

Secuencia y estructura de la región control mitocondrial del roedor cubano *Capromys pilorides* (Rodentia: Capromyidae)

✉ Alejandro Silva¹, Adriana Artiles^{2,3}, William Suárez⁴, Gilberto Silva⁴

¹Grupo de Tecnología, Empresa de Gestión del Conocimiento y la Tecnología, GECYT
Calle 20 e/ 41 y 47 #4110, Playa, La Habana, Cuba

²Laboratorio de Genética Molecular, Hospital Hermanos Ameijeiras
San Lázaro 701 esq. Belascoaín, Centro Habana, CP 10 300, La Habana, Cuba

³Laboratorio de Sanidad Acuicola, Centro de Investigaciones Pesqueras, CP
5ta. Avenida y 246, Barlovento, Santa Fe, Playa, CP 19100, La Habana, Cuba

⁴Departamento de Paleogeografía y Paleobiología,
Museo Nacional de Historia Natural de Cuba, MNHNCu
Obispo 61, Plaza de Armas, Habana Vieja, CP 10100, La Habana, Cuba
E-mail: alejo@gecyt.cu

INVESTIGACIÓN

RESUMEN

Con el objetivo de explorar los patrones de variación y la presencia de los dominios y subsecuencias se secuenció la región control mitocondrial (D-loop) completa de *Capromys pilorides*, un roedor autóctono cubano, y se comparó con la descripción de otros dos roedores hystricognathos caviomorfos. Los resultados mostraron que la región control mitocondrial completa de esta especie cuenta con 1336 pares de bases, y se verificó la presencia de los dominios y las secuencias extendidas asociadas a la terminación (ETAS), central (CD), y bloque de secuencias conservadas (CSB) y las subsecuencias ETAS1, ETAS2, CSB1, CSB2, y CSB3. A su vez, se observó una región de ADN repetitivo entre las subsecuencias CSB1 y CSB2. La región más conservada resultó ser la correspondiente al dominio CD, a la que siguen los dominios ETAS y CSB. El análisis comparativo de la composición de bases entre dominios y de la distancia genética, apoya el propósito de utilizar estas secuencias como fuentes de marcadores útiles para los estudios de genética poblacional, con aplicación a la conservación de esta y otras especies de roedores cubanos afines, algunas de ellas en severo riesgo de extinción.

Palabras clave: *Capromys pilorides*, estructura D-loop, roedores

Biotecnología Aplicada 2011;28:130-135

ABSTRACT

Sequence and structure of the mitochondrial control region of the Cuban rodent *Capromys pilorides* (Rodentia: Capromyidae). The complete mitochondrial DNA (mtDNA) control region from *Capromys pilorides*, an autochthon Cuban rodent, was sequenced and compared to two other species of hystricognath caviomorph rodents, in order to know patterns of variation and to explore the existence of previously described domains and other elements in rodents. The results revealed that the complete D-loop region of this species is 1336 base pairs long. Our data were compatible with the proposal of three domains [extended terminal associated sequences (ETAS), central (CD), and conserved sequence blocks (CSB)] within the control region, as well as the subsequences ETAS1, ETAS2, CSB1, CSB2, and CSB3. Likewise, a repetitive DNA region between the subsequences CSB1 and CSB2 was observed. The most conserved domain in the mitochondrial control region was the CD domain followed by ETAS and CSB domains in that order. The comparative analysis on base composition and genetic distance support the rationale of using the mitochondrial control region as a source of useful markers for population genetic studies with application to the conservation of this and other related Cuban rodent species, some of them under severe extinction risk.

Keywords: *Capromys pilorides*, D-loop structure, rodents

Introducción

Por las características del ADN mitocondrial de los vertebrados, como la herencia maternal, la presencia de una sola copia de genes ortólogos, la casi inexistencia de recombinación [1], la alta tasa de mutación [2], y su relativamente fácil amplificación por ser multicopia, determinan que esta biomolécula sea esencial en estudios genéticos, taxonómicos, sistemáticos y evolutivos, y que se use particularmente en genética para la conservación de la biodiversidad. Se ha convertido en la fuente más popular de marcadores moleculares en las últimas tres décadas [3].

Los genomas mitocondriales de mamíferos existen como moléculas circulares de doble cadena cerradas,

que contienen 13 genes codificantes para proteínas, 2 genes para ARN ribosomales y 22 genes para ARNt. Las regiones no codificantes se limitan a las áreas denominadas región control o D-loop, involucrada en la replicación y la transcripción de estas moléculas, y la región OL, cuyo papel funcional se asocia al inicio de la replicación [4]. Varios estudios revelan que la parte de más rápida evolución del genoma mitocondrial es la región control o D-loop [5]. Las investigaciones de la región D-loop en los mamíferos [6] reportan la existencia de tres dominios; el dominio de secuencias extendidas asociadas a la terminación (ETAS; desde el ARNt prolinea al dominio central), el dominio

1. Hurst GDD, Jiggins FM. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 2005;272:1525-34.

2. Nabholz B, Glémin S, Galtier N. Strong variations of mitochondrial mutation rate across mammals the longevity hypothesis. *Mol Biol Evol.* 2008;25(1):120-30.

3. Galtier N, Nabholz B, Glémin S, Hurst GD. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Mol Ecol.* 2009;18(22):4541-50.

central (CD), y el dominio de bloques de secuencias conservados (CSB) (del CD al ARNt fenilalanina). Los estudios comparativos de la región control mitocondrial (RCM) de los mamíferos han demostrado que cada uno de los tres dominios presenta un patrón distinto de variación, con regiones que evolucionan rápidamente, como por ejemplo los dominios ETAS y CSB; mientras que el CD mantiene un alto grado de conservación entre especies [6, 7].

El análisis de 25 secuencias completas de la RCM de 23 especies pertenecientes a los subórdenes Sciurognathi e Hystricognathi del orden Rodentia, más un Lagomorfo [8], apunta a que solamente el dominio central (CD), una región conservada del dominio ETAS, adyacente al CD, el ETAS1, y el bloque de secuencia conservado 1 (CSB1) del dominio CSB se encuentran en todas las especie de roedores. No obstante, es importante puntualizar que en este estudio, los roedores del suborden Hystricognathi estuvieron representados por solo 4 especies.

Los mapas de la biodiversidad mundial muestran alrededor de 2000 especies de roedores: de ellas, más de 40 especies y 12 géneros descubiertos desde 1992 en la zona neotropical solamente [9]. Se conoce además que la vulnerabilidad de este grupo de mamíferos se ha incrementado pues entre el 50 y el 51% de sus especies se han extinguido en los últimos 500 años [10]. Existen 388 especies vivientes de roedores que habitan en islas, clasificadas en 127 géneros y 10 familias. La familia endémica antillana *Capromyidae* pertenece a los roedores hystricognathoscaviomorfos del nuevo mundo, y de todas las familias de roedores existentes, es la única endémica restringida a islas [11].

La subfamilia Capromyinae, una de las agrupadas en la familia *Capromyidae*, está compuesta por las especies de jutías vivientes y extinguidas. En la actualidad se reconocen 5 géneros con 26 especies en esta subfamilia; de ellas, 17 (66%) son extintas. Se reportan 7 especies vivientes en Cuba [12] de las cuales 5 enfrentan diferentes grados de amenaza de extinción [13]. Se conoce además que las especies vivientes de jutías constituyen el único grupo de mamíferos terrestres en Cuba aún observables en nuestra naturaleza, pues el resto se ha extinguido o no se conocen registros recientes de observación, como en el caso del almiquí (*Solenodon cubanus*) [12].

Capromys pilorides (CP) es la especie de caprómicos, de mayor abundancia y más amplia distribución en el archipiélago cubano; ocupa disímiles hábitats y muestra una amplia variabilidad fenotípica [14-17]. Por tanto, esta especie puede ser de utilidad para conocer la secuencia y la estructura de la región D-loop de estos roedores con vistas a estudios genéticos con aplicación en la conservación de estas especies.

Para alcanzar este propósito se obtuvo la secuencia y se determinó la estructura de la región D-loop de CP, luego se comparó con las de otros dos roedores hystricognathoscaviomorfos: *Cavia porcellus* (CV) y *Octodon degus* (OD).

Materiales y métodos

Especies en estudio

La tabla 1 describe los datos relevantes de las especies utilizadas en este trabajo, según la correspondencia

Tabla 1. Especie de roedores en este estudio

Especie	Ejemplar	Familia	Suborden	No. de acceso ^a
<i>Capromys pilorides</i>	MNHNCU-25.0066	Capromyidae	Hystricognathi	FR686471
<i>Capromys pilorides</i>	MNHNCU-25.0067	Capromyidae	Hystricognathi	NE ^b
<i>Octodon degus</i>	ND	Octodontidae	Hystricognathi	AY007362
<i>Cavia porcellus</i>	ND	Caviidae	Hystricognathi	AJ222767
<i>Mus musculus</i>	ND	Muridae	Sciurognathi	AJ512208
<i>Rattus norvegicus</i>	ND	Muridae	Sciurognathi	NM181627

^aGenBank/EMBL.

^bNE: secuencia no reportada en la base.

ND: No determinado.

taxonómica a nivel de familia y el suborden del orden *Rodentia*, así como el número de acceso a GenBank para las secuencias utilizadas en las comparaciones.

Extracción y amplificación de ADN

El ADN total de dos especímenes de CP, pertenecientes a la colección de materiales biológicos en congelación del Museo Nacional de Historia Natural de Cuba (MNHNCU), se obtuvo a partir de hígado, utilizando el sistema DNeasy Tissue (Qiagen, EE.UU.), y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El ADN se utilizó en la amplificación de un fragmento de ADN mitocondrial de aproximadamente 2.3 kb, que contenía las secuencias para el extremo 3' del gen citocromo b, los ARNt treonina y prolina, la RCM, el ARNt fenilalanina, y una porción del gen 12s, mediante los cebadores O-009 (5'-GCCTATGCCATCCTACGCTC-3') y O-012 (5'-GGTGTGCTTGATACCCGCTC-3') (Figura 1). Ambos cebadores se diseñaron a partir de las secuencias reportadas [18, 19] para los genes citocromo b y 12s mitocondriales de CP y mediante la aplicación del software FastPCR [20] (Figura 1).

Las reacciones de amplificación (PCR) se hicieron en 50 µL de volumen, utilizando los componentes del sistema GoTAQ Core y 2.5 U de la enzima Taq polimerasa, ambos de Promega (EE.UU.). La amplificación se ejecutó con un paso de desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, y posteriormente 35 ciclos consistentes en 94 °C por 45 s de desnaturalización, 58 °C por 45 s de hibridación, y 72 °C por 2.5 min de extensión, que finalizó con una extensión a 72 °C durante 10 min.

Los resultados de la amplificación se examinaron en gel de agarosa al 8%, tampón TBE (Tris base 54 g/L, ácido bórico 27.5 g/L, 20 mL de EDTA 0.5M pH 0.8), y el fragmento de 2.3 kb esperado se purificó mediante el sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega (EE.UU.).

Clonaje y secuenciación

Los fragmentos purificados se ligaron al vector pGEMT-easy, mediante las condiciones y componen-

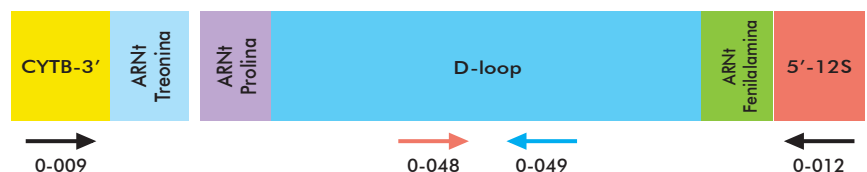


Figura 1. Esquema de la región amplificada del genoma mitocondrial de *Capromys pilorides* mostrando la posición aproximada de los cebadores O-009 y O-012 para la amplificación inicial y secuenciación, y la posición de los cebadores O-048 y O-049 solo para secuenciación.

4. Shadel GS, Clayton DA. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem.* 1997;66:409-35.

5. Saccone C, Lavane C, Pesole G, Sbisà E. Peculiar features and evolution of mitochondrial genomes in mammals. In: DiMauro S, Wallace DC, editors. *Mitochondrial DNA in human pathology*. New York: Raven Press;1993. p. 27-37.

6. Sbisà E, Tanzariello F, Reyes A, Pesole G, Saccone C. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene.* 1997;205(1-2):125-40.

7. Pesole G, Gissi C, De Chirico A, Saccone C. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *J Mol Evol.* 1999;48(4):427-34.

8. Larizza A, Pesole G, Reyes A, Sbisà E, Saccone C. Lineage specificity of the evolutionary dynamics of the mtDNA D-loop region in rodents. *J Mol Evol.* 2002; 54(2):145-55.

9. Amori G, Gippoliti S. A higher-taxon approach to rodent conservation priorities for the 21st century. *Anim Biodivers Conserv.* 2003;26(2):1-18.

10. MacPhee RDE, Flemming C. Requiem Aeternam. The last five hundred years of mammalian species extinctions. In: MacPhee RDE, editor. *Extinctions in near time*. New York: Kluwer Academic / Plenum Publisher. 1999; p. 333-71.

11. Amori G, Gippoliti S, Helgen KM. Diversity, distribution, and conservation of endemic island rodents. *Quat Int.* 2008; 182:6-15.

12. Silva T G, Duque S W, Diaz-Franco S. Mamíferos terrestres autóctonos de Cuba. Ciudad de la Habana: Ediciones Boloña; 2007.

13. International Union for the Conservation of Nature (IUCN). Red list of threatened species [CD-ROM]. Cambridge: The IUCN Species Survival Commission, 2008.

tes del sistema pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems (Promega, EE.UU.). Las células competentes [21] XL1Blue (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba) se transformaron con la mezcla de ligamiento, y los clones positivos se seleccionaron sobre placas LBA (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.2, agar 15 g/L, ampicilina 100 µg/mL) a las que se les adicionó IPTG 100 mM (40 µL/placa) y XGAL 20 mg/mL (40 µL/placa) para facilitar el reconocimiento de los recombinantes.

Cuatro colonias blancas y una azul provenientes de la amplificación del ADN de cada espécimen de CP, se sometieron a PCR de colonias [22] para comprobar la presencia de la banda de 2.3 kb. Los plasmidios que contenían la banda se purificaron utilizando el sistema Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, EE.UU.) conforme con las instrucciones del fabricante.

Para la secuenciación en ambas direcciones de los insertos en los plasmidios, uno por espécimen, se utilizaron los servicios de Macrogen (Corea del Sur). En la secuenciación se utilizaron, además de los cebadores universales, otros dos: O-048 (5'-TCTGGTTCTTTCTTCAGG-3'), y O-049 (5'-GAGATGTCTTATTAAGGG-3') complementarios a una subsecuencia del dominio central (Figura 1) tomando como referencia la RCM de CV y la aplicación del software FastPCR [20].

Análisis de secuencias

Las secuencias de la RCM de ambos especímenes de CP se alinearon a las ortólogas correspondientes en CV y OD mediante el software Clustal X 2.0.10 [23], y la composición nucleotídica se analizó con la ayuda de los softwares DAMBE v5.0.48 [24] y PAUP 4.10 beta [25]. Los valores de distancia genética para estimar el grado de homología de las secuencias entre las tres especies se calcularon mediante el software MEGA 4.0 [26] y el modelo de evolución denominado dos parámetros de Kimura (K2P) [27].

La presencia o no de las subsecuencias fundamentales (ETAS, DC y CSB) reportadas en la RCM de mamíferos [5, 6] y específicamente de roedores [8] se inspeccionaron y compararon por reconocimiento visual, debido al aceptable nivel de homología entre estas. Para corroborar la ausencia o presencia de la subsecuencia ETAS2 se realizó un segundo alineamiento que incluyó a las especies de roedores *Mus musculus* y *Rattus norvegicus* que, a diferencia de CV y OD, sí poseen la subsecuencia ETAS2.

Resultados y discusión

Secuencia y caracterización de la RCM en *C. pilorides*

La longitud de las secuencias de la RCM en los dos especímenes de CP resultó de 1336 pb. En correspondencia con estudios anteriores de esta misma región en mamíferos y específicamente en roedores [5, 6, 8], en la RCM de CP se pueden distinguir tres dominios: el dominio central altamente conservado y los dos dominios que lo flanquean; ETAS y CSB. También se encontró una región de ADN repetitivo dentro del dominio CSB (Figura 2). Debido a la gran similitud entre las secuencias (98%) de los dos especímenes de

CP incluidos en este estudio, no será necesario especificar los resultados para cada uno y por tanto nos referiremos en lo adelante a la especie.

Dominio ETAS

El dominio ETAS posee una longitud de 350 pb en CP. Dentro de esta región se han descrito dos subsecuencias conservadas, ETAS1 y ETAS2. ETAS2 es compartido por diversas especies de mamíferos [5, 6, 28, 29], en cambio se conoce que no todas las especies de roedores poseen la subsecuencia ETAS2 [8]. A partir de la comparación con secuencias de la RCM de CV, OD, *M. musculus*, y *R. norvegicus*, se confirma la presencia de ambas subsecuencias en CP (Figura 1 del material suplementario). Del mismo modo, en un estudio filogenético en curso (Silva A, observaciones inéditas) utilizando secuencias de dominio ETAS de 20 especies de roedores hystricognathos fue posible reconocer también la presencia de las subsecuencias ETAS2. A pesar de que se ha reportado la existencia de ADN repetitivo en esta región para roedores [8], según nuestros resultados no fue así en CP.

Dominio central

La longitud de este dominio en CP es de 309 pb. Se confirmó, además, la presencia de las denominadas subsecuencias A, B, y C (Figura 2) que se involucran en la unión de elementos del citoesqueleto que se asocian a la mitocondria [30].

Dominio CSB

El dominio CSB en CP mostró una longitud de 676 pb y la existencia de los tres bloques de secuencias conservadas CSB1, CSB2, y CSB3. Adicionalmente, este dominio presenta una región de ADN repetitivo compuesta por 300 pb entre los bloques de secuencias conservadas CSB1 y CSB2 (Figura 2), lo que coincide con lo reportado para otros mamíferos y en especial roedores [5, 6, 8, 29, 31, 32]. En esta especie, la región de ADN repetitivo está compuesta por 50 unidades de 6 bases, no todas iguales entre sí (Tabla 2).

Comparación con CV y OD

Como el objetivo fundamental de este trabajo es conocer la secuencia y estructura de la región control mitocondrial de una especie representante de los roedores cubanos agrupados en la subfamilia *Capromyinae*, con vistas a aplicar las técnicas de la genética molecular en estudios encaminados a la conservación de estas especies, se hace necesario comparar la secuencia obtenida en CP con otras especies de roedores filogenéticamente afines para evaluar la factibilidad de utilizar nuestros resultados como base para futuros estudios poblacionales, interespecíficos y supraespecíficos.

Las dos especies escogidas para la comparación, CV y OD, son también roedores hystricognathos del nuevo mundo. OD está evolutivamente más relacionado a CP que CV [33-36], por lo que es de esperar un mayor grado de similitud entre las secuencias de los dos primeros que entre ellos y CV. Los resultados de la tabla 3 confirman las expectativas antes mencionadas, tanto en la longitud de cada uno de los dominios como en la distancia genética (homología) al compararlos entre sí.

14. Berovides AV, Alfonso SMA, Camacho PA. Variabilidad de la jütia conga *Capromys pilorides* (Rodentia, Capromyidae) de Cuba. Doñana Acta Vertebr. 1990;17(1):122-7.

15. Berovides AV, Camacho PA, Comas GA, Borroto PR. Variación ecológica en poblaciones de la jütia conga *Capromys pilorides* (Rodentia, Capromyidae). Cienc Biol. 1990;23:44-58.

16. Berovides AV, Gutiérrez AA. Grado de heterocigocidad y peso corporal de la jütia conga *Capromys pilorides* (Rodentia, Capromyidae). Rev. Biol. 1999;13(1):59-60.

17. Berovides AV. Variaciones morfológicas en poblaciones de jütia conga *Capromys pilorides* (Rodentia, Capromyidae) en hábitats de bosques y manigua costera. Cubazoo 2006;13:11-5.

18. Nedbal MA, Allard MW, Honeycutt RL. Molecular systematics of hystricognath rodents: evidence from the mitochondrial 12S rRNA gene. Mol Phylogenet Evol. 1994;3(3):206-20.

19. Leite YL, Patton JL. Evolution of South American spiny rats (Rodentia, Echi-myidae): the star-phylogeny hypothesis revisited. Mol Phylogenet Evol. 2002; 25(3):455-64.

20. Kalendar R, Lee D, Schulman AH. FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. In: Mansour A, editor. Focus on Bioinformatics. Genes, Genomes and Genomics. 2009;3(Special Issue 1):1-14.

21. Tu Z, He G, Li KX, Chen MJ, Chang J, Chen L, et al. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. Electron J Biotechnol. 2005;8(1):113-20.

22. Zon LI, Dorfman DM, Orkin SH. The polymerase chain reaction colony miniprep. Biotechniques. 1989;7(7):696-8.

23. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 2007;23(21):2947-8.

24. Xia X. Data analysis in molecular biology and evolution. Boston/Dordrecht/London: Kluwer Academic Publishers; 2000.

25. Swofford DL. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4. Sunderland: Sinauer Associates; 2000.

26. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol. 2007;24(8):1596-9.

27. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol. 1980;16(2):111-20.

28. Reyes A, Nevo E, Saccone C. DNA sequence variation in the mitochondrial control region of subterranean mole rats, *Spalax ehrenbergi* superspecies, in Israel. Mol Biol Evol. 2003;20(4):622-32.

29. Matson CW, Baker RJ. DNA sequence variation in the mitochondrial control region of red-backed voles (*Clethrionomys*). Mol Biol Evol. 2001;18(8):1494-501.

En la comparación del número de bases entre dominios (Tabla 3), observamos una diferencia importante en la longitud del dominio ETAS en OD. Esto no es contradictorio si tenemos en cuenta la reportada variabilidad en extensión para este dominio en roedores [8], lo que aún no cuenta con una explicación estructural y funcional concluyente. Excepto la diferencia aludida para el dominio ETAS, el resto de los dominios muestran longitudes similares entre las especies comparadas.

Los valores de distancia calculados indican que los dominios ETAS y CD (Tabla 3) muestran valores de homología concordantes con los descritos para familias de mamíferos [37, 38]. En el caso del par CP y OD en cuanto a los valores computados de distancia genética para el dominio CD se aproximan incluso al promedio encontrado para géneros de una misma familia de roedores [39], aún cuando ambas especies pertenecen a diferentes familias: CP a *Capromyidae* y OD a *Octodontidae*, lo que confirma la estrecha relación evolutiva entre las dos familias que han sido por ello agrupadas en la superfamilia *Octodontoidea*.

En cambio CV, perteneciente a la familia *Caviidae* y agrupada en la superfamilia *Cavioidea*, evidencia un valor de divergencia genética (inverso a homología) superior en relación con las otras dos especies comparadas, coherente este valor con el esperado para familias de roedores menos relacionadas evolutivamente [37].

Los resultados anteriores se confirman en la observación de los alineamientos de los dominios ETAS (Figura 1 del material suplementario), CD (Figura 2 del material suplementario), y CSB (Figura 3 del material suplementario, donde se excluyó para cada especie la región de ADN repetitivo) y la tabla 3.

En los tres alineamientos se comprueba mayor similitud entre las secuencias de los dominios de CP y OD, lo que evidencia que la incidencia de inserciones y deleciones entre estas especies es muy inferior a la observada entre estas dos y CV.

En el caso específico del dominio CSB, se observan las mayores divergencias en distancia genética, número de inserciones y deleciones, así como la proporción de inserciones y deleciones mayores de una base (entre paréntesis en la tabla 3, inserciones/deleciones), lo que corrobora la mayor variabilidad de este dominio con respecto a ETAS y CD. Lo anterior se hace más evidente en CV con respecto a las otras dos especies involucradas, lo que subraya una vez más el grado de divergencia evolutiva entre estas especies.

Tabla 2. Composición de la región de ADN repetitivo de las tres especies comparadas

Especie	Unidad repetitiva	Bases/Unidad	Copias
<i>Cavia porcellus</i>	GTACGCACAGACGTGT	16	19
<i>Octodon degus</i>	TACACACACGTA	12	11
	TACACACGTA	10	8
	TACGCACACGTA	12	7
	CGTACACACGTA	12	1
	TACACACA	8	1
			(28) ^a
<i>Capromys pilorides</i>	CATACA	6	21
	CATACG	6	7
	TACGTA	6	7
	TACACA	6	6
	CACACA	6	4
	TACGTA	6	2
	CACATA	6	1
	CACACG	6	1
	TACACG	6	1
			(50) ^a

^aTotal de copias.

Tabla 3. Comparación entre *Capromys pilorides* (CP), *Octodon degus* (OD), y *Cavia porcellus* (CV) en cuanto a longitud de los dominios, homología, y deleciones

Especie	Longitud de dominios (pb)			Homología (%) ^a						Inserciones/deleciones					
	ETAS ^b	CD ^c	CSB ^d	ETAS		CD		CSB*		ETAS		CD		CSB*	
				1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
CP	350	309	677	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OD	266	310	679	73	-	84	-	69	-	2	-	0	-	8(2)	-
CV	351	315	684	49	50	60	68	54	60	5	7	7	7	16	15
														(12)	(11)

^aHomología K2P. Los números entre paréntesis se refieren a las cantidades de inserciones y deleciones mayores que una base.

^bETAS: secuencias extendidas asociadas a la terminación.

^cCD: dominio central.

^dCSB: bloque de secuencias conservadas.

*Excluye la región de ADN repetitivo.

En el dominio CSB de las tres especies también se observó una región de ADN repetitivo, entre las subsecuencias CSB1 y CSB2, con diferente composición de las unidades de repetición y número de copias (Tabla 2). Mientras que CV posee varias copias de una sola unidad, en CP y OD las unidades son heterogéneas en secuencia y número de copias.

La presencia de ADN repetitivo en el dominio CSB se ha documentado en mamíferos; entre las especies estudiadas es muy variable, e incluso puede no existir [5, 6, 8]; pero aún se desconoce por qué existen estas secuencias repetitivas en la región control mitocondrial.

En el alineamiento del dominio CSB (Figura 3 del material suplementario), se observó que las tres especies muestran los tres bloques de secuencias CSB1,

30. Jackson DA, Bartlett J, Cook PR. Sequences attaching loops of nuclear and mitochondrial DNA to underlying structures in human cells: the role of transcription units. *Nucleic Acids Res.* 1996;24(7):1212-9.

31. Gemmill NJ, Western PS, Watson JM, Graves JA. Evolution of the mammalian mitochondrial control region-comparisons of control region sequences between monotreme and therian mammals. *Mol Biol Evol.* 1996;13(6):798-808.

32. Stewart DT, Baker AJ. Patterns of sequence variation in the mitochondrial D-loop region of shrews. *Mol Biol Evol.* 1994;11(1):9-21.



Figura 3. Alineamiento de los bloques de secuencias CSB1, CSB2 y CSB3 del dominio CSB en *Capromys pilorides* (CP), *Octodon degus* (OD) y *Cavia porcellus* (CV). CSB2 y CSB3 muestran alto grado de conservación, mientras que en CSB1 se muestra las diferencias entre las tres especies. Se le asignó colores que resaltan la diferencia a cada base en las tres subsecuencias con respecto a la secuencia consenso (Cons.).

CSB2, y CSB3 con un alto grado de conservación entre sí, y en donde solo son perceptibles diferencias en CSB1 (Figura 3). La presencia de los tres bloques no está generalizada en roedores ni en el resto de los mamíferos, y hasta el momento, de las siete especies con secuencias completas de la región control mitocondrial conocidas en *Hystriognathos*, solo la presentan las valoradas en este trabajo.

En resumen, aun cuando se han reportado otras secuencias en CP y otros caprómidos, con el propósito de estudiar las relaciones filogenéticas intra y supraespecíficas de la familia *Capromyidae* [18, 19, 40], este constituye el primer reporte de la secuencia completa de la región D-loop para un miembro de la familia *Capromyidae*, lo que además de la contribución al conocimiento de nuestros recursos genéticos representa un punto de partida para la exploración de esta región del ADN mitocondrial en otras especies de los caprómidos cubanos.

Los resultados indican que la secuencia y la estructura de la RCM en CP corresponden con las reportadas previamente en los roedores, lo que revela una

congruente similitud con las conocidas en el suborden *Hystriognathos*.

La alta homología entre las secuencias completas de la RCM de los dos especímenes de CP (98%), los valores resultantes de las comparaciones de los dominios ETAS y CD entre especies, en cuanto a longitud, distancia genética, e incidencia de inserciones y deleciones, y los resultados en otros roedores utilizando las secuencias de ambos dominios [41, 42, 43] como marcadores en estudios poblacionales, permiten afirmar que estas secuencias pueden ser de utilidad para estudios poblacionales de los caprómidos cubanos en interés de su conservación.

Reconocimientos

Los autores desean agradecer a la Dirección del Laboratorio de Genética Molecular del Hospital Hermanos Ameijeiras, a sus especialistas y a la Dirección del hospital, por facilitarnos sus instalaciones y el apoyo constante para el trabajo experimental de este proyecto. Este proyecto recibió financiamiento de la organización World Wildlife Fund (WWF, de Canadá).

33. Huchon D, Douzery EJ. From the Old World to the New World: a molecular chronicle of the phylogeny and biogeography of hystriognath rodents. *Mol Phylogenet Evol.* 2001;20(2):238-51.

34. Honeycutt RL, Rowe DL, Gallardo MH. Molecular systematics of the South American caviomorph rodents: relationships among species and genera in the family *Octodontidae*. *Mol Phylogenet Evol.* 2003;26(3):476-89.

35. Opazo JC. A molecular timescale for caviomorph rodents (*Mammalia*, *Hystriognathi*). *Mol Phylogenet Evol.* 2005;37(3):932-7.

36. Galewski T, Mauffrey JF, Leite YL, Patton JL, Douzery EJ. Ecomorphological diversification among South American spiny rats (*Rodentia*; *Echimyidae*): a phylogenetic and chrono-

logical approach. *Mol Phylogenet Evol.* 2005; 34(3):601-15.

37. Johns GC, Avise JC. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Mol Biol Evol.* 1998;15(11):1481-90.

38. Castresana J. Cytochrome b phylogeny and the taxonomy of great apes and mammals. *Mol Biol Evol.* 2001;18(4):465-71.

39. Bradley RD, Baker RJ. A test of the genetic species concept: Cytochrome b sequences and mammals. *J Mammal.* 2001;82(4):960-73.

40. Woods CA, Borroto R, Kilpatrick CW. Insular patterns and radiations of West Indian rodents. In: Woods CA, Sergile FE, editors.

Biogeography of the West Indies: patterns and perspectives. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2002. p. 335-53.

41. Ojeda AA. Phylogeography and genetic variation in the South American rodent *Tympanoctomys barrerae* (*Rodentia*: *Octodontidae*). *J Mammal.* 2010;91(2):302-13.

42. Meshchersky IG, Feoktistova NY. Intraspecific organization of dwarf hamsters *Phodopus campbelli* and *Phodopus sungorus* (*Rodentia*: *Cricetinae*) based on mtDNA analysis. *Dokl Biol Sci.* 2009;424:35-8.

43. Trucchi E, Gentile G, Sbordoni V. Development of primers to amplify mitochondrial DNA control region of Old World porcupines (subgenus *Hystrix*). *Mol Ecol Resour.* 2008;8(5):1139-41.

Recibido en agosto, 2010. Aceptado para publicar en junio, 2011.

Material suplementario

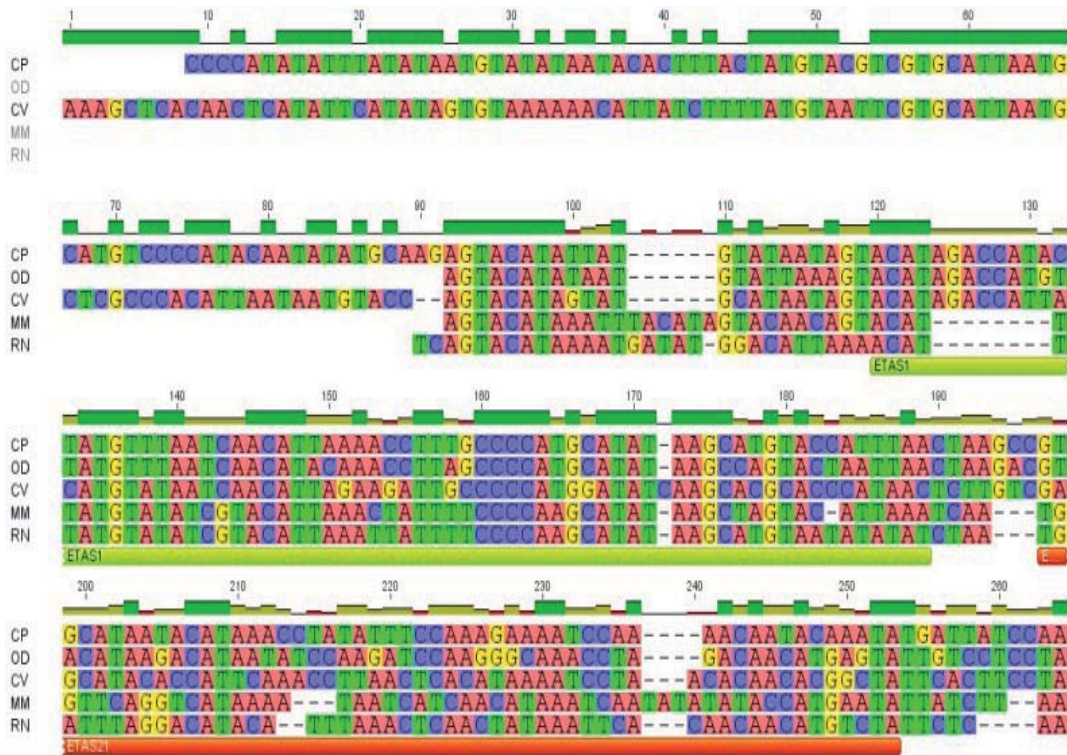


Figura 1. Alineamiento de las secuencias correspondientes a los dominios ETAS de *Capromys pilorides* (CP), *Octodon degus* (OD), *Cavia porcellus* (CV), *Mus musculus* (MM), *Rattus norvegicus* (RN), en el que se observan las subsecuencias ETAS1, ETAS2 para cada especie.

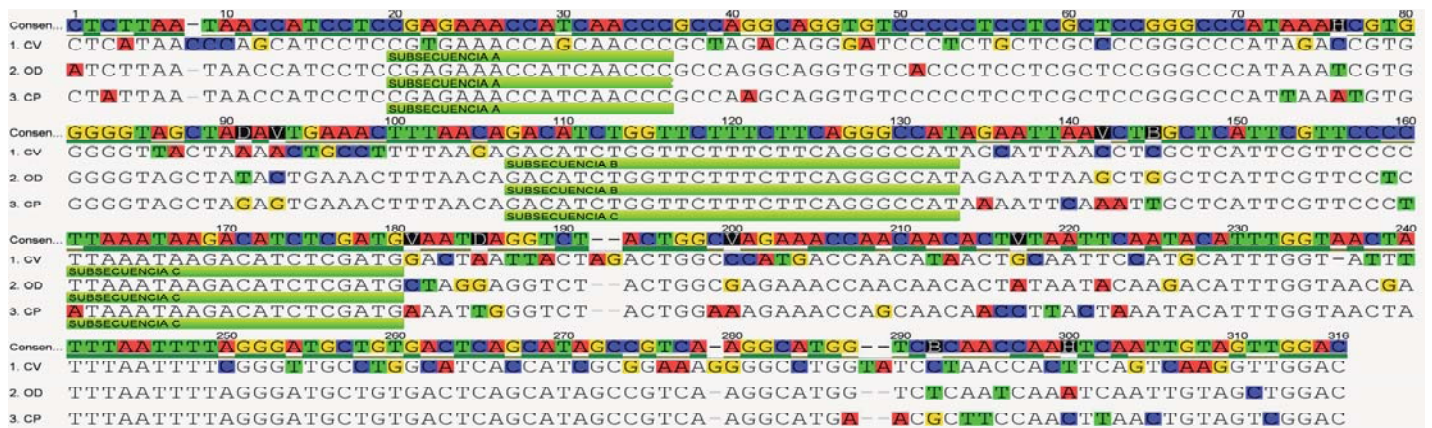


Figura 2. Alineamiento de las secuencias correspondientes al dominio central en *Capromys pilorides* (CP), *Octodon degus* (OD), y *Cavia porcellus* (CV), que muestra las subsecuencias A, B, C.

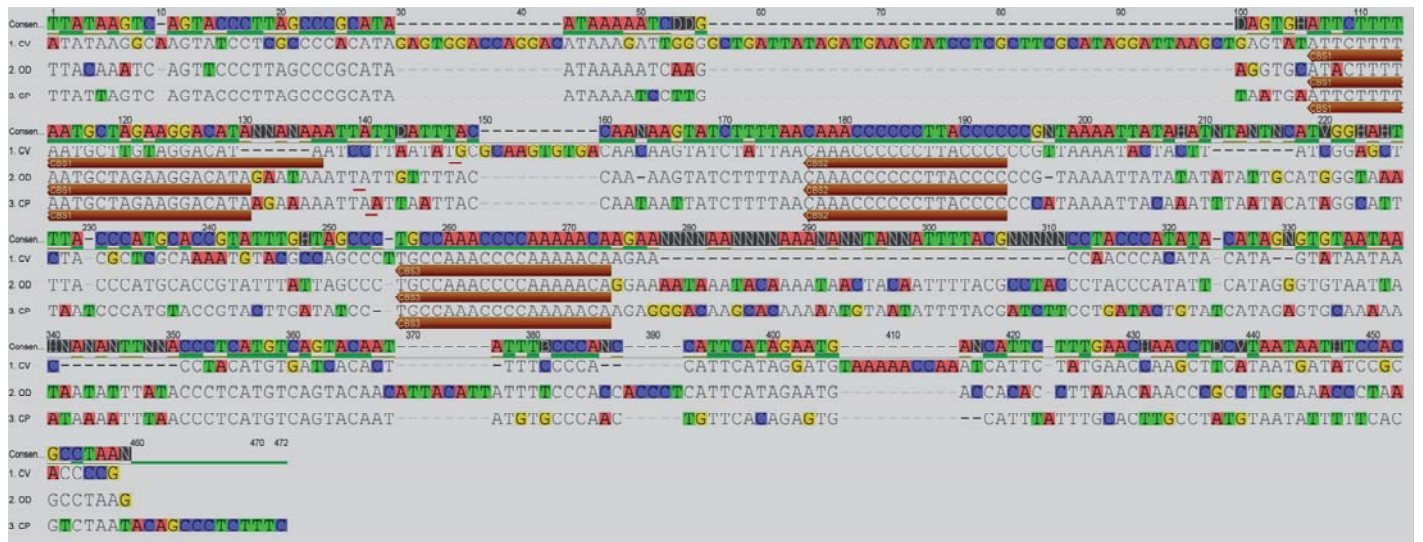


Figura 3. Alineamiento de las secuencias correspondientes al dominio CSB (sin región de ADN repetitivo) en *Capromys pilorides* (CP), *Octodon degus* (OD) y *Cavia porcellus* (CV). Obsérvese la presencia de los bloques de secuencias CSB1, CSB2, CSB3, y de frecuentes deleciones e inserciones mayores de una base en CV con respecto a las otras dos especies.