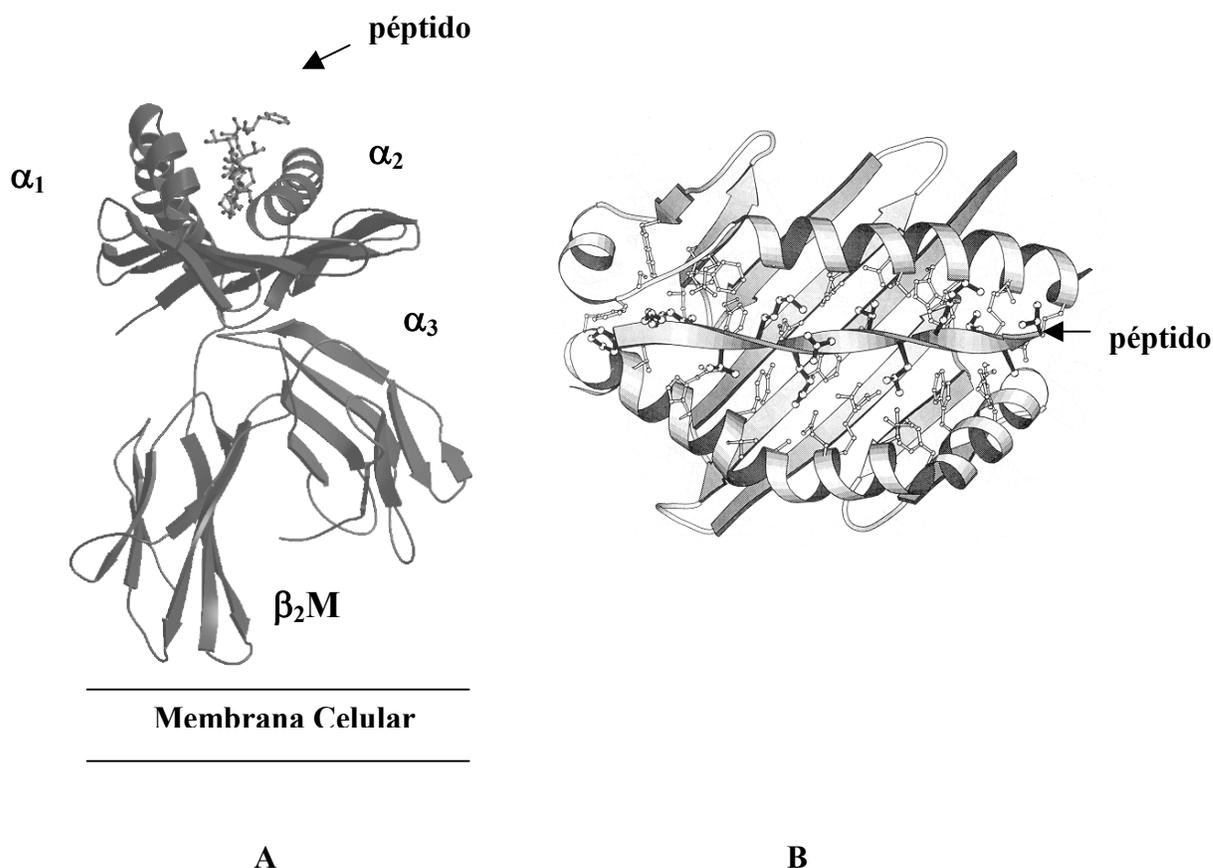


Figura 3. (A) Estructura tridimensional de una molécula Mhc Clase I mostrando los cuatro dominios extracelulares y la posición del péptido patogénico. (B) Región de unión del péptido (PBR) vista desde arriba, mostrando la interacción entre las cadenas laterales del péptido (en negro) y las de la molécula HLA-DR1 (en blanco) (tomado de Stern *et al.* 1994).

Comparativamente, las moléculas *Mhc*-II constan de una cadena α y una β que constituyen dos dominios extracelulares cada una (α_1 , α_2 y β_1 , β_2 , respectivamente). La PBR en este caso está formada por los dominios distales α_1 y β_1 , donde cada uno aporta una hélice- α y aproximadamente la mitad de las placas- β . Los dominios α_2 y β_2 constituyen los dominios tipo inmunoglobulina próximos a la membrana, seguidos por un péptido conector, una región transmembranosa y una región citoplásmica más corta que la presente en clase I (Kaufman *et al.* 1994).

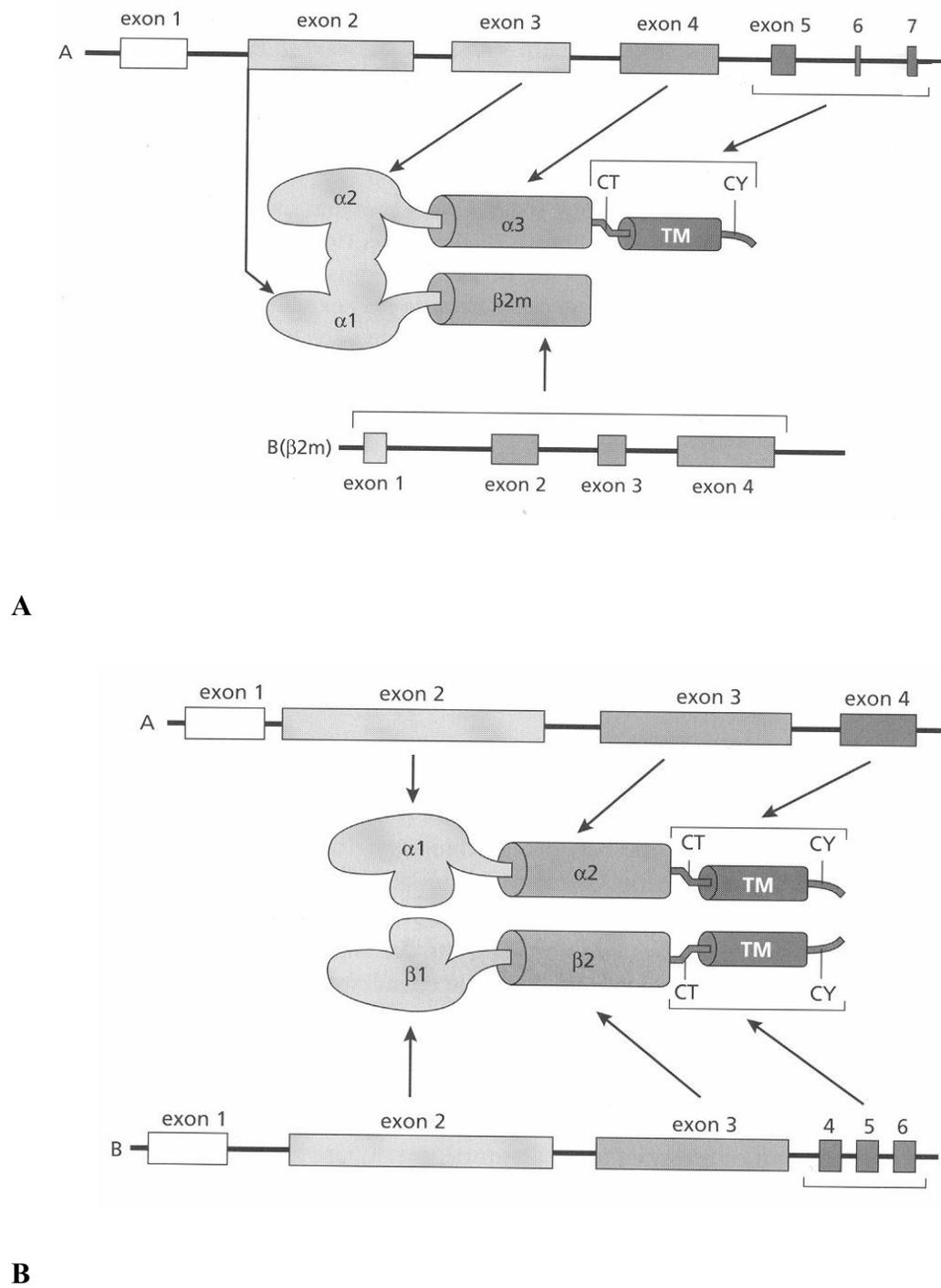


Figura 4. (A) Diagrama de la estructura y organización de exones e intrones del *Mhc* Clase I y **(B)** Clase II (Edwards *et al.* 2000).

En las moléculas Mhc clase II, las cadenas α y β son codificadas por genes distintos: los genes clase II están arreglados en varias regiones cromosómicas del *Mhc* (siendo las más importantes las denominadas *DR*, *DQ* y *DP*) cada una de las cuales contienen al menos un gen para las cadenas α y uno o más genes para las cadenas β . Los genes que codifican las cadenas α se designan “A” (Ej. *DRA*), mientras que aquellos que codifican las β cadenas se denominan “B” (Ej. *DQB*). En estos genes también existe correspondencia exón-dominio: el exón 2 de los genes A y B codifican respectivamente los dominios α_1 y β_1 , el exón 3 los dominios α_2 y β_2 , mientras que el resto de los exones (4, 5 y 6) codifican las regiones transmembranasas y citoplásmicas (Fig. 4B) (Edwards *et al.* 2000). En general, las cadenas β (y en correspondencia los genes B) del *Mhc*-II son mucho más polimórficas que las α (Hughes *et al.* 1997) y concentran más residuos que interactúan con el péptido o con el receptor de las células T (Brown *et al.*, 1993 y Stern *et al.* 1994). En humanos, la región *DR* contiene cuatro loci B polimórficos funcionales (*DRB1*, *DRB3*, *DRB4* y *DRB5*) y entre uno y tres de éstos se presentan en un haplotipo individual. Las regiones *DQ* y *DP* contienen un solo locus B funcional (*DQB1* y *DPB1*, respectivamente) (Hughes *et al.* 1997), aunque en otras especies de cetartiodáctilos como el ciervo rojo *Cervus elaphus* (Swarbrick y Crawford, 1997) y la ballena franca *Eubalena gracialis* (Murray y White, 1998) se ha documentado la presencia de dos loci *DQB* (*DQB1* y *DQB2*).

Las moléculas Mhc-I se expresan en la superficie de toda célula nucleada. Capturan péptidos de 9 a 12 residuos, que resultan de la degradación al interior de la célula de proteínas propias así como aquellas extrañas o anormales. Tales péptidos derivan de la acción multicatalítica de proteosomas y son transportados por moléculas transportadoras TAP (por *Transporters for Antigen Presentation*) al retículo endoplásmico, en donde son capturados por las cadenas α_1 y α_2 (PBR). A este complejo Mhc-I/péptido se une una chaperonina llamada calnexina (o gp 88), y la β_2 -microglobulina. La calnexina se disocia y el complejo resultante se transporta a través del aparato de Golgi a la superficie celular por una vía “exocítica” (Kaufman *et al.* 1994). En la superficie celular, el complejo *Mhc*-I/péptido es mostrado a las células citotóxicas T (específicamente al receptor TcR, *T cell*

Receptor y co-receptor CD8), de las que alguna clona particular reconocerá tal combinación *Mhc-I*/péptido y reaccionará atacando a la célula infectada o maligna para destruirla, expeliendo gránulos líticos que causan la apoptosis y lisis de la célula que contenía proteínas virales o anormales (Kaufman *et al.* 1994). En contraste, las moléculas *Mhc-II* tienen una distribución bastante más restringida. Su expresión se limita a macrófagos, células B y células dendríticas, que se conocen como células presentadoras de antígenos (APC por *Antigen Presenting Cells*). Estas engolfan partículas extrañas que provienen del exterior de la célula (péptidos exógenos) como péptidos bacterianos o de parásitos extracelulares (Grey *et al.* 1989). Dentro de éstas células tales materiales son degradados por proteasas en compartimentos específicos como lisosomas y endosomas. En el retículo endoplásmico las moléculas *Mhc-II* se unen a otra molécula (llamada “cadena invariante” o *Ii*), la que impide la unión de péptidos y dirige el complejo *Mhc-II/Ii* del aparato de Golgi a los lisosomas y endosomas, donde se proteoliza a la cadena invariante, permitiendo que la PBR capture péptidos antigénicos de 19 a 24 residuos (Kaufman *et al.* 1994). Los complejos *Mhc-II*/péptido son expuestos en superficie celular, donde interactúan con los receptores TcR y co-receptores CD4 de una clona específica de las células T cooperadoras, promoviendo en la misma la exocitosis de citocinas e interleucinas que estimulan a los macrófagos, así como a las células B en la producción y liberación de anticuerpos específicos para contrarrestar la infección (Hughes *et al.* 1997).

El polimorfismo de los genes *Mhc* en la mayoría de vertebrados y su importancia inmune han ocasionado un gran interés por conocer los procesos que han moldeado su polimorfismo y su poder como marcadores moleculares en genética de poblaciones y estudios de conservación (Klein *et al.* 1993; Yuhki y O’Brien, 1990). Al respecto, la evolución, dinámica poblacional y adaptación de los cetáceos los convierten en un grupo interesante para estudiar cómo las fuerzas selectivas han moldeado el polimorfismo del *Mhc* en el medio marino (Slade, 1992; Flores-Ramírez *et al.* 2000).

Los primeros estudios respecto al polimorfismo del *Mhc* en mamíferos marinos reportaron niveles reducidos de polimorfismos de restricción (RFLP’s) en la ballena de

aleta (*Balaenoptera physalus*), en la ballena de Sei (*B. borealis*), y en el elefante marino del Sur (*Mirounga leonina*), presumiblemente debido a la menor presión parasitaria y probabilidad de contagio en el medio marino en comparación con sus contrapartes terrestres (Trowsdale *et al.* 1989; Slade, 1992). Sin embargo, estudios recientes basados en secuenciación automática han revelado la presencia de un polimorfismo moderado en genes *Mhc-II* (*DQB* y *DRB*) de la beluga (*Delphinapterus leucas*), el narval (*Monodon monoceros*) y cuatro especies de pinnípedos (*Mirounga leonina*, *M. angustirostris*, *Arctocephalus gazella*, *A. fosteri*), así como en genes *Mhc-I* de la ballena gris (*Eschrichtius robustus*) y el tursiÓN (*Tursiops truncatus*) (Murray *et al.* 1995; Shirai *et al.* 1998; Murray y White, 1998; Hoelzel *et al.* 1999; Flores-Ramirez *et al.* 2000; Flores-Ramírez *et al.* 2001). En estos estudios, frecuentes sustituciones no sinónimas en sitios de la molécula implicados en la unión de péptidos indican que el polimorfismo es mantenido por selección natural.

La historia natural de *P. sinus* presenta características únicas que determinan que la especie sea un modelo muy interesante de estudio para explorar como la interacción de factores determinísticos (Ej. selección natural) y estocásticos (Ej. deriva genética), aunados a la endogamia, determinan la evolución de familias de genes y el mantenimiento de polimorfismo neutral y funcional en una población pequeña y aislada; y también su impacto en la adecuación y viabilidad de especies de cetáceos en peligro de extinción en el mundo (Barlow, 1986; IUCN, 2002).

Este cetáceo endémico del Alto Golfo de California, presenta una única población que apenas cuenta con unos 600 individuos (Jaramillo-Legorreta *et al.* 1999). Es la única especie perteneciente a la familia Phocoenidae que presenta distribución subtropical y se plantea que su población constituye un relictos de una especie ancestral austral (relacionada con *P. spinipinnis* de la costa pacífica sudamericana) que habría cruzado el ecuador hacia el Norte durante alguno de los periodos glaciales del Pleistoceno (1.8 Millones de años o Ma.). Esto habría determinado que la misma quedara atrapada en el Golfo de California cuando la temperatura aumentó, evolucionando probablemente a partir de un efecto fundador (Norris y McFarland, 1958). La ausencia de polimorfismo en la región control

mitocondrial (Rosel y Rojas-Bracho, 1999), ha sido explicada como una consecuencia de su historia genética y rareza histórica (Taylor y Rojas Bracho, 1999).

Lo expuesto aunado a su dieta variada que puede aportar patógenos diversos (Pauly *et al.* 1998); y el que el polimorfismo génico y del *Mhc* se relacione con la adecuación (Coltman *et al.* 1998; Patterson *et al.* 1998), motivó a elucidar el polimorfismo del *Mhc* en vistas de obtener información útil para inferir la historia evolutiva y viabilidad de *P. sinus*. De acuerdo a lo anterior, se presenta el reporte de la caracterización molecular de secuencias histocompatibles correspondientes a los segundos exones del *Mhc-I* y del locus *DQB* del *Mhc-II* aisladas de una marsopa verdadera (Cetácea: Phocoenidae).

I.2. Hipótesis

Al respecto, en primera instancia se planteó la hipótesis de si las secuencias *Mhc* I y II (*DQB*) de *P. sinus* codificaban para moléculas funcionales que mostraran evidencias de estar sujetas a la selección natural, entonces podrían ser utilizadas en un estudio para estimar su polimorfismo en el contexto de la vulnerabilidad de la especie.

I.3. Objetivos

Particular: Aislar y caracterizar secuencias del Complejo Principal de Histocoampatibilidad clase I y II de *P. sinus*.

Específicos:

- Aislar y caracterizar el segundo exón del *Mhc* clase I.
- Aislar y caracterizar el segundo exón del locus *DQB* del *Mhc* clase II.
- Comprobar la funcionalidad de tales secuencias con base a análisis comparativos de homología y patrones de sustitución nucleotídica.
- Comprobar la genealogía de tales secuencias con base a la reconstrucción de su filogenia.

I.4. Métodos

A partir de tres individuos capturados incidentalmente en redes de pesca (No. 23, 24 y 25 del Anexo 2, respectivamente) y que se obtuvieron de la colección de mamíferos marinos del Museo de Historia Natural de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (Curador Dr. Jorge Urbán Ramírez), se aisló ADN total mediante un protocolo estándar de digestión con proteinasa K, extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol como se describe en Rosel *et al.* (1995). EL ADN obtenido se utilizó para amplificar, clonar y secuenciar el segundo exón del *Mhc* clase I, que codifica el dominio α_1 y que constituye aproximadamente la mitad de la PBR. La amplificación del exón referido se llevó a cabo vía la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con los primers 339 (5'TACGTGGMCGACACGSAGTTC) y 340 (5'CTCGCTCTGGTTGTAGTAGCS) (Flores-Ramírez *et al.* 2000), diseñados con base al alineamiento de consenso de regiones conservadas de secuencias clase I reportadas de carnívoros y artiodáctilos, los cuales amplifican 147 pb de secuencias clase I, que constituyen 54.4% del dominio α_1 y no son locus-específicos. Las condiciones de PCR fueron: 10mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada deoxinucleótido (dNTP), 0.2 μ M de cada primer, 1 unidad de Taq DNA polimerasa y 50-100 ng de ADN template en un volumen final de 50 μ l. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PCR System modelo 9700, comprendiendo 30 ciclos de: 94°C 1 min, 47°C 1 min, y 72°C 2 min. Los productos de PCR fueron clonados empleando el TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Co.) siguiendo las especificaciones del proveedor y transformados en células super competentes *E. coli* TOP10F incluídas en el Kit. La detección de colonias de *E. coli* recombinates conteniendo plásmidos con inserto se efectuó en placas de agar LB, ampicilina (100 μ g/ml), y X-gal (100mM). La presencia del inserto de interés se verificó reamplificado su secuencia con el juego de primers descritos. Para ello, se tomo una pequeña muestra de las colonias con inserción positiva (blancas), picándolas con la punta de un palillo de dientes de madera estéril, que se "enjuagó" ligeramente, sumergiéndolo una sola vez en 10 μ l de agua destilada estéril contenida en un tubo de PCR de 0.2 μ l, para acto seguido introducir el palillo en

tubos de ensaye rotulados, conteniendo 1.5 ml de medio LB líquido y ampicilina (100 µg/ml) con el objetivo de preservar la colonia en cultivo en el caso de que ésta presentara el fragmento deseado. Los tubos de PCR que contenían los 10µl de agua y las células recombinantes eran sometidos a un protocolo de lisis en el termociclador (65°C 5 min, 96 °C 2 min, 65 °C 4 min, 96 °C 1 min, 65 °C 1 min y 96 °C 30 seg), a cuyo término, se utilizó el volumen de 10µl para reamplificar del fragmento bajo las condiciones ya descritas. Los productos de esta reacción se visualizaron en geles de agarosa al 1.5% para verificar cuáles colonias presentaban una amplificación positiva del tamaño esperado.

Previo a la reacción de secuenciación, los productos eran purificados empleando el GeneClean Kit (Bio 101) siguiendo las especificaciones del proveedor, mientras que la cantidad de ADN presente en cada muestra era determinada corriendo un volumen conocido de las mismas (5 µl) en geles de agarosa al 1.5% junto con un marcador estándar de masa molecular en el rango 20-100 ng (Molecular Mass Ruler, Biorad). Con base a ello, se eligieron al azar 15 clonas distintas correspondientes de cada uno de los 3 individuos de *P. sinus* (45 clonas totales). Estas fueron secuenciadas en ambos sentidos (Derecho y Reverso) empleando un secuenciador automático capilar ABI PRISM 310 (CIBNOR, S.C., La Paz, B.C.S.). Cada par de secuencias Derecha y Reversa fue alineada en consenso empleando el programa MegAlign (Lasergene, DNASTAR, Inc.), y cuidadosamente comparadas a ojo con el cromatograma que muestra los datos en crudo utilizando el programa Chromas Versión 1.45. Las secuencias que así lo requirieron fueron editadas con el programa EditSeq (Lasergene, DNASTAR, Inc.).

El ADN obtenido de los tres individuos de *P. sinus* descritos también se usó para amplificar el segundo exón del locus *Mhc* clase II locus *DQB*, con los primers genéricos *DQBF* (5' CTGGTAGTTGTGTCTGCACAC) y *DQBR* (5' CATGTGCTACTTCACCAACGG) (Tang *et al.* 2000), amplificando 171 pb, que constituyen 63.3% del dominio β₁. Las condiciones de amplificación fueron iguales a las descritas, pero usando MgCl₂ 2mM y temperatura de afianzamiento de 55° C.

Los productos fueron clonados y reamplificados como ya se describió y siete clonas distintas elegidas al azar de cada uno de los tres individuos ($7 \times 3 = 21$ clonas totales) fueron secuenciadas en ambos sentidos empleando el servicio de secuenciación de la Universidad de Yale (W.M. Keck Facility, 301 BCMM, 295 Congress Avenue, New Haven, CT 06519-1418, USA).

La naturaleza histocompatible de las secuencias aisladas se verificó con base a un análisis de homología, que consistió en comparar sus homología sitio a sitio, respecto al resto de secuencias depositadas en GenBank (Octubre, 2002) mediante búsquedas *BlastN* (Secuencia Nucleotídica), en el sitio del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Además, para verificar el mismo patrón de evolución de las secuencias se condujeron comparaciones pareadas entre secuencias para calcular los valores promedio de sustituciones no sinónimas (dN) y sinónimas (dS) por sitio, utilizando el software MEGA Ver. 2.1 (Kumar *et al.* 2001). Los valores promedio fueron después comparados con una prueba t-Student.

Para reconocer los patrones de diversificación evolutiva de las secuencias aisladas (Ej. confirmar la existencia de alelos que han trascendido eventos de especiación), se reconstruyó la historia evolutiva de las secuencias clase I y II de *P. sinus* con base a sus relaciones filogenéticas con secuencias representativas de mamíferos depositadas en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las secuencias fueron previamente alineadas utilizando el programa MegAlign y exportadas a una plataforma Macintosh donde se empleó el programa Model-Test (Posada y Crandall, 1998), para determinar los parámetros de un modelo de mutación de máxima verosimilitud, con los que se alimentó el software PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002) para reconstruir la filogenia de las secuencias acorde al método de optimización de Máxima Verosimilitud (Felsenstein, 1981), empleando una búsqueda heurística mediante el algoritmo TBR (*Tree Bisection Reconnection*). La robustez de los árboles generados se evaluó estadísticamente con base a un análisis de Bootstrap (con 1000 réplicas) contenido en PAUP.

I.5 Resultados

Un total de 7 secuencias únicas de nucleótidos del exón 2 *Mhc-I* (*Phsi-01* a *07*, Números de Acceso GenBank AY170890 a 96) fueron aisladas al analizar 15 clonas de cada uno de tres individuos distintos de *Phocoena sinus* (Fig. 5).

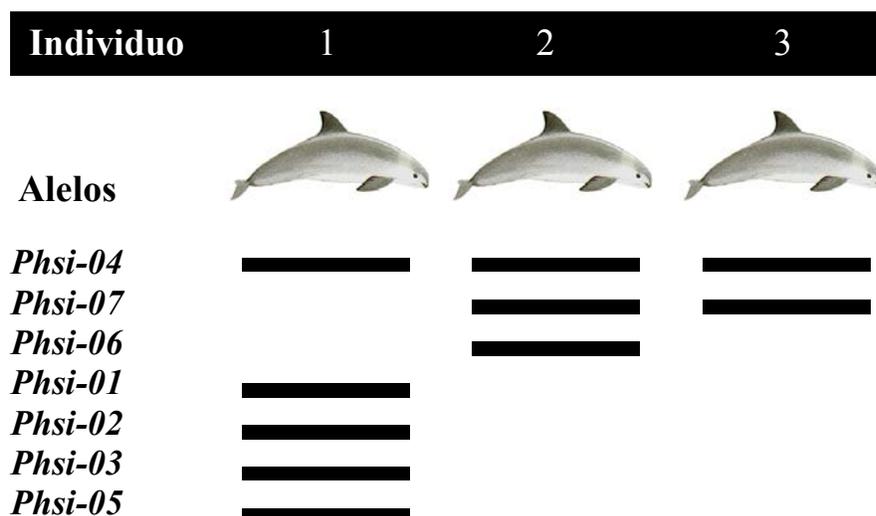


Figura 5. Distribución y frecuencia de las secuencias del segundo exón del *Mhc* clase I en los 3 individuos de *P. sinus* analizados (Individuos 1, 2 y 3= No. 25, 23 y 24 del Anexo 2, respectivamente).

De uno de los individuos se aislaron cinco secuencias *Mhc-I*, mientras que en el resto de los individuos se presentaron solo tres y dos secuencias clase I, respectivamente. La secuencia (*Phsi-04*) estuvo presente en los tres individuos, mientras que la secuencia *Phsi-07* se presentó en dos de ellos. La naturaleza histocompatible de las secuencias referidas se verificó de acuerdo a su grado de homología (establecido utilizando la herramienta bioinformática *BlastN*) con distintas secuencias histocompatibles clase I depositadas en GenBank (Octubre, 2002) del sitio NCBI. Las secuencias referidas mostraron alta homología con secuencias *Mhc-I*, exón 2 aisladas del rinoceronte (*Diceros bicornis*, 89-91%), ganado bovino (*Bos taurus*, 89-91%) y gato (*Felis catus*, 88-90%), así

como secuencias de perro (*Canis familiaris*), leopardo (*Leopardus pardalis*), cerdo (*Sus scrofa*), ballena gris (*Esrichtius robustus*) y caballo (*Equinus caballus*) (Tabla 1)

Tabla 1. Secuencias histocompatibles clase I homólogas a las secuencias *Mhc-I* exón 2 de *P. sinus* (*Phsi-01 a 07*), de acuerdo a la búsqueda en la base de datos GenBank (Octubre, 2002). Se muestran las identidades y el porcentaje de homología.

Especie	<i>Phsi-01</i>	<i>Phsi-02</i>	<i>Phsi-03</i>	<i>Phsi-04</i>	<i>Phsi-05</i>	<i>Phsi-06</i>	<i>Phsi-07</i>
<i>Diceros bicornis</i>	133/146 (91%)	131/146 (89%)	131/147 (89%)	134/147 (91%)	131/146 (89%)	134/147 (91%)	135/147 (91%)
<i>Bos taurus</i>	132/146 (90%)	130/146 (89%)	135/147 (91%)	133/147 (90%)	130/146 (89%)	125/139 (89%)	134/147 (91%)
<i>Felis catus</i>	126/140 (90%)	124/140 (88%)	127/140 (90%)	126/140 (90%)	124/140 (88%)	125/139 (89%)	127/140 (90%)
<i>Canis familiaris</i>	129/146 (88%)	127/146 (86%)	128/147 (87%)	130/147 (88%)	127/146 (86%)	119/135 (88%)	131/147 (89%)
<i>Leopardus pardalis</i>	124/140 (88%)	122/140 (87%)	123/140 (87%)	124/140 (88%)	122/140 (87%)	123/139 (88%)	125/140 (89%)
<i>Sus crofa</i>	128/146 (87%)	126/146 (86%)	128/147 (87%)	129/147 (87%)	123/142 (86%)	121/139 (87%)	130/147 (88%)
<i>Eschrichtius robustus</i>	128/146 (87%)	126/146 (86%)	130/147 (88%)	129/147 (87%)	126/146 (86%)	122/139 (87%)	130/147 (88%)
<i>Equinus caballus</i>	128/146 (87%)	126/146 (86%)	129/147 (87%)	129/147 (87%)	126/146 (86%)	121/139 (87%)	130/147 (88%)

Todas las secuencias *Mhc-I* exón 2 de aisladas de *P. sinus* mostraron marcos de lectura abiertos continuos. Un total de 16 sustituciones de nucleótidos se encontraron distribuidas en 13 posiciones variables. 11 de las sustituciones fueron no sinónimas y sólo 5 sinónimas. Tres de éstas sustituciones ocurrieron en la primera posición del codón, cinco en la segunda y ocho en la tercera. Al comparar las siete secuencias en forma pareada y

Al comparar las secuencias *Mhc-I* de *P. sinus* con la estructura cristalográfica de las moléculas clase I del HLA (Bjorkman *et al.* 1987a; Bjorkman *et al.* 1987b; Bjorkman y Parham, 1990), se observa que 4 de las 6 sustituciones de aminoácidos ocurren en residuos que han sido propuestos que contactan directamente con el péptido antigénico (posiciones 58, 70, 73 y 80 en la Tabla 2), y una más en un sitio adyacente (posición 69). Al respecto, un análisis de los cambios en polaridad, carga y tamaño de las seis sustituciones de residuos observadas (Tabla 3) mostró que todas, excepto la posición 73, son no conservativas e involucran un cambio en las propiedades fisicoquímicas del aminoácido.

Tabla 3. Sustituciones de aminoácidos observadas entre las secuencias clase I de *P. sinus* y algunas de sus propiedades fisicoquímicas como polaridad, carga y tamaño. PM = Peso Molecular. Posiciones como en la Tabla 1.

Posición	aa	Propiedades	aa	Propiedades
54	Gln	Polar sin carga PM= 146	Val	No polar, hidrofóbico PM = 117
58	Glu	Polar con carga negativa, ácido PM = 147	Val	No polar, hidrofóbico PM = 117
69	Glu	Polar con carga negativa, ácido PM = 147	Ala	No polar, hidrofóbico PM = 89
70	Asp	Polar sin carga PM = 132	Ala	No polar, hidrofóbico PM = 89
73	Phe	No polar, hidrofóbico PM = 165	Leu	No polar, hidrofóbico PM = 131
80	Thr	No polar, hidrofóbico PM = 119	Lys	Polar con carga positiva, básico PM = 146

Por otra parte, respecto al *Mhc* clase II en la vaquita, una única secuencia *Mhc Phsi-DQB*01* (Número de Acceso GenBank AY170897) se encontró al analizar siete clonas provenientes de cada uno de tres individuos distintos. La comparación con las secuencias depositadas en el GenBank mostró homología cercana con secuencias alélicas *DQB* de

otros cetáceos como la beluga y el narval (91-92%) (Tabla 4), así como con alelos del locus clase II *DRB* de beluga y algunos primates como el lemur.

Tabla 4. Resultados de la comparación de la secuencia *DQB* de *P. sinus* con la base de datos del GenBank (Octubre 2002). Se muestran las identidades y el porcentaje de homología.

Especie	Locus	Alelo	% Homología
<i>Delphinapterus leucas</i>	<i>DQβ</i>	<i>Dele-DQβ*0202</i>	92 % (159/171)
<i>Monodon monoceros</i>	<i>DQβ</i>	<i>Momo-DQβ*0201</i>	92 % (159/171)
<i>Delphinapterus leucas</i>	<i>DQβ</i>	<i>Dele-DQβ*0102</i>	91 % (157/171)
<i>Delphinapterus leucas</i>	<i>DQβ</i>	<i>Dele-DQβ*0101</i>	91 % (157/171)
<i>Microcebus myoxinus</i>	<i>DRβ</i>	<i>Mimy-DRβ*Wa03</i>	92 % (157/169)
<i>Microcebus myoxinus</i>	<i>DRβ</i>	<i>Mimy-DRβ*Wa04</i>	92 % (156/169)
<i>Eulemur fulvus albifrons</i>	<i>DRβ</i>	<i>Eufi-DRβ*Wa01</i>	92 % (156/169)
<i>Lemur catta</i>	<i>DRβ</i>	<i>Leca-DRβ*Wa02</i>	92 % (156/169)
<i>Delphinapterus leucas</i>	<i>DRβ</i>	<i>Dele-DRβ*0402</i>	92 % (155/168)
<i>Cheirogaleus medius</i>	<i>DRβ</i>	<i>Chme-DRβ*Wa02</i>	91 % (155/169)
<i>Microcebus rufus</i>	<i>DRβ</i>	<i>Miru-DRβ*Wc04</i>	91 % (155/169)
<i>Delphinapterus leucas</i>	<i>DQβ</i>	<i>Dele-DQβ*0201</i>	92 % (154/167)

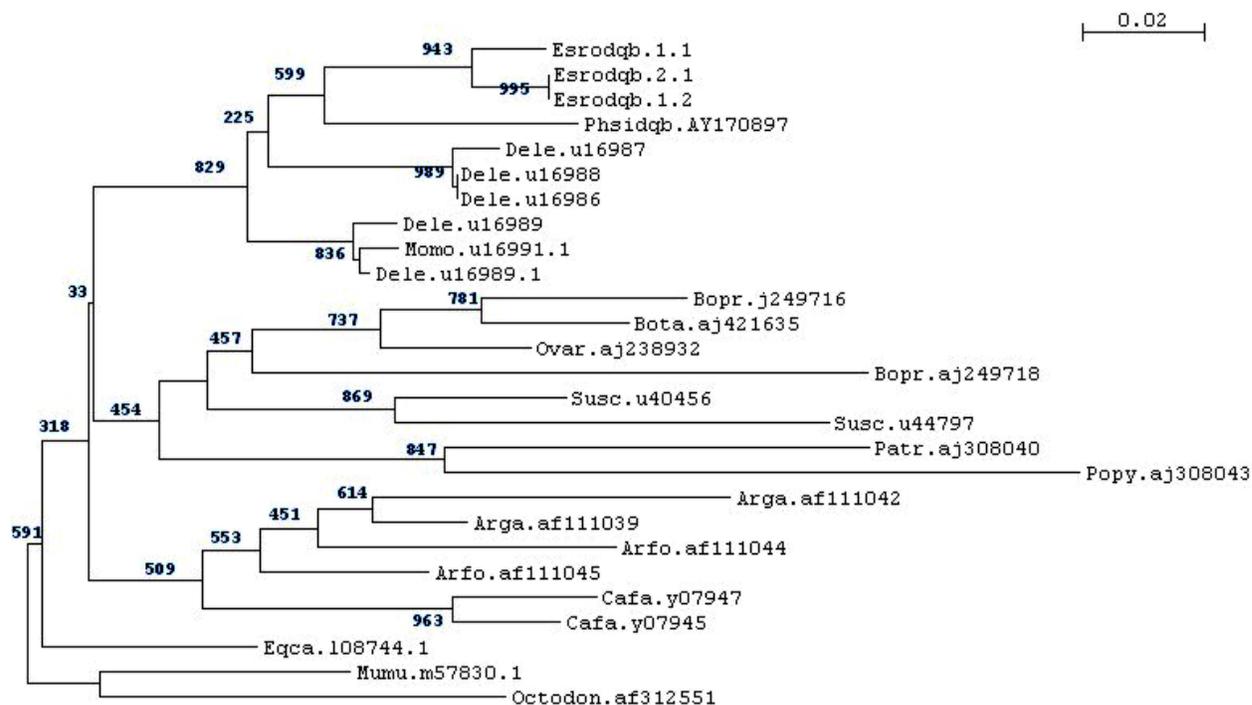
La secuencia contiene un marco de lectura abierto que en su traducción codifica para una cadena ininterrumpida y al parecer funcional de 57 aminoácidos correspondientes a las posiciones 21-77 del dominio β_1 del *Mhc-II* (Brown *et al.* 1993; Stern *et al.* 1994). En la Tabla 5 se muestra la secuencia de aminoácidos del alelo *Phsi-DQB*01*, comparada con secuencias similares aisladas de otras especies de cetáceos como la beluga y el narval (Murray *et al.* 1995), y la ballena gris (este estudio, datos sin publicar).

La comparación con otras especies de cetáceos muestra que la secuencia proteica del alelo *Phsi-DQB*01* difiere respecto a las otras especies en posiciones específicas que en varios casos coinciden con residuos polimórficos en los otros cetáceos, y que se considera

En cuanto a la secuencia *Phsi-DQB*01*, el filograma (Fig. 6B) muestra que la secuencia de *P. sinus* forma un linaje independiente y más relacionado con las secuencias de ballena gris (bootstrap 59.9%). Al respecto, las secuencias de beluga y narval parecen ancestrales respecto a las de *P. sinus* y ballena gris. Una longitud de rama considerable en *P. sinus* indica que un buen número de sustituciones de nucleótidos la separan del resto de las secuencias *DQB* de otros cetáceos, las cuales en conjunto son aparentemente divergentes de las secuencias correspondientes a dos grupos ancestrales con distinta profundidad evolutiva (Artiodáctilos y Creodontos).



A



B

Figura 6. Filogramas de máxima verosimilitud representando la filogenia de las secuencias del *Mhc-I* exón 2 (A) y *Mhc-II DQB* exón 2 (B) de *P. sinus* y otras especies. Los números sobre las ramas indican los valores de 1000 réplicas de bootstrap. Se emplearon secuencias del canguro rojo (*Macropus rufogriseus* Maru) y *Octodon* (Rodentia) como grupos fuera para definir la polaridad de cambio. Taxa: Phsi= *P. sinus*; Dola= *Tursiops truncatus*; Dele= *Delphinapterus leucas*; Momo= *Monodon monoceros*; Dibi= *Diceros bicornis*; Esro= *Eschrichtius robustus*; Feca= *Felis catus*; Eqca= *Equs caballus*; Ovar= *Ovis aries*; Bota= *Bos taurus*; Mumu= *Mus musculus*; Susc= *Sus scrofa*; Hosa= *Hommo*; Patr= *Pan troglodites*; Bopr= *Bos primigenius*; Bota= *Bos taurus*; Popy= *Pongo pygmaeus*; Cafa= *Cannis familiaris*; Phvi= *Phoca vitulina*; Arga= *Arctocephalus gazella*; Arfo= *A. Forsterii*; Lepa= *Leopardus pardalis*. Bovmhcib, Bovmhawa y Bovmhbkna= *Bos taurus*.

I.6 Discusión

A partir de tres individuos *P. sinus*, se aislaron y caracterizaron 7 secuencias únicas del segundo exón del *Mhc-I*, cuya alta homología (hasta del 91%) con secuencias similares depositadas en Genbank (Tabla 1) constituye una evidencia de su naturaleza histocompatible. Al respecto las secuencias descritas mostraron un mayor grado de homología con secuencias correspondientes al rinoceronte (*Diceros*), ganado bovino (*Bos*) y felinos (*Felis*), lo que es consistente con la divergencia común de los Cetardiodáctilos y los Carnívoros de los Ferungulados (Millinkovitch y Thewissen, 1997).

De los tres individuos referidos, se aislaron respectivamente, 5, 3 y 2 secuencias *Mhc-I Phsi* (Fig. 5). La presencia de 5 alelos en un solo individuo sugiere la presencia de al menos tres loci clase I en la especie, lo cual coincide con reportes previos que indican la presencia de tres loci clase I en la ballena gris (Flores-Ramírez *et al.* 2000), así como en los artiodáctilos (Ellis *et al.* 1999; Garber *et al.* 1993; Lunney, 1998), a los que se considera el grupo ancestral de los cetáceos (Milinkovitch y Thewissen, 1997).

Otra línea de evidencia que indica la naturaleza histocompatible y funcional de las secuencias *Mhc-I* aisladas de *P. sinus* la constituye su traducción polipeptídica que indica que las secuencias aisladas tienen marcos de lectura abiertos que codifican proteínas histocompatibles. Esto último, acorde al alineamiento de la traducción polipeptídica con secuencias histocompatibles funcionales descritas previamente en otras especies de cetáceos y el hombre (Tabla 2).

En la Tabla 2 se resumen características muy particulares que comparten tales secuencias, que las definen como histocompatibles. Por ejemplo, entre las secuencias de *P. sinus*, y de manera similar al patrón observado en la Tabla 2 para otras especies de cetáceos, las sustituciones de aminoácidos se concentran en posiciones que de acuerdo con la estructura tridimensional propuesta para el *HLA* clase I (Bjorkman y Parham, 1990), corresponden a posiciones de residuos implicados en la unión y captura de péptidos antigénicos (marcadas con un asterisco en la Tabla 2). El análisis de las sustituciones de aminoácidos observadas entre las secuencias clase I *P. sinus* mostró que además eran no

conservativas (Tabla 3). Estos resultados en conjunto coinciden con el patrón de variación típico de una molécula del *Mhc* (Hedrick, 1994), que ha sido explicado en función de una selección balanceadora que tiende a diversificar la PBR de estas moléculas en sitios importantes en la captura de péptidos antigénicos (Hedrick *et al.* 1991; Salamon *et al.* 1999). La selección estaría promoviendo además un cambio en las propiedades fisicoquímicas de éstos residuos determinadas principalmente por sus cadenas laterales (Tabla 3), lo cual podría tener una significancia funcional al permitir que los productos de estas secuencias histocompatibles tuvieran la capacidad de establecer un rango mayor y más variado de interacciones moleculares (fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals) que resultaran en una mayor capacidad para unir diversos péptidos patogénicos, y en consecuencia, desencadenar respuestas inmunes hacia un mayor número de patógenos (Garrett *et al.* 1989; Hughes *et al.* 1990; Falk *et al.* 1991). Estos resultados coinciden con el patrón observado en el *Mhc* de otros mamíferos y sugieren que el *Mhc* de la vaquita, al igual que el del tursiÓN y la ballena gris, ha estado sujeto a la presión de selección que representa la diversidad de patógenos, aunque en realidad dicha selección debiera ser muy reducida considerando la escasa variación observada entre las secuencias del segundo exÓN del *Mhc-I* de *P. sinus* (Tabla 2, Fig. 6A).

En otras secuencias histocompatibles (Hughes y Nei, 1988, 1989; Hughes *et al.* 1997), incluidas especies de mamíferos marinos (Murray *et al.* 1995; Murray y White, 1998; Hoelzel *et al.* 1999; Flores-Ramírez *et al.* 2000), un mayor número de sustituciones no sinónimas por sitio (dN) respecto al número de sustituciones sinónimas por sitio (dS) en los exones que constituyen la PBR, ha sido interpretado como evidencia de adaptación molecular e indicativo de selección natural positiva o Darwiniana que promueve la diversificación de la molécula (Hughes y Nei, 1988, 1989; Yang y Bielawski, 2000). Al respecto, aunque entre las secuencias del segundo exÓN clase I aisladas de *P. sinus* el número de sustituciones no sinónimas fue mayor al de sustituciones sinónimas (11 vs. 5, respectivamente), promediadas entre los sitios respectivos, el valor de dN fue significativamente menor que el de dS. Aunque la capacidad para detectar evidencias de

adaptación molecular entre las secuencias de *P. sinus* podría estar siendo influenciada por el reducido número de secuencias (n=7), así como por la escasa variación encontrada entre ellas, el ratio dN/dS= 0.5 observado entre las secuencias clase I de *P. sinus* también podría estar indicando la presencia de una selección negativa o purificadora que estaría estabilizando la PBR de las moléculas (Yang y Bielawski, 2000), en el caso, por ejemplo, de que la modificación de la PBR constituyera una desventaja si la especie se encontrara actualmente adaptada a pocos patógenos con los que ha estado en contacto desde hace tiempo.

El análisis de clonas del segundo exón del locus *DQB* de los mismos tres individuos de *P. sinus* descritos indicó la presencia de un solo alelo, denominado *Phsi-DQB*01*. Al respecto, en el análisis del locus *DQB* de la ballena franca *Eubalena gracialis* se encontró evidencia de un evento de duplicación en este locus (Murray y White, 1998). No obstante, el aislamiento de una única secuencia en *P. sinus*, indica la presencia de un sólo locus *DQB* en este focénido al igual que en otros odontocetos como la beluga y el narval (Monodóntidae) (Murray *et al.* 1995), por lo que el evento de duplicación en *E. gracialis* parece haber ocurrido en algún momento después de la divergencia entre odontocetos y mysticetos. La presencia de una sola secuencia también indica que los tres individuos analizados eran homocigotos para el alelo *Phsi-DQB*01*. Aunque esto podría ser indicativo de niveles reducidos de variabilidad en la especie en relación con la ausencia de variabilidad observada para la región control mitocondrial (Rosel y Rojas-Bracho, 1999), dicho panorama debió ser confirmado analizando un mayor número de ejemplares (Capítulo II):

Al igual que las moléculas clase I de *P. sinus*, la secuencia *Phsi DQB*01* mostró una alta homología (91-92%) con secuencias *Mhc* clase II similares aisladas de otros cetáceos, como los alelos *DQB* de la beluga y el narval, así como con alelos *DRB* de la beluga y especies de lemúr (Tabla 4). El análisis comparativo y funcional de esta secuencia mostró que presenta un marco de lectura abierto que codifica una proteína histocompatible,

acorde al alineamiento de la traducción polipeptídica con secuencias similares descritas previamente para otros cetáceos (Tabla 5).

Al respecto, en la Tabla 5 se observa que la secuencia proteica del alelo *Phsi DQB*01* difiere en residuos que son polimórficos en las otras secuencias de cetáceos, y que en el caso de beluga y ballena gris corresponden a posiciones que presentan variación intra específica, manteniendo alta homología con el resto de la secuencia de aminoácidos. Acorde al modelo cristalográfico propuesto por Brown *et al.* (1993) y Stern *et al.* (1994) para el *HLA* clase II, estos sitios corresponden también a sitios en que la molécula histocompatible interactúa con el péptido antigénico. Estas observaciones sugieren que el alelo *DQB* presente en *P. sinus* codifica para una molécula histocompatible de estructura y función similar a la de otras especies, y que las diferencias de aminoácidos que la definen pueden ser explicadas con base en su funcionalidad.

En este estudio, al igual que Flores-Ramírez *et al.* (2000) se seleccionaron y secuenciaron al azar clonas conteniendo insertos *Mhc-I*. Esto y el hecho de que existan al menos tres loci *Mhc-I* en la especie hace probable que las secuencias del segundo exón del *Mhc-I* encontradas (Fig. 5) probablemente no sean las únicas presentes en los individuos, lo que aunado a la incertidumbre del locus particular del cual proviene cada secuencia y al reducido tamaño de muestra analizado ($n= 3$), limita su interpretación en términos de los niveles de variabilidad presente a nivel poblacional en ambas especies.

Lo anterior justificó el intentar segregar a las secuencias clase-I en sus correspondientes linajes alélicos, tarea en la que el análisis filogenético de secuencias ha demostrado su utilidad (Ej. Vincek *et al.* 1997; Klein *et al.* 1993), y que adicionalmente proporciona un marco hipotético respecto a los procesos evolutivos que han experimentado las secuencias a lo largo de su historia.

Al respecto, el análisis filogenético de las secuencias del segundo exón de *Mhc* clase I de *P. sinus* (Figura 6A) mostró que a diferencia de secuencias similares de otras especies, las siete secuencias de *P. sinus* se agrupan juntas y no presentan el polimorfismo transespecífico característico del *Mhc* (Klein *et al.* 1998) y que también se ha reportado

para secuencias clase I de la ballena gris (Flores-Ramírez *et al.* 2000, y que se observa también en la Figura 6A), así como en secuencias *DQB* de cuatro especies de pinnípedos (Hoelzel *et al.* 1999). Esta observación, aunada a la gran similitud entre los alelos de *P. sinus* que se refleja en las cortas distancias observadas sobre el árbol comparadas con otras especies (Figura 6A), podría ser indicativo de un origen reciente del linaje alélico, que podría estar relacionado con un efecto fundador o un cuello de botella histórico en la historia evolutiva de la especie (Norris y McFarland, 1958; Rosel y Rojas-Bracho, 1999; Taylor y Rojas-Bracho, 1999), siendo coincidente con la ausencia de evolución transespecífica que muestran los linajes que han sufrido cuellos de botella poblacionales o tamaños efectivos reducidos a lo largo de su historia evolutiva (Ej. Clark, 1997).

El análisis filogenético de la secuencia *Phsi-DQB*01* mostró que ésta constituye un linaje independiente que a juzgar por la longitud de su rama en el árbol (Fig. 6B) ha divergido desde tiempos antiguos respecto a las secuencias de otras especies como la ballena gris, o secuencias de la beluga y el narval (Fig. 6B). Aunque la información filogenética que brinda un único alelo *DQB* en *P. sinus* es muy limitada, indudablemente éste corresponde a un linaje relacionado con alelos *DQB* de otras especies de cetáceos, y que muestra una divergencia que podría ser funcional.

En resumen, el análisis de homología, traducción y comparación con secuencias similares indica que las secuencias aisladas del segundo exón del *Mhc-I* y del locus *DQB* clase II de *P. sinus* codifican para moléculas histocompatibles funcionales, similares a las presentes en otras especies, y que muestran evidencias de estar sujetas a una selección relacionada con su función.

Capítulo II

POLIMORFISMO DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD E HISTORIA DEMOGRÁFICA DE LA VAQUITA *Phocoena sinus*

II.1. Introducción

II.1.1. La Pérdida de Variabilidad Genética en Poblaciones Pequeñas

En una población pequeña, dos procesos (endogamia y deriva genética) son responsables de un deterioro de la diversidad genética, el cual se refleja en una disminución en la proporción de individuos heterocigotos y en el número de alelos presentes (y sus frecuencias) en una población (O'Brien, 1994; Amos y Balmford, 2001).

En una población pequeña, aislada y de distribución restringida como la de *P. sinus* es muy probable que la reproducción entre consanguíneos (endogamia) sea una práctica frecuente y aún inevitable, aunque los apareamientos se realicen aleatoriamente entre los individuos remanentes. La endogamia es comúnmente definida por F (coeficiente de endogamia), el cual define la probabilidad de que dos genes homólogos en un individuo sean idénticos por descendencia con base en su pedigrí (Keller y Waller, 2002). La endogamia también puede referirse al grado de parentesco en una pareja reproductiva respecto a una pareja elegida al azar en la población, en cuyo caso se mide por F_{is} o la desviación de la heterocigosidad observada (H_o) en un individuo respecto al valor esperado (H_e) bajo un esquema de reproducción aleatoria (en equilibrio de Hardy Weinberg).

$$F_{is} = 1 - \frac{H_o}{H_e}$$

Ecuación (1)

Promediada en la población (F_{it}), sus valores equivalen a la endogamia por pedigrí (F) (Keller y Waller, 2002).

La endogamia por sí sola no cambia las frecuencias alélicas en una población (Hedrick, 2000), sin embargo produce un aumento en la proporción de homocigotos con la consecuente disminución de heterocigotos. Tal aumento en la homocigosidad debido a la endogamia puede causar una depresión en la adecuación de los organismos o depresión endogámica. Dos hipótesis han explicado las causas genéticas de la depresión por endogamia: la hipótesis de dominancia sugiere un incremento en la expresión de alelos recesivos, mientras que la hipótesis de sobredominancia propone una disminución en la expresión de alelos sobredominantes que confieren una ventaja adaptativa (Charlesworth y Charlesworth, 1999). La depresión endogámica comúnmente es medida comparando algún componente de la adecuación (viabilidad, fecundidad, fertilidad, éxito reproductivo, crecimiento, sobrevivencia o susceptibilidad a estrés ambiental) en individuos endogámicos ($F > 0$) y no-endogámicos con reproducción aleatoria ($F = 0$). Para estimar los valores de F , comúnmente se emplean análisis de pedigrí, análisis genéticos empleando marcadores moleculares o bien, cuando es posible, reproducción experimental dirigida (Keller y Waller, 2002).

La depresión por endogamia ha sido ampliamente documentada en numerosos estudios en especies de plantas y animales domésticos y de laboratorio, así como en poblaciones silvestres y en cautiverio (Falconer y Mackay, 1996; Hedrick y Kalinowski, 2000; Keller y Waller, 2002). Por ejemplo, durante los crudos inviernos en la isla Mandarte al Oeste de Canadá, los individuos endogámicos del gorrión *Melospiza melodia* (Keller *et al.* 1994; Keller, 1998) presentaron una mortalidad mucho mayor durante tormentas invernales severas respecto a los no-endogámicos. En poblaciones en cautiverio, Ralls *et al.* (1979) y Ralls y Ballou (1983) mencionan que con excepción de un caso, 24 especies de mamíferos presentaron una mayor mortalidad juvenil en individuos endogámicos respecto a no-endogámicos. En un estudio complementario, una estimación del costo de la endogamia en 38 especies indicó una mortalidad juvenil promedio de un 33% mayor en individuos endogámicos (Ralls *et al.* 1988). Poblaciones experimentales de *Drosophila* también han

mostrado que la endogamia causa un incremento en la probabilidad de extinción (Bijlsma *et al.* 2000).

Aunque la depresión endogámica es un fenómeno común, su intensidad varía ampliamente entre taxa, poblaciones y ambientes, así como en función de la etapa del ciclo de vida y el componente de la adecuación empleado para estimarla (Hedrick y Kalinowski, 2000; Keller y Waller, 2002). Por ejemplo, en una revisión de casos de estudio en organismos silvestres Crnokrak y Roff (1999) reportaron niveles significativos de depresión en ~50% de los estudios. Tal variación puede ser explicada debido a la interacción del componente genético con los factores ambientales y demográficos en la adecuación de los individuos y sus poblaciones (Mills y Smouse, 1994; Bijlsma *et al.* 2000), así como en función de distintas historias de selección.

Además de la endogamia, las poblaciones pequeñas están sujetas a los efectos aleatorios de la deriva genética. En cualquier población el azar influye en la forma que los alelos pasan de una generación a la siguiente (i.e. la segregación de alelos en los gametos y el muestreo de aquellos que llegan a producir individuos que a su vez dejan descendencia). Sin embargo, conforme el número efectivo o individuos reproductivos (N_e) de una población disminuye, los efectos de la deriva son mayores, produciendo fluctuaciones aleatorias en las frecuencias alélicas entre generaciones y eventualmente puede redundar en la pérdida y fijación de alelos en la población (Hedrick, 2000).

La tasa de pérdida de heterocigosidad para un locus neutral es inversamente proporcional al tamaño efectivo (N_e) de la población, y la teoría predice que dicha disminución sigue un decaimiento exponencial (Hedrick, 2000):

$$H_t = H_o \left(1 - \frac{1}{2N_e}\right)^t$$

Ecuación (2)

Donde: H_o y H_t son la heterocigosidad inicial y final, respectivamente.

De la ecuación se aprecia que los dos factores determinantes son el tamaño efectivo (N_e) más reducido que la población haya experimentado, y el tiempo (t) medido en generaciones, que la población se haya mantenido en dicho tamaño.

Aunque, la estimación de la pérdida de alelos por deriva es una cuestión compleja y no existen soluciones analíticas sencillas al respecto (England y Osler, 2001), se reconoce en general que la diversidad alélica es más sensible a los efectos de la deriva que la heterocigosidad (Amos y Balmford, 2001).

De manera reciente, la implementación de métodos Monte Carlo para el cálculo de probabilidades (Ej. Griffiths y Tavaré, 1996) en el desarrollo de programas computacionales (Geneloss; England y Osler, 2001) han abierto la posibilidad de hacer algunas aproximaciones a la dinámica de la pérdida de alelos y heterocigosidad en poblaciones pequeñas a lo largo de varias generaciones.

Partiendo de una diversidad alélica inicial, este tipo de métodos estiman los valores promedio en la distribución de la heterocigosidad y el número de alelos al final de cuellos de botella de tamaño y duración determinados, y en los cuales, a diferencia de los métodos exactos (Ecuación 2), es posible considerar la influencia de la elevada varianza que se presenta en un proceso estocástico como la deriva. Este tipo de aproximaciones abren la posibilidad de explorar distintos escenarios históricos para explicar la pérdida de variabilidad genética actual observada en una población en peligro como *P. sinus*.

Tales estudios han sido motivados por la necesidad que hay de explorar la importancia de los riesgos genéticos en la sobrevivencia y extinción de poblaciones pequeñas. Como parte de un tema objeto de debate en los últimos años, se ha argumentado que el papel del componente genético en la extinción es secundario en comparación con factores ecológicos como la estocasticidad demográfica y ambiental que pueden ser la principal causa de extinción en el corto plazo (Lande, 1988; Caro y Laurenson, 1994; Merola, 1994; May, 1995; Harcourt, 1991).

No obstante, evidencia creciente basada en modelos teóricos (Lande, 1994, 1995; Mills y Smouse, 1994; Frankham, 1995a; Lynch, 1995; Higgins y Lynch, 2001), estudios

experimentales (Bijlsma *et al.* 2000), y en poblaciones de plantas y animales silvestres (Ledig, 1986; Allendorf y Leary, 1986; O'Brien, 1994; Keller y Waller, 2002) y en cautiverio (Ralls *et al.* 1988), han resaltado la influencia de la erosión genética al determinar la viabilidad y extinción de las poblaciones (Ellstrand y Elam, 1993; Hedrick y Kalinowski, 2000; Amos y Balmford, 2001), poniendo de manifiesto la naturaleza multifactorial y sinérgica del vórtice de extinción.

La variación genética es la materia prima del proceso evolutivo, y una de las principales consecuencias de su pérdida es la disminución en la capacidad de respuesta ante cambios ambientales tanto a nivel individual como poblacional (Amos y Balmford, 2001), ya sean éstos nuevas enfermedades, parásitos, competidores o predadores, o bien el calentamiento global del planeta o la exposición a contaminantes. Además, las poblaciones pequeñas sufren de una disminución en la varianza genética aditiva para caracteres cuantitativos que es proporcional a la pérdida de heterocigosidad (Lande, 1988; Falconer y Mackay, 1996), lo que puede disminuir el potencial evolutivo de una población (Frankham, 1995a) e incrementar su riesgo de extinción. Por ejemplo, en una metapoblación de mariposas *Melitaea cinzia* en Finlandia (Saccheri *et al.* 1998) las poblaciones con menor variación genética presentaron una mayor probabilidad de extinción.

II.1.2. El Papel de la Selección Natural en Poblaciones Pequeñas

Aunque la deriva genética y la endogamia actúan por igual sobre todos los loci, aquellos genes que codifican para proteínas funcionales que afectan la sobrevivencia y/o reproducción (adecuación) de los individuos están sujetos a la selección natural, la cual, dependiendo de la ventaja (o desventaja) que proporcionen al organismo en su ambiente, determinan la supervivencia y reproducción diferencial (no aleatoria) de los individuos dependiendo de sus genotipos, y como consecuencia, los alelos pueden ser mantenidos o eliminados de la población.

Bajo un esquema de selección natural, los individuos mejor adecuados sobreviven más y tienen más hijos que aquellos que presentan un grado de adecuación menor. El grado

de adecuación se mide por s (coeficiente de selección). En general, se reconocen tres tipos básicos de selección que se ilustran a continuación. Considerando un modelo sencillo de un locus que presenta dos alelos (A y a), al genotipo más fuerte se le atribuye un valor de 1 y a los menos fuertes 1-s (Smith, 1996):

	GENOTIPOS		
	AA	Aa	aa
Selección direccional	1	1	1-s
Selección disruptiva	1	1-s	1
Selección balanceadora	1-s	1	1-s

En la selección direccional se favorece un genotipo o carácter, en la disruptiva dos o más genotipos distintos, mientras que la balanceadora o estabilizadora actúa contra la producción de individuos homocigotos extremos y favorece al heterocigoto que aumenta su frecuencia en la población hasta llegar a un valor de equilibrio (Smith, 1996).

La mayoría de los genes en organismos diploides operan satisfactoriamente con una sola copia por individuo, por lo que en individuos heterocigotos generalmente existe dominancia en la expresión de un alelo sobre el otro (coeficiente de dominancia $h=1$). Los genes deletéreos, en cambio, son generalmente recesivos, mostrando su efecto sólo cuando el individuo es homocigoto ($h=0$) (Page y Holmes, 1998).

En la ausencia de mutación, la depresión por endogamia causada por alelos deletéreos puede en teoría ser reducida mediante la purga de alelos por selección (Hedrick y Kalinowski, 2000). La teoría predice que el aumento en la homocigosidad por la endogamia expondría los alelos recesivos letales, los cuales serían eliminados de la población al morir los individuos portadores. En una población ideal de tamaño infinito, otros alelos deletéreos (no letales) serían mantenidos en bajas frecuencias dependiendo de su intensidad de selección (producto sh), y con el tiempo también podrían ser purgados o eliminados por deriva (Hedrick, 2001).

Sin embargo, la influencia de la selección natural al moldear en una población los alelos presentes y sus frecuencias disminuye junto con el tamaño poblacional, y la teoría indica que en una población pequeña la selección podría ser completamente contrarrestada por los efectos de la deriva en aquellos alelos cuyas intensidades de selección (s) sean también reducidas ($< 1/2Ne$) (Kimura, 1983; Lynch *et al.* 1995). Resolviendo s para distintas Ne , y considerando distintos grados de dominancia (h), es posible estimar las intensidades de selección mínimas que la selección natural es capaz de ejercer sobre un carácter en poblaciones pequeñas (Figura 7, Anexo 1).

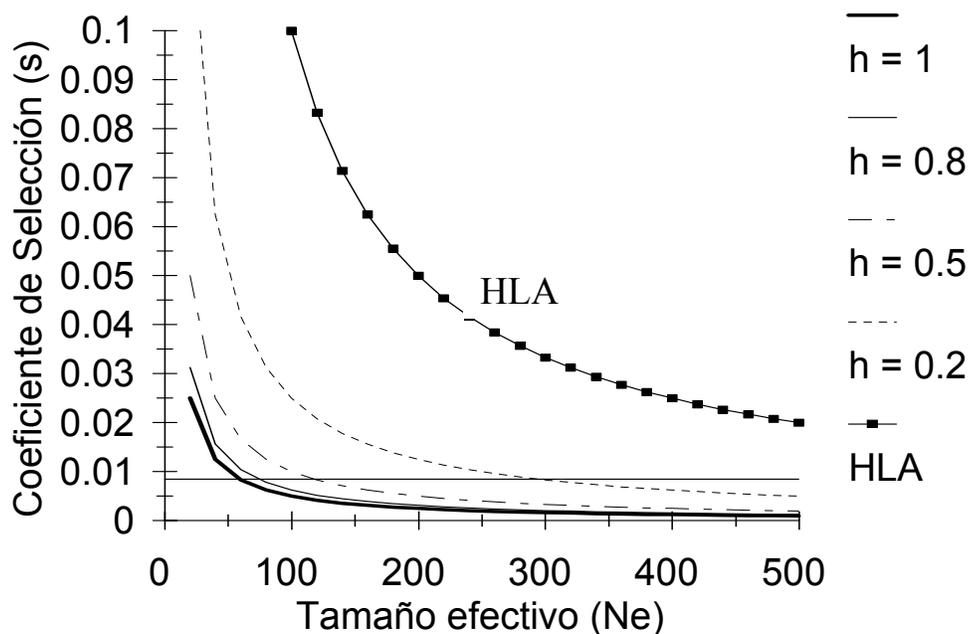


Figura 7. Coeficientes de selección mínimos que la selección es capaz de ejercer sobre un carácter en poblaciones pequeñas ($Ne < 500$), de acuerdo a $s = 1/2Ne$ h (Kimura, 1983); considerando distintos grados de dominancia: $h=1$ (dominancia completa), $h = 0.8$, $h=0.5$ (codominancia) y $h= 0.2$. También se muestra la selección observada en el *Mhc* Humano (*HLA*) ($s= 10/Ne$, Takahata, 1990). La línea horizontal muestra el coeficiente de selección calculado para el locus *DQB1* del humano ($s= 0.0085$) (Satta *et al.* 1994).

Como consecuencia de la deriva y la ineficacia de la selección en poblaciones pequeñas, algunas mutaciones deletéreas, particularmente aquellas cuyas intensidades de selección (s_h) son pequeñas, pueden pasar inadvertidas ante la selección y acumularse en el genoma a lo largo del tiempo produciendo un decaimiento por mutación (*mutational meltdown*) (Lande, 1994; Lynch *et al.* 1995).

Así, la adecuación de los organismos depende del número y peso de mutaciones deletéreas en su genoma. Tal carga genética describe el grado en que la adecuación promedio de un individuo o población disminuye como consecuencia de sus alelos deletéreos (Keller y Waller, 2002).

Los estudios acerca de la purga de deletéreos son contradictorios. Aunque la teoría predice una disminución de pocos puntos porcentuales en la depresión endogámica tras una reducción drástica en el tamaño poblacional (Kirkpatrick y Jarne, 2000), y algunos estudios han demostrado un “rebote” de intensidad variable en componentes de la adecuación tras pocas generaciones de endogamia (Ej. Barret y Charlesworth, 1991; Saccheri *et al.* 1996). Otros casos de purga dramáticos en tan sólo tres generaciones, como el del programa de reproducción en cautiverio de la gacela *Gazella spekei* son difíciles de reconciliar con la teoría (Kalinowski *et al.* 2000). Por otro lado, en revisiones que involucran 25 poblaciones de mamíferos en cautiverio (Ballou, 1997) y 53 poblaciones de plantas (Byers y Waller, 1999) se observó que la purga ocurre sólo en algunos caracteres, sólo en algunas poblaciones y, que, de manera general, el rebote en la adecuación observado es generalmente pequeño.

Por otro lado, además de la influencia del tamaño poblacional, otros factores genéticos y demográficos como la interferencia en la selección entre locus (*background selection*), distintas historias de endogamia (tasa de endogamia), y la reintroducción de deletéreos por inmigración (Byers y Waller, 1999; Amos y Balmford, 2001; Hedrick, 2001; Keller y Waller, 2002) pueden dificultar el proceso de purga.

II.1.3. Antecedentes del Monomorfismo en el D-loop Mitocondrial de *P. sinus*

El ADN mitocondrial (ADNmt) es una molécula circular (16 Kb en el humano) que se encuentra presente en la mayoría de las células somáticas, así como en los óvulos que al ser fecundados heredan su ADNmt al cigoto (Randi, 2000). A diferencia de genes nucleares, está presente en forma haploide y contiene genes que codifican subunidades de ARN ribosomal y ARN de transferencia, así como enzimas involucradas en la respiración (citocromo b y oxidasa, ATPasa, etc.) (Page y Holmes, 1998). Las secuencias mitocondriales evolucionan, en promedio, 5-10 veces más rápido que los genes nucleares (Brown *et al.* 1979), siendo sus tasas de mutación del orden de 10^{-8} /nucleótido y 10^{-9} /nucleótido, respectivamente (Nei, 1987). En consecuencia, el ADNmt ha mostrado ser muy útil en estudios poblacionales de alta resolución y particularmente a nivel intraespecífico (Ej. Cann *et al.* 1987).

La región control (D-loop) es el sitio donde inicia la replicación del ADNmt. Al parecer esta es una región neutral, y en teoría todas las mutaciones que ocurren son acumuladas por lo que usualmente es la sección más variable del ADNmt. En los cetáceos, la tasa de mutación parece ser en general más lenta (Milinkovitch *et al.* 1993). Para la región control, por ejemplo, que en éste grupo comprende unas 900 pb, es del orden de 5×10^{-9} (Hoelzel *et al.* 1991), lo cual podría explicar la aparente variabilidad genética reducida presente en los cetáceos en general (Schlötterer *et al.* 1991).

Considerando que el ADN mitocondrial es heredado sólo por vía materna, y que en cada hembra está presente sólo una copia (haploide), el número efectivo de genes mitocondriales es tan sólo un cuarto del de los nucleares. En consecuencia, el tiempo de coalescencia (medido en generaciones) para genes mitocondriales neutrales es $2N_{e_h}$ (siendo N_{e_h} el número de hembras reproductivas), que equivale a N_e generaciones. En contraste, el tiempo de coalescencia de genes nucleares neutrales es aproximadamente cuatro veces mayor, correspondiente a $4N_e$ generaciones (Page y Holmes, 1998). Lo anterior se traduce en que la fijación por deriva ocurre mucho antes en genes mitocondriales que en nucleares.

No obstante, la fijación puede ser retardada mucho más por efecto de la selección positiva y la mutación (Ej. Nei *et al.* 1997; Klein *et al.* 1998).

En un estudio de la variación en una porción (322 pb) de la región control mitocondrial de *P. sinus*, Rosel y Rojas-Bracho (1999) encontraron un solo haplotipo presente en 43 individuos colectados entre 1985 y 1993, indicando niveles muy reducidos de variabilidad genética en la especie. En contraste, todas las demás especies de focénidos muestran múltiples haplotipos en esta región (Rosel *et al.* 1995). Tal resultado sugirió que la especie presentaba un alto grado de endogamia, y llevó a Taylor y Rojas-Bracho (1999) a evaluar mediante modelos demográficos si la fijación observada era histórica o relacionada con la disminución de su población de manera reciente (a partir del año 1940) debido a la mortalidad incidental en redes de pesca. Para ello, a partir de una distribución inicial de haplotipos tomada de la marsopa común *Phocoena phocoena* del Pacífico ($n=57$, $h=0.88$), simularon el proceso de deriva génica para los últimos 10,000 años, suponiendo tasas plausibles de mutación y de crecimiento poblacional, así como un ambiente constante (respecto a la capacidad de carga del sistema), para modelar dos escenarios que comprendieron: i) Un evento de fragmentación, con poblaciones donde N_{e_h} (número efectivo de hembras reproductivas) = 500 a 8000 y abundancias más o menos constantes en tiempo, y ii) Un evento de fundador con $N_{e_h} = 10$ a 360, y abundancias más o menos constantes hasta la actualidad, así como abundancias que habían sido reducidas hasta la abundancia efectiva actual ($N_{e_h} 125$). De 1000 simulaciones realizadas, se observó la fijación en 293, de las cuales en 247 (84%) la fijación de haplotipos fue histórica (tras los primeros 1000-2000 años de simulación), y en 46 (16%) ocurrió recientemente (de los años 1940's a la fecha) con el inicio de la pesca incidental. Así, se concluyó que la fijación de un sólo haplotipo mitocondrial en *P. sinus* podría bien ser el resultado de un efecto fundador por pocos individuos, seguido de un tamaño efectivo (N_e) reducido por un largo periodo (decenas o miles de años), indicando que era probable que la ausencia de variabilidad en la región control fuera el resultado de un proceso histórico y no resultado de la reducción reciente de la poblacional producto de su captura incidental. Taylor y Rojas-Bracho (1999)

mostraron los primeros indicios genéticos que apoyan la rareza histórica de la especie, y bajo este razonamiento, sugirieron que no estaría deprimida por endogamia debido a la probable purga de alelos deletéreos durante el tiempo que la población se hubiera mantenido en baja abundancia.

II.1.4. El *Mhc* como Marcador Molecular en Estudios de Conservación y Modelado Demográfico de la Historia de *P. sinus*

El estudio de poblaciones pequeñas en la naturaleza no es una tarea sencilla. Aunque se ha propuesto que *P. sinus* no sufre de depresión por endogamia, la estimación directa de este parámetro en la población de *P. sinus* mediante la medición de algún componente de la adecuación (Ej. tasa de sobrevivencia de adultos o juveniles) es un reto metodológico hasta el momento insuperado (Taylor y Rojas-Bracho, 1999). Además, debido a su tamaño poblacional tan reducido, el poder de un análisis estadístico para detectar tendencias (Ej. en abundancia) sería inaceptablemente bajo (Taylor y Gerrodette, 1993).

Frankham (1996) mostró la relación inequívoca que existe entre el tamaño de una población y su variación genética. Con base en lo anterior, existe una relación de los niveles de variación genética de una especie con el tamaño del área que habita, su distribución geográfica y su tasa de evolución cromosómica (Frankham, 1996), por lo que también se espera una relación con su potencial evolutivo. Al respecto, la población de *P. sinus* presenta la distribución más restringida de los cetáceos marinos. Su población comprende menos de 600 individuos y es una de las especies de cetáceos en mayor peligro de extinción en el mundo (Rosel y Rojas-Bracho, 1999). También es la única especie de mamífero sin variabilidad en la secuencia de la región control mitocondrial, y que presenta además extrañas características anatómicas como fusión anormal de vértebras y polidactilia, que podrían estar indicando la ocurrencia de un síndrome en la especie (Ortega-Ortíz *et al.* 2000).

En concordancia, se percibió que el análisis histórico del polimorfismo del Complejo principal de Histocompatibilidad (*Mhc*) en *P. sinus* sería útil para determinar si la baja variabilidad genética en la especie se presenta sólo en la región control mitocondrial, o si es una característica generalizada resultado de su historia evolutiva. En este sentido los genes del *Mhc* podrían ser particularmente útiles para hacer inferencias acerca de la historia de la población pues, al estar sujetos a diversas fuentes de selección (sobredominancia, resistencia a patógenos, interacciones materno-fetales, y selección de parentela o Kin selection; Edwards y Hedrick, 1998), en teoría proveen de un registro mucho más antiguo, comúnmente transespecífico, comparados con genes neutrales (Klein *et al.* 1998; Muirhead, 2001) y más aún respecto a genes mitocondriales. Además, se obtendría un panorama histórico sobre los posibles efectos de la deriva y la endogamia en genes que podrían ser importantes para la adecuación de la especie, así como información valiosa sobre su historia demográfica y perspectivas de conservación.

De tal marco conceptual, derivó el presente estudio que consistió en aplicar la técnica de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP's) de secuencias de ADN para determinar el polimorfismo de secuencias histocompatibles en la especie, y utilizar tal información para simular en forma retrospectiva la historia demográfica de la vaquita. Así, primero se procedió a analizar la variación del segundo exón del locus *DQB* del *Mhc-II* en una muestra de 25 individuos de *P. sinus* colectados a lo largo de distintos años y provenientes de diferentes localidades.

Varios estudios han resaltado la importancia de la variación genética como un factor fundamental en la persistencia de las poblaciones (O'Brien, 1994; Amos y Balmford, 2001; Hedrick, 2001). No obstante, la importancia de la selección natural en la evolución molecular ha sido objeto de debate. La teoría neutral propuesta por Kimura (1968) supone que la mayoría de la variación molecular observada dentro y entre especies es el resultado de la fijación de mutaciones selectivamente neutrales. En realidad existen pocos casos de estudio que demuestren empíricamente cómo los niveles de variación reducidos afectan la viabilidad o vigor de los individuos en condiciones naturales (Ej. O'Brien, 1994).

Los estudios de genes sujetos a selección balanceadora están relacionados principalmente con la inmunidad y la reproducción (Yang y Bielawski, 2000), dentro de éstos, el *Mhc* en los gnatostomados y el sistema de Auto-Incompatibilidad (*SI*) en las plantas con flores ofrecen los dos más claros ejemplos de familias de genes sujetas a selección balanceadora (Hughes y Nei, 1988, 1989; Clark, 1997; Klein, *et al.* 1998).

Los genes del *Mhc* son los genes funcionales más polimórficos que se conocen, siendo su variación al menos 10 veces mayor que la de otros genes en vertebrados (Radtkey *et al.* 1996), su función es presentar péptidos extraños a las células T, desencadenando la respuesta inmune correspondiente. Contrario a las predicciones de la teoría neutral, un locus *Mhc* típico presenta numerosos alelos en frecuencias intermedias (Hedrick *et al.* 1991; Salamon *et al.* 1999). Sus secuencias presentan una elevada tasa de sustitución no sinónima en la región de unión del péptido (PBR) de la molécula, indicativo de selección Darwiniana positiva (Hughes y Nei, 1988, 1989). Las moléculas histocompatibles codificadas por distintos alelos *Mhc* difieren en su capacidad para capturar péptidos (Ej. Xu *et al.* 1993; Hill *et al.* 1991; Carrington *et al.* 1999). En consecuencia, un individuo heterocigoto en sus genes del *Mhc* estaría protegido contra un mayor variedad de patógenos que un homocigoto.

Algunos estudios genéticos del *Mhc* en poblaciones silvestres han mostrado el papel de la variación genética funcional en su persistencia mediante la resistencia a enfermedades infecciosas. En uno de los casos de estudio ahora clásicos, se demostró una ausencia extrema de variación genética en poblaciones silvestres y en cautiverio del cheeta *Acinonyx jubatus* de acuerdo a una variedad de estudios moleculares como electroforesis de proteínas, polimorfismos de restricción (RFLP's) en el ADNmt y en genes del *Mhc*, y microsatélites, (O'Brien *et al.* 1983; Yuhki y O'Brien, 1990; Menotti-Raymond y O'Brien, 1993; O'Brien, 1994). La relación con una elevada vulnerabilidad en esta especie es impresionante: los cheetas son extremadamente difíciles de reproducir en cautiverio (tan sólo un ~15% de las parejas reproductivas tienen éxito) y presentan una elevada mortalidad juvenil (O'Brien *et al.* 1985). El análisis de su esperma indica bajos conteos y una alta

frecuencia de anomalías (70%). Notablemente, una epidemia de peritonitis causada por un agente viral en una población de cheetas en cautiverio a mediados de 1980's resultó en 100% de morbilidad (síntomas) y 60% de mortalidad, mientras que experimentos de injertos recíprocos de piel entre individuos no emparentados no mostraron rechazo, corroborando la ausencia de variabilidad en genes del *Mhc* de la especie (O'Brien *et al.* 1985). Estudios similares en el león *Panthera leo* mostraron una correlación entre su escasa variabilidad genética y niveles reducidos de testosterona y baja calidad de espermatozoides (Wildt *et al.* 1987; Packer *et al.*, 1991; O'Brien, 1994). Estos signos de depresión endogámica al igual que en los cheetas se relacionó con niveles de variación reducidos en genes del *Mhc*, lo cual llevó a Yuhki y O'Brien, (1990) a sugerir que el polimorfismo de ésta familia de genes refleja bastante bien la diversidad genómica en general así como la historia de cuellos de botella y endogamia de las poblaciones.

Estos y otros estudios indican que poblaciones con *Mhc* poco diversos son más susceptibles a enfermedades infecciosas (O'Brien *et al.* 1985; O'Brien y Evermann, 1988; Watkins *et al.* 1990; Paterson *et al.* 1998). Por ello se ha propuesto mantener el polimorfismo del *Mhc* como prioridad en programas de reproducción en cautiverio de vertebrados silvestres (Hughes, 1991; Hedrick y Miller, 1994), determinando el monitoreo de la diversidad histocompatible en los programas de reproducción en cautiverio del lobo mexicano (Hedrick *et al.* 2000a), caballo de Przewalski (Hedrick *et al.* 1999), y oryx arábigo (Hedrick *et al.* 2000b). No obstante, otros autores han cuestionado la relevancia del *Mhc* sobre otros loci funcionales también importantes (Gilpin y Wills, 1991; Miller y Hedrick, 1991; Vrijenhoek y Leberg, 1991).

En otro caso de estudio bien documentado, una población de ovejas (*Ovis aries*) de la isla Soay en Escocia, demostró que algunos microsatélites dentro del *Mhc* estaban asociados con la sobrevivencia de los juveniles y su resistencia a nemátodos intestinales (Paterson *et al.* 1998b). Dichos alelos estaban presentes en frecuencias uniformes y presentaban desequilibrio encadenado en consistencia con la selección balanceadora típica del *Mhc* (Paterson, 1998). Un estudio posterior (Coltman *et al.* 1999) mostró que la

homocigocidad estaba relacionada con una mayor carga parasitaria y menor sobrevivencia durante veranos crudos en los que escaseaba el alimento, lo cual actuaba como un factor de selección que incrementaba la heterocigocidad en la siguiente generación.

La aplicación del estudio de genes del *Mhc* se ha extendido recientemente a la identificación de especies, unidades de manejo y unidades evolutivas, como en el caso del pez *Poeciliopsis occidentalis* (Hedrick *et al.* 2001a). En los últimos años es notable también el incremento en el uso del *Mhc* como marcador molecular para el estudio de la historia y viabilidad de poblaciones silvestres de vertebrados, en concordancia con una tendencia al uso de genes sujetos a selección sobre genes neutros. Estos estudios incluyen especies de roedores como *Hypogeomys antimena*, *Rattus fuscipes greyii*, el antilope *Damaliscus pygargus*, *Castor fiber*, *Alces alces*, *Ovis canadiensis*, peces cíclidos de lagos africanos y pinzones de Darwin (*Geospiza*) (Ellegren *et al.* 1993; Klein *et al.* 1993; Mikko y Andersson, 1995; Vincek *et al.* 1997; Seddon y Baverstock, 1999; Sommer y Tichy, 1999; Van der Walt *et al.* 2001; Hedrick *et al.* 2001b).

La teoría predice que el número de alelos presentes y sus frecuencias en el locus *DQB* de la población de vaquitas actuales es el resultado de la operación individual o sinérgica de alguna de las fuerzas evolutivas (mutación, deriva genética, selección) en el contexto del equilibrio de Hardy – Weinberg. Así, la variación observada del locus *DQB* fue explicada con base en la magnitud de la influencia que cada una de dichas fuerzas evolutivas podrían haber tenido en la estructura genética actual de *P. sinus*.

Para describir el proceso de pérdida de variabilidad por deriva en poblaciones pequeñas se recurrió al empleo de modelos analíticos (Ecuación 2) y simulaciones computacionales (Geneloss; England y Osler, 2001), que permitieran inferir el número efectivo poblacional (N_e) y el tiempo (generaciones) necesarios para explicar los niveles de polimorfismo observados en el locus *DQB* de *P. sinus*, suponiendo poblaciones de distintos tamaños efectivos (N_e) que presentaban distintos niveles de polimorfismo inicial.

Las simulaciones comprendieron dos escenarios principales: el primero, exploró, si la pérdida de variabilidad por deriva era consistente con eventos Recientes en la historia

demográfica de la especie, como su mortalidad incidental en redes de pesca en el siglo pasado, que podría haber iniciado al menos desde 1940.

El segundo panorama modelado exploró escenarios Históricos, y abarca aproximadamente el tiempo transcurrido desde el último máximo glacial que marca el inicio del fin del Pleistoceno (~15-20,000 años) (Ganopoiski *et al.* 1998; Lowell, 2000; Petet, 2000). En el contexto del tamaño histórico de la población de *P. sinus*, sería posible estimar la influencia relativa de la selección natural que dió como resultado la composición genética actual de la especie, con referencia a sus niveles actuales de variación mitocondrial neutral y nuclear selectiva, así como respecto a la variación deletérea (Hedrick, 2001).

Esto, permitiría explicar con base a un proceso evolutivo, la presencia de caracteres inusuales en la especie como la polidactilia y el riesgo de depresión por endogamia, y evaluar el efecto de la acumulación de mutaciones deletéreas y pérdida de variabilidad en el potencial evolutivo y adaptativo de la especie. Dado el desconocimiento sobre la historia y abundancia de *P. sinus* en el pasado y la importancia de considerar la historia evolutiva en la conservación de las especies en peligro, aún aproximaciones empíricas como las realizadas en el presente trabajo podrían brindar un panorama histórico y evolutivo que sirviera de guía para evaluar y valorar a una especie poco común, recién y poco conocida que se encuentra amenazada por actividades relacionadas con el hombre.

II.2. Hipótesis

Si *P. sinus* es una especie rara, cuya población ha sido históricamente pequeña y aislada, es probable que la deriva genética y la endogamia afectaran aún a genes nucleares reduciendo su polimorfismo, mientras que si uno de esos genes como el *DQB* del *Mhc* estuviera sujeto a la selección natural, ésta tendería a mantener su variación, la cual podría ser indicativa de la capacidad de adecuación de la especie.

II.3. Objetivos

Particular: Evaluar el polimorfismo genético presente en el Complejo principal de histocompatibilidad de *Phocoena sinus*, en relación a su historia evolutiva y su estado de conservación actual.

Específicos:

- Evaluar la variabilidad alélica y genotípica del locus *DQB* en una muestra de la población.
- Realizar simulaciones exactas y computacionales de la pérdida de variabilidad genética por deriva que permitan estimar algunos parámetros importantes de la historia demográfica de la población, como su tamaño efectivo histórico.
- Integrar los resultados obtenidos con información de su historia natural y compararla con otras especies en el contexto de su estado de conservación actual.

II.4. Métodos

II.4.1. Análisis SSCP del locus *DQB*

Muestras de piel fueron colectadas de 25 individuos de *P. sinus* capturados incidentalmente entre 1990 y 1993, principalmente (Anexo 2), y entre las que se incluye a los tres individuos empleados al inicio para caracterizar el segundo exón del locus *DQB* de la especie (Capítulo I). La muestra incluye individuos colectados en el Golfo de Santa Clara (4), Rocas Consagradas (1), El Burro (6), El Quelele (6), El Tornillal (3), El Borrascoso (1), San Felipe (2), y dos individuos más con localidad de colecta no disponible. Hay 10 hembras, 10 machos y 5 sin información. También hay individuos de diferentes edades (a juzgar por las tallas), así como maduros e inmaduros sexualmente (Anexo 2). 21 de los ejemplares analizados fueron determinados previamente como invariables para la región control por Rosel y Rojas-Bracho (1999) (Anexo 2).

El ADN fue aislado mediante un protocolo estándar de digestión con proteinasa K, extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol como se describe en Rosel *et al.*

(1995), o bien mediante una extracción con CTAB como se describe en Rosel y Rojas-Bracho (1999).

Se realizó la amplificación de un fragmento del segundo exón del locus *DQB* de los 25 individuos siguiendo el protocolo de PCR descrito en el Capítulo I. El polimorfismo de los productos obtenidos se analizó mediante la técnica de Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla o SSCP por *Single Stranded Conformational Polymorphism*.

La técnica *SSCP* es simple y puede ser utilizada para diferenciar moléculas de ADN del mismo tamaño pero que difieren en su secuencia de nucleótidos. La técnica fue desarrollada por Orita *et al.* (1989) para la detección de polimorfismos genéticos en ADN de humano, y después fue aplicada por Hayashi (1991) para la detección de mutaciones en productos de PCR. Para conducir un análisis de SSCP, el ADN de doble cadena es primero desnaturizado en cadenas o hebras sencillas elevando la temperatura en presencia de un agente desnaturizante (formamida o NaOH) para después ser separadas mediante una electroforesis en gel no desnaturizante de poliacrilamida. En este tipo de geles, las hebras sencillas de ADN se pliegan sobre sí mismas adquiriendo estructuras moleculares secundarias, y principalmente terciarias, que son determinadas por la secuencia de nucleótidos que presentan, y de esta forma durante la electroforesis son separadas no sólo con base en su tamaño, sino también dependiendo de la forma que adquieren. Mediante esta técnica, diferencias en secuencia tan pequeñas como una sola base pueden afectar la conformación de las hebras sencillas y así ser detectadas en el gel mediante diferencias en el patrón de migración (Sunnucks *et al.* 2000). La eficiencia para detectar mutaciones puntuales disminuye de manera inversa con el tamaño de los fragmentos analizados, siendo del 99% para 100-300 pb, y >80% para 400 bp (Girman, 1996).

En un análisis típico de SSCP, una molécula de ADN de doble cadena produce tres productos o bandas detectables en el gel: dos hebras sencillas y una doble hebra que se produce debido al realineamiento entre las hebras sencillas durante la aplicación de las muestras en gel (Ej. Figura 8). El producto de doble hebra es claramente distinguible de las hebras sencillas debido a que migra a través de la matriz de gel mucho más rápido. En

algunos casos, una hebra sencilla puede presentar más de una conformación bajo condiciones específicas y por ende producir bandas adicionales que generalmente se observan con una menor intensidad que la conformación principal (Ej. Figura 8) (Tebbe *et al.* 2001). En otras ocasiones, es posible que ambas hebras sencillas migren a la misma velocidad y por lo tanto se aprecien como una sola banda (Tebbe *et al.* 2001). Una desventaja importante para realizar un análisis de SSCP es que es imposible predecir las condiciones experimentales óptimas para una molécula de ADN en particular, por lo que es imprescindible la optimización de las condiciones de corrida para el tipo de fragmentos que se desee analizar, lo cual puede llegar a implicar un tiempo de laboratorio considerable.

En el presente estudio, el análisis SSCP se realizó empleando un equipo DCODE (Biorad) para detección de mutaciones, conectado a un recirculador-enfriador externo (VWR, Modelo 1166) que contenía como anticongelante una solución de etilenglicol al 50% para lograr el enfriamiento del buffer en la cámara de electroforesis. Tras concluido el proceso de optimización de la técnica SSCP que permitiera una separación óptima y clara de los fragmentos (Anexo 3), se llegó al siguiente protocolo con el cual se realizó el análisis final de las muestras: 3 μ l del producto de PCR eran mezclados con 20 μ l de buffer de corrida (azul de bromofenol 0.05%, azul de xilencianol 0.05%, formamida 95%, EDTA 20 mM). Las muestras eran desnaturalizadas en un termoblock a 95° C durante 5 min para después ser transferidos a un *lab top cooler* a 0° C donde permanecían (al menos 5 min) hasta ser cargadas en un gel de acrilamida al 12% (acrilamida/bis 37.5:1, que contenía además 10% de glicerol y ½ de buffer TBE), la cámara contenía también ½ de buffer TBE recién preparado y previamente equilibrado a 4° C (el recirculador era equilibrado con anterioridad a -5°C) y se aplicaba una corriente constante de 500 V durante 16-20 horas. Para la tinción del gel, se empleaban 50 ml de una solución fresca 1X de SYBR gold (Molecular Probes, Inc.) en ½ de TBE que era vertida sobre el gel y reposada en obscuridad durante al menos 30 min siguiendo las especificaciones del proveedor. Los geles eran visualizados con luz UV empleando un transiluminador (UVITEC, Cambridge B4 4WS-England) y las imágenes eran capturadas en una computadora.

II.4.2. Simulaciones de la Pérdida de Variabilidad Genética por de Deriva.

Se emplearon modelos analíticos y simulaciones computacionales que describieran el proceso de deriva genética y que permitieran explicar el nivel de polimorfismo del locus *DQB* observado en la población actual. Aunque el efecto de los otros factores que afectan la estructura genética del locus (mutación y selección) no se consideró en las simulaciones de manera explícita, se hace referencia a sus posibles implicaciones en la sección de Discusión.

Se simularon poblaciones de distinto tamaño efectivo (N_e) presentando distintos niveles de variabilidad genética inicial (Número de alelos, heterocigosidad), cuya pérdida por deriva se modelo a través del paso del tiempo (generaciones). Las simulaciones se centraron en dos escenarios: el primero (Reciente) comprende un periodo de 30 generaciones y pretende explorar la reducción reciente de la población debida a la mortalidad incidental en redes de pesca que habría iniciado al menos desde 1940, y comparar el caso de la vaquita con el de otras especies en peligro que han sido diezmadas severamente por el hombre en los últimos 100-200 años. El segundo, (Histórico) considera 2500 generaciones y se ubica en una escala evolutiva que comprende, por ejemplo, desde el último máximo glacial (15,000 años), y en el cual se estiman las abundancias históricas y el tiempo necesario para explicar los niveles de variación actuales.

Las simulaciones de pérdida de variabilidad por deriva se realizaron empleando dos aproximaciones distintas: 1) simulaciones computacionales con el programa Geneloss (England y Osler, 2001), con el cual se calculó la heterocigosidad y el número de alelos promedio tras las generaciones de deriva en una serie de iteraciones, y 2) una solución analítica (Ecuación 2) que describe la pérdida de heterocigosidad por deriva, la cual fue resuelta en una hoja de cálculo (Corel Quattro Pro, Ver. 8), donde se integraron todos los resultados y se elaboraron las gráficas correspondientes.

Para cada escenario Reciente (30 generaciones) simulado con Geneloss se obtuvieron los valores promedio de heterocigosidad y número de alelos en las 3000

iteraciones que permite el programa. Sin embargo, en los escenarios Históricos (2500 generaciones) se observó un dramático aumento en el tiempo de computo del programa (de media a varias horas) que parecía proporcional a la complejidad del escenario (+alelos, +generaciones). Se consideró entonces reducir el número de iteraciones a un valor práctico en el que los resultados no mostraran ya variaciones significativas respecto a las 3000 iteraciones. Se observó que con 300 iteraciones los resultados de heterocigosidad obtenidos con GeneLoss eran prácticamente iguales a la predicción de la solución analítica (Anexo 4, Fig. 9C y 9D), y se eligió tal valor para analizar todos los escenarios Históricos.

Dado que se desconoce cuál podría haber sido la distribución de alelos y frecuencias del locus *DQB* de *P. sinus* en el pasado, se tomó como referencia la distribución observada en el locus *DQB* de la beluga *Delphinapterus leucas* (Murray *et al.* 1999). En esta especie que se encuentra distribuida en 11 stocks poblacionales sólo en Norte América y que cuenta con varios miles de individuos, se encontró un total de 5 alelos *DQB*. No obstante Murray *et al.* (1999) reporta frecuencias sólo para cuatro (debido a un par de alelos que diferían en una sola sustitución no sinónima y que fueron agrupados juntos en su análisis al no poder distinguirlos por SSCP). De las 13 poblaciones reportadas por Murray *et al.* (1999), la mayoría presentan un alelo dominante y el resto en baja frecuencia. En una primera serie de escenarios, se consideraron 2, 3 y 4 alelos en las siguientes frecuencias iniciales:

- 2 alelos en frecuencias 0.931 y 0.069 (Población “Churchill” en Murray *et al.* 1999).
- 3 alelos en frecuencias 0.85, 0.084 y 0.066 (Población “Mackenzie Delta” en Murray *et al.* 1999).
- 4 alelos en frecuencias 0.702, 0.153, 0.1, y 0.045. (Total de todas las poblaciones, calculada a partir de la Tabla 3 en Murray *et al.* (1999).

Por otro lado, se consideró también otro escenario en el que el mismo número de alelos estuvieran presentes ahora en frecuencias iguales, como podría ser el caso de un gen

del *Mhc* sujeto a una selección balanceadora considerable (Hedrick *et al.* 1991; Paterson, 1998; Salamon *et al.* 1999):

- 2 alelos en frecuencias 0.5 y 0.5
- 3 alelos en frecuencias 0.334, 0.333 y 0.333
- 4 alelos en frecuencias 0.25, 0.25, 0.25 y 0.25

Respecto al tiempo generacional en *P. sinus*, el único estudio que existe sobre madurez sexual en la especie indicó que todos los individuos menores de 3 años eran inmaduros, mientras que aquellos mayores de 6 eran maduros (Hohn *et al.* 1996). Los estudios en otras marsopas indican la madurez sexual en edades similares de entre 3-5 años (Ridgway y Harrison, 1999). Aunque Taylor y Rojas-Bracho (1999) sugirieron un tiempo generacional promedio de 10 años para sus modelos demográficos, se decidió emplear un valor conservador de 6 años tan sólo para expresar las generaciones en un contexto de tiempo en años. No obstante los resultados se presentan con el tiempo medido en generaciones, y en la Discusión se tratan las transformaciones de generaciones a años.

El tamaño (N_e) y la duración (generaciones) de cada uno de los escenarios simulados se presenta a continuación y en el Anexo 4.

II.4.2.1. Escenarios Recientes

La mortalidad incidental de la especie habría comenzado con el inicio de las pesquerías con redes agalleras de nylon en el Alto Golfo al menos desde inicios de 1940 (Taylor y Rojas-Bracho, 1999), no obstante se desconoce el impacto previo de redes elaboradas con fibras naturales, por ejemplo, en los años 1930 (Robles *et al.* 1987). Aunque se desconoce la abundancia previa a esa fecha es probable que la población haya disminuido desde entonces hasta su nivel más bajo en la actualidad. En consecuencia, para simular la posible pérdida de variabilidad por deriva debido a la pesca incidental es necesario considerar el tamaño efectivo actual de la población. Al respecto, se sabe que la estimación más reciente indica una abundancia de menos de 600

individuos, de los cuales aproximadamente la mitad son adultos reproductivos, por lo que en el mejor de los casos el límite superior de N_e para *P. sinus* podría situarse en ~300 individuos. No obstante, estudios en poblaciones silvestres han mostrado que el ratio N/N_e puede ser en realidad mucho menor (1/10 a 1/3 de la estimación poblacional; Frankham, 1995b; Nunney, 1993), debido por ejemplo a un sistema de reproducción poliándrico como el sugerido para *P. sinus* (Hohn *et al.* 1996; Vidal *et al.* 1999). Bajo este esquema, todos los machos tratan de reproducirse cuantas veces pueden, pero las hembras se reproducen sólo una o pocas veces. La teoría predice que un sistema así produce un tamaño efectivo que es 2/3 el número actual bajo condiciones de reproducción aleatoria (Higgins y Lynch, 2001). Bajo un esquema de poliandria, el tamaño efectivo actual de *P. sinus* podría verse reducido a ~200. Con base en este criterio, se simularon poblaciones donde $N_e = 100, 200$ y 300 , y se incluyeron para fines comparativos $N_e = 600$, así como el máximo de $N_e = 2000$ (1000 parejas reproductivas) soportadas por Geneloss. Estos valores de N_e estarían representando un amplio rango de abundancias poblacionales (N), que fluctuarían entre ($N_e = 1/3$ de N): 300, 600, 900, 1800 y 6000 individuos, o bien ($N_e = 1/10$ de N): 1000, 2000, 3000, 6000 y 20,000 individuos. Respecto al tiempo desde que la población habría sido reducida (~1940) a la fecha de colecta de la mayoría de los individuos analizados (Anexo 2) habrían transcurrido unos 60 años, que se traducen en unas 10-6 generaciones de *P. sinus*. Se consideraron entonces para las simulaciones periodos de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 generaciones, que estarían representando un periodo de 200-300 años atrás, esto con el objetivo de hacer comparaciones de *P. sinus* con estudios similares que muestran la pérdida de variabilidad genética en otras especies en peligro y que en su mayoría han experimentado sus más bajas abundancias (cuellos de botella) en los últimos dos o tres siglos (Gilligan *et al.* 1997; Amos y Balmford, 2001).

II.4.2.2. Escenarios Históricos

Rosel *et al.* (1995) estimó con base en secuencias mitocondriales del citocromo b que la mayoría de las marsopas (Phocoenidae), entre ellas *P. sinus*, habrían divergido en los últimos 2-3 Ma., en concordancia con las estimaciones con base en el registro fósil del promedio de vida de una especie, que se sitúa en ~2 Ma. (Stanley, 1975). El origen evolutivo de *P. sinus* ha sido ubicado en alguna de las glaciaciones del Pleistoceno, época que marca el inicio de la era Cuaternaria hace 1.8 Ma. De acuerdo a Norris y McFarland (1958), las vaquitas serían una población relicto de una especie ancestral (relacionada con *P. spinipinnis* de América del Sur) que habría cruzado el ecuador durante un periodo glacial, el cual al terminar habría atrapado a los migrantes en el Golfo de California. En consecuencia, podría ser posible, por ejemplo, que más de 1 Ma. hubiera pasado desde que el linaje de *P. sinus* divirgió de un ancestro común a *P. spinipinnis*, quizá a partir de un efecto fundador o de fragmentación (Taylor y Rojas-Bracho, 1999). No obstante, sería extremadamente difícil intentar estimar los efectos de la deriva durante las 100,000 generaciones a que equivale 1 Ma. considerando un tiempo generacional de 10 años. En consecuencia, las simulaciones en una escala de tiempo evolutiva involucraron un periodo mucho más reciente (500, 1000, 1500, 2000 y 2500 generaciones), que considerando un tiempo generacional de 6 años equivalen a 3, 6, 9, 12 y 15 mil años, respectivamente. Este horizonte abarca aproximadamente desde el último máximo glacial ubicado hace 15-20,000 años (Ganopolski *et al.* 1998; Lowell, 2000; Peteet, 2000). y estaría representando tan sólo el último 1.5% de la historia de *P. sinus* si ésta se remontara a 1 Ma.

Respecto a los tamaños de las poblaciones simuladas, se consideraron tamaños efectivos similares a los empleados en el escenario 1940, con excepción de $N_e = 300$ que fue sustituida por $N_e = 400$ (Abundancias de 1200-4000, respectivamente), para lograr una mejor representación de las tendencias en las gráficas de las simulaciones históricas.

II. 5. Resultados

II. 5.1. Polimorfismo SSCP de secuencias histocompatibles *DQB*

El análisis SSCP es un método rápido y eficiente para detectar 99% de las diferencias en un solo nucleótido entre fragmentos de 100-300 pb (Girman, 1996), y en el presente estudio se aplicó para la detección de la variación de secuencias de ADN en un fragmento del segundo exón del locus *DQB* de 25 individuos de *P. sinus*. En una muestra previa (Capítulo I) se habían analizado tres individuos mediante la secuenciación de 7 clonas de cada uno (21 clonas totales), en las cuales se encontró una única secuencia *Phsi-DQB*01*, indicando que los individuos eran homocigotos. En el presente estudio, 22 individuos adicionales (25 totales, Anexo 2) fueron analizados por SSCP junto con el alelo previamente clonado, y se analizaron sus respectivos fenotipos.

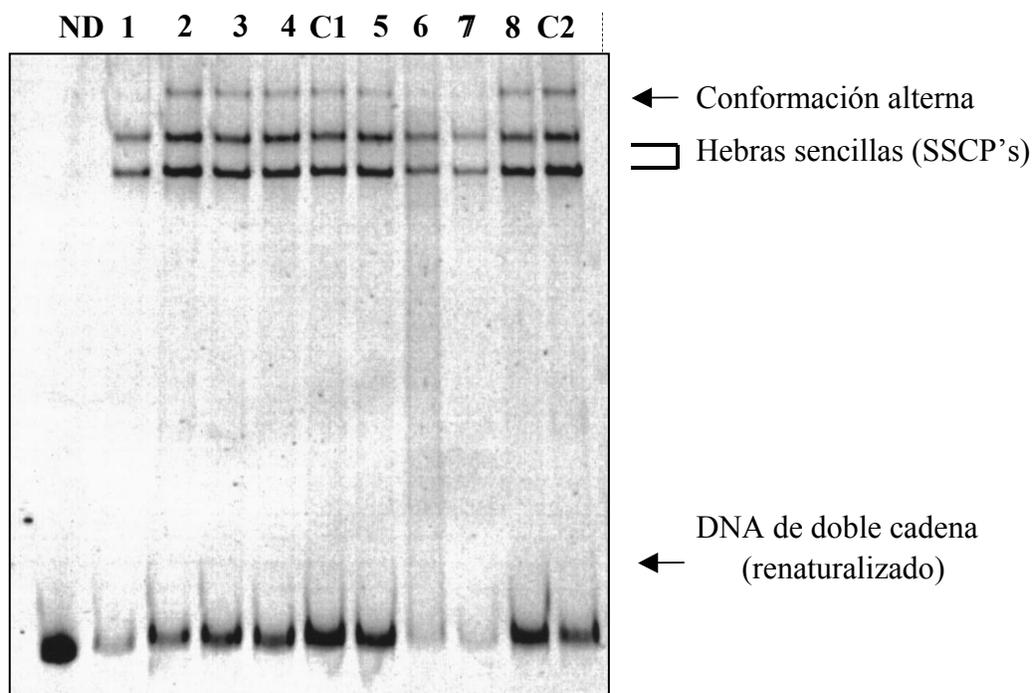


Figura 8. Monomorfismo SSCP para el locus *DQB* de *P. sinus*. 1-8 individuos de *P. sinus* homocigotos para el alelo *Phsi-DQB*01* (No. 2, 4, 7, 8, 12, 15, 16 y 18 del Anexo 2, respectivamente). ND= muestra No Desnaturalizada; C1 y C2 clonas del alelo *Phsi-DQB*01* aisladas de los individuos No. 8 y 18 del Anexo 2, respectivamente.

El análisis indicó que todos los individuos presentaban un fenotipo SSCP idéntico al del alelo *Phsi-DQB*01* aislado previamente, indicando que todos los individuos eran homocigotos para dicho alelo. La Figura 8 presenta un gel SSCP de los productos de amplificación del locus *DQB* en una muestra de 8 individuos, junto con dos de las secuencias aisladas a partir de las clonas. En ésta es posible observar una banda inferior correspondiente al ADN de doble cadena, y dos bandas intensas en posición superior que corresponden a dos hebras complementarias que indican la presencia de una sola molécula de ADN (alelo) en todos los individuos. En las secuencias aisladas de las clonas (C1 y C2 en Figura 8) consistentemente se observó durante los análisis SSCP la presencia de una banda extra en posición superior y de menor intensidad que se determinó como una conformación alterna de alguna de las hebras de la misma secuencia, y la cual se observaba también en algunos de los individuos cuando se cargaba un exceso de muestra (Figura 8) y durante el proceso de optimización (Anexo 3). Este tipo de conformaciones múltiples para una sola molécula de ADN en un análisis SSCP ha sido reportada con anterioridad (Sunnucks *et al.* 2000; Tebbe *et al.* 2001), y se explican como una proporción de moléculas de una misma secuencia de ADN que presentan más de una conformación estable de cadena sencilla bajo determinadas condiciones de corrida. Otro tipo de conformaciones alternas del alelo *Phsi-DQB*01* fueron también observadas durante el proceso de estandarización de los SSCP (Anexo 3), y al parecer estaban relacionadas con un exceso de ADN cargado en la muestra y con condiciones subóptimas de corrida.

Con el fin de confirmar los resultados sugeridos por el análisis SSCP, los productos de amplificación de cinco individuos adicionales (No. 1, 8, 9, 16, y 18 del Anexo 2) fueron clonados y secuenciados en ambos sentidos, y dos individuos más (No. 10 y 12 del Anexo 2) fueron secuenciados directamente (sin clonar). En todos los casos se confirmó que se trataba de individuos homocigotos para el alelo *Phsi-DQB*01*.

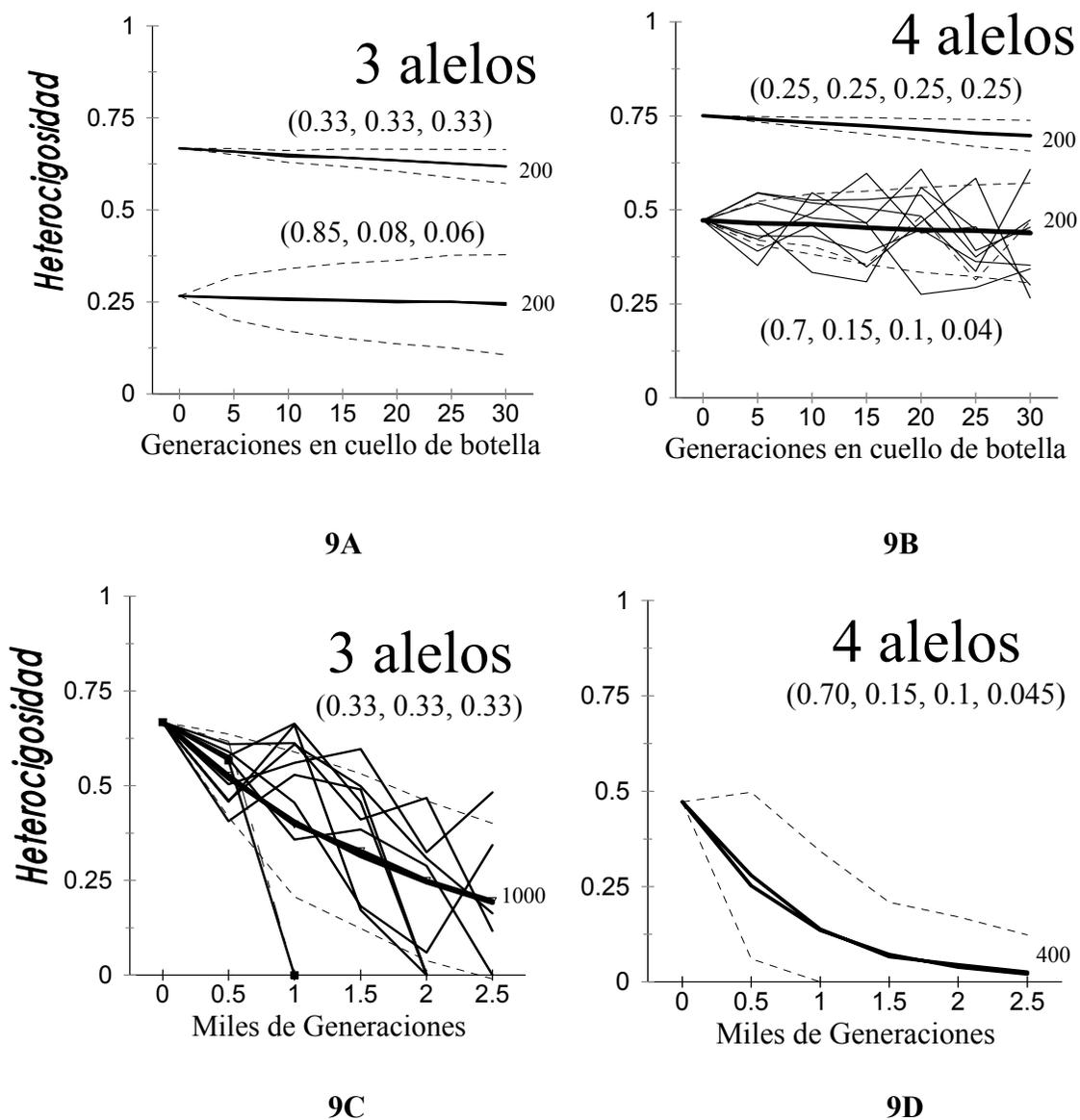
II. 5.2. Simulaciones del Proceso de Deriva Genética

La pérdida de variabilidad por deriva en épocas Recientes (200-300 años) e Históricas (15-20,000 años) fue simulada en un total de 66 poblaciones hipotéticas con distintos niveles de diversidad alélica inicial (2, 3 y 4 alelos en distintas frecuencias) y distintos tamaños ($N_e = 100$ a 2000) (Anexo 4).

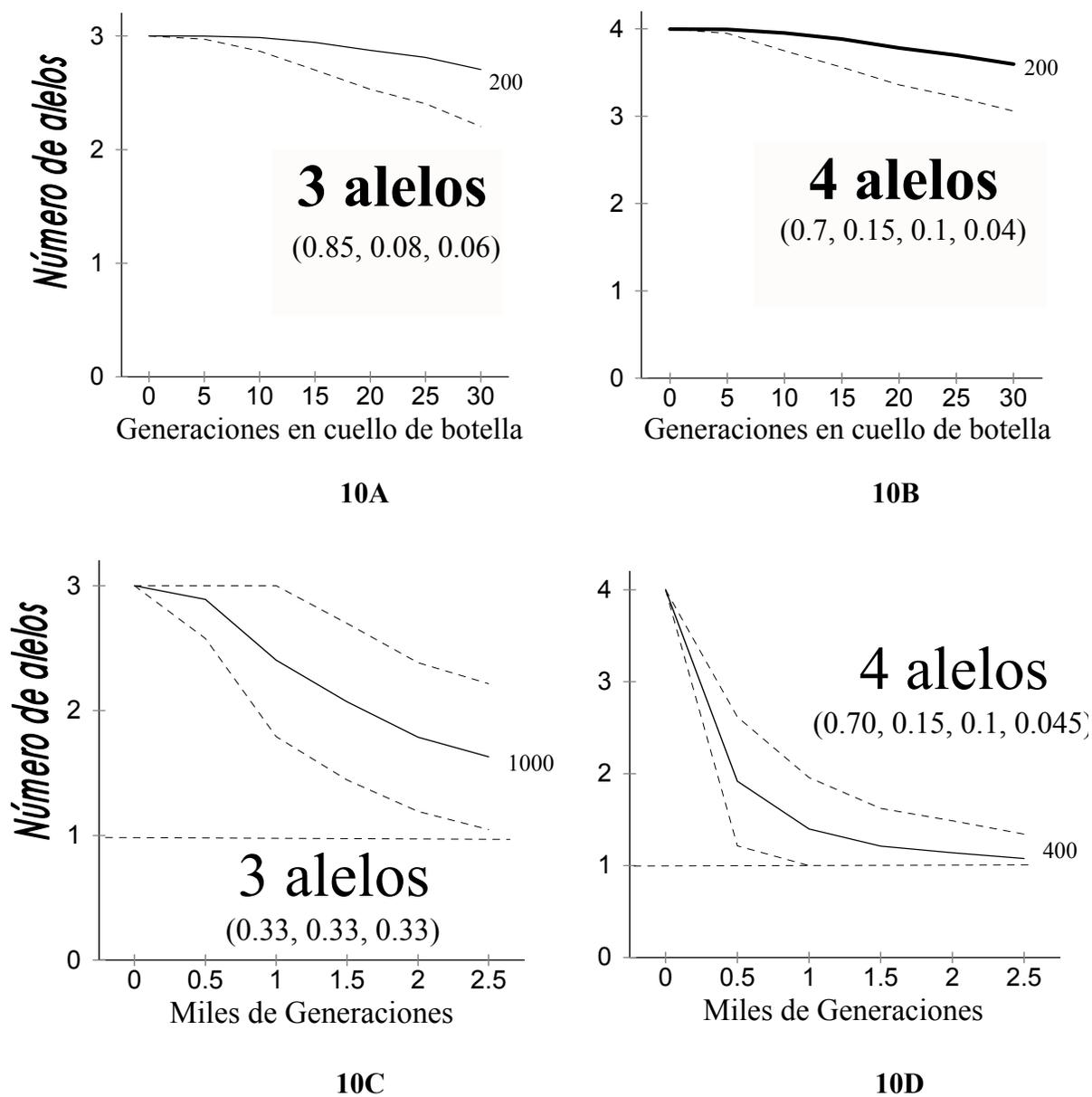
La heterocigosidad final esperada tras los cuellos de botella de distintos tamaños y duración fue calculada empleando dos aproximaciones distintas: un modelo exacto (solución analítica, Ecuación 2) y un modelo probabilístico empleando simulaciones computacionales (programa Geneloss), el cual permitió calcular también el número promedio de alelos esperado.

Los valores esperados de heterocigosidad promedio obtenidos mediante ambos métodos fueron prácticamente idénticos en los escenarios Recientes (Anexo 4). Entre los escenarios Históricos, el coeficiente de correlación (r) entre los resultados de ambos métodos fue $> 99\%$ en la mayoría de los casos, a excepción de algunos escenarios como los #3, #5 y #6 (Anexo 4) que presentaban sólo dos alelos iniciales siendo uno de ellos el predominante, y en los cuales el coeficiente de correlación fue ligeramente menor (93.3, 94.5 y 91.2%, respectivamente). Por ejemplo, en la Figura 9 se muestran ejemplos con 3 y 4 alelos, en los cuales es casi imposible discernir entre ambos métodos. En consecuencia, para graficar las pérdidas esperadas de heterocigosidad en las simulaciones realizadas (Fig. 11 y 13) se decidió mostrar sólo los valores promedio obtenidos mediante la solución analítica (Ecuación 2).

Los resultados presentados a continuación sobre la pérdida de heterocigosidad y número de alelos muestran sólo los valores promedio esperados, y aunque son útiles para descifrar tendencias generales es importante remarcar la naturaleza estocástica del proceso de deriva genética, la cual en realidad causa fluctuaciones considerables alrededor de la media.



Figuras 9 A-D. Variación observada alrededor de los valores promedio de heterocigosidad en escenarios Recientes e Históricos en poblaciones de distinto tamaño ($N_e = 200, 400$ y 1000) con 2, 3 y 4 alelos, cuyas frecuencias iniciales se indican entre paréntesis. La línea punteada indica la Desviación Estandar alrededor de la media (línea continua gruesa) calculada con Geneloss y la solución analítica, respectivamente. En las Figuras 9B y 9C se muestra también el comportamiento de diez iteraciones individuales en cada caso (líneas continuas delgadas). Los promedios obtenidos mediante métodos computacionales y analíticos son prácticamente iguales y se observan como una sola línea gruesa al centro de las distribuciones.



Figuras 10 A-D. Ejemplos de la variación observada en el número promedio de alelos en las simulaciones (reciente e histórico) en poblaciones de distintos tamaños ($N_e=200, 400$ y 1000 respectivamente) con 3 y 4 alelos cuyas frecuencias iniciales se indican entre paréntesis. La línea punteada indica la Desviación Estandar alrededor de la media (línea continua) calculada con Geneloss.

Al respecto, con el programa Geneloss se calcularon también los valores de desviación estandar (D.E.) alrededor de los valores promedio esperados con base en la distribución generada en las series de iteraciones (England y Osler, 2001) (Anexo 4). Por ejemplo, en las Figuras 9B y 9C se presenta una muestra de 10 iteraciones alrededor de la heterocigosidad promedio, en donde se observa que en realidad el comportamiento de una población en particular (iteración) fluctúa alrededor de la media, pudiendo presentarse incluso incrementos momentáneos respecto a la heterocigosidad inicial en algunos casos. Los valores de desviación estándar (Figuras 9 y 10, líneas punteadas) alrededor de la media calculadas por Geneloss (Anexo 4) en general se incrementaron conforme aumentaba el número de generaciones simuladas. En la Figura 10 se muestran también algunos ejemplos de las desviaciones estándar alrededor del promedio de alelos en escenarios recientes e históricos para 3 y 4 alelos que se discuten más adelante.

II. 5.2.1. Escenarios Recientes

Las Figuras 11 y 12 muestran los valores esperados de heterocigosidad y número de alelos para 30 distintos escenarios tras 30 generaciones simuladas de deriva. Los valores de heterocigosidad promedio (Fig. 11) se vieron poco afectados en un periodo de 30 generaciones. Tras 10 generaciones, el efecto observado fue aún menor (línea punteada vertical, Fig. 11). Los escenarios con alelos en frecuencias iguales mostraron disminuciones ligeramente menores que los escenarios con un alelo dominante. Las poblaciones más pequeñas simuladas ($N_e = 100$), por ejemplo, mostraron una pequeña reducción de pocos puntos porcentuales, mientras que poblaciones con $N_e = 2000$ prácticamente no mostraron ningún efecto. En ninguno de los casos se observó la pérdida total de heterocigosidad.

Respecto al número promedio de alelos (Figura 12), los resultados variaron dependiendo de la distribución de frecuencias iniciales. Los escenarios con dos, tres y cuatro alelos en frecuencias uniformes no mostraron reducción en el número de alelos promedio por deriva tras 30 generaciones (Figura 12B). Por otro lado, en los escenarios con un alelo dominante, se observaron reducciones moderadas sólo cuando $N_e = 100, 200$ y

300, mientras que con $N_e > 600$, no se observó cambio. En ninguno de los casos se observó la disminución en el número de alelos a un valor igual a 1 (fijación). El análisis de las tasas de retención de los alelos mostró que la probabilidad de pérdida dependía de su frecuencia inicial, y en todos los casos la tasa de retención del alelo dominante fue siempre del (100%), lo que implica que las disminuciones observadas en éstos escenarios se debían a la pérdida de los alelos menos frecuentes (Anexo 4).

Por ejemplo, tomando en cuenta el escenario más drástico (la población más pequeña simulada, $N_e = 100$), en el escenario de menor diversidad (escenario #1 en Anexo 4, 2 alelos iniciales en frecuencias 0.93 y 0.07, Figura 12A), se observa una pérdida del alelo menos frecuente en el 42% de las iteraciones tras 30 generaciones (inverso de tasa de retención en Anexo 4), y tan sólo en un 10% tras 10 generaciones. Para el escenario con 3 alelos (escenario #11 en Anexo 4, Figura 12C), cuando $N_e = 100$ en un 78% de las iteraciones se perdió alguno de los dos alelos menos frecuentes tras 30 generaciones, mientras que tan sólo 16% perdió algún alelo tras 10 generaciones. En el caso de 4 alelos presentes (Figura 12D), es casi segura la pérdida de algún alelo tras 30 generaciones (96%), sin embargo, tras 10 generaciones la pérdida de un alelo ocurrió en sólo el 10% de los casos.

II. 5.2.2. Escenarios Históricos

Las Figuras 13 y 14 muestran los valores esperados de heterocigosidad y número de alelos tras las 2500 generaciones de deriva en 36 distintos escenarios. Como puede suponerse de la Ecuación 2, la pérdida de heterocigosidad por deriva (Figura 13) mostró una disminución que describe una curva decaimiento exponencial proporcional al tamaño efectivo de la población. La pérdida de alelos (Figura 14), aunque mostró un comportamiento similar, en general se vio menos afectada que la heterocigosidad.

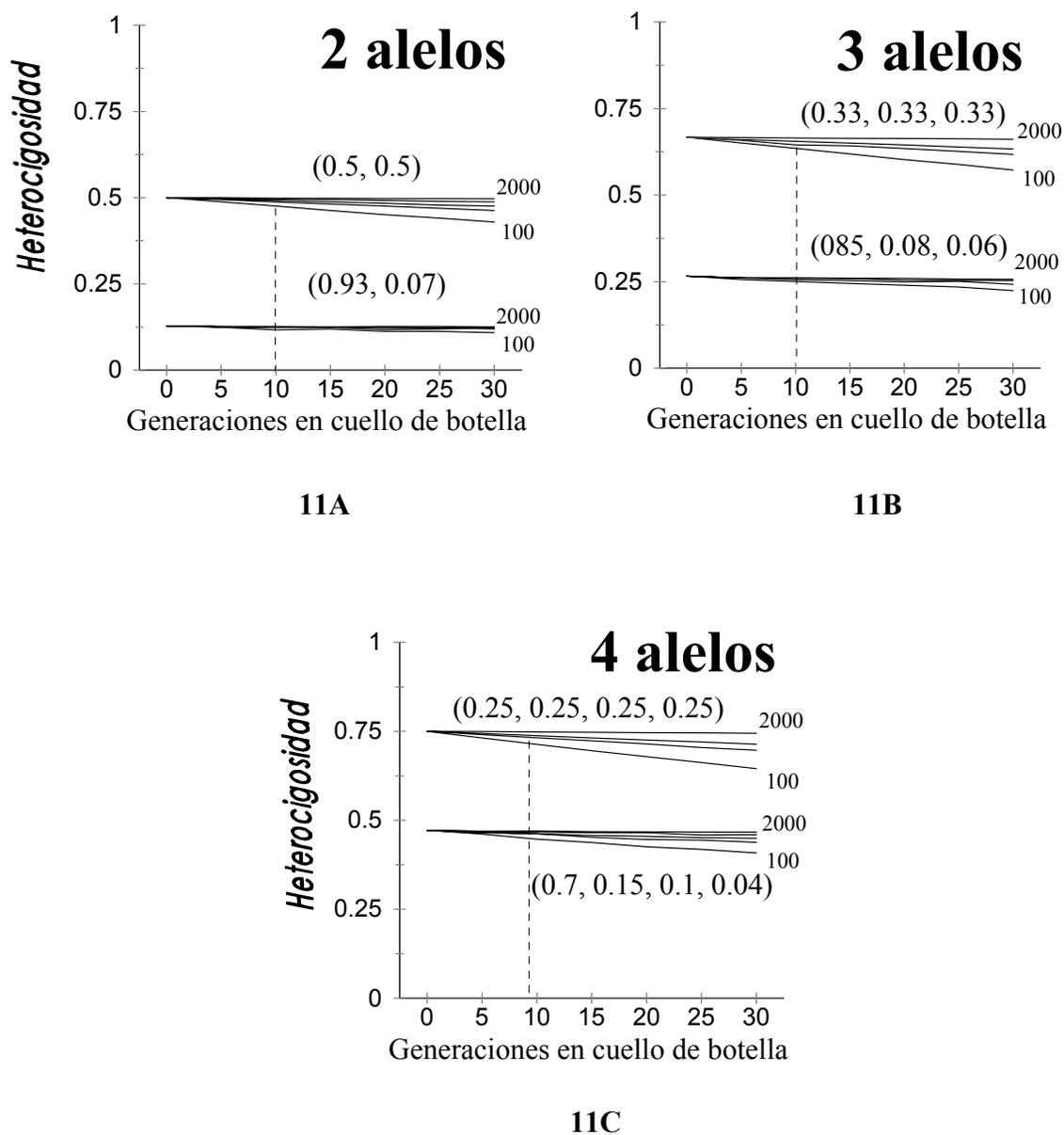


Figura 11 A-C. Disminución en la heterocigosidad esperada tras 30 generaciones en cuellos de botella con N_e de cientos (100 200, 300, 600) a N_e 2000 individuos, para escenarios con 2, 3 y 4 alelos cuyas frecuencias iniciales se indican entre paréntesis. La línea punteada vertical indica aprox. 10 generaciones transcurridas desde el inicio de la mortalidad incidental de *P. sinus* en 1940. Las líneas indican los promedios calculados con la Ecuación 2 (Anexo 4).

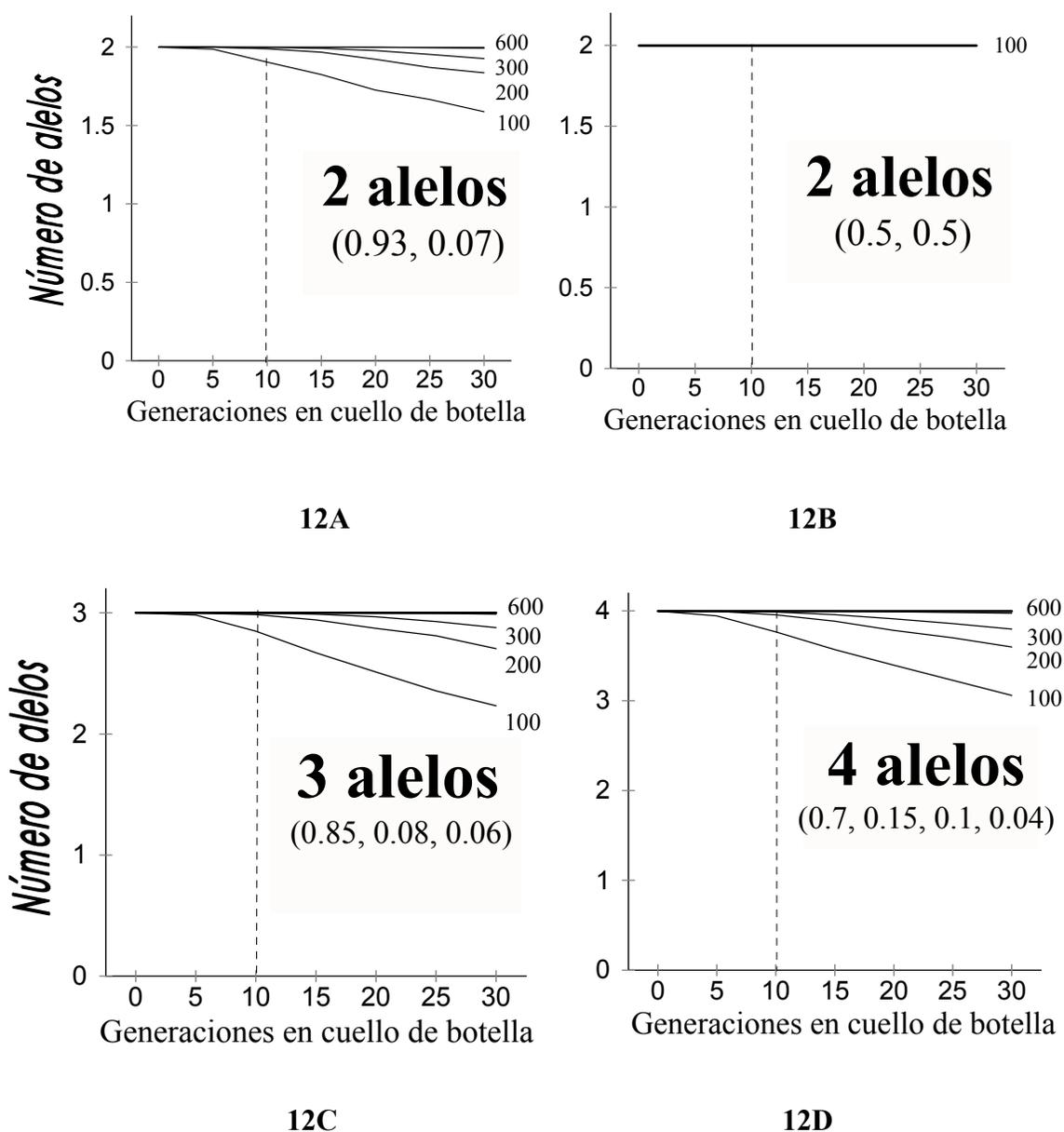


Figura 12 A-D. Pérdida esperada de alelos tras 30 generaciones en cuellos de botella de tamaños $N_e = 100, 200, 300, 600$ y 2000 individuos, con 2, 3 y 4 alelos cuyas frecuencias iniciales se indican entre paréntesis. La línea punteada indica aprox. 10 generaciones transcurridas desde el inicio de la mortalidad incidental en 1940. Los escenarios con 3 y 4 alelos presentes en frecuencias uniformes (0.334, 0.333, 0.333 y 0.25, 0.25, 0.25 y 0.25, respectivamente), en ningún caso tampoco mostraron disminución en el número de alelos (Fig. 12B), aún para la población más pequeña ($N_e = 100$), y por brevedad no se muestran. Las líneas indican los promedios de 3000 iteraciones calculadas con el programa Geneloss (Anexo 4).

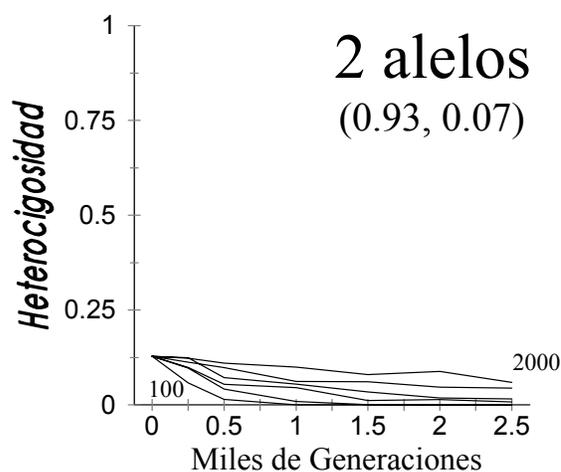
El efecto de la deriva sobre la heterocigosidad (Figura 13) y el número de alelos (Figura 14) fue mucho mayor en las poblaciones donde $N_e = 100$ y 200 , las cuales fueron las únicas cuyos valores promedio indicaron la fijación estricta de un solo alelo, independientemente de si se presentaban al inicio 2, 3 o 4 alelos. Cuando $N_e = 100$ y una distribución de frecuencias con un alelo dominante (Figuras 13 y 14 A,C y E, respectivamente), la fijación ocurrió tras ~ 500 generaciones, mientras que cuando $N_e = 200$ se requirieron ~ 1000 generaciones. En contraste, cuando la distribución de frecuencias era uniforme (Figuras 13 y 14 B, D y F, respectivamente), la fijación se retrasó hasta ~ 1000 generaciones para $N_e = 100$, y ~ 1500 para $N_e = 200$.

Todas las poblaciones con $N_e = 400$ mostraron un comportamiento similar: los valores promedio de heterocigosidad y número de alelos se aproximaron a la fijación siempre hacia el final de la simulación tras 2500 generaciones, mientras que el efecto de una distribución de frecuencias uniforme fue de retrasar solo mínimamente la pérdida de heterocigosidad y alelos (Figura 13 y 14).

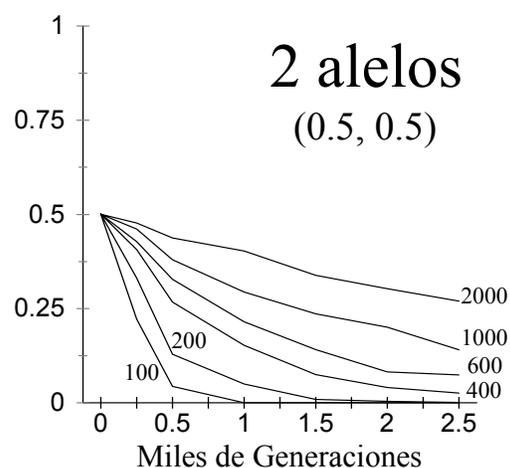
En el resto de las poblaciones con $N_e = 600$, 1000 , y 2000 , sus valores promedio no se redujeron hasta la fijación. En éstas se observa de manera más clara un retraso en la pérdida de heterocigosidad y número de alelos en aquellos escenarios que parten de una distribución con frecuencias iguales respecto a los que presentan un alelo dominante. Cuando $N_e = 600$, los valores promedio se ven reducidos críticamente en el caso de las distribuciones con un alelo dominante, y cuando hay sólo 2 alelos (Figura 13A y 14A) parece ocurrir la fijación.

En las poblaciones donde $N_e = 1000$, y particularmente $N_e = 2000$, la fijación parece ser un evento poco probable aún tras las 2500 generaciones, y particularmente en los escenarios con frecuencias iniciales uniformes. En el caso de los escenarios con una distribución inicial con frecuencias iguales, poblaciones con $N_e = 1000$ mantuvieron al final de las simulaciones un promedio de poco menos de la mitad de su valor de heterocigosidad inicial, mientras que con $N_e = 2000$ se mantuvo más de la mitad (Figuras 13 B, D y F). Lo mismo puede ser dicho también para el número promedio de alelos en estos escenarios (14

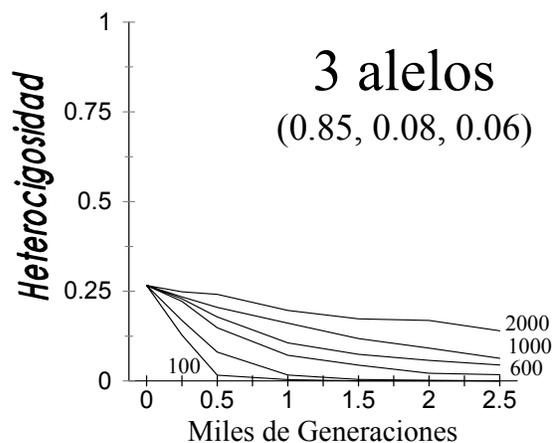
B, D y F). En contraste, en el caso de los escenarios con una distribución en la que uno de los alelos es dominante, poblaciones con $N_e = 2000$ mantuvieron en promedio aproximadamente tan sólo la mitad de sus valores de heterocigosidad, y un número promedio de alelos aún menor.



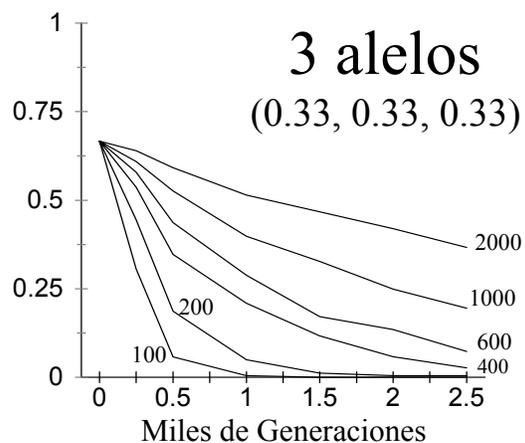
13A



13B



13C



13D

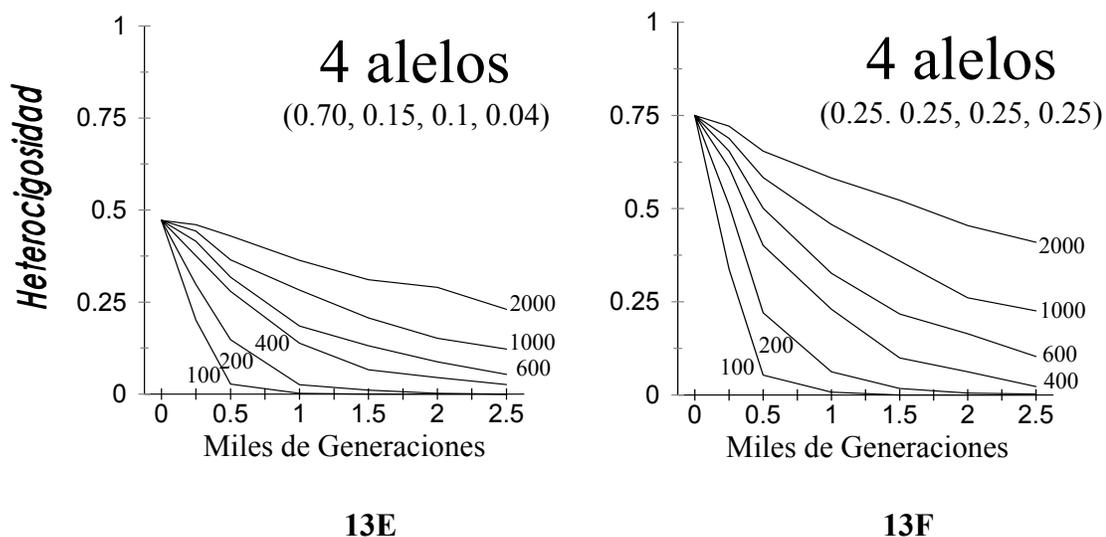
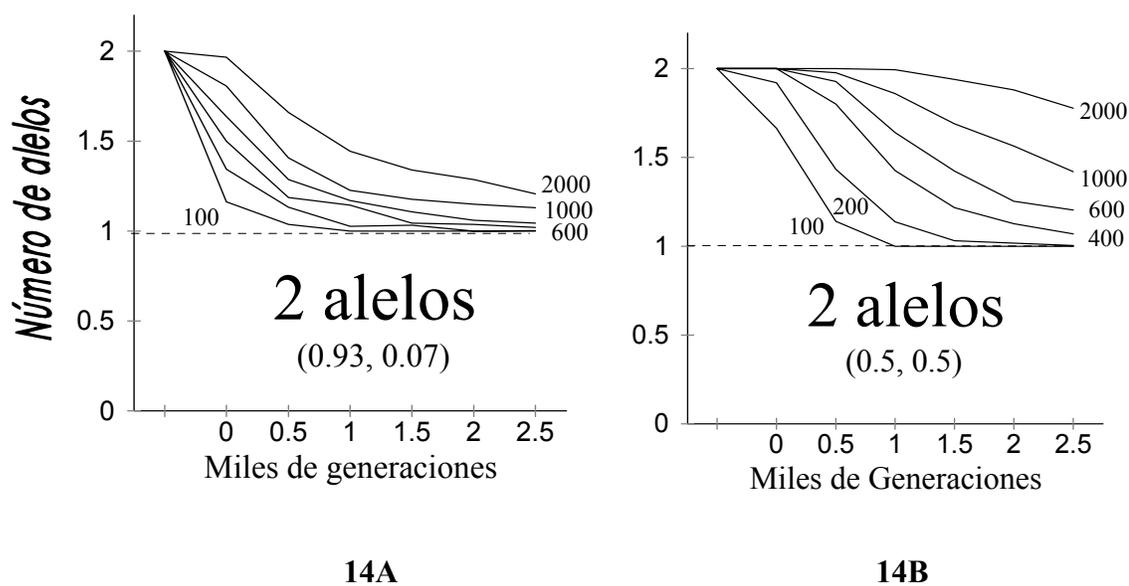


Figura 13 A-F. Disminución en la heterocigosidad esperada por deriva tras 2500 generaciones en poblaciones con tamaños $N_e = 100, 200, 400, 600, 1000$ y 2000 individuos, con 2, 3 y 4 alelos cuyas frecuencias iniciales se indican entre paréntesis. Las líneas indican los promedios calculados con la Ecuación 2 (Anexo 4).



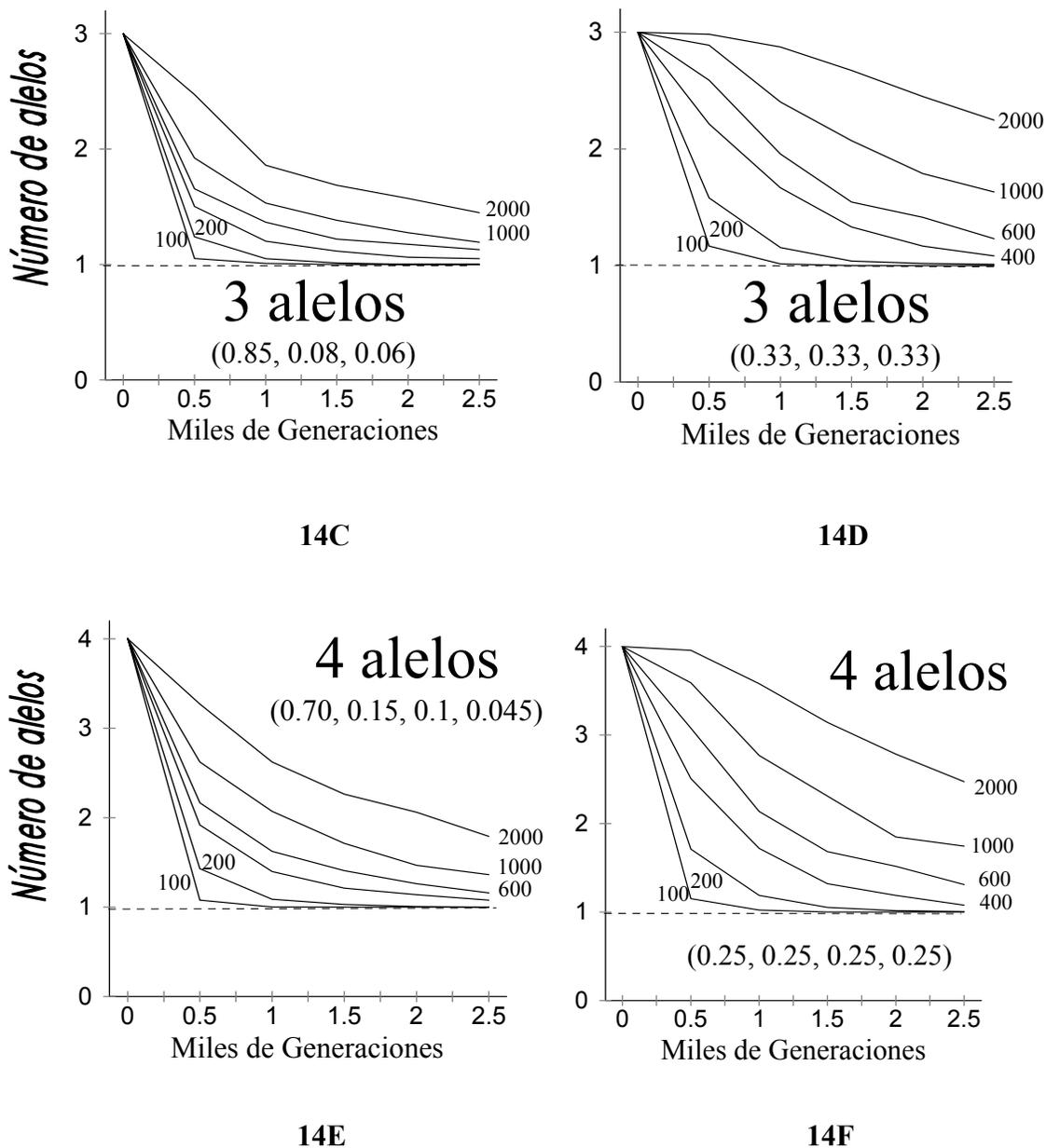


Figura 14 A-F. Pérdida esperada de alelos por deriva tras 2500 generaciones en poblaciones de tamaños $N_e = 100, 200, 400, 600, 1000$ y 2000 individuos, con 2, 3 y 4 alelos cuyas frecuencias iniciales se indican entre paréntesis. La línea punteada indica la fijación cuando el Número de alelos es igual a 1. Las líneas indican los promedios de 300 iteraciones calculadas con el programa Geneloss (Anexo 4).

II.6 Discusión

El análisis SSCP del segundo exón del locus *DQB* de *P. sinus* mostró que de manera similar para la región control mitocondrial previamente analizada por Rosel y Rojas-Bracho, (1999), todos los individuos presentaban fijo un sólo alelo (*Phsi-DQB*01*). 21 de los 25 especímenes empleados en este estudio fueron analizados también para la región control (Anexo 2). Ambos marcadores moleculares sugieren que *P. sinus* constituye un caso extremo y sin precedente de uniformidad genética entre los individuos de una especie que se encuentran constituyendo una única población.

Estudios recientes en el *Mhc* de otras especies de mamíferos marinos empleando técnicas similares (SSCP+secuenciación), han revelado la presencia de un polimorfismo moderado y poco menor que el presente en mamíferos terrestres, contradiciendo reportes previos que indicaban niveles reducidos de polimorfismo de restricción (RFLP's) en el *Mhc* de mamíferos marinos, presumiblemente debido a una menor exposición a parásitos comparado con sus contrapartes terrestres (Trowsdale *et al.* 1989; Slade, 1992). Por ejemplo, En poblaciones de Norteamérica de la beluga *Delphinapterus leucas*, el análisis SSCP de los segundos exones revelaron 5 alelos *DQB* (n= 233, empleando el mismo par de primers que en el presente estudio) y 8 DRB1 (n= 313), mientras que en el narval *Monodon monoceros* se encontró en una pequeña muestra (n=12) sólo 1 alelo *DQB* y 3 DRB1 (Murray *et al.* 1995; Murray *et al.* 1998). En el presente estudio, de una muestra de 2 individuos de la ballena gris *Esrichtius robustus* analizados con fines comparativos (Capítulo I), se aislaron 3 secuencias *DQB* distintas. Por otro lado, un estudio reciente en las Franciscanas *Pontoporia blainvillei*, indican “el mismo patrón de bandeo” en el análisis SSCP del locus *DQB*, no obstante los autores (Heinzelmann *et al.* 2001) no explican si se trata de individuos homocigotos o heterocigotos.

Por su parte, Hoelzel *et al.* (1999), en un análisis por SSCP de la divergencia del locus *DQB* en pinípedos, reporta en el segundo exón 8 alelos para el elefante marino del Sur *Mirounga leonina* (n= 109), 2 para el elefante marino del Norte *Mirounga*

angustirostris (n= 69), 4 para el lobo fino Antártico *Arctocephalus gazella* (n= 13), y 4 para el lobo fino de Nueva Zelanda *Arctocephalus fosteri* (n=19).

Comparativamente, mamíferos terrestres muy abundantes como el humano *Homo sapiens*, el ratón *Mus musculus* y el ganado bovino *Bos taurus* presentan respectivamente 25, 34 y 9 alelos *DQB* (Gu y Nei, 1999; She *et al.* 1991; Sigurdardóttir *et al.* 1992).

II.6.1. Pérdida Reciente de Variación Genética por Deriva

Desde el siglo XVIII, las poblaciones de numerosas especies silvestres de mamíferos terrestres y marinos se han visto severamente reducidas debido a la sobrexplotación por caza y la reducción o fragmentación de su hábitat por actividades relacionadas con el hombre.

La ausencia de variabilidad en el locus *DQB* de *P. sinus* fue evaluada en el contexto del probable efecto que la mortalidad incidental en redes de pesca iniciada en 1940 podría haber tenido en la pérdida de variabilidad genética por deriva debido a una reducción en el tamaño efectivo de la población hasta los niveles actuales, ($N_e \sim 200-300$ individuos). Las simulaciones mostraron que, independientemente de los niveles de variabilidad inicial considerados, en los últimos 60 años (~ 10 generaciones, línea punteada en las Fig. 11A-C, y 12A-D) la pérdida esperada de variabilidad genética por deriva en poblaciones del tamaño actual de *P. sinus* ($N_e = 200-300$) sería realmente mínima, aún considerando la variación alrededor de la media expresada por los valores de desviación estándar (Fig. 9 y 10 A y B, respectivamente, Anexo 4).

Aún en el caso extremo de $N_e = 100$ parece imposible la fijación de un solo alelo en algún escenario tras sólo 10 generaciones (Ver Resultados y Anexo 4), y ni siquiera tras las 30 generaciones simuladas parece haber una reducción considerable en la heterocigosidad o en el número de alelos, con la posible excepción de $N_e = 100$ en el escenario con los niveles iniciales más bajos de polimorfismo (2 alelos en frecuencias 0.93 y 0.07, Fig. 11A y 12A), en el que si bien los valores promedio de heterocigosidad no cambian considerablemente,

existiría casi un 50% de probabilidad de pérdida para el alelo menos común tras 30 generaciones (Ver Tasas de Retención, Escenario Reciente #1, Anexo 4).

En consecuencia, la fijación en el locus *DQB* de *P. sinus* no podría ser el resultado de la reducción reciente de la población debida a la mortalidad incidental, lo cual confirma las simulaciones realizadas por Taylor y Rojas-Bracho (1999) para la región control mitocondrial que sugieren que la ausencia de variación en la especie es un rasgo histórico.

Los resultados indicaron que aún 30 generaciones de deriva (equivalentes a 300 años considerando un tiempo generacional de 10 años), no son suficientes para erosionar considerablemente los niveles de variabilidad genética en una población como la de *P. sinus* reducida a un número efectivo de pocos cientos de individuos. Al respecto, estudios teóricos realizados por Amos (1996) sugirieron que los niveles de variación genética en las poblaciones de mamíferos marinos no habrían sido afectados severamente por el hombre en los últimos siglos, y de manera similar, un estudio reciente que incluye 80 poblaciones en declive de mamíferos en peligro de extinción demostró, de acuerdo con la teoría, que 90% de las poblaciones habrían perdido menos del 10% de sus valores de heterocigosidad inicial (Menchini *et al.* citado en Amos y Balmford, 2001). Por ejemplo, el lobo fino Antártico *Arctocephalus gazella* y el lobo fino tropical *A. tropicalis* que fueron severamente diezmos en los siglos XVIII y XIX a tamaños efectivos de probablemente pocos cientos de individuos a principios del siglo XX, muestran pocas evidencias de erosión genética al presentar numerosos alelos para la región control mitocondrial en poblaciones actuales muy abundantes que cuentan varias decenas de miles de individuos (Wynen *et al.* 2000). De manera similar, en la ballena franca *Balaena mysticetus* el polimorfismo en microsatélites y en la región control que muestran numerosos alelos no se vió afectado por un cuello de botella de ~1000 individuos a principios del siglo XX (Rooney *et al.* 2001). El rinoceronte de un solo cuerno *Rhinoceros unicornis* en Nepal, que fue reducido a menos de 100 individuos en 1962, en la actualidad cuenta unos 400 individuos también mantienen niveles elevados de heterocigosidad (9.9%) en 29 loci de isozimas (Dinerstein y McCracken, 1990).

No obstante, si el número efectivo se ve reducido severamente a tan sólo unos cuantos individuos, la pérdida de variabilidad puede ser considerable. Por ejemplo, la población de Kestrels *Falco punctatus* de la isla Mauricio fue reducida hasta menos de 50 individuos durante ~40 años, en los cuales en 1974 sobrevivió quizá sólo una pareja; la población que en la actualidad se estima en 400-500 individuos muestra una pérdida del 55% en la diversidad alélica y un 57% en heterocigosidad en 12 loci microsatélites (Groombridge *et al.* 2000).

Por otro lado, el bisón europeo *Bison bonasus* que fué reducido hasta un número efectivo $N_e \sim 10$ a principios del siglo XX y que actualmente cuenta con más de 3000 individuos, muestra una heterocigosidad de tan sólo el 1.2% en 69 loci de isozimas (Hartl y Pucek, 1994), aunado a una variación muy reducida en el locus DRB3 del *Mhc* y a un monomorfismo en la región control mitocondrial de acuerdo con estudios de polimorfismos de restricción (Tiedemann *et al.* 1998).

La población de lobos *Canis lupus* de la Isla Royale en Canadá que fundada en 1950 por una pareja y reducida en la actualidad a sólo dos o tres parejas reproductivas muestra una reducción del 50% en la heterocigosidad de isozimas, y un sólo haplotipo mitocondrial medido por fragmentos de restricción (Wayne *et al.* 1991). De manera similar, el oryx arabigo *Oryx leucoryx* presenta una variación genética reducida con tan sólo 3 alelos DRB, consistente con un cuello de botella de 10-18 individuos en 1960 y cuya población actualmente comprende más de 2000 individuos (Hedrick *et al.* 2000b).

Un caso interesante y comúnmente citado es el elefante marino del Norte *Mirounga angustirostris*, que fué reducido a menos de 100 individuos ($N_e \sim 20-30$) hacia finales del siglo XIX, y que no muestra variación en 24 loci de isozimas, y presenta tan sólo 2 alelos mitocondriales y 2 alelos *DQB* en una población actual que cuenta con más de 100,000 individuos (Bonnell y Selander, 1974; Hoelzel *et al.* 1993; Hoelzel *et al.* 1999). Aunque en estos estudios la escasa variación observada ha sido atribuída al cuello de botella referido, varios autores han remarcado con base en comparaciones teóricas respecto al elefante marino del Sur *Mirounga leonina*, que la corta duración del mismo (sólo 2 o 3

generaciones) explicaría sólo la severa pérdida de variabilidad en genes mitocondriales, pero no es consistente con una variación tan reducida en genes nucleares (Hedrick, 1995; Amos y Balmford, 2001).

II.6.2. Pérdida Histórica de Variación Genética por Deriva

Para estimar el tamaño efectivo (N_e) y el tiempo necesarios para explicar la fijación histórica de un alelo en el locus *DQB* de *P. sinus*, se realizó una segunda serie de simulaciones en la que el número de generaciones se extendió hasta 2500, que considerando un tiempo generacional de 6 años estarían representando aproximadamente el tiempo transcurrido desde el fin del periodo Pleistoceno (~15,000 años).

En las Figuras 13 y 14 se observa que en promedio la fijación estricta de un sólo alelo en dicho periodo ocurrió sólo cuando N_e era ≤ 400 . No obstante, tomando en consideración los valores de desviaciones estándar alrededor de los valores promedio de heterocigosidad y número de alelos (Escenarios Históricos, Anexo 4), es probable que la fijación ocurriera en algunos casos también cuando $N_e = 600$. En el caso de $N_e = 1000$ y 2000 la reducción de variabilidad es moderada y la fijación puede considerarse poco probable aún considerando la desviación estándar alrededor de la media (Escenarios Históricos, Anexo 4, Figura 9C), y en particular para los escenarios con distribución inicial de frecuencias iguales. Esto implica que para explicar la fijación observada en el *DQB* la población de *P. sinus* tendría que haber presentado probablemente una $N_e \leq 600$ desde tiempos históricos, por lo que nunca habría sido una población muy abundante en el pasado.

Respecto al tiempo en el que se observó la fijación, las simulaciones mostraron que independientemente del número de alelos presentes al inicio, cuando $N_e = 100$ y 200 la fijación ocurrió en promedio tras ~500 y ~1000 generaciones en el caso de un alelo dominante, o tras ~1000 y ~1500 generaciones cuando la distribución de frecuencias alélicas era uniforme, respectivamente (Fig. 13 y 14). Para $N_e = 400$ y 600, los valores promedio de heterocigosidad y número de alelos se acercaron a cero hacia el final de las

simulaciones (tras ~2500 generaciones), particularmente en los escenarios con un alelo dominante (Fig. 13 y 14), no obstante, considerando los valores de desviación estándar para $N_e=400$, la fijación podría ocurrir desde las ~1000 generaciones (Escenarios Históricos, Anexo 4, Fig. 9D), o bien cuando $N_e= 600$ desde las ~1500 generaciones.

Estimaciones similares a las de las simulaciones se obtienen considerando el tiempo promedio de coalescencia para genes nucleares neutros ($4N_e$ generaciones). Por ejemplo, tomando $N_e= 200$ el tiempo de coalescencia se sitúa en 800 generaciones, y para $N_e= 300$ corresponde a 1200 generaciones. En el caso de $N_e= 400$ y 600, los tiempos de coalescencia abarcan un promedio de 1600 y 2400 generaciones, respectivamente. Comparativamente, el tiempo de coalescencia para genes mitocondriales neutros (N_e generaciones) indica que la fijación habría sido 4 veces más rápida. Por ejemplo, considerando la región control mitocondrial analizada por Rosel y Rojas-Bracho (1999), los tiempos promedio de coalescencia para la población actual de *P. sinus* (N_e 200-300) se estiman en tan sólo 200-300 generaciones.

Las simulaciones del proceso de fijación histórica por deriva genética realizadas en este trabajo indican, de manera general, que la población de *P. sinus* no ha sido mucho más abundante en el pasado de lo que es ahora, y que su tamaño efectivo histórico corresponde muy probablemente a $N_e \leq 600$, que por ejemplo, considerando $N_e \sim 1/3$ de N (Nunney, 1993), correspondería a abundancias poblacionales históricas de $N \leq 1800$ individuos, es decir, tan sólo ~2 o 3 veces su abundancia actual estimada alrededor de 600 (Jaramillo-Legorreta et al. 1999). Por otro lado, las simulaciones y la teoría de coalescencia indican que la población de *P. sinus* se habría mantenido en tales abundancias (Ej. $N_e= 400$ o 600) al menos durante las últimas ~1000-1500 generaciones, que acorde a un tiempo generacional de 6 años, equivale a un rango de por lo menos 6-9,000 años, pudiendo extenderse en promedio con facilidad hasta unas 2500 generaciones, es decir, los 15,000 años desde el Fin del Pleistoceno. En el caso de considerar el tiempo generacional empleado por Taylor y Rojas-Bracho (1999), los límites inferiores corresponderían a 10-15,000 años, pudiéndose extender hasta 25,000 años.

Dado que los modelos empleados no consideran los efectos de la selección ni de la mutación en la estructura genética del locus *DQB*, es muy probable que el periodo de fijación en realidad sea mucho mayor. Es bien conocido que los genes del *Mhc*, así como otros sistemas genéticos sujetos a fuertes presiones de selección como las Inmunoglobulinas en vertebrados o el Sistema SI de Auto-Incompatibilidad en plantas presentan un tipo de polimorfismo transespecífico (Takahata, 1990; Nei *et al.* 1997; Clark, 1997; Gu y Nei, 1999) , en el cual la selección mantiene los alelos durante periodos tan largos que algunos de ellos parecen haber pasado a través de varios eventos de especiación, sobrepasando por mucho el tiempo promedio de vida de las especies, calculado en 2 M.a.(Stanley, 1975). Por ejemplo, el polimorfismo DRB1 más antiguo presente en el humano data de 55 M.a. mientras que para *DQB1* se ha calculado en 28 M.a. (Klein *et al.* 1998). Al respecto, algunos estudios han reportado polimorfismos transespecíficos en secuencias *Mhc* clase I de ballena gris con secuencias de ungulados (Flores-Ramírez *et al.* 2000), así como en secuencias *DQB* de cuatro especies de pinípedos (Hoelzel *et al.* 1999) .

Por ejemplo, en las simulaciones realizadas, los escenarios cuya distribución de frecuencias alélicas iniciales era uniforme, como sería el caso de los genes del *Mhc* sujetos a una selección balanceadora (Hedrick *et al.* 1991; Salamon *et al.* 1999), mostraron un retraso en la pérdida del número de alelos respecto a cuando estaba presente un alelo dominante. En el escenario Reciente ninguna de las poblaciones simuladas con 2, 3 o 4 alelos en frecuencias iguales mostró una reducción siquiera perceptible tras 30 generaciones de deriva (Fig. 12B), con excepción de una pequeña disminución observada cuando $N_e = 100$ de acuerdo a los valores de desviación estándar (Anexo 4). En el escenario Histórico, la presencia de alelos en frecuencias iguales retrasó ~500 generaciones la fijación para $N_e 100$ y 200 (Fig. 13 y 14), mientras que para $N_e 1000$ y 2000 en dichos escenarios se mantienen hacia el final de la simulación un número promedio de alelos considerablemente mayor. Por ejemplo, en el caso de 3 alelos, poblaciones con $N_e 1000$ y 2000 muestran un promedio final de 1.19 y 1.45 alelos cuando hay un alelo dominante, respectivamente (Fig. 14C, Escenarios Históricos 17 y 18 respectivamente, Anexo 4).,

mientras que cuando las frecuencias son iguales los valores promedio finales se incrementan a 1.63 y 2.24 alelos (Fig. 14D, Escenarios Históricos 23 y 24 respectivamente, Anexo 4).

Por otro lado, respecto a la mutación, la teoría predice que la reconstitución de la diversidad genética es lenta y actúa en escalas de tiempo en el orden del recíproco de la tasa de mutación por locus. Por ejemplo, considerando la tasa de mutación estimada por Satta *et al.* (1994) para los genes clase II del *Mhc* humano (7.5×10^{-7} por PBR por generación), y considerando las 2500 generaciones consideradas en las simulaciones, se esperarían tan sólo 0.0018 sustituciones de nucleótidos, y un número aún menor en el segundo exón analizado que corresponde a $\frac{1}{2}$ de la PBR, por lo que es evidente que en el periodo de tiempo considerado existe una muy baja probabilidad de que se generaran nuevos alelos *DQB* por mutación.

En conclusión, aunque las simulaciones no consideraron de manera explícita el efecto de la mutación, la generación de nuevos alelos sería un evento muy poco probable en el periodo considerado. Por otro lado, la selección balanceadora podría retardar el tiempo de fijación hasta en uno o dos órdenes de magnitud en *comparación* con la predicción de la teoría neutral (Ej. Klein *et al.* 1998). Lo anterior hace suponer que el límite inferior estimado para que ocurriera la fijación (1000-1500 generaciones) cuando $N_e \leq 600$, esté en realidad subestimado, por lo que el tiempo que la población de *P. sinus* habría sido pequeña se podría incrementar, considerando el efecto de la selección natural sobre el locus *DQB*, al menos un orden de magnitud, es decir, de 6-10,000 años de acuerdo a la teoría neutral, hasta 60-100,000 años en presencia de la selección natural.

II.6.3. Evaluando la Depresión por Endogamia en *P. sinus*

Con base en el análisis de la región control (Rosel y Rojas-Bracho, 1999), así como en el análisis del locus *DQB* del *Mhc*, el nivel de Endogamia presente en la especie es altísimo. De acuerdo a la Ecuación 1, el coeficiente de Endogamia en *P. sinus* es $F_{it} = 1$.

También es muy probable que los alelos fijados en cada uno de los individuos provengan todos de un mismo alelo ancestral ($F = 1$).

En el contexto de un tamaño poblacional muy reducido (probablemente $N_e \leq 600$) en tiempos históricos (+6-10 mil años) ¿Cuál sería el grado de Depresión por Endogamia esperado en la especie?

En una población con las características de *P. sinus*, sería prácticamente imposible analizar algún componente de la adecuación como la sobrevivencia de adultos o juveniles directamente en el campo (Taylor y Rojas-Bracho, 1999). Además, el poder de un análisis estadístico para mostrar tendencias en una población tan pequeña sería inaceptablemente bajo (Taylor y Gerrodette, 1993). Otra complicación, mucho más grande, es que no existe otra población de vaquitas que fuera no-endogámica con la cual comparar los resultados obtenidos y estimar el grado de depresión.

Dos mecanismos genéticos relacionados con un aumento en la homocigosidad han sido propuestos para explicar los efectos en la adecuación de la Depresión por Endogamia. El primero, conocido como hipótesis de dominancia, propone una disminución en la adecuación resultado de un aumento en la expresión de alelos deletéreos o carga genética. El segundo, conocido como hipótesis de sobredominancia, plantea que la depresión es producto del decline en la heterocigosidad en loci benéficos sujetos a selección balanceadora como podrían ser los del *Mhc* (Charlesworth y Charlesworth, 1999).

Con el fin de analizar la probable contribución de ambas hipótesis al grado de Depresión por Endogamia esperado en *P. sinus*, se analizaron por separado los distintos tipos de polimorfismo genético, de acuerdo a Hedrick (2001): 1) **Adaptativo**, o variación genética que produce una ventaja en la adecuación, 2) **Detrimental**, o variación que tiene un efecto negativo en la adecuación. Posteriormente, un tercer tipo de polimorfismo, 3) **Neutral**, o variación cuyo coeficiente de selección es muy pequeño en comparación con el tamaño poblacional, fué analizado en el contexto del potencial evolutivo de la especie.

II.6.4. Variación Genética Adaptativa en *P. sinus*

Aunque la fijación de un gen neutral puede ser explicada sólo en términos de deriva, la función de los loci *Mhc* hace suponer que la selección natural favorecería niveles elevados de polimorfismo (Edwards y Hedrick, 1998), contrarrestando el proceso de fijación. De acuerdo a la teoría (Fig. 7, Anexo 1), la fijación de un locus como el *DQB* estaría determinada por su coeficiente de selección (s) así como por el tamaño efectivo de la población. Aunque al respecto se podría argumentar que un factor de selección muy intenso (s cercano a 1), (Ej. una pandemia o epidemia), fuera el responsable de la fijación de un solo alelo *DQB*, el hecho de que la fijación en las vaquitas se extienda también a regiones neutrales como la región control mitocondrial (Rosel y Rojas-Bracho, 1999), sugiere que la explicación más plausible para ambos loci sea la fijación por deriva, en cuyo caso la selección natural habría sido incapaz de mantener el polimorfismo del locus *DQB* en la población. Un polimorfismo muy limitado en genes clase I también sugiere que el efecto de la selección sobre el *Mhc* es reducido.

La teoría (Fig. 7) nos puede ayudar a explorar el papel de la selección natural sobre el polimorfismo adaptativo de *P. sinus* con base en su abundancia histórica y actual. Cuando hay dominancia ($h=1$) en poblaciones donde $N_e = 100, 200, 300, 400$ y 500 , la selección sería capaz de actuar sobre genes cuyos coeficientes de selección fueran de por lo menos el 0.5, 0.25, 0.16, 0.12 y 0.1% respectivamente (Figura 7, Anexo 1). En el caso de codominancia como en el caso de genes del *Mhc* ($h=0.5$) la selección es el doble de ineficaz (Ayala *et al.* 1994; Lynch *et al.* 1995), y requeriría de valores de s mayores al 1, 0.5 y 0.33, 0.25 y 0.2%, respectivamente.

Los coeficientes de selección estimados para los loci *Mhc* del hombre, como son el *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *DRB1*, *DQA1*, *DQB1* y *DPB1*, son del orden de 1.5, 4.2, 0.26, 1.9, 0.28, 0.85 y 0.07%, respectivamente (Satta *et al.* 1994). Estos valores corresponden a una intensidad de selección al menos un orden de magnitud mayor que el límite de la influencia de la selección en presencia de codominancia (*HLA* en Fig. 7, Anexo 1) (Takahata, 1990).

Aunque los valores de s del *HLA* seguramente estarían sobreestimados para el *Mhc* de *P. sinus*, pues en el hombre son congruentes con un polimorfismo 10 veces mayor que otros genes presentes en vertebrados (Radtkey *et al.* 1996), así como con un tamaño efectivo muy grande en la especie humana (Ayala *et al.* 1994), podrían estar representando otros genes muy importantes para la adecuación de *P. sinus* (con valores altos de s). Así, bajo el escenario de los valores de s para el HLA, y considerando una abundancia histórica probable de $N_e \sim 500$ en *P. sinus*, la selección sería capaz de actuar sobre la mayoría de los loci en presencia de codominancia ($s > 0.2\%$), con excepción del DPB1. Por otro lado, considerando la abundancia actual (N_e 200-300), varios loci como el HLA-C, DQA1 y el DPB1 podrían pasar inadvertidos a la selección ($s < 0.5-0.33\%$) (Figura 7, Anexo 1), no obstante que los loci principales como el *HLA-A*, *HLA-B*, *DRB1* y *DQB1* estarían sujetos a selección y podrían presentar un polimorfismo.

Estos resultados sugieren que la mayoría de los genes importantes para la adecuación (valores altos de s , similares a los del HLA) habrían estado sujetos a selección aún siendo una población histórica considerablemente reducida, no obstante, algunos de los genes menos importantes, como parece ser el caso del *DQB*, habrían estado sujetos a deriva y se habrían fijado en la población actual.

Para explicar la fijación del locus *DQB1* con base en el valor de s estimado para dicho locus en el HLA humano (Fig. 7 línea horizontal, Anexo 1) se requeriría de un tamaño efectivo $N_e \leq 60$ en presencia de dominancia, o bien $N_e \leq 120$ individuos en presencia de codominancia, es decir, mucho menor al Número efectivo actual (N_e 200-300), lo que hace suponer que en realidad el valor de s para el *DQB* de *P. sinus* haya sido mucho menor. Al respecto, considerando una abundancia histórica de $N_e \sim 500$, el locus *DQB* tendría que haber estado sujeto a una selección muy pequeña ($s < 0.2\%$) para que se fijara.

Al igual que la selección habría sido incapaz de mantener genes con coeficientes de selección pequeños que confirieran una ventaja ($+s$), se esperaría que en el mismo grado disminuyera la capacidad de purgar genes deletéreos cuyos valores negativos de s fueran

también pequeños ($-s$), los cuales además generalmente presentan bajas dominancias, lo que dificultaría aún más el papel de la selección (Fig. 7, Anexo 1).

II.6.5. Variación Genética Detrimental en *P. sinus*

Las estimaciones promedio de los grados de dominancia en genes deletéreos en *Drosophila* fluctúan entre 0.2-0.4 (Mukai *et al.* 1972). Bajo este esquema, por ejemplo, en el caso probable de una abundancia histórica de $N_e \sim 500$ para la población de *P. sinus*, la teoría predice que la selección natural habría purgado los alelos más recesivos ($h \sim 0.2$) con un valor de $s \geq 0.5\%$, mientras que para los alelos medianamente recesivos ($h \sim 0.5$) la selección sería más eficaz ($s \geq 0.2\%$) (Figura 7, Anexo 1). Por otro lado, considerando el tamaño efectivo actual ($N_e \sim 200-300$), la selección habría sido capaz de purgar alelos recesivos ($h \sim 0.2$) con valores de $s \geq 1.25-0.83\%$, o bien alelos medianamente recesivos ($h \sim 0.5$) con valores de $s \geq 0.5-0.33\%$.

Bajo este esquema, considerando estudios en *Drosophila* que indican coeficientes de selección promedio del 3%-5% para las mutaciones deletéreas (Wang y Hill, 1999), se esperaría que acorde a lo propuesto por Taylor y Rojas-Bracho (1999), la población de *P. sinus* habría purgado a lo largo de su historia de población reducida ($N_e \sim 500$) la mayoría de la carga genética causada por alelos letales, subletales, o medianamente deletéreos, que son los causantes de aproximadamente la mitad de la depresión en *Drosophila*. Esta porción de la carga genética es la causante de la mayor parte de la depresión en la adecuación en poblaciones abundantes históricamente que han sido reducidas recientemente de manera drástica (Hedrick, 2001; Keller y Waller, 2002) y que constituye la principal causa de su rápida extinción y baja adecuación (Soulé, 1986).

No obstante, otros estudios indican que la distribución de los coeficientes de selección puede ser leptocúrtica con la mayoría de las mutaciones con valores de s pequeños (Keightley, 1994; Fry *et al.* 1999), mientras que otros autores soportan la idea de una distribución de mutaciones deletéreas de tipo exponencial donde la frecuencia disminuye conforme aumenta s , con un coeficiente de variación cercano a uno (Ej. Mackay

et al. 1992; Santiago *et al.* 1992). Bajo éste esquema, los coeficientes de selección promedio para *Drosophila* podrían fluctuar entre 2 y 6%. Por otro lado, estudios recientes también han resaltado la posibilidad de una elevada ocurrencia de mutaciones de efectos deletéreos muy pequeños (Ej. $s = 1 - 0.1\%$) (Keightley, 1996; Latter, 1998; Fry *et al.* 1999;). Bajo este razonamiento, Lynch *et al.* (1995), estimaron que poblaciones donde $N_e < 100$ ($N \sim 1000$) presentarían un mayor riesgo de extinción debido a la acumulación de mutaciones deletereas en tan sólo 100 generaciones, no obstante éste no sería un riesgo para las poblaciones reducidas recientemente en los últimos dos o tres siglos y en las cuales habrían transcurrido unas 30 generaciones considerando un tiempo generacional promedio de 10 años (Gilligan *et al.* 1997).

No obstante muy probablemente *P. sinus* hubiera purgado la mayoría de los deletéreos de mediana o mucha influencia, la purga de los alelos de menor efecto (Ej. valores de $s = 1 - 0.1\%$) se habría visto impedida en una población tan pequeña históricamente. Bajo este esquema, por ejemplo, para purgar un alelo recesivo ($h = 0.2$) con un valor de s del 1%, se requiere un valor de $N_e \geq 250$, mientras que para un alelo con s del orden de 0.1% se requeriría un N_e considerablemente más grande de 2,500 individuos (Figura 7, Anexo 1). Para alelos medianamente recesivos ($h = 0.5$), se requieren tamaños de $N_e = 100$ y 1,000 individuos, respectivamente.

Considerando el tamaño efectivo histórico estimado para *P. sinus* ($N_e \sim 500$), se pone de manifiesto que alelos recesivos ($h = 0.2$) con valores de $s < 0.5\%$ (Anexo 1) podrían haber pasado inadvertidos a la selección, mientras que considerando el tamaño efectivo actual ($N_e = 200-300$), la fijación es probable aún para valores de s del 1% (Figura 7, Anexo 1).

Con base en lo anterior, y de acuerdo con varios autores (Hedrick, 2001; Amos y Balmford, 2001), una población como la de *P. sinus* que hubiera sido pequeña en el largo plazo presentaría niveles elevados de carga genética aportada por la fijación de alelos deletéreos de muy poca influencia. En realidad, algunas de las características anatómicas más características de la especie podrían verse relacionadas con tal carga genética. En este

contexto, la presencia de malformaciones anatómicas en *P. sinus* puede ser explicada como resultado de la ineficacia de la selección en una población pequeña históricamente.

Todas las vaquitas analizadas hasta el momento (n= 43) presentan polidactilia (Figura 15), es decir, la presencia de un sexto dígito incipiente que se origina en el tercer metacarpo en ambas aletas pectorales y cuyo grado de desarrollo (número de falanges) varía entre individuos, y algunas veces entre la aleta izquierda y derecha del mismo individuo. Dado que todos los individuos presentan el carácter, la frecuencia de la mutación parece ser del 100%, es decir, estaría fija en la población al igual que los genes de la región control mitocondrial y del locus *DQB* del *Mhc*. Otras malformaciones reportadas incluyen hiperosteosis en las vértebras en un 23% (n=62), de las cuales 55% presentan además fusión de las vértebras 26 y 27 vía las espinas neurales (Ortega-Ortíz *et al.* 2000). También se ha reportado la presencia en algunas hembras de inusuales cuerpos calcificados en los ovarios (posibles *corpora albicantia* en regresión) (Hohn, *et al.* 1996).

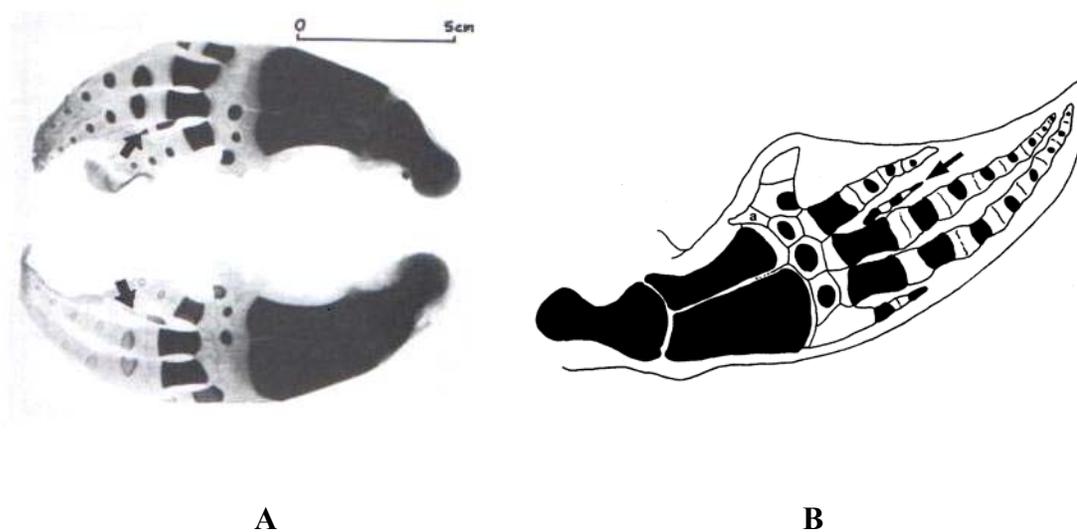


Figura 15. Polidactilia en *P. sinus*: las flechas indican el dígito extra asociado con el tercer metacarpo y que se presenta (en distintos grados de desarrollo) en todos los individuos hasta ahora analizados. **A)** Fotografía de las aletas pectorales de una hembra en donde el 6°. dígito consta de dos falanges. **B)** Diagrama esquemático de la aleta pectoral de un individuo donde el 6° dígito presenta tres falanges. Tomado de Ortega-Ortíz *et al.* 2000.

Todos los tetrápodos presentan cinco dígitos en sus extremidades, y la polidactilia, aunque es un fenómeno presente en muchas especies, se presenta siempre en bajas frecuencias. En humanos, por ejemplo, no obstante que es la anomalía más común al nacimiento, se presenta en tan sólo un 0.1 – 0.2% de los individuos (Castilla *et al.* 1998, citado en Galis *et al.* 2001), lo cual puede atribuirse a que en una población tan grande la selección natural es muy eficaz para reducir al máximo la presencia del carácter (Galis *et al.* 2001).

La polidactilia en algunos casos podría significar una ventaja adaptativa. Al respecto, Gallo-Reynoso y Torre-Cosío (1997) sugirieron que el sexto dígito en las vaquitas podría proporcionar una mayor área de impulso a las aletas pectorales, lo cual les permitiría navegar mejor en las corrientes fuertes del Alto Golfo. Sin embargo, en la Figura 15 se puede observar que el área que incrementa dicho dígito extra en la aleta pectoral es, si es que algo, muy pequeña, lo que hace pensar que la ventaja adaptativa (valor de *s*) que podría brindar a sus portadores también sería reducida como para ser detectada y menos aún fijada por sobre el estado normal de cinco dígitos por la selección natural. En ninguna de las otras especies de focénidos se ha observado polidactilia, y dentro de los odontocetos, se ha reportado en fetos de tan sólo dos especies: la beluga *Delphinapterus leucas* y el tursión *Tursiops truncatus* (revisado por Ortega-Ortíz *et al.* 2000). En consecuencia, la explicación más plausible para la presencia de polidactilia en *P. sinus* es la fijación por deriva genética de un alelo ligeramente deletéreo en una población históricamente pequeña.

Existe nuevo soporte en la literatura (revisado por Galis *et al.* 2001), para las hipótesis de Wright y Lande, respecto a que la restricción a presentar cinco dígitos no puede ser explicada únicamente por una selección negativa contra la presencia de dígitos extra en sí mismos, sino que debe existir una fuerte selección negativa contra los efectos pleiotrópicos asociados, que indirectamente constituyen una restricción evolutiva que ha limitado y mantenido constante el número de dígitos a cinco en los tetrápodos.

Estudios recientes han sugerido que dichas restricciones en el cambio en el número de dígitos en los amniotas ocurren en el periodo filotípico durante el desarrollo

embrionario, que es también cuando los vertebrados más se asemejan entre sí. Este periodo inicia con la neurulación y termina cuando la mayoría de los somitas han sido formados, y se caracteriza por la presencia de una alta interacción entre las distintas unidades de desarrollo o módulos. La presencia de interacciones inductivas entre las diferentes partes del cuerpo causaría que una mutación en una parte tuviera efectos pleiotrópicos en otras. En amniotas (exceptuando la mayoría de los anfibios), el desarrollo del patrón de las extremidades ocurre principalmente durante el periodo filotípico también, mientras que estudios de trasplante y explante han mostrado que el módulo responsable del desarrollo de las extremidades no es independiente, sino que se encuentra integrado con otros de manera general. Aunado a esto, muchos de los genes involucrados en el desarrollo y especificación de los dígitos (familias Hedgehog, Bmp, Fgf y Hox) son genes reguladores (*upstream*), que se encuentran al inicio de las cadenas de regulación, por lo que es muy probable que un cambio en éstos afecte otras partes del embrión sobre las cuales dichos genes tienen también influencia, como el desarrollo próximo-distal, dorso-ventral y antero-posterior.

Las mutaciones en el número de dígitos comúnmente se asocian con otras anomalías en los perros, ratones, pollos y humanos. En perros, la polidactilia se asocia con enfermedades locomotoras y problemas gástricos e intestinales. En humanos la polidactilia es una característica de varios síndromes, como el de Ellis van Crefeld, Bardet-Biedl, trisomía 13 y el síndrome de Down, y se ha estimado que un 15% de los nacimientos con polidactilia presentan además otras anomalías congénitas. En ratones, la ocurrencia de oligodactilia se asocia siempre con efectos pleiotrópicos en el esqueleto apendicular y axial. Wright en 1935 mostró cómo los cerdos de guinea que eran heterocigotos para la mutación Px presentaban polidactilia sin ninguna anomalía aparente, mientras que los individuos homocigotos presentaban anomalías en casi cada órgano del cuerpo.

Estos argumentos, revisados por Galis *et al.* (2001), dan soporte a la hipótesis de Ortega-Ortiz *et al.* (2000) que en las vaquitas, la mutación responsable de la polidactilia muy posiblemente esté asociada también con las otras malformaciones observadas en el

esqueleto axial. En este caso, aunque la presencia de un sexto dígito podría considerarse “anormal” en las vaquitas, en realidad sería una característica evolutiva única de la especie, resultado del proceso evolutivo de una población considerablemente pequeña y endogámica durante decenas o quizá centenas de miles de años durante los cuales el carácter se habría fijado por deriva en la población.

II.6.6. Variación Genética Neutral en *P. sinus*

La fijación de un sólo haplotipo en la región control mitocondrial que es hipervariable en otras especies indicó la ausencia de variabilidad neutral en *P. sinus* (Rosel y Rojas-Bracho, 1999) En el presente estudio se encontró que aún un gen nuclear como el *DQB* del *Mhc* que podría estar sujeto a la selección natural y presentar codominancia ha sido fijado en la población. Toda la evidencia acumulada hasta ahora sugiere que la deriva genética a jugado un papel determinante en la estructura genética de *P. sinus*, por lo que en consecuencia se esperarían niveles reducidos o bien ausentes de variabilidad neutral en la especie. La excepción, sin embargo, podrían ser genes nucleares que presentan las tasas más elevadas de mutación. Acorde a lo anterior, el análisis preliminar de 2 loci microsátélites en 7 individuos de *P. sinus* mostró múltiples alelos así como individuos heterocigotos (Rosel y Rojas-Bracho, 1999).

Un aspecto importante que habría afectado los niveles de variación neutral en *P. sinus* es la selección sobre sitios adyacentes o background selection (Charlesworth *et al.* 1993). Bajo este esquema, la variación neutral asociada a genotipos con alta adecuación tendería a una rápida fijación, mientras que la asociación con genotipos de baja adecuación tendería a su pronta eliminación. Suponiendo que las mutaciones de mediano y mayor efecto hayan sido efectivamente pугadas de la población de vaquitas, se esperaría que una proporción de la variación neutral asociada hubiera sido eliminada también de la población. En el caso de la variación neutral asociada a mutaciones de menor efecto, la fijación esperada sería mayor conforme el comportamiento de éstas se acerca a la neutralidad cuando N_e es pequeña (Fig. 7).

II.6.7. ¿Cuál es el riesgo de Depresión por Endogamia en *P. sinus*?

La hipótesis de dominancia que implica un incremento en la carga genética es la explicación biológicamente más realista y la que presenta el mayor soporte en la literatura con base en modelos teóricos para explicar la depresión por endogamia observada en *Drosophila* y en plantas superiores (Ballou, 1997; Charlesworth y Charlesworth, 1999; Keller y Waller, 2002). En *Drosophila*, uno de los modelos mejor conocidos y más ampliamente estudiados, análisis genéticos y estadísticos han mostrado que la depresión por endogamia tiene dos componentes principales, cada uno de los cuales aporta aproximadamente el 50% de la disminución en la adecuación: a) alelos raros producto de mutaciones puntuales, que son letales o subletales y cuyo efecto en la adecuación es de moderado a alto, b) numerosos alelos cuyos efectos detrimentales son pequeños, presentan alta dominancia y sus efectos son aditivos (Lande, 1995; Charlesworth y Charlesworth, 1999).

Al respecto, si la población de *P. sinus* ha sido pequeña ($N_e < 1000$, probablemente ~ 500) durante varios miles de años (+6-9 mil años), la especie seguramente habría purgado el primer y más importante componente de la depresión, es decir, aquellos alelos poco abundantes cuyos efectos en la adecuación (valores de s) fueran de medianos a altos. En este sentido, se esperaría que *P. sinus* mostrara niveles reducidos de depresión por endogamia (Hedrick, 2001), constituyendo un caso muy distinto al de otras especies en peligro cuyas poblaciones fueron reducidas drásticamente de una población abundante de amplia distribución en el pasado a unos cuantos individuos en el siglo XX, y que manifiestan niveles altos de Depresión por Endogamia relacionados en todos los casos con niveles bajos de polimorfismo genético respecto a poblaciones similares no endogámicas.

En éstas poblaciones reducidas drásticamente de manera reciente, la segregación de mutaciones deletéreas portadas por los fundadores constituye un riesgo de extinción importante. Por ejemplo, en una población cautiva de lobos *Canis lupus* fundada por sólo 6 individuos entre 1950 y 1980, y que actualmente cuenta con < 100 individuos se presentan

niveles elevados de Depresión Endogámica medida en el peso de los juveniles, reproducción y longevidad (Laikre y Ryman, 1991). Las poblaciones de leones africanos *Panthera leo leo* del cráter de Ngorongoro en Tanzania, y la población de leones asiáticos *P. l. persica* del Santuario del Bosque de Gir en India, reducidas en el último siglo a tamaños N_e de 15 y 20 animales, respectivamente, muestran una reducción considerable en la calidad de espermatozoides y los niveles de testosterona en poblaciones actuales que cuentan con 100 y 250 individuos, respectivamente (Wildt *et al.* 1987; Yuhki y O'Brien, 1990; Packer *et al.* 1991). La pantera de Florida *Felis concolor coryi* fue reducida hasta un tamaño actual de $N_e < 30$ y en la actualidad muestra una muy baja calidad de espermatozoides, elevada incidencia de anomalías congénitas (como el criptocordismo en el cual uno de los testículos jamás desciende) y elevada susceptibilidad a parásitos microbianos (O'Brien, 1994). El bisonte europeo *Bison bonasus* reducido a 10 individuos a principios del siglo XX presenta una depresión en el crecimiento esquelético así como una mortalidad de crías y juveniles en una población actual de unos 3000 individuos (Olech, 1987, citado en Pucek y Hartl, 1994). De manera similar, 38 especies de mamíferos en cautiverio cuyas poblaciones recientemente fueron fundadas por pocos individuos muestran niveles elevados de mortalidad juvenil (33% más) entre individuos endogámicos (Ralls *et al.* 1988).

Aunque el caso del cheeta *Acinonyx jubatus* indudablemente representa uno de los primeros casos mejor documentados de depresión endogámica en una población silvestre (O'Brien, 1994), la relación entre su uniformidad genética y uno o más cuellos de botella históricos propuestos hace ~10,000 años ha sido cuestionada en estudios recientes de manera similar al caso del elefante marino del Norte *Mirounga angustirostris* en cuanto a la dificultad para reconciliar dicha hipótesis con una población actual que cuenta varios miles de individuos (Amos y Balmford, 2001), y que podría presentar una estructura metapoblacional que explicara los niveles tan bajos de variabilidad (Hedrick, 1996). La explicación final de la uniformidad genética presente en estas especies permanece aún sin ser descubierta (Amos y Balmford, 2001).

No obstante la purga de los alelos de mayor efecto, como resultado de la ineficacia de la selección en una población pequeña durante tanto tiempo, se esperaría un nivel alto de la carga genética relativa al segundo componente de la Depresión observado en *Drosophila*, es decir, la acumulación de alelos deletéreos de menor efecto. Al respecto, las malformaciones anatómicas características de la especie soportan este escenario. Si bien dicha carga genética histórica probablemente causó una reducción en la adecuación de *P. sinus*, respecto, por ejemplo, a poblaciones de marsopas de otras especies no endogámicas, sus efectos indudablemente no le impidieron sobrevivir como una población pequeña y endogámica hasta nuestros días, y es aquí donde radica lo excepcional de *P. sinus*, al ser una especie limitada a una única población tremendamente endogámica y con una elevada uniformidad genética, que, sin embargo, ha encontrado la forma de contrarrestar los azares del destino y ha sobrevivido así durante miles de años.

Dado que el tamaño histórico de la población de *P. sinus* era probablemente de tan sólo 2 o 3 veces su abundancia actual de N_e 200-300, es muy probable que su carga genética actual no sea muy diferente de la que presentaba en el pasado y que habría estado ya “purgada” en una población históricamente pequeña desde antes de la disminución de la población debido a la mortalidad por pesca en el siglo pasado. No obstante, de la Figura 7 se observa que si la población continua disminuyendo aún más y sobrepasa el umbral de $N_e < 50$, la especie podría colapsarse rápidamente en pocas generaciones debido a la fijación de alelos deletéreos de efectos cada vez mayores y a la pérdida irremediable por deriva de la poca variación remanente, sino es que se extinguiera desde antes debido a otros factores demográficos o ambientales (Lande, 1988; Mills y Smouse, 1994).

Por otro lado, el probable efecto de la hipótesis de sobredominancia sobre la depresión endogámica en *P. sinus* puede evaluarse tomando como referencia el locus *DQB* del *Mhc*. De acuerdo con la abundancia histórica de *P. sinus*, la selección a la que habría estado sujeta el locus *DQB* habría sido muy pequeña ($s \leq 0.2\%$) para que un solo alelo estuviera fijo en la población actual. En el presente, se esperaría que otros genes con coeficientes de selección ligeramente mayores ($s \leq 0.5-0.33\%$) estuvieran sujetos también a

la deriva genética. Lo anterior sugiere que probablemente *P. sinus* carecería del polimorfismo en otros genes adaptativos sujetos a poca selección, no obstante, no se esperaría la fijación en loci sujetos a niveles moderados a altos de selección. Por ejemplo, el análisis de secuencias del segundo exón del *Mhc* clase I muestra la presencia de un polimorfismo funcional, aunque en realidad éste es bastante escaso y limitado en comparación con otras especies (Capítulo I).

Es importante remarcar que no obstante la ausencia de variación en el locus *DQB* del *Mhc*, hasta la fecha no existe evidencia de susceptibilidad a enfermedades infecciosas en *P. sinus*, y los únicos parásitos reportados son sólo 2 especímenes de Nemátodos (*Crassicauda*) y 2 de Tremátodos (*Synthesium*), cada uno de ellos en diferentes individuos (Vidal *et al.* 1999). También se han encontrado balanos comensales (*Xenobalanus globicipitis*) en 14 individuos (Vidal *et al.* 1999). Debido a que hasta la fecha no existe evidencia de susceptibilidad a enfermedades infecciosas o una elevada carga parasitaria en *P. sinus*, el polimorfismo del locus *DQB* no parece haber sido crucial para la persistencia de la especie hasta nuestros días. La uniformidad genética que parece ser característica de *P. sinus* podría estar determinando una abundancia y distribución tan restringidas como su capacidad de adecuación debido a la ausencia de variantes selectivas (distintos alelos), particularmente aquellos que permitieran pequeños ajustes en la adecuación (pequeños valores positivos de *s*).

II.6.8. Implicaciones de la Uniformidad Genética de *P. sinus*

Si la población de *P. sinus* ha sobrevivido tanto tiempo con niveles altos de endogamia y sin variabilidad genética, ¿Cuál es entonces el costo de la endogamia y el papel del polimorfismo genético en las poblaciones naturales?

El castor, *Castor fiber* fué diezmado en Noruega a tan sólo 100 individuos hacia finales del siglo XIX por cazadores, y de manera similar al caso del elefante marino del Norte *Mirounga angustirostris* su población se recuperó rápidamente hasta varias decenas de miles de individuos en la actualidad. De acuerdo a estudios de restricción (Ellegren *et al.*

1993), el castor no muestra variación en el *Mhc* y muy poco polimorfismo genético en general. No obstante, al igual que en el caso de *M. angustirostris*, la ausencia de variabilidad genética parece ser una característica evolutiva de la especie, que sin embargo se podría haber visto acentuada pero no explicada en su totalidad por el cuello de botella a fines del siglo XIX (Hedrick, 1995; Amos y Balmford, 2001). Aunque a diferencia de *P. sinus* ambas poblaciones eran muy abundantes históricamente, como lo son de nuevo ahora, estos ejemplos muestran que poblaciones con escasa variabilidad en general, incluido el *Mhc*, pueden subsistir y recuperarse drásticamente.

La magnitud y los efectos específicos de las variantes deletéreas en cada población son muy variables en el tiempo, pues dependen de la interacción de los genotipos con el medio ambiente particular (Ej. Gibbs y Grant, 1987; Lande, 1995). Un aspecto muy importante para *P. sinus* es el hecho de que los beneficios de la purga de alelos recesivos parecen ser al menos en parte dependientes del ambiente en el que se encuentre una población. Por ejemplo, bajo condiciones ambientales de estrés en *Drosophila*, niveles considerables de carga genética son expresados causando un incremento significativo en su tasa de extinción aún si la población ha sido sometida previamente a la purga de alelos deletéreos (Bijlsma *et al.* 2000). De manera similar, estudios en el escarabajo *Tribolium* sugieren que una misma población puede expresar distintos grados de depresión endogámica en distintos ambientes (Pray *et al.* 1994). Estos resultados sugieren que la selección eliminaría sólo aquellos alelos deletéreos expresados de manera condicional en un ambiente específico, pero no purgaría todos los alelos recesivos que pueden afectar a la población bajo otras condiciones ambientales en el futuro. También es importante reconocer que la depresión endogámica puede presentarse aún en especies naturalmente endogámicas y pequeñas, como son algunas plantas que se reproducen principalmente por autofertilización, como la especie de distribución restringida *Astragalus linifolius* (Ellstrand y Elam, 1993).

Aunado a esto, experimentos en *Drosophila* muestran que los efectos de la endogamia en la extinción de una población son más severos bajo condiciones de estrés

(Pray *et al.* 1994; Dahlgaard y Hoffmann, 2000; Bijlsma *et al.* 2000), y el mismo patrón ha sido observado en estudios de ratones de campo (Jiménez *et al.* 1994), y en poblaciones silvestres de aves y mariposas (Keller *et al.* 1994; Saccheri *et al.* 1998), sugiriendo la existencia de un sinergismo entre la endogamia y el estrés ambiental que puede intensificar el riesgo de extinción.

Por otro lado, estudios teóricos recientes indican que la probabilidad de extinción de una población se incrementa con la endogamia, y particularmente cuando su tasa de crecimiento es baja (Mills y Smouse, 1994), como podría ser el caso de *P. sinus* considerando por ejemplo que la producción de crías se realizara cada 2 años (Hohn *et al.* 1996). De manera similar, estudios experimentales en la planta *Clarkia pulchella* (Newman y Pilson, 1997), así como en *Drosophila* y el ratón *Mus musculus* (Frankham, 1995a) muestran que la endogamia incrementa la probabilidad de extinción de una población. Los resultados de Bijlsma *et al.* (2000) van aún más allá, demostrando que la tasa de extinción en el corto plazo para *Drosophila*, aumenta proporcionalmente con el grado de endogamia (medido mediante el coeficiente de endogamia).

La uniformidad en genes mitocondriales y del *Mhc* de *P. sinus* es una característica evolutiva, que sin embargo tiene gran importancia para su conservación. La deriva tendería a remover la variabilidad que actualmente es menos importante para el organismo mediante el desequilibrio encadenado (efecto de *background selection*, Charlesworth *et al.* 1993). Al respecto, estudios recientes han resaltado la importancia de la variación genética y del *Mhc* en la adecuación de poblaciones silvestres (Coltman *et al.* 1998; Patterson *et al.* 1998). En este sentido, el hecho de presentar una o pocas variantes alélicas implicaría entonces una adecuación reducida para afrontar cambios ambientales en el futuro. Por ejemplo, durante el colapso de poblaciones de ovejas de la Isla Soay, los individuos heterocigotos para la adenosin desaminasa muestran una mayor sobrevivencia que los homocigotos (Gulland *et al.* 1993). De manera similar, Bijlsma *et al.* (1999) mostraron que individuos homocigotos de *Drosophila* eran significativamente más afectados en su adecuación que los heterocigotos al estrés ambiental.

La tasa de evolución fenotípica promedio en respuesta a la selección natural direccional es proporcional a la varianza genética aditiva, (Falconer y Mackay, 1996), la cual se pierde a la misma tasa que disminuye la heterocigosidad (Ecuación 2), lo que en conjunto disminuye el potencial evolutivo de una especie. Por ejemplo, cuando poblaciones endogámicas y no endogámicas de *Drosophila* fueron sometidas a un factor de selección al que comúnmente no están expuestas (concentraciones crecientes de NaCl), las poblaciones no endogámicas se adaptaron mejor (Frankham *et al.* 1999).

Las secuencias aisladas del *Mhc* de *P. sinus* indican que los genes son funcionales y similares a los de otras especies, por lo que indudablemente la especie sería capaz de desencadenar una respuesta inmune (Capítulo I). No obstante, un polimorfismo muy limitado en genes clase I, así como una ausencia de variación en el locus *DQB* indican que dicha respuesta inmune sería muy limitada. La ausencia de heterocigosidad en el *DQB* indica una adecuación muy reducida a nivel individual, pues los individuos homocigotos serían más susceptibles a enfermedades que los heterocigotos (Hughes y Nei, 1988; Hughes y Nei, 1989; Paterson *et al.* 1998). Por otro lado, la ausencia de alelos sugiere una adecuación poblacional limitada a quizá uno o muy pocos haplotipos *Mhc*, en cuyo caso la especie sería muy susceptible a enfermedades infecciosas (O'Brien *et al.* 1985; O'Brien y Evermann, 1988; Watkins *et al.* 1990; Sanjayan *et al.* 1996). En el peor de los escenarios, un patógeno extraño al lugar donde habita *P. sinus* podría diezmar a toda la población por igual.

II.6.9. *P. sinus* como una Especie Rara

En el presente trabajo se ha evidenciado que *P. sinus* es una especie naturalmente rara, que presenta niveles extremadamente bajos de variación genética en general resultado de una larga historia de deriva y endogamia en una población históricamente pequeña. De manera similar, otras poblaciones históricamente pequeñas y aisladas de mamíferos como algunos roedores endémicos de islas muestran un patrón similar con un polimorfismo en el *Mhc* muy reducido o ausente. El ratón más grande y endémico de la isla de Madagascar

Hypogeomys antimena, hace sólo 1400 años habitaba ampliamente la isla pero en la actualidad está restringido a un área de unos 20 x 40 km en donde los individuos remanentes presentan sólo 2 alelos en el locus *DQA* del *Mhc* clase II (Sommer y Tichy, 1999). De manera similar, la rata *Rattus fuscipes greyii* endémica de Australia se distribuye también en pequeñas islas al Sur del continente que habrían estado aisladas desde el fin del último periodo glacial. En éstas, un análisis de la variación en el segundo exón del *Mhc* (denominado *RTI.Ba* en roedores) mostró que de 14 islas, 10 presentaban fijo un solo alelo y 3 más presentaban tan sólo 2 alelos (Seddon y Baverstock, 1999). Estos estudios y el presente sobre *P. sinus*, soportan la noción de que la intensidad de la selección natural en el *Mhc* puede ser insuficiente para mantener la variación en poblaciones pequeñas y aisladas durante periodos largos de tiempo. En este sentido, *P. sinus* podría ser comparada en su historia evolutiva y demográfica con tribus Amerindias como los Zuni en Nuevo México, los Waorani en Ecuador o los Kaingang y Guarani en Brazil, las cuales fueron fundadas por pocos individuos durante la colonización de América desde Asia en los últimos 11-40 mil años, y que han mantenido poblaciones pequeñas y aisladas genética, cultural y lingüísticamente. Estas tribus muestran niveles elevados de endogamia y en algunos casos presentan una elevada frecuencia de mutaciones deletéreas como el albinismo en los Zuni (0.0062%) (Watkins *et al.* 1992). Consistentemente, también presentan una variación muy limitada de haplotipos mitocondriales (Torrioni *et al.* 1992), así como un polimorfismo depauperado pero muy característico en genes del *Mhc* (Belich *et al.* 1992; Watkins *et al.* 1992).

Desde una perspectiva biogeográfica, *P. sinus* habría evolucionado en una especie de “isla” oceánica. De acuerdo a caracteres morfológicos (Norris y McFarland, 1958), así como a análisis filogenéticos con base en secuencias del citocromo b y de la región control (Rosel *et al.* 1995), el pariente más cercano de la vaquita es la marsopa de Burmeister *Phocoena spinipinnis* que actualmente habita las costas del Pacífico y Atlántico Sur de Sudamérica. Respecto al origen evolutivo de *P. sinus*, se ha sugerido que la especie constituye una población relicto de una especie ancestral a *P. spinipinnis* de afinidad

templada que habría cruzado el ecuador desde el hemisferio sur en una expansión de rango durante alguno de los periodos glaciales del Pleistoceno, y cuando la temperatura del agua hubiera aumentado de nuevo al final del periodo glacial, el Golfo de California habría actuado como un *cul-de-sac* atrapando a los ancestros de *P. sinus* que se habrían movido hacia el Norte siguiendo las aguas templadas (Norris y McFarland, 1958).

Es probable que *P. sinus* hubiera evolucionado a partir de un efecto fundador o bien de una expansión de rango de sus ancestros seguido de un evento de fragmentación (Taylor y Rojas-Bracho, 1999). En cualquier caso, la especie probablemente habría evolucionado como una población pequeña y aislada en la zona del Alto Golfo en donde habita actualmente. La historia evolutiva de *P. sinus*, caracterizada por una población pequeña y aislada en el Alto Golfo, habría determinado que la endogamia y la deriva genética determinarían un alto grado de uniformidad genética en la población actual. La ausencia de variación genética podría entonces ser la causa de que la población sea tan pequeña y presente una distribución tan restringida. Bajo esta perspectiva, la especie podría encontrarse restringida tan sólo a su hábitat óptimo al que está perfectamente adaptada, pero no se podría mover de ahí, ni presentar grandes abundancias, pues carecería del potencial genético que le permitiera adaptarse a otros ambientes. No obstante, bajo el modelo de paisaje adaptativo propuesto por Wright (Ej. Eldredge, 1989) *P. sinus* se encontraría en su mayor pico adaptativo. La teoría de selección natural predice que la población habría preservado o fijado las variantes genéticas que le brindaran una mayor adecuación en su ambiente. En este sentido, la presencia de la especie hasta nuestros días indica claramente que se encuentra perfectamente adaptada al sitio y condiciones ambientales en las que vive.

No obstante, indudablemente *P. sinus* es una especie extremadamente vulnerable al cambio ambiental, y particularmente a factores externos ajenos a su ambiente, como podría ser la introducción de algún patógeno. Es en este sentido que la modificación del ambiente del Alto Golfo de California por acciones relacionadas con el hombre podría resultar en la extinción de la especie por factores como la introducción accidental de un nuevo patógeno,

o la presencia de contaminantes. La región del Alto Golfo de California ha experimentado cambios ambientales significativos en el último siglo, y seguramente experimentará más en el futuro. La reducción del afluente del Río Colorado ha sido reducida considerablemente debido a la creciente demanda de agua en la frontera con los Estados Unidos (Cisneros-Mata *et al.* 1995), e indudablemente esto ha ocasionado un cambio en las condiciones químicas e hidrodinámicas del Alto Golfo, no obstante que la productividad en el área permanece alta en general (Rojas-Bracho y Taylor, 1999). Otro factor de riesgo podría ser la presencia de contaminantes. No obstante, estudios recientes en Alto Golfo (ver Rojas-Bracho y Taylor, 1999) han mostrado que los niveles de organoclorados y pesticidas hidrocarbonados son bajos, en concordancia con un estudio específico en tejidos de *P. sinus* que mostró niveles bajos de DDT y PCBs (Calambokidis *et al.* 1993). Sin duda el factor que presenta el mayor riesgo de extinción para la especie en el corto plazo es la mortalidad incidental en redes de pesca, la cual de continuar con las tasas de captura actuales podría causar la extinción de la población en las próximas dos o tres décadas (Rojas-Bracho y Taylor, 1999).

Finalmente, es importante remarcar que no obstante la ausencia de variación genética en *P. sinus* la hace muy vulnerable al cambio ambiental, con base en la información genética y evolutiva disponible hasta el momento no existen razones para pensar que la especie esté condenada a la extinción. Al contrario, su persistencia como una población considerablemente pequeña hasta nuestros días sugieren que se encuentra muy bien adaptada al área restringida en la que habita.

CONCLUSIONES GENERALES

- ❑ Las secuencias histocompatibles aisladas de *P. sinus* codifican para moléculas funcionales que muestran evidencias de la influencia de la selección natural sobre sitios específicos de la molécula relacionados con la unión de péptidos.
- ❑ La especie muestra una gran uniformidad genética en general, con base en la ausencia de variación en la región control mitocondrial y en el locus *DQB* del *Mhc*, así como en la presencia de caracteres inusuales presentes en todos los individuos.
- ❑ Tal uniformidad genética es producto de una historia evolutiva caracterizada por un tamaño poblacional muy reducido (N_e probablemente ≤ 600) durante por lo menos una decena de miles de años.
- ❑ Dado que el tamaño poblacional histórico de *P. sinus* habría sido apenas 2 o 3 veces su abundancia actual, la especie habría purgado a lo largo de su historia evolutiva los alelos deletéreos de mayor efecto, por lo que en la actualidad no sufriría de la depresión por endogamia observada en poblaciones abundantes históricamente y reducidas drásticamente de manera reciente.
- ❑ Al ser una población históricamente pequeña, la selección natural habría sido ineficaz sobre alelos recesivos con efectos menores sobre su adecuación (valores de s y h pequeños), lo cual podría explicar la presencia de caracteres como la polidactilia y otras malformaciones vertebrales en la especie, e indica la ausencia de variantes genéticas que le podrían brindar pequeñas ventajas selectivas.
- ❑ La persistencia de la especie desde tiempos históricos como una población muy pequeña y aislada hasta nuestros días indica que se encuentra perfectamente adaptada a su ambiente. No obstante, su uniformidad genética sugiere que la especie presenta una capacidad muy limitada para adaptarse a condiciones ambientales distintas o cambiantes.
- ❑ No obstante su alta vulnerabilidad, no existen razones para pensar que la especie esté condenada a la extinción, por lo que un plan adecuado para su recuperación y conservación está plenamente justificado.

PERSPECTIVAS

P. sinus constituye una especie con características demográficas y evolutivas únicas. Desde un punto de vista científico es increíble como una población de mamíferos tan pequeña y aislada ha logrado sobrevivir hasta nuestros días a pesar de los efectos negativos de la endogamia y la deriva genética durante decenas o quizá cientos de miles de años. ¿Qué estrategia evolutiva habría seguido la especie para lograr sobrevivir hasta nuestros días? Una respuesta probable, como ya se comentó, es limitar su abundancia y su distribución geográfica acorde a una variación genética también muy limitada. No obstante, un problema mayor habría sido la acumulación alelos deletéreos (carga genética). Al respecto, además de la purga por selección, podrían haber ocurrido modificaciones en el desarrollo ontogénico. Es bien sabido que las mutaciones deletéreas tienden a expresarse principalmente en estadios tempranos del desarrollo (Keller y Waller, 2002; Galis *et al.* 2001; Pusey y Wolf, 1996). En presencia de epistasia positiva, cada mutación deletérea adicional produce una reducción cada vez mayor de la adecuación, que en un caso extremo produce una selección total bajo la cual los individuos que presentan un nivel determinado de carga genética dejan de reproducirse (Kondrashov, 1988). Bajo este esquema, una estrategia evolutiva podría haber sido una aceleración de la maduración y la truncación del desarrollo ontogénico o paedomorfosis, de manera que la carga genética letal no se expresara. Aunque los miembros de la Familia Phocoenidae presentan distintivamente un mayor grado de paedomorfosis respecto al resto de las familias de cetáceos (Barnes, 1985), es interesante que *P. sinus* sea la especie de menor tamaño y en la que dichas características embriónicas son más pronunciadas (Norris y Mc Farland, 1958), y evidentes aún a simple vista en su morfología externa (Fig. 1). Al final de todo, tal hipótesis es tan interesante como especulativa, pero podría constituir una línea de investigación tomando en cuenta además la presencia de mutaciones importantes en genes reguladores como serían los causantes de la polidactilia en la especie.

REFERENCIAS

- Allendorf, F.W. y R.F. Leary.** 1986. Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. En: Soulé, M.E. (ed). Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity. Sinauer. p 57-76.
- Amos, B.** 1996. Levels of genetic variability in cetacean populations have probably changed little as a result of human activities. Report of the International Whaling Commission 46: 657-658.
- Amos, W. y A. Balmford.** 2001. When does conservation genetics matter? Heredity 87: 257-265.
- Ayala, F.J., A. Escalante, C. O'Huigin y J. Klein.** 1994. Molecular genetics of speciation and human origins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 91: 6787-6794.
- Avise J.C., B.W. Bowen, T. Lamb, A.B. Meylan y B. Eldredge.** 1992. Mitochondrial DNA evolution at a turtle's pace: evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the Testudines. Molecular Biology and Evolution 9: 457-473.
- Ballou, J.D.** 1997. Ancestral inbreeding only minimally affects inbreeding depression in mammalian populations. Journal of Heredity 88: 169-178.
- Barlow, J.** 1986. Factors affecting the recovery of *Phocoena sinus*, the vaquita of Gulf of California harbor porpoise. US NMFS. Southwest Fisheries Science Center. Administrative Report No. LJ-86-37. 39 pp.
- Barlow, J., L. Fleischer, K. Forney y C.O. Maravilla.** 1993. An experimental aerial survey for vaquita (*Phocoena sinus*) in the Northern Gulf of California, México. Marine Mammal Science 9: 89-94.
- Barlow, J., T. Gerrodette y G. Silber.** 1997. First estimates of vaquita abundance. Marine Mammal Science 13: 44-58.
- Barnes, L.G.** 1985. Evolution, taxonomy and antitropical distributions of the porpoises (Phocoenidae, Mammalia). Marine Mammal Science 1: 149-165.
- Barret, S.C. y D. Charlesworth.** 1991. Effects of a change in the level of inbreeding on the genetic load. Nature 352: 522-524.
- Belich, M.P., J.A. Madrigal, W.H. Hildebrand, J. Zemmour, R.C. Williams, R. Luz, M.L. Petzl-Erler y P. Parham.** 1992. Unusual *HLA-B* alleles in two tribes of Brazilian indians. Nature 357: 326-333.
- Bijlsma, R., J. Bundgaard y W.F. Van Putten.** 1999. Environmental dependence of inbreeding depression and purging in *Drosophila melanogaster*. Journal of Evolutionary Biology 12: 1125-1137.

- Bijlsma, R., J. Bundgaard y A.C. Boerema.** 2000. Does inbreeding affect the extinction risk of small populations?: predictions from *Drosophila*. *Journal of Evolutionary Biology* 13: 502-514.
- Bjorkman, P.J. y P. Parham.** 1990. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annual Review of Biochemistry* 59: 253-288.
- Bjorkman, P.J., M.A. Saper, B. Samraoui, W.S. Bennett, J.L. Strominger y D.C. Wiley.** 1987a. Structure of the human class I histocompatibility antigen, *HLA-A2*. *Nature* 329: 506-512.
- Bjorkman, P.J., M.A. Saper, B. Samraoui, W.S. Bennett, J.L. Strominger y D.C. Wiley.** 1987b. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329: 512-518.
- Bodmer, W.** 1972. Evolutionary significance of the *HL-A* system. *Nature* 237: 139-145.
- Bonnell, M.L. y R.K. Selander.** 1974. Elephant seals: genetic variation and near extinction. *Science* 184: 908-909.
- Briles, W.E., H.A. Stone y R.K. Cole.** 1977. Marek's disease: effects of B histocompatibility alleles in resistant and susceptible chicken lines. *Science* 195: 193-195.
- Bromham L., A. Rambaut y P. H. Harvey PH.** 1996. Determinants of rate variation in mammalian DNA sequence evolution. *Journal of Molecular Evolution* 6: 610-621.
- Brown, J.H., T.S. Jardetzky, J.C. Gorga, L.J. Stern, R.G. Urban, J.L. Strominger y D.C. Wiley.** 1993. Three dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DRI. *Nature* 364: 33-39.
- Brown, J.L. y A. Eklund.** 1994. Kin recognition an the major histocompatibility complex: an integrative review. *American Naturalist* 143: 435-461.
- Brown, W.M., M. George y A.C. Wilson.** 1979. Rapid evolution of mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 76: 1967-1971.
- Brownell, Jr. R.L.** 1976. Status of the cochito, *Phocoena sinus*, in the Gulf of California. Scientific Consultation on marine mammals. FAO. Bergen, Norway. 4 pp.
- Brownell, Jr. R.L.** 1986. Distribution of the vaquita, *Phocoena sinus*, in Mexican waters. *Marine Mammal Science* 2: 299-305.
- Brownell, Jr. R.L., LI.T. Findley, O. Vidal, A. Robles y S. Manzanilla.** 1987. External morphology and pigmentation of the vaquita *Phocoena sinus* (Cetacea: Mammalia). *Marine Mammal Science* 3: 22-30.
- Byers, D.L. y D.M. Waller.** 1999. Do plant populations purge their genetic load? Effects of population size and mating history on inbreeding depression. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30: 479-513.

- Calambokidis, J., L.T. Findley, R.L. Brownell Jr y J. Barlow.** 1993. Chlorinated hydrocarbon concentrations in the Gulf of California harbor porpoise (*Phocoena sinus*). Abstracts. Tenth Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. Noviembre. Galveston, Texas. p 13.
- Cann, R.L., M. Stoneking y A.C. Wilson.** 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325: 31-36.
- Caro T.M. y K. Laurenson.** 1994. Ecological and genetic factors in conservation: a cautionary tale. *Science* 263: 485-486.
- Carrington, M., G.W. Nelson, M.P. Martin, T. Kissner, D. Vlahov, J.J. Goedert, R. Kaslow, S. Buchbinder, K. Hoots, S.J. O'Brien.** 1999. *HLA* and HIV-1: heterozygote advantage and *B*35-Cw*04* disadvantage. *Science* 283: 1748-1752.
- Charlesworth, D. y B. Charlesworth.** 1999. The genetic basis of inbreeding depression. *Genetic Research* 74: 329-340.
- Charlesworth, B., M.T. Morgan y D. Charlesworth.** 1993. The effect of deleterious mutations on neutral molecular variation. *Genetics* 134: 1289-1303.
- Cisneros-Mata, M.A., G. Montemayor-López y M.J. Román-Rodríguez.** 1995. Life history and conservation of *Totoaba macdonaldi*. *Conservation Biology* 9: 806-814.
- CITES.** 1998. Checklist of CITES species. Compiled by World Conservation Monitoring Center. Cambridge. United Kingdom. 312 p.
- Clark, A.G.** 1997. Neutral behavior of shared polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94: 7730-7734.
- Coltman, D.W., M.D. Bowen y J.M. Wright.** 1998. Birth weight and neonatal survival of harbour seal pups are positively correlated with genetic variation measured by microsatellites. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 265: 803-809.
- Coltman, D.W., J.G. Pilkington, J.A. Smith y J.M. Pemberton.** 1999. Parasite-mediated selection against inbred Soay sheep in a free-living, island population. *Evolution* 53: 1259-1267.
- Crnokrak, P. y D.A. Roff.** 1999. Inbreeding depression in the wild. *Heredity* 83: 260-270.
- Dahlgaard J. y A.A. Hoffmann.** 2000. Stress resistance and environmental dependency of inbreeding depression in *Drosophila melanogaster*. *Conservation Biology* 14: 1187-1192.
- D'Agrosa, C., O. Vidal y W.C. Graham.** 1995. Mortality of the vaquita (*Phocoena sinus*) in gillnet fisheries during 1993-94. Report of the International Whaling Commission. Special Issue 16: 283-391.
- D'Agrosa, C., C.E. Lennert-Cody y O. Vidal.** 2000. Vaquita bycatch in Mexico's artisanal gillnet fisheries: driving a small population to extinction. *Conservation Biology* 14: 1110-1119.

- Diario Oficial de la Federación.** 1993. Secretaría de Pesca. México, D.F. Junio 15. p 15-19.
- Diario Oficial de la Federación.** 1994. Secretaría de Pesca. México, D.F. Febrero 10. p 47-50.
- Dinerstein, E. y G.F. McCracken.** 1990. Endangered greater one-horned rhinoceros carry high levels of genetic variation. *Conservation Biology* 4: 417-422.
- Doherty, P.C. y M.R. Zinkernagel.** 1975. Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *Nature* 256: 50-52.
- Edwards, S.V. y P.W. Hedrick.** 1998. Evolution and ecology of MHC molecules: from genomics to sexual selection. *Trends in Ecology and Evolution* 13: 305-310.
- Edwards, S.V., J. Nusser y J. Gasper.** 2000. Characterization and evolution of major histocompatibility complex (MHC) genes in non-model organisms, with examples from birds. En: A.J. Baker (ed). *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell. Oxford. p 168-207.
- Eldredge, N.** 1989. *Macroevolutionary dynamics*. Mc Graw Hill. USA. 227 ppp.
- Ellegren, H., G. Hartman, M. Johansson y L. Andersson.** 1993. Major histocompatibility complex monomorphism and low levels of DNA fingerprinting variability in a reintroduced and rapidly expanding population of beavers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90: 8150-8153.
- Ellis, S.A., E.C. Holmes, K.A. Staines, K.B. Smith, M.J. Stear, D.J. McKeever, N.D. MacHugh y W.I. Morrison.** 1999. Variation in the number of expressed MHC genes in different cattle class I haplotypes. *Immunogenetics* 50: 319-328.
- Ellstrand, M.C. y D.R. Elam.** 1993. Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 217-242.
- England, P.R. y G.H.R. Osler.** 2001. Geneloss: a computer program for simulating the effects of population bottlenecks on genetic diversity. *Molecular Ecology Notes* 1: 111-113.
- Falconer, D.S. y F.C. Mackay.** 1996. *Introduction to quantitative genetics*. Longman. England.
- Falk, K., O. Röttschke, S. Stevanović, G. Jung y H. Rammensee.** 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351: 290-296.
- Felsenstein, J.** (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17: 368-376.
- Findley, L.T., J.M. Nava y J. Torre.** 1995. Food habits of *Phocoena sinus* (Cetacea: Phocoenidae). Abstracts. Eleventh Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. 14-18 Diciembre. Orlando, Florida.

- Flores-Ramírez, S., J. Urbán-Ramírez y R.D. Miller.** 2000. Major histocompatibility complex class I loci from the grey whale (*Eschrichtius robustus*). *Journal of Heredity* 91: 279-282.
- Flores-Ramírez, S., A. Munguía-Vega, R. Vázquez-Juárez, L. Rojas-Bracho y R.D. Miller.** 2001. Is pathogenic pressure negligible on marine mammals? Evidence from the major histocompatibility complex of gray whales, bottlenose dolphins and vaquitas. Abstracts. Fourteenth Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. 28 Noviembre-3 Diciembre. Vancouver, B.C. p 72.
- Fontaine, P.M., C. Barret y M.O. Hammill.** 1991. Testis size and reproduction of male harbor porpoise in the estuary and the Gulf of St. Lawrence, Quebec, Canadá. Abstracts. Ninth Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. 5-9 Diciembre. Chicago, Illinois. EUA.
- Frankham, R.** 1995a. Inbreeding and extinction: a threshold effect. *Conservation Biology* 9: 792-799.
- Frankham, R.** 1995b. Effective population size/adult size ratios in wildlife: A review. *Genetic Research* 66: 95-107.
- Frankham, R.** 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology* 10: 1500-1508.
- Frankham, R., K. Less, M.E. Montgomery, P.R. England, E.H. Lowe y D.A. Briscoe.** 1999. Do population size bottlenecks reduce evolutionary potential? *Animal Conservation* 2: 255-260.
- Fry, J.D., P.D. Keightley, S.L. Heinsohn y S.V. Nuzhdin.** 1999. New estimates of the rates and effects of mildly deleterious mutation in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96: 574-579.
- Galis, F., J.J.M. van Alphen y J.A.J. Metz.** 2001. Why five fingers? evolutionary constraints on digit numbers. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 637-646.
- Gallo-Reynoso, J.P. y J. Torre-Cosío.** 1997. La vaquita (*Phocoena sinus* Norris y McFarland, 1958) y su hábitat crítico en el Alto Golfo de California. Resúmenes. XXII Reunión Internacional para el Estudio de los Mamíferos Marinos. Nuevo Vallarta, Nayarit. México. p.2.
- Ganopoiski, A., S. Rahmstorf, V. Petoukhov y M. Claussen.** 1998. Simulation of modern and glacial climates with a coupled global model of intermediate complexity. *Nature* 391: 351-356.
- Garber, T.L., A.L. Hughes y N.L. Letvin.** 1993. Sequence and evolution of cattle MHC class-I cDNAs: concerted evolution has not taken place in cattle. *Immunogenetics* 38: 11-20.
- Garrett, T.P., M.A. Saper, P.J. Bjorkman, J.L. Strominger y D.C. Wiley.** 1989. Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature* 342: 692-696.

- Gerrodette, T., L.A. Fleischer, H. Pérez-Cortés y B. Villa-Ramírez.** 1995. Distribution of the vaquita, *Phocoena sinus*, Based on Sightings from Systematic Surveys. Report of the International Whaling Commission, Special Issue 16: 273-282.
- Gibbs, H.L y P.R. Grant.** 1987. Oscillating selection on Darwin's finches. *Nature* 237: 511-513.
- Gilligan, D.M., L.M. Woodworth, M.E. Montgomery, D.A. Briscoe y R. Frankham.** 1997. Is mutation accumulation a threat to the survival of endangered populations? *Conservation Biology* 11: 1235-1241.
- Gilpin, M. y C. Willis.** 1991. MHC and captive breeding: a rebuttal. *Conservation Biology* 5: 554-555.
- Girman, D.** 1996. The use of PCR-based single-stranded conformation polymorphism analysis (PCR-SSCP) in conservation genetics. En: Smith T.B. y R.K. Wayne (eds). *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Oxford University Press, Oxford. p 167-182.
- Goodman, S.J y R. Slade.** 1995. DNA sequence variation in european harbour seal (*Phoca vitulina*) major histocompatibility (MHC) class I genes. Abstracts of the Eleventh Biennial on the Biology of Marine Mammals. Orlando, Florida. p 45.
- Goodwin, H.A. y C.W. Holloway.** 1978. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources Red Data Book. Vol. I. Mammalia. IUCN. Morges, Suiza.
- Grey, H.M., A. Sette y S. Buus.** 1989. How T cells see antigen?. *Scientific American* 261: 56-64.
- Griffiths, R.C. y S. Tavaré.** 1996. Montecarlo inference methods in population genetics. *Mathematical Computational Modelling* 23: 141-158.
- Groombridge, J.J., C.G. Jones, M.W. Bruford y R.A. Nichols.** 2000. Ghost alleles of the Mauritius kestrel. *Nature* 403: 616.
- Gu, Xun y M. Nei.** 1999. Locus specificity of polymorphic alleles and evolution by a birth and death process in mammalian MHC genes. *Molecular Biology and Evolution* 16: 147-156.
- Gulland, F.M.D., S.D. Albon, J.M. Pemberton, P.R. Moorcroft y T.H. Clutton-Brock.** 1993. Parasite-associated polymorphism in a cyclic ungulate population. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 254: 7-13.
- Haig S.M.** 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecology*. 2: 413-425.
- Hartl, G. y Z. Pucek.** 1994. Genetic depletion in the European bison (*Bison Bonasus*) and the significance of electrophoretic heterozygosity for conservation. *Conservation Biology* 8: 167-173.
- Harcourt, S.** 1991. Cheap big science. *Nature* 354: 10.
- Hayashi, K.** 1991. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods and Applications* 1: 34-38.

- Hedrick, P.W.** 1994. Evolutionary genetics of the major histocompatibility complex. *American Naturalist* 143: 945-964.
- Hedrick, P.W.** 1995. Elephant seals and the estimation of a population bottleneck. *Journal of Heredity* 86: 232-235.
- Hedrick, P.W.** 1996. Bottleneck(s) or metapopulation in cheeta? *Conservation Biology* 10: 897-899.
- Hedrick, P.W.** 2000. *Genetics of populations*. 2a ed. Jones y Bartlett. U.S.A. 553 pp.
- Hedrick, P.W.** 2001. Conservation genetics: where are we now?. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 629-636.
- Hedrick, P.W. y S.T. Kalinowski.** 2000. Inbreeding depression in conservation biology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31: 139-162.
- Hedrick, P.W. y P.S. Miller.** 1994. Rare alleles, MHC and captive breeding. En: V. Loeschcke y S.K. Jain (eds). *Conservation Genetics*. Birkhauser Verlag. Suiza. p. 187-203.
- Hedrick, P.W., T.S. Whittam y P. Parham.** 1991. Heterozygosity at individual amino acid sites: extremely high levels for *HLA-A* and *-B* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88: 5897-5901.
- Hedrick, P.W., R.N. Lee y K.M. Parker.** 2000a. Major histocompatibility complex (MHC) variation in the endangered Mexican wolf and related canids. *Heredity* 85: 617-624.
- Hedrick, P.W., K.M. Parker y R.N. Lee.** 2001a. Using microsatellite and MHC variation to identify species, ESUs, and MUs in the endangered Sonoran topminnow. *Molecular Ecology* 10: 1399-1412.
- Hedrick, P.W., G.A. Gutiérrez-Espeleta y R.N. Lee.** 2001b. Founder effect in an island population of bighorn sheep. *Molecular Ecology* 10: 851-857.
- Hedrick, P.W., K.M. Parker, E.L. Miller y P.S. Miller.** 1999. Major histocompatibility complex variation in the endangered Przewalski's horse. *Genetics* 152: 1701-1710.
- Hedrick, P.W., K.M. Parker, G.A. Gutiérrez-Espeleta, A. Rattink y K. Lievers.** 2000b. Major histocompatibility complex variation in the Arabian oryx. *Evolution* 54: 2145-2151.
- Heinzelmann, L., P.H. Ott, E.R. Secchi, A. Zaha y K.L. Haag.** 2001. Lack of MHC class II diversity in Franciscanas (*Pontoporia blainvillei*) from southern Brazil assessed by PCR-SSCP. Abstracts. Fourteenth Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. 28 Noviembre- 3 Diciembre. Vancouver, B.C. Canadá. p 97.
- Higgins, K. y M. Lynch.** 2001. Metapopulation extinction caused by mutation accumulation. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences* 98: 2928-2933.

- Hill, A.V.S., C.E.M. Allsopp, D. Kwiatkowski, N.M. Anstey, P. Twumasi, P.A. Rowe, S. Bennett, D. Brewster, A.J. McMichael y B.M. Greenwood.** 1991. Common west african *HLA* antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 352: 595-600.
- Hoelzel, A.R., J.M. Hancock y G.A. Dover.** 1991. Evolution of the cetacean mitochondrial D-loop region. *Molecular Biology and Evolution* 8: 475-493.
- Hoelzel, A.R., J.C. Stephens y S. O'Brien.** 1999. Molecular genetic and evolution at the MHC *DQB* locus in four species of pinnipeds. *Molecular Biology and Evolution* 16: 611-618.
- Hoelzel, A.R., J. Halley, S.J. O'Brien, C. Campagna, T. Arnbom, B.J. Le Boeuf, K. Ralls y G.A. Dover.** 1993. Elephant seal genetic variation and the use of simulation models to investigate historical population bottlenecks. *Journal of Heredity* 84: 443-449.
- Hohn, A.A., A.J. Read, S. Fernández, O. Vidal y L.T. Findley.** 1996. Life history of the vaquita, *Phocoena sinus* (Phocoenidae, Cetacea). *Journal of Zoology. of London* 239: 235-251.
- Hughes, A.L.** 1991. MHC polymorphisms and the design of captive breeding programs. *Conservation Biology* 5: 249-251.
- Hughes, A.L. y M. Nei.** 1988. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature* 335: 167-170.
- Hughes, A.L. y M. Nei.** 1989. Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: evidence for over dominant selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86: 958-962.
- Hughes, A., T. Ota y M. Nei.** 1990. Positive Darwinian selection promotes charge profile diversity in the antigen-binding cleft of class I major histocompatibility complex molecules. *Molecular Biology Evolution* 7: 515-524.
- Hughes, A.L., M.K. Hughes, C.Y. Howell y M. Nei.** 1997. Natural selection at the class II major histocompatibility complex loci of mammals. En: Hamilton W.D. y J.C. Howard (eds). *Infection, Polymorphism and Evolution*. Chapman. UK. p 89-97.
- Hyde J., J. McClure, S. Mesnik y A. Dizon.** 2001. Low genetic diversity in sperm whales: Diversity takes a dive. Abstracts. Fourteenth Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. Vancouver BC. Nov 28 - dec. 3. p 104.
- IUCN.** 2002. Red List of Threatened Species. International Union for Conservation of Nature. (disponible en: www.iucn.org)
- Jaramillo-Legorreta A.M., L. Rojas-Bracho y T. Gerrodette.** 1999. A new abundance estimate for vaquitas: first step for recovery. *Marine Mammal Science* 15: 957-973.
- Jefferson, T.A. y S. Leatherwood.** 1995. Mamíferos marinos. En: Fisher, W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter y V.H. Niem (eds). *Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental. Vol. III. Vertebrados-Parte 2.* FAO. Roma. p. 1669-1745.

- Jiménez, J.A., K.A. Hughes, G. Alaks, L. Graham y R.C. Lacy.** 1994. An experimental study of inbreeding depression in a natural habitat. *Science* 26: 271-273.
- Kalinowski, S.T., P.W. Hedrick y P. S. Miller.** 2000. Inbreeding depression in the Speke's gazelle captive breeding program. *Conservation Biology* 14: 1375-1384.
- Kaufman, J., J. Salomonsen y M. Flajnik.** 1994. Evolutionary conservation of MHC class I and class II molecules-different yet the same. *Seminars in Immunology* 6: 411-424.
- Keightley, P.D.** 1994. The distribution of mutation effects on viability in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 138: 1315-1322.
- Keller, L.F.** 1998. Inbreeding and its fitness effects in an insular population of song sparrows (*Melospiza melodia*). *Evolution* 52: 240-250.
- Keller, L.F. y D.M. Waller.** 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 230-241.
- Keller, L.F., P. Arcese, J.N.M. Smith, W.M. Hochachka y S.C. Stearns.** 1994. Selection against inbred song sparrows during a natural population bottleneck. *Nature* 372: 356-357.
- Kimura, M.** 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217: 624-626.
- Kimura, M.** 1983. The neutral theory of Molecular Evolution. Cambridge. Cambridge University Press.
- Kirkpatrick, M. y P. Jarne.** 2000. The effects of a bottleneck on inbreeding depression and the genetic load. *American Naturalist* 155: 154-167.
- Klein, J. y C. O'Huigin.** 1997. MHC polymorphism and parasites. En: Hamilton, W.D. y J.C. Howard (eds). *Infection, polymorphism and evolution*. Chapman. UK. p 81-88.
- Klein, J., A. Sato, S. Nagl y C. O'Huigin.** 1998. Molecular trans-species polymorphism. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 1-21.
- Klein, D., H. Ono, C. O'hUigin, V. Vincek, T. Goldschmidt y J. Klein.** 1993. Extensive MHC variability in cichlid fishes of Lake Malawi. *Nature* 364: 330-334.
- Kondrashov, A.S.** 1988. Deleterious mutations and the evolution of sexual reproduction. *Nature* 336: 435-440.
- Kumar, S., K. Tamura, I.B. Jakobsen y M. Nei.** 2001. MEGA 2: Molecular evolutionary genetic analysis software. Arizona State University. Tempe. Arizona. USA.
- Laikre, L. y N. Ryman.** 1991. Inbreeding depression in a captive wolf (*Canis lupus*) population. *Conservation Biology* 45: 104-119.
- Lande, R.** 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science* 241: 1455-1460.

- Lande, R.** 1994. Risk of population extinction from fixation of new deleterious mutations. *Evolution* 48: 1460-1469.
- Lande, R.** 1995. Mutation and conservation. *Conservation Biology* 9: 782-791.
- Latter, B.D.H.** 1998. Mutant alleles of small effect are primarily responsible for the loss of fitness with slow inbreeding in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 148: 1143-1158.
- Ledig, F.T.** 1986. Heterozygosity, heterosis, and fitness in outbreeding plants. En: Soulé, M.E. (ed). *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity*. Sinauer. USA. p. 77-104.
- Lowell, T.V.** 2000. As climate changes, so do glaciers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97: 1351-1354.
- Lunney, J.** 1998. Immunology of the pig. Major histocompatibility complex. En: Pastoret P.P., P. Griebel, H. Bazin y A. Govaerts (eds). *Handbook of vertebrate immunology*. Academic press. New York. p 387-389.
- Lynch, M., J.Conery y R. Burger.** 1995. Mutation accumulation and the extinction of small populations. *American Naturalist* 146: 489-518.
- Mackay, T.F.C., R.F. Lyman y M.S. Jackson.** 1992. Effects of P element insertions on quantitative traits in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 130: 315-332.
- Martin A.P., Palumbi S.R.** 1993. Body Size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90: 4087-4091.
- May, R.M.** 1995. The cheetah controversy. *Nature* 374: 309-310.
- Menotti-Raymond, M. y S.J. O'Brien.** 1993. Dating the genetic bottleneck of the African cheetah. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90: 3172-3176.
- Merola, M.** 1994. A reassessment of homozygosity and the case for inbreeding depression in the cheetah *Acinonyx jubatus*: implications for conservation. *Conservation Biology* 8: 961-971.
- MHC Sequencing Consortium.** 1999. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* 401: 921-923.
- Mikko, S, y L. Andersson.** 1995. Low major histocompatibility complex class II diversity in European and North American moose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92: 4259-4263.
- Miller, P.S. y P.W. Hedrick.** 1991. MHC polymorphism and the design of captive breeding programs: simple solutions are not the answer. *Conservation Biology* 5: 556-558.
- Mills, L.S. y P.E. Smouse.** 1994. Demographic consequences of inbreeding in remnant populations. *American Naturalist* 144: 412-431.

- Milinkovitch, M.C., G. Ortí y A. Meyer.** 1993. Revised phylogeny of whales suggested by mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Nature* 361:346-348.
- Milinkovitch, M.C. y J.G.M. Thewissen.** 1997. Even-toed fingerprints on whale ancestry. *Nature* 388: 622-624.
- Muirhead, C.A.** 2001. Consequences of population structure on genes under balancing selection. *Evolution* 55: 1532-1541.
- Mukai, T., S.I. Chigusa, L.E. Mettler y J.F. Crow.** 1972. Mutation rate and dominance of genes affecting viability in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 72: 333-355.
- Murray, B.W. y B. N. White.** 1998. Sequence variation at the major histocompatibility complex *DRB* loci in beluga (*Delphinapterus leucas*) and narwhal (*Monodon monoceros*). *Immunogenetics* 48: 242-252.
- Murray, B.W., S. Malik y B.N. White.** 1995. Sequence variation at the major histocompatibility complex locus *DQB* in beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *Molecular Biology and Evolution* 12: 582-593.
- Murray, B.W., R. Michaud y B.N. White.** 1999. Allelic and haplotype variation of major histocompatibility complex class II *DRB1* and *DQB* loci in the St Lawrence beluga (*Delphinapterus leucas*). *Molecular Ecology* 8: 1127-1139.
- Nei, M.** 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press. New York.
- Nei, M., X. Gu y T. Sitnikova.** 1997. Evolution by the birth and death process in multigene families of the vertebrate immune system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94: 7799-7806.
- Newman, D. y D. Pilson.** 1997. Increased probability of extinction due to decreased genetic effective size: experimental populations of *Clarkia pulchella*. *Evolution* 51: 354-362.
- Norris, K.S. y W.N. McFarland.** 1958. A new harbor porpoise of the genus *Phocoena* from the Gulf of California. *Journal of Mammalogy* 39: 22-39.
- Nunney, L.** 1993. The influence of mating system and overlapping generations on effective population size. *Evolution* 47: 1329-1341.
- O'Brien, S.J.** 1994. A role for molecular genetics in biological conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91: 5748-5755.
- O'Brien, S.J. y J.F. Evermann.** 1988. Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations. *Trends in Ecology and Evolution* 3: 254-259.
- O'Brien, S., D.E. Wildt, D. Goldman, C.R. Merrill y M. Bush.** 1983. The cheetah is depauperate in genetic variation. *Science* 221: 459-461.

- O'Brien, S.J., M.E. Roelke, L. Marker, A. Newman, C.A. Winkler, D. Meltzer, L. Colly y J.F. Evermann.** 1985. Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. *Science* 227: 1428-1434.
- Ohta, T.** 1998. On the pattern of polymorphisms at Major Histocompatibility Complex loci. *Journal of Molecular Evolution* 46: 633-638.
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi y T. Sekiya.** 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86: 2766-2770.
- Ortega-Ortíz, J.G., B. Villa-Ramírez y J.R. Gersenowies.** 2000. Polidactyly and other features of the manus of the vaquita *Phocoena sinus*. *Marine Mammal Science* 16: 277-286.
- Packer, C., A.E. Pusey, H. Rowley, D.A. Gilbert, J. Martenson y S.J. O'Brien.** 1990. Case study of a population bottleneck: lions of the Ngorongoro crater. *Conservation Biology* 5: 219-230.
- Page, R.D.M y E.C. Homes.** 1998. *Molecular evolution. A phylogenetic approach.* Blackwell. Cambridge. UK. 346 pp.
- Paterson, S.** 1998. Evidence for balancing selection at the major histocompatibility complex in a free-living ruminant. *The Journal of Heredity* 89: 289-294.
- Paterson, S., K. Wilson y J.M. Pemberton.** 1998. Major histocompatibility complex variation associated with juvenile survival and parasite resistance in a large unmanaged ungulate population (*Ovis aries*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95: 3714-3719.
- Pauly, D., A. W. Trites, E. Capuli, y V. Christensen.** 1998. Diet composition and trophic levels of marine mammals. *ICES Journal of Marine Science* 55: 467-481.
- Pérez-Cortés, M.H.** 1996. Contribución al conocimiento de la biología de la vaquita *Phocoena sinus*. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 68 pp.
- Pesole G., C. Gissi, A. De Chirico y C Saccone.** 1999. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution* 48:427-434.
- Peteet, D.** 2000. Sensitivity and rapidity of vegetational response to abrupt climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97: 1359-1361.
- Posada, D. y K.A. Crandall.** 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Pray, L.A., J.M. Schwartz, C.J. Goodnight y L. Stevens.** 1994. Environmental dependency of inbreeding depression: implications for conservation biology. *Conservation Biology* 8: 562-568.

- Primack, R.B.** 1998. Essentials of Conservation Biology. 2nd ed. Sinauer. USA. 659 pp.
- Pusey, A. Y M. Wolf.** 1996. Inbreeding avoidance in animals. Trends in Ecology and Evolution 11: 201-206.
- Radtkey, R.R., B. Becker, R.D. Miller, R. Riblet y T.J. Case.** 1996. Variation and evolution of Class I MHC in sexual and parthenogenetic geckos. Proceedings of the Royal Society of London, Series B 263: 1023-1032.
- Ralls, K. y J. Ballou.** 1983. Extinction: lessons from zoos. En: Schonewald-Cox C.M., S.M. Chambers, B. MacBryde y L. Thomas (eds). Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant populations. Benjamin Cummings. Menlo Park. p 164-184.
- Ralls, K., K. Brugger y J. Ballou.** 1979. Inbreeding and juvenile mortality in small populations of ungulates. Science 206: 1101-1104.
- Ralls, K., J. Ballou y A. Templeton.** 1988. Estimates of lethal equivalents and the cost of inbreeding in mammals. Conservation Biology 2: 185-193.
- Randi, E.** 2000. Mitochondrial DNA. En: A.J. Baker (ed). Molecular methods in ecology.. Blackwell. Oxford. p 136-167.
- Ridgway, S.H. y R. Harrison.** 1999. Handbook of marine mammals. Volumen 6: The second book of dolphins and porpoises. Academic Press. USA. 472 pp.
- Robles, A., O. Vidal y L.T. Findley.** 1987. La totoaba y la vaquita. Información Científica y Tecnológica 9 (124): 4-6.
- Rojas-Bracho, L. y B.L. Taylor.** 1999. Risk factors affecting the vaquita (*Phocoena sinus*). Marine Mammal Science 15: 974-989.
- Rooney, A.P., R.L. Honeycut y J.N. Derr.** 2001. Historical population size change of bowhead whales inferred from DNA sequence polymorphism data. Evolution 55: 1678-1685.
- Rosel, P. y L. Rojas-Bracho.** 1999. Mitochondrial DNA variation in the critically endangered vaquita, *Phocoena sinus*. Marine Mammal Science 15: 990-1003.
- Rosel, P.E., M.G. Haygood y W.F. Perrin.** 1995. Phylogenetic relationships among the true porpoises (Cetacea: Phocoenidae). Molecular Phylogenetics and Evolution 4: 463-474.
- Saccheri, I., P.M. Brakefield y R.A. Nichols.** 1996. Severe inbreeding depression and rapid fitness rebound in the butterfly *Bicyclus anynana* (Satyridae). Evolution 50: 2000-2013.
- Saccheri, I.J., M. Kuussaari, P. Vikman, W. Fortelius y I. Hanski.** 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. Nature 392: 491-494.

- Sanjayan, M.A., K. Crooks, G. Zegers y D. Foran.** 1996. Genetic variation and the immune response in natural population of pocket gophers. *Conservation Biology* 10: 1519-1527.
- Santiago, E., J. Albornoz, A. Domínguez, M.A. Toro y C. López-Fanjul.** 1992. The distribution of spontaneous mutations on quantitative traits and fitness in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 132: 771-781.
- Satta, Y., C. O'Huigin, N. Takahata y J. Klein.** 1994. Intensity of natural selection at the major histocompatibility complex loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91: 7184-7188.
- Schlötterer, C. B. Amos y D. Tautz.** 1991. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature* 354: 63-65.
- Seddon, S.M. y P.R. Baverstock.** 1999. Variation on islands: major histocompatibility complex (*Mhc*) polymorphism in populations of the Australian bush rat. *Molecular Ecology* 8: 2071-2079.
- She, J.X., S.A. Boehme, T.W. Wang, F. Bonhommf y E.K. Wakeland.** 1991. Amplification of major histocompatibility complex class II gene diversity by intraexonic recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88: 453-457.
- Shirai, K., T. Saki y T. Oike.** 1998. Molecular cloning of bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*) MHC class I cDNA. *Journal of Veterinay Medicine and Science* 60: 1093-1096.
- Siguadardóttir, S., C. Borsch, K. Gustafsson y L. Anderson.** 1992. Gene duplications and sequence polymorphism of bovine class II *DQB* genes. *Immunogenetics* 35: 205-213.
- Silber, G.K.** 1990. Occurrence and distribution of the vaquita *Phocoena sinus* in the Northern Gulf of California. *Fishery Bulletin U.S.* 88: 339-346.
- Silber, G.K y N.S. Norris.** 1991. Geographic and seasonal distribution of the vaquita, *Phocoena sinus*. *Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Zoología* 62(2): 263-268.
- Slade, R.** 1992. Limited MHC polymorphism in the southern elephant seal: implications for MHC evolution and marine mammal population biology. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 249: 163-171.
- Slatkin, M.** 2000. Balancing selection at closely linked, overdominant loci in a finite population. *Genetics* 154: 1367-1378.
- Smith, P.J.** 1996. La diversidad genética de los recursos pesqueros marinos: posibles repercusiones de la pesca. *FAO Documento Técnico de Pesca. No. 344. FAO. Roma. 59 pp.*
- Sommer, S., y H. Tichy.** 1999. Major histocompatibility complex (MHC) class II polymorphism and paternity in the monogamous *Hypogeomys antimena*, the endangered, largest endemic Malagasy rodent. *Molecular Ecology* 8: 1259-1272.

- Soulé, M.E.** 1986. Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity. Sinauer. USA. 584 pp.
- Stanley, S.M.** 1975. A theory of evolution above the species level. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 72: 646-650.
- Stern, L.J., J.H. Brown, T.S. Jardetzky J.C. Gorga, R.G. Urban, J.L. Strominger y D.C. Wiley.** 1994. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with and influenza virus peptide. Nature 368: 215-221.
- Sunnucks, P., A.C.C. Wilson, L.B. Beheregaray, K. Zenger, J. French y A.C. Taylor.** 2000. SSCP is not so difficult: application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. Molecular Ecology 9: 1699-1710.
- Swarbrick, P.A. y A.M. Crawford.** 1997. The red deer (*Cervus elaphus*) contains two expressed major histocompatibility complex class II *DQB* genes. Animal Genetics 28: 49-51.
- Swofford, D.L.** 2002. PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony. Ver.4.0b10. Smithsonian Institute. Illinois Natural History Survey. Champaign. ILL.
- Takahata, N.** 1990. A simple genealogical structure of strongly balanced allelic lines and trans-species evolution of polymorphism. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 87: 2419-2423.
- Tang, T., A. Smith, H. Noreen, M. Fernández-Viña, B. Schmeckpeper, D. Middleton y C.K. Hurley.** 2000. Primers and probes for HLA class II typing. Thirteenth International Histocompatibility Workshop. Version 1.4. 77 pp.
- Taylor, B.L. y T. Gerrodette.** 1993. The uses of statistical power in conservation biology: the vaquita and Northern spotted owl. Conservation Biology 7: 489-500.
- Taylor, B. y L. Rojas-Bracho.** 1999. Examining the risk of inbreeding depression in a naturally rare cetacean, the vaquita (*Phocoena sinus*). Marine Mammal Science 15: 1004-1029.
- Tebbe, C.C., A. Schmalenberger, S. Peters y F. Schwieger.** 2001. Single strand conformation polymorphism (SSCP) for microbial community analysis. En: A. Rochelle (ed). Enviromental Molecular Microbiology: Protocols and Applications. Horizon Scientific Press. Wymondham, UK. p 161-175.
- Thomas, M.L., J.H. Harger, D.K. Wagener, B.S. Rabin y T.J. Gill.** 1985. HLA sharing and spontaneous abortion in humans. American Journal of Obstetrics and Gynecology 151: 1053-1058.
- Thurz, M.R., H.C. Thomas, B.M. Greenwood y A.V.S. Hill.** 1997. Heterozygote advantage for HLA class-II type in hepatitis B virus infection. Nature Genetics 17: 11-12.

- Tiedemann, R., K. Nadlinger y Z. Pucek.** 1998. Mitochondrial DNA-RFLP analysis reveals low levels of genetic variation in European bison *Bison bonasus*. *Acta Theriologica*, Suppl. 5: 83-87.
- Trowsdale, J., V. Groves y A. Arnason.** 1989. Limited MHC polymorphism in whales. *Immunogenetics* 29: 19-24.
- Turk, B.P. y G. Silber.** 1994. Estimate of vaquita, *Phocoena sinus*, mortality in gillnet fisheries in the Northern Gulf of California, México. *Reports of the International Whaling Commission*, Special Issue 15: 628-629.
- Van der Walt, J.M., L.H. Nel y A.R. Hoelzel.** 2001. Characterization of major histocompatibility complex *DRB* diversity in the endemic South African antelope *Damaliscus pygargus*: a comparison in two subspecies with different demographic histories. *Molecular Ecology* 10: 1679-1688.
- Vidal, O.** 1995. Population biology and incidental mortality of the vaquita, *Phocoena sinus*. Report of the International Whaling Commission, Special Issue 16: 247-272.
- Vidal, O., R.L. Brownell Jr. y L.T. Findley.** 1999. Vaquita (*Phocoena sinus*) Norris and McFarland, 1958. En: Ridgway, S.H. y R. Harrison (eds). *Handbook of marine mammals*. Volumen 6: The second book of dolphins and porpoises. Academic Press. USA. p 357-378.
- Villa-Ramírez, B.** 1976. Report on the status of *Phocoena sinus*, Norris y McFarland 1958, in the Gulf of California. *Anales del Instituto de Biología de la UNAM. Serie Zoología* 47(2): 203-208.
- Villa-Ramírez B.** 1978. Especies Mexicanas de vertebrados silvestres raras o en peligro de extinción. *Anales del Instituto de Biología de la UNAM. Serie Zoología* 49(1): 303-320.
- Vincek, V., C. O'Huigin, Y. Satta, N. Takahata, P.T. Boag, P.R. Grant, B.R. Grant, y J. Klein.** 1997. How large was the founding population of Darwin's finches? *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 264: 111-118.
- Vrijenhoek, R.C. y P.L. Leberg.** 1991. Let's not throw the baby out with the bathwater: a comment on management for MHC diversity in captive populations. *Conservation Biology* 5: 252-254.
- Wang, J. y W.G. Hill.** 1999. Effect of selection against deleterious mutations on the decline in heterozygosity at neutral loci in closely inbreeding populations. *Genetics* 153: 1475-1489.
- Watkins, D.I., Z.W. Chen, A.L. Hughes, M.G. Evans, T.F. Tedder y N.L. Letvin.** 1990. Evolution of the MHC class I genes of a New World primate from ancestral homologues of human nonclassical genes. *Nature* 346: 60-63.
- Watkins, D.I., S.N. McAdam, X. Liu, C.R. Strang, E.L. Milford, C.G. Levine, T.L. Garber, A.L. Dogon, C.I. Lord, S.H. Ghim, G.M. Troup, A.L. Hughes y N.L. Letvin.** 1992. New recombinant *HLA-B* alleles in a tribe of South American Amerindians indicate rapid evolution of MHC class I loci. *Nature* 357: 329-333.

- Wayne, R.K., N. Lehman, D. Girman, P.J.P. Gogan, D.A. Gilbert, K. Hansen, R.O. Peterson, U.S. Seal, A. Eisenhauer, L.D. Mech y R.J. Krumenaker.** 1991. Conservation Genetics of the endangered Isle Royale gray wolf. *Conservation Biology* 5: 41-51.
- Wildt, D.E., M. Bush, K.L. Goodrowe, C. Packer, A.E. Pusey, J.L. Brown, P. Joslin y S.J. O'Brien.** 1987. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. *Nature* 329: 338-331.
- Wynen L.P., S.D. Goldsworthy, C. Guinet, M.N. Bester, I.L. Boyd, I. Gjertz, G.J.G. Hofmeyr, R.W.G. White y R. Slade.** 2000. Postsealing genetic variation and population structure of two species of fur seal (*Arctocephalus gazella* and *A. tropicalis*). *Molecular Ecology* 9: 299-314.
- Xu, A., M.J.T. Van Eijk, C. Park y H.A. Lewin.** 1993. Polymorphism on *BoLA-DRB3* exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *Journal of Immunology* 151: 6977-6985.
- Yang, Z. y J.P. Bielawski.** 2000. Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 496-503.
- Yuhki, N. y S.J. O'Brien.** 1990. DNA variation of the mammalian major histocompatibility complex reflects genomic diversity and population history. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 87: 836-840.

Anexo 1

Límites de la influencia de la selección natural sobre la deriva genética

Coefficientes de selección (valores de s) mínimos necesarios para contrarrestar a la deriva genética en poblaciones pequeñas ($N_e < 500$), de acuerdo a $s = 1/2N_e h$ (Kimura, 1983; Lynch *et al.* 1995), considerando distintos grados de dominancia: $h=1$ (dominancia completa), $h = 0.8$, $h=0.5$ (codominancia) y $h= 0.2$. También se muestra la selección observada en el *Mhc* humano (*HLA*) ($s= 10/N_e$, Takahata, 1990). Ver Figura 7.

Ne	h=0.2	h=0.5	h=0.8	h=1	HLA
20	0.125	0.05	0.0312	0.025	0.5
40	0.0625	0.025	0.0156	0.0125	0.25
60	0.0416	0.0166	0.0104	0.0083	0.1666
80	0.0312	0.0125	0.0078	0.0062	0.125
100	0.025	0.01	0.0062	0.005	0.1
120	0.0208	0.0083	0.0052	0.0041	0.0833
140	0.0178	0.0071	0.0044	0.0035	0.0714
160	0.0156	0.0062	0.0039	0.0031	0.0625
180	0.0138	0.0055	0.0034	0.0027	0.0555
200	0.0125	0.005	0.0031	0.0025	0.05
220	0.0113	0.0045	0.0028	0.0022	0.0454
240	0.0104	0.0041	0.0026	0.0020	0.0416
260	0.0096	0.0038	0.0024	0.0019	0.0384
280	0.0089	0.0035	0.0022	0.0017	0.0357
300	0.0083	0.0033	0.002	0.0016	0.0333
320	0.0078	0.0031	0.0019	0.0015	0.0312
340	0.0073	0.0029	0.0018	0.0014	0.0294
360	0.0069	0.0027	0.0017	0.0013	0.0277
380	0.0065	0.0026	0.0016	0.0013	0.0263
400	0.0062	0.0025	0.0015	0.0012	0.025
420	0.0059	0.0023	0.0014	0.0011	0.0238
440	0.0056	0.0022	0.0014	0.0011	0.0227
460	0.0054	0.0021	0.0013	0.0010	0.0217
480	0.0052	0.0020	0.0013	0.0010	0.0208
500	0.005	0.002	0.0012	0.001	0.02

Anexo 2. Origen de los ejemplares de *P. sinus* analizados (ver Rosel y Rojas-Bracho, 1999; Vidal, 1995). (-) indica información no disponible. (Φ) indica los individuos no analizados para la región control mitocondrial por Rosel y Rojas-Bracho (1999).

No.	Número de catálogo	Fecha de colecta	Localidad de colecta	Sexo	Longitud (cm)	Madurez Sexual
1	ITESEM900519	05/19/90	El Golfo de Santa Clara	M	127	NO
2	ITESEM930518	05/18/93	El Golfo de Santa Clara	M	109.4	NO
3	ITESEM 930616	06/16/93	Rocas Consagradas	-	-	-
4	ITESEM900412	04/12/90	El Burro Sonora	M	131.8	SI
5	ITESEM920124	01/24/92	El Quelele, Baja California	H	113.2	NO
6	ITESEM910407	04/07/91	El Burro, ca El Golfo de Santa Clara	M	135.8	SI
7	ITESEM900526	05/26/90	El Tornillal (Φ)	M	113.7	NO
8	ITESEM910312-1	03/12/91	El Burro, ca El Golfo de Santa Clara	M	109.1	NO
9	ITESEM920120	01/20/92	El Quelele, ca El Golfo de Santa Clara	H	116.6	NO
10	ITESEM930403	04/03/93	-	H	116.3	NO
11	ITESEM900408	04/02/90	El Quelele, Baja California	H	135	SI
12	ITESEM930206	02/06/93	-	H	145.2	SI
13	ITESEM910304	03/04/91	El Golfo de Santa Clara	H	128.7	NO
14	ITESEM930222	02/22/93	El Tornillal, Sonora	-	-	-
15	ITESEM910224-1	02/24/91	ca El Golfo de Santa Clara (Φ)	H	71.5	NO
16	ITESEM910331	03/31/91	El Burro, ca El Golfo de Santa Clara	H	140.5	SI
17	ITESEM910222-1	02/22/91	El Burro, ca El Golfo de Santa Clara	H	120.7	NO
18	ITESEM900408-02	04/02/90	El Quelele, Baja California	M	78.2	NO
19	ITESEM910313-3	03/13/91	Entre El Burro y el Tornillal (Φ)	M	144	SI
20	ITESEM910312-2	03/12/91	El Burro, Sonora	H	74.9	NO
21	ITESEM930331	03/31/93	El Quelele, Baja California	M	129.8	SI
22	ITESEM930416	04/16/93	El Quelele, Baja California	-	-	-
23	UABCS	14/03/00	San Felipe (Φ)	M	-	-
24	UABC5-7792	07/1992	El Borrascoso ca El Golfo de Santa Clara	-	-	-
25	UABC6-7693	06/1993	San Felipe	-	-	-

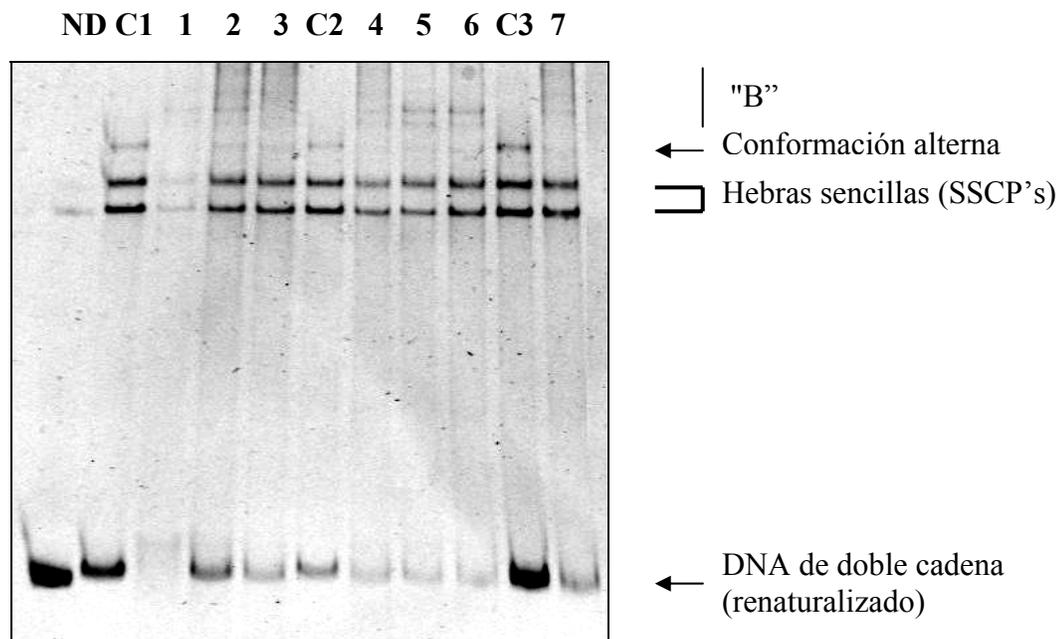
Anexo 3

Notas sobre la estandarización y desempeño de la técnica SSCP

Para lograr una separación y visualización adecuada de los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla, como la que se muestra en la Figura 8, fue necesario realizar una labor intensiva de optimización. Para ello se exploró el desempeño de la técnica bajo las siguientes condiciones de corrida con base en recomendaciones de estudios previos (Sunnucks *et al.* 2000; Tebbe *et al.* 2001), así como en observaciones empíricas realizadas durante el trabajo en el laboratorio: concentración de acrilamida del gel (6, 8, 10 y 12%), concentración de glicerol en el gel (5, 10, 15 y 20%), concentración final de formamida en la muestra (20, 40, 60 y 80%) y temperatura de corrida (4, 8, 15, 20 y 25° C).

Sunnucks *et al.* (2000) y Tebbe *et al.* (2001) mencionan que una molécula de ADN puede llegar a presentar más de una conformación de hebra sencilla estable bajo ciertas condiciones, en cuyo caso se observan en los geles SSCP como bandas extras de mucho menor intensidad. Durante el proceso de estandarización, se observó que el alelo *Phsi-DQB*01* podía presentar varias conformaciones SSCP alternas (múltiples) dependiendo de las condiciones de corrida y de la cantidad de ADN cargado en el gel SSCP. Por ejemplo, las secuencias individuales reamplificadas de las clonas presentaban de manera consistente una banda extra de menor intensidad (“conformación alterna” en Figura 8, y en la Figura de abajo), que se llegó a observar también en algunos individuos cuando se cargaba un exceso de ADN en el gel.

Otro tipo de conformaciones alternas se observan también en la Figura de abajo donde se encuentran marcadas como “B”. Durante el proceso de estandarización estas sutiles bandas extras causaron confusión, pues se llegó a pensar que correspondían a secuencias distintas. No obstante, con base en el re-análisis de las muestras bajo el protocolo final (Ver Métodos), así como en su reamplificación a partir del gel y re-análisis SSCP (Tebbe *et al.* 2001), y en la secuenciación de individuos adicionales (Ver Resultados), se confirmó que estas bandas marcadas como “B” correspondían a conformaciones alternas del alelo *Phsi-DQB*01* que se producían bajo ciertas condiciones (subóptimas) de corrida y que se relacionaban con un exceso en la cantidad de ADN cargado en el gel.



Gel SSCP del segundo exón del locus *DQB* en *P. sinus*, bajo condiciones subóptimas de corrida durante el proceso de estandarización de la técnica (temperatura 15° C, acrilamida 8%, formamida 80%, sin glicerol). 1-7 individuos de *P. sinus* (Individuos No. 1, 5, 6, 9, 10, 12 y 23 del Anexo 2, respectivamente). ND= muestra No Desnaturalizada; C1, C2 y C3 clonas del alelo *Phsi-DQB*01* aisladas de los individuos No. 1, 9 y 23 del Anexo 2, respectivamente.