



II. OBJETIVOS

Ateles geoffroyi

Fuente: Michael Truco 1999

Para la realización de este trabajo se propusieron los siguientes objetivos:

1.- Estudiar las homologías cromosómicas que se presentan al comparar los cariotipos de diferentes grupos de primates, y determinar las reorganizaciones cromosómicas que puedan explicar esas homologías,

Para llevar a cabo este estudio se han elegido especies pertenecientes a tres géneros de Simiiformes:

- *Cebus*: se considera que el cariotipo que presenta este género es muy similar al cariotipo ancestral de los Platyrrhini

- *Ateles*: género cuyas especies poseen un cariotipo muy reorganizado si se compara con el cariotipo ancestral de los Platyrrhini

- La especie *Homo sapiens*: es el primate del que se posee mayor información citogenética

El estudio tanto de las homologías como de las reorganizaciones cromosómicas evolutivas se ha llevado a cabo a dos niveles:

1.1.- Comparación del cariotipo de especies o subespecies que pertenecen al mismo género:

- *Cebus apella* y *Cebus capucinus*

- *Ateles belzebuth hybridus*, *Ateles belzebuth marginatus*, *Ateles paniscus paniscus*, *Ateles paniscus chameck* y *Ateles geoffroyi*.

1.2.- Comparación del cariotipo de especies pertenecientes a géneros diferentes:

- *Homo sapiens* y *Cebus apella*

- *Homo sapiens* y *Ateles belzebuth hybridus*

- *Cebus apella* y *Ateles belzebuth hybridus*

2.- Estudiar la posible relación existente entre las bandas implicadas en las reorganizaciones cromosómicas evolutivas determinadas en este trabajo, con:

- lugares frágiles del cariotipo humano

- bandas sensibles al efecto de las radiaciones ionizantes del cariotipo humano y del cariotipo de *Cebus apella*

- secuencias teloméricas intersticiales del cariotipo humano

3.- Caracterizar cualitativamente la heterocromatina constitutiva de diferentes Simiiformes.

Este estudio se ha llevado a cabo en especies pertenecientes a diferentes familias taxonómicas del grupo de los Simiiformes:

- Catarrhini: especies pertenecientes a las familias Cercopithecidae, Hominidae e Hylobatidae

- Platyrrhini: especies pertenecientes a la familia Cebidae

4.- Analizar la posible relación entre las variaciones cualitativas de la heterocromatina constitutiva en las especies de primates Simiiformes, y los procesos de especiación en este grupo.



III. MATERIAL Y MÉTODOS

Ejemplar del género *Cercopithecus*

Fuente: Primates. Nuestros antepasados

Editorial Folio 1997

III.1. MATERIAL BIOLÓGICO

En esta tesis se han analizado cromosomas metafásicos de linfocitos procedentes de cultivos de sangre periférica, de ejemplares pertenecientes a diferentes especies de primates. En la tabla 3.1 se detallan los géneros y las especies estudiadas, su relación filogenética y el número de individuos analizados de cada una de ellas.

Tabla 3.1. Especies de Simiiformes analizadas en este trabajo.

	Familia	Especie	Código	2n	Individuos analizados	
Catarrhini	Hominidae	<i>Homo sapiens</i>	HSA	46	4_1_	
		<i>Pan troglodytes</i>	PTR	48	2_1_	
		<i>Gorilla gorilla</i>	GGO	48	1_1_	
	Hylobatidae	<i>Hylobates syndactylus</i>	HSY	50	1_	
	Cercopithecoidea	(tribu Papionini)	<i>Macaca fascicularis</i>	MFA	42	1_1_
			<i>Macaca tibetana</i>	MTI	42	1_
			<i>Papio leucophaeus</i>	PLE	42	1_
			<i>Papio sphinx</i>	PSP	42	1_
		(tribu Cercopithecini)	<i>Cercopithecus aethiops</i>	CAE	60	1_
			<i>Cercopithecus sabaues</i>	CSA	60	1_
<i>Cercopithecus albogularis</i>			CAL	74	1_	
Platyrrhini	Cebidae	<i>Cebus apella</i>	CAP	54	7_4_	
		<i>Ateles belzebuth hybridus</i>	ABH	34	4_2_	
		<i>Aotus azarae</i>	AAZ	50	1_	
		<i>Aotus nancymai</i>	ANA	54	1_	

La procedencia de los ejemplares analizados en este estudio es la siguiente:

* PTR, GGO, HSY, MTI, PLP, PSP y ABH: Parc Zoològic de Barcelona

* MFA: CIDA, S.A. (Barcelona)

* CAE y CSA: Zoológico de la Casa de Campo (Madrid)

* CAP: Zoológico de la Casa de Campo (Madrid), Marineland Catalunya (Palafolls, Barcelona) y Aqualeón (Albinyana, Tarragona)

* CAL, AAZ y ANA: colecciones particulares (Madrid)

Fruto de la colaboración con el grupo de citogenética de la Doctora Regina Barros de la Universidad de Pará (Brasil), en este trabajo se presentan también los resultados del análisis citogenético de diferentes ejemplares de las siguientes subespecies del género *Ateles*: *A. paniscus paniscus*, *A. paniscus chamek* y *A. belzebuth marginatus*, todos ellos procedentes de diferentes áreas geográficas de la Amazonia brasileña (Medeiros y col. 1997).

Los cariotipos de *Cebus capucinus* y *Ateles geoffroyi* utilizados para algunas de las comparaciones, no han sido determinados en este trabajo. En estos casos, se han utilizado los datos publicados por Carlá Campa y Stanyon (1992) y Morescalchi y col. (1997) respectivamente.

III.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

III.2.1. OBTENCIÓN DE CROMOSOMAS METAFÁSICOS

Los cromosomas metafásicos se obtuvieron a partir del **cultivo de linfocitos** de sangre periférica de los diferentes ejemplares analizados. La extracción de sangre se realizó mediante punción en la vena femoral (con jeringas previamente heparinizadas) y la cantidad recogida osciló entre 1 y 4 ml, dependiendo del peso del animal.

Material necesario

MEDIO DE CULTIVO Y OTROS PRODUCTOS

- Medio de cultivo: RPMI 1640 suplementado con un 25 % de Suero Fetal Bovino (previamente descomplementado a 56°C durante 30 minutos), un 2 % de Penicilina/Estreptomina (100 u.i./ml y 0,1 mg/ml respectivamente), un 2 % de L-Glutamina (200mM), un 1 % de Heparina sódica y un 1% de tampón HEPES.

- Pokeweed

- Fitohemaglutinina

- Colcemid (10 µgr/ml)

- KCl (0,075M)

- Carnoy (metanol:ácido acético en la proporción 3:1)

MATERIAL DESECHABLE

- Tubos estériles de 10 ml con el fondo cónico

- Portaobjetos de vidrio

- Pipetas Pasteur

UTILLAJE

- Cabina de flujo laminar vertical
- Estufa a 37°C

La **metodología** empleada fue la siguiente:

a) Se colocó, en cada tubo estéril, 4.5 ml de medio de cultivo, 0.2 ml de Fitohemaglutinina, 0.2 ml de Pokeweed y 0.5 ml de sangre periférica. La Fitohemaglutinina y el Pokeweed son estimuladores de la división celular *in vitro* de los linfocitos T y B.

b) Los tubos fueron introducidos en una estufa a 37°C durante 72 horas. Para paliar la falta de accesibilidad a los nutrientes de las células de la fase inferior (como consecuencia de la sedimentación celular), se agitaron suavemente los tubos a las 24 y a las 48 horas del inicio del cultivo.

c) A las 71 horas y 30 minutos del inicio del cultivo se adicionó, a cada tubo, entre 0,08 y 0,1 ml de Colcemid. Se incubaron los tubos en una estufa (37°C) para completar el tiempo de cultivo. El Colcemid es un análogo sintético de la Colchicina, y es un inhibidor de la mitosis.

d) Se centrifugaron los tubos a 1000 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante por aspiración y el sedimento celular fue disuelto en una solución hipotónica (KCl 0,075 M). Se mantuvieron las células en esta solución hipotónica, a 37°C al baño maría, durante 30 minutos. La adición del KCl provoca la entrada de agua en las células, como consecuencia de la alta concentración de sales que hay en el interior de las mismas. El citoplasma aumenta su volumen y los cromosomas permanecen flotando en su interior.

e) Tras el tiempo de actuación de la solución hipotónica, los tubos se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. Se eliminó nuevamente el sobrenadante y se procedió a la fijación con Carnoy. El fijador se dejó caer gota a gota en cada tubo para evitar la aglutinación celular, hasta completar un volumen de 10 ml aproximadamente. De nuevo los tubos se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos y se aspiró el sobrenadante de cada uno de ellos. Se realizaron de 3 a 5 lavados del sedimento celular con el fijador Carnoy.

f) Las **preparaciones cromosómicas** se realizaron sobre portaobjetos que habían sido previamente desengrasados en metanol a -20°C. Se resuspendieron los sedimentos celulares con una cantidad de Carnoy proporcional al tamaño del sedimento celular y se dejaron caer de dos a tres gotas sobre cada portaobjetos. Las preparaciones cromosómicas se almacenaron en cajas en el congelador (-20°C) hasta su utilización.

III.2.2. BANDEO CROMOSÓMICO Y OBTENCIÓN DEL CARIOTIPO

Para la obtención del cariotipo de cada uno de los ejemplares estudiados en este trabajo, se utilizó la técnica de **bandeo cromosómico G-C secuencial**. La técnica de bandas G produce un patrón de bandas a lo largo de todo el eje cromosómico que es característico de cada par, y que por tanto, permite su identificación. La aplicación de la técnica de bandas C permite determinar las regiones cromosómicas en las que se localiza la heterocromatina constitutiva y el tamaño de las mismas en cada individuo. No obstante no permite reconocer, con seguridad, cada par cromosómico. Por ello, es imprescindible aplicar la técnica de bandas C en preparaciones cromosómicas sobre las que se haya aplicado previamente la técnica de obtención de bandas G. De esta forma, y comparando las imágenes fotográficas de la misma metafase con los dos métodos de bandeo, se puede identificar cada par cromosómico en la imagen de los cromosomas con bandas C.

Material necesario

PRODUCTOS

- 2xSSC
- HCl 0,02N
- Ba(OH)₂ al 1% en agua destilada
- Solución Wright (tampón Sorensen:colorante Wright en la proporción 3:1)
- Solución Leishman (tampón Leishman:colorante Leishman en la proporción 4:1)
- Agua destilada
- Soluciones de etanol al 30%, 70% y 90%

MATERIAL Y UTILLAJE

- Cubetas de vidrio
- Pipetas de vidrio de 10 ml.
- Baño termostático
- Microscopio óptico de campo claro marca Zeiss, modelo Axioplan, con cámara fotográfica.

MATERIAL FOTOGRÁFICO

- Película fotográfica blanco y negro COPEX PAN A.H.U. de la marca AGFA
- Revelador para película fotográfica blanco y negro marca RODINAL en la proporción 1:25 en agua destilada
- Papel fotográfico Brovira *speed* del nº 2 marca AGFA
- Revelador para papel fotográfico marca AGFA en la proporción 1:9 en agua destilada
- Baño de paro para papel fotográfico: ácido acético al 5% en agua destilada
- Fijador para película fotográfica blanco y negro y para papel fotográfico, marca AGFA en la proporción 1:8 en agua destilada

Metodología

La técnica de **bandas G** utilizada fue la descrita por Seabright (1971) con pequeñas modificaciones:

- a) Se dejaron envejecer las preparaciones cromosómicas a temperatura ambiente durante 1-2 días.
- b) Los portaobjetos fueron sumergidos en una solución salina de 2XSSC a 65 °C de 1 a 5 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron con agua destilada y se dejaron secar.
- c) Se tiñeron con la solución Wright durante 3 minutos.
- d) Las preparaciones se lavaron con agua, se dejaron secar, y se procedió a la observación al microscopio de las metafases bandeadas.
- e) Después de fotografiar las metafases de las preparaciones cromosómicas, se eliminó el colorante Wright de las mismas: se sumergieron los portaobjetos en una serie de soluciones con etanol al 30%, 70% y 90% (dos minutos en cada uno) primero en concentración creciente y luego en concentración decreciente, y finalmente en una cubeta con agua destilada durante dos minutos.
- f) Una vez secos, los portaobjetos fueron almacenados en cajas a -20°C hasta el momento de aplicar la técnica de obtención de bandas C.

La técnica de obtención de **bandas C** utilizada fue la descrita por Sumner (1972), con algunas modificaciones:

- a) Los portaobjetos fueron sumergidos en una solución de HCl 0,02N a temperatura ambiente, durante 3 minutos, se lavaron con agua destilada y se dejaron secar.

b) Se sumergieron las preparaciones en una solución de Ba(OH)_2 al 2% a 60°C durante un período de tiempo variable (de 4 a 30 segundos).

c) A continuación, se sumergieron los portaobjetos de forma consecutiva en tres cubetas con agua destilada, HCl 0.02N, y agua destilada en este orden, 10 segundos en cada una de ellas. Una vez secas, se procedió a la tinción de las preparaciones con la solución Leishman durante 5 minutos.

d) Se eliminó el exceso de colorante con agua destilada y una vez secas, se procedió a la observación de las preparaciones cromosómicas al microscopio óptico. Seguidamente, se fotografiaron las mismas metafases que habían sido previamente fotografiadas tras la aplicación de la técnica de obtención de bandas G.

e) Se revelaron las películas fotográficas que contenían las imágenes de las metafases bandeadas y se hicieron copias en papel fotográfico de las mismas.

f) Se construyeron de 6 a 15 cariotipos con bandas G-C secuenciales de cada uno de los individuos analizados en este estudio.

III.2.3. HOMOLOGÍAS Y REORGANIZACIONES CROMOSÓMICAS EVOLUTIVAS

III.2.3.1. Homologías cromosómicas: bandas G

Se ha realizado el estudio de las homologías cromosómicas basadas en la comparación del patrón de bandas G, de las siguientes especies y subespecies:

- del género *Cebus* : *C. apella* (CAP) y *C. capucinus* (CCA)
- del género *Ateles* : *A. belzebuth hybridus* (ABH), *A. belzebuth marginatus* (ABM), *A. paniscus paniscus* (APP), *A. paniscus chameck* (APC) y *A. geoffroyi* (AGE)

Una vez construidos los cariotipos de CAP y ABH (en este trabajo) y ABM, APP y APC (Medeiros y col. 1997) siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.2.2, y utilizando los cariotipos de CCA y AGE publicados por Carla Campá y Stanyon (1992) y Morescalchi y colaboradores (1997) respectivamente, se procedió a la comparación del patrón de bandas G de las dos especies del género *Cebus* entre sí y de las tres especies del género *Ateles* entre sí. La comparación del patrón de bandas G permitió determinar las homologías cromosómicas existentes en las especies analizadas.

III.2.3.2. Homologías cromosómicas: ZOO-FISH y bandas G secuenciales

Otra aproximación para realizar el estudio de las homologías cromosómicas ha sido la aplicación de la técnica de ZOO-FISH de forma secuencial con la técnica de obtención de bandas G. Esta técnica se ha aplicado utilizando las sondas de todos los cromosomas humanos.

Para reconocer los cromosomas o los segmentos cromosómicos de los primates no humanos que hibridaron con cada una de las sondas humanas utilizadas, se siguieron dos protocolos: **1)** Bandas G previas a la aplicación de la técnica de ZOO-FISH y **2)** Bandas G posteriores a la aplicación de la técnica de ZOO-FISH. Ambos protocolos difieren en el tratamiento del portaobjetos previo a la hibridación, y en la secuencia metodológica para la obtención de las bandas G. El protocolo para la realización de la técnica de hibridación *in situ* es idéntico en ambos casos.

Material necesario

SONDAS Y ANTICUERPOS

- Sondas de los cromosomas humanos 1 al 22 y el X, marcadas con Digoxigenina (ONCOR).
- Sondas de los cromosomas 3, 4 y 7 humanos concentradas y marcadas con Cy3 (CAMBIO)
- Tampón para diluir las sondas de los cromosomas 3, 4 y 7 (CAMBIO)
- Anticuerpos para la amplificación y la detección de las sondas marcadas con digoxigenina (ONCOR):

Primer anticuerpo: Antidigoxigenina conjugada a IsoTioCianato Fluoresceína (FITC)

Segundo anticuerpo: Rabbit anti-sheep

Tercer anticuerpo: Anti-Rabbit conjugado a IsoTioCianato Fluoresceína (FITC)

REACTIVOS

- Detergente de tampón fosfato (PBD) (ONCOR)
- Ioduro de propidio/*Antifade* (ONCOR)
- 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) III/*Antifade* (VYSIS)
- Citrato sódico salino (2xSSC) (ONCOR)
- Formamida (ONCOR)
- Agua desionizada

- Carnoy (metanol:ácido acético en la proporción 3:1)
- Etanol
- Colorante Wright
- Tampón Sørensen

MATERIAL DESECHABLE Y UTILLAJE

- Cubreobjetos de plástico (ONCOR)
- Cubreobjetos de vidrio
- Cubetas de tinción
- Cola de encuadernar
- Tubos Eppendorf estériles
- Cámara húmeda
- Baño termostático
- Estufa
- Microscopio Olympus con filtros específicos para FITC y Cy3, conectado a una cámara de vídeo en color Sony 3CCD y a un ordenador dotado con el sistema de análisis de imagen *GENUS System* (Applied Imaging Corporation)
- Ordenador PC dotado con una placa de vídeo Matrox Comet (versión 1.21)

MATERIAL FOTOGRÁFICO

- El mismo que el descrito en el apartado III.2.2.

Protocolo 1: Bandas G + ZOO-FISH (sondas marcadas con digoxigenina)

a) Bandas G

- Se siguió el protocolo de obtención de bandas G descrito en el apartado III.2.2.
- Se examinaron al microscopio las preparaciones cromosómicas y las metafases fueron fotografiadas con una película de blanco y negro.
- Los portaobjetos fueron decolorados en una serie de soluciones con etanol al 30%, 70% y 90% (2 minutos en cada uno) primero en concentración creciente y luego en concentración decreciente, y finalmente se sumergieron en una cubeta con agua destilada durante dos minutos.
- Una vez secas, las preparaciones cromosómicas se almacenaron en cajas en el congelador (-20°C) hasta el momento de realizar la hibridación.

A continuación se detalla el protocolo utilizado para la aplicación de la técnica de **hibridación *in situ* fluorescente (FISH)**:

b) Desnaturalización del DNA de la sonda

- El vial que contenía la sonda fue incubado, a 37°C en una estufa, durante 5 minutos.
- Se tomaron 0.008 ml. de la sonda (para hibridar una superficie de 24x24mm de un portaobjetos) y se introdujeron en un tubo Eppendorf previamente esterilizado.
- Con el fin de proceder a la desnaturalización del DNA que forma la sonda, se sumergió el Eppendorf que la contiene en un baño a 72°C ±2°C durante 10 minutos.
- Para permitir la reasociación de las secuencias de DNA repetitivo que contiene la sonda, se incubó el Eppendorf que la contenía al baño maría, durante 90 minutos, dentro de una estufa a 37°C.

c) Preparación del portaobjetos y desnaturalización del DNA cromosómico

Los portaobjetos fueron extraídos del congelador una hora antes de iniciar la hibridación, y se mantuvieron a temperatura ambiente. Media hora antes de que finalizara el tiempo de reasociación del DNA repetitivo de la sonda, se procedió a la preparación de los portaobjetos para la hibridación.

- Decoloración y post-fijación del material cromosómico: las preparaciones cromosómicas se sumergieron en Carnoy durante 15 segundos, en agua destilada durante 3 minutos y se dejaron secar.
- Se deshidrataron los portaobjetos sumergiéndolos en una serie de soluciones con etanol al 70%, 80% y 95% durante 2 minutos en cada una, a temperatura ambiente, y se dejaron secar.
- El DNA cromosómico se desnaturalizó sumergiendo los portaobjetos en una solución de Formamida al 70% en 2XSSC a 72°C ±2°C durante 2 minutos.
- Para parar la reacción de desnaturalización, los portaobjetos se sumergieron en una serie de soluciones frías (-20°C) con etanol al 70%, 80% y 95%, 2 minutos en cada una, y se dejaron secar.

d) Hibridación

- Transcurridas las dos horas de incubación de la sonda a 37°C, se colocó la sonda sobre la superficie del portaobjetos seleccionada para la hibridación.
- Se colocó un cubreobjetos de vidrio (24x24mm) sobre la gota que contenía la sonda, y se sellaron portaobjetos y cubreobjetos con la cola de encuadernar.

- La hibridación se realizó en una cámara húmeda introducida en una estufa a 37°C y en oscuridad, durante 72 horas (según Scherthan (1994) para realizar hibridaciones con sondas humanas en otras especies de mamíferos).

e) Amplificación y detección de la señal de hibridación

Transcurridas las 72 horas de hibridación, se procedió a la detección de la misma.

- Se eliminó la cola de sellado y el cubreobjetos con unas pinzas, y el portaobjetos fue sumergido en una cubeta con 2xSSC a 72°C ±2°C durante 2 minutos.

- Transcurrido ese tiempo, y para eliminar los restos de 2xSSC, se sumergió el portaobjetos en PBD a temperatura ambiente, durante 2 minutos.

- Se eliminó el exceso de PBD del portaobjetos y se añadieron 0.04 ml (para una superficie de 24x24 mm) del primer anticuerpo (Antidigoxigenina conjugada a FITC). Se colocó un cubreobjetos de plástico sobre la preparación cromosómica y ésta fue introducida en una cámara húmeda y en una estufa a 37°C durante 15 minutos.

- Se separó el cubreobjetos de la preparación y se realizaron dos lavados en PBD de 2 minutos cada uno, a temperatura ambiente, y en agitación.

- Se eliminó el exceso de PBD del portaobjetos y se realizó la incubación con 40 µl del segundo anticuerpo (rabbit anti-sheep) en las mismas condiciones que el primero, y también durante 15 minutos.

- El método para eliminar el exceso de segundo anticuerpo fue el mismo que para el primero. Tras el segundo lavado en PBD se procedió a la incubación con 40 µl del tercer anticuerpo (anti-rabbit conjugado a FITC) en las condiciones anteriormente citadas.

- Se eliminó el exceso del tercer anticuerpo, se dejó semisecar la preparación cromosómica y se colocaron 10 µl (para una superficie de 24x24mm) de Ioduro de Propidio.

- Se colocó un cubreobjetos de vidrio de 24x24 mm en la zona del portaobjetos en la que se llevó a cabo la hibridación y se procedió a su observación al microscopio.

- Las imágenes de las metafases que presentaron señal de hibridación fueron captadas con una cámara de vídeo y almacenadas en soporte informático en formato TIF o JPG.

Protocolo 2: ZOO-FISH + Bandas G (sondas marcadas con Digoxigenina)

El protocolo empleado para la realización de la técnica de **hibridación *in situ* fluorescente** se detalla a continuación:

a) Desnaturalización del DNA de la sonda

Igual que en el Protocolo 1

b) Preparación del portaobjetos y desnaturalización del DNA cromosómico

Pasos c2) a c4) del Protocolo 1

c) Hibridación

Igual que en el Protocolo 1

d) Amplificación y detección de la señal de hibridación

Igual que en el Protocolo 1

e) Bandas G

Los portaobjetos se sacaron del congelador una hora antes de iniciar la aplicación de la metodología de obtención de bandas G, y se mantuvieron a temperatura ambiente.

- Se eliminó la cola de sellado y se separó el cubreobjetos de la preparación cromosómica.
- El portaobjetos fue sumergido en una cubeta con PBD, a temperatura ambiente, durante 4 minutos.
- Seguidamente se introdujo en una cubeta con 2xSSC a temperatura ambiente, durante 2 minutos, y se dejó secar.
- El portaobjetos fue sumergido en una cubeta con Carnoy durante 15 segundos y a continuación en otra cubeta con agua destilada durante 2 minutos, y se dejó secar.
- Se sumergió el portaobjetos en una serie de soluciones con etanol al 30%, 70% y 90% (2 minutos en cada uno) primero en concentración creciente y luego en concentración decreciente.
- Una vez seca la preparación se tiñó con Wright durante 5 minutos y se dejó secar. El portaobjetos fue examinado al microscopio para confirmar la presencia de bandas G. Aquellas preparaciones que no presentaron bandeos G se sumergieron durante 1-2 segundos en 2xSSC a 65°C, y se tiñeron nuevamente con Wright.
- Los portaobjetos fueron examinados al microscopio, y se procedió al fotografiado de las metafases que habían presentado señal de hibridación.

Protocolo 3: ZOO-FISH + Bandas G (sondas marcadas con Cy3)

A continuación se detalla el protocolo empleado para la realización de la técnica de **hibridación *in situ* fluorescente**.

a) Desnaturalización del DNA de la sonda

- Los viales que contienen la sonda de DNA y el tampón de hibridación fueron sometidos a una incubación en una estufa a 37°C, durante 5 minutos.
- Se tomaron 0.003 ml. de la solución con la sonda y 0.012 ml del tampón, se introdujeron en un tubo Eppendorf previamente esterilizado y se mezclaron con la ayuda de una micropipeta.
- Con el fin de proceder a la desnaturalización del DNA que forma la sonda, se sumergió el Eppendorf que la contenía, en un baño a 65°C ±2°C durante 10 minutos.
- Para permitir la reasociación de las secuencias de DNA repetitivo que contiene la sonda, se incubó el Eppendorf al baño maría, dentro de una estufa a 37°C, durante 90 minutos.

b) Preparación del portaobjetos y desnaturalización del DNA cromosómico

Del segundo al cuarto paso de la parte c) del Protocolo 1

c) Hibridación

Igual que en el Protocolo 1

d) Detección de la señal de hibridación

- Se eliminó la cola de sellado y las preparaciones cromosómicas se sumergieron en una cubeta con 2xSSC a 45°C para despegar suavemente el cubreobjetos.
- Las preparaciones cromosómicas fueron sumergidas en una cubeta con 50% de Formamida en 2xSSC a 45°C durante 2 minutos y seguidamente en una cubeta con 2xSSC a 45°C durante otros 2 minutos.
- Se dejaron semisecar las preparaciones cromosómicas, se colocaron 15 µl de DAPI sobre cada una de ellas, se colocó un cubreobjetos de vidrio, se selló con cola, y se procedió a la observación de las preparaciones al microscopio de fluorescencia.
- Una vez finalizada la captación de las imágenes tras la FISH, las preparaciones cromosómicas fueron almacenadas a -20°C hasta la aplicación de la técnica de obtención de bandas G.

Tras la hibridación *in situ* con las sondas de los cromosomas 4 y 7 humanos en ABH, las imágenes fueron captadas en un ordenador dotado con el programa de análisis de imagen.

e) Bandas G

Para la hibridación con la sonda del cromosomas 3 humano en *Cebus apella*, se realizaron las bandas G posteriores a la FISH siguiendo los pasos del primero al séptimo de la parte e) del protocolo 2.

En el caso de las sondas de los cromosomas 4 y 7 humanos, se realizó la conversión del patrón obtenido con el DAPI III, en bandas DAPI (similares a las bandas G).

Tras la aplicación de la ZOO-FISH y el tratamiento de obtención de bandas G, se compararon las imágenes de la misma metafase. De esta forma se pudo identificar cuales eran los cromosomas o los segmentos cromosómicos que habían hibridado con cada una de las sondas utilizadas y que por tanto, eran homólogos al cromosoma humano representado en cada sonda.

De esta forma se establecieron las homologías cromosómicas entre la especie humana (HSA) y *Cebus apella* (CAP) y entre HSA y *Ateles belzebuth hybridus* (ABH). Basándonos en estos resultados se procedió a la comparación de los patrones de bandas G de CAP y ABH, y se establecieron, de forma indirecta, las homologías cromosómicas existentes entre ambas especies.

III.2.3.3. Reorganizaciones cromosómicas evolutivas

Una vez establecidas las homologías cromosómicas de las especies de primates analizadas en este trabajo, se procedió al estudio de las **reorganizaciones** que podrían explicar estas homologías. Para ello se realizó el cultivo de linfocitos de sangre periférica (apartado III.2.1) de 5 individuos de la especie humana no relacionados familiarmente, y se trataron los cromosomas metafásicos de cada uno de ellos con la técnica de obtención de bandas G. Una vez comprobada la normalidad de sus cariotipos, se tomaron de 6 a 10 cromosomas (de metafases fotografiadas) de cada par cromosómico humano, y se compararon con de 6 a 10 cromosomas (de metafases fotografiadas) de CAP y ABH.

Las **reorganizaciones** que podrían explicar las homologías cromosómicas, se establecieron comparando los patrones de bandas G de los cromosomas humanos con los de los cromosomas o segmentos cromosómicos homólogos en cada una de las especies de primates del nuevo mundo estudiadas. Esta comparación permitió también, determinar

las **bandas** que contenían los **puntos de rotura** implicados en estas **reorganizaciones** cromosómicas evolutivas.

Una vez determinadas las bandas implicadas en las reorganizaciones cromosómicas evolutivas detectadas en este trabajo, se ha relacionado la localización de las mismas con la presencia de lugares frágiles y con la localización de bandas sensibles al efecto de las radiaciones ionizantes del cariotipo humano, así como la localización de bandas sensibles al efecto de las radiaciones ionizantes del cariotipo de CAP. Para determinar la significación de esta relación, se ha aplicado el test estadístico de la Ji cuadrado.

III.2.4. ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA

III.2.4.1. Digestión *in situ* con enzimas de restricción

Material necesario

ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

- Enzimas de restricción y tampones de incubación (Boheringer Mannheim)

AluI -tampón A

HaeIII -tampón M

RsaI -tampón L

Sau3A -tampón A

OTRAS SOLUCIONES

- Agua desionizada estéril

- Solución Leishman (tampón Leishman:colorante Leishman en la proporción 4:1)

MATERIAL DESECHABLE

- Tubos Eppendorf estériles

- Cubreobjetos de vidrio

UTILLAJE

- Cámara húmeda

- Microscopio óptico marca ZEISS

MATERIAL FOTOGRÁFICO

- El mismo que el descrito en el apartado III.2.2.

Protocolo

a) Los tampones de incubación concentrados (10x) fueron disueltos en agua desionizada (10 μ l de tampón en 90 μ l de agua). Cada enzima de restricción fue disuelta en el tampón correspondiente (1x), hasta obtener una concentración final de 0,5u/ μ l.

b) Se colocaron 100 μ l de la solución formada por el enzima de restricción y el tampón de incubación, sobre un portaobjetos con extensiones cromosómicas recién hechas, o sobre una preparación cromosómica que había sido almacenada a -20°C inmediatamente después de realizar la extensión cromosómica. Se colocó un cubreobjetos sobre cada preparación. Simultáneamente a la digestión con los enzimas de restricción, se realizaron dos controles: 1) algunos portaobjetos fueron sometidos al tratamiento arriba indicado, pero en este caso, la solución contenía únicamente el tampón y no el enzima. Este procedimiento permitió detectar si se habían producido o no bandas en los cromosomas por la acción del tampón; 2) en los experimentos realizados con las especies de primates no humanos se realizó también la digestión de cromosomas humanos. De esta forma, se obtuvo un control de la actividad del enzima de restricción y por tanto, de su capacidad de digestión.

c) Los portaobjetos fueron incubados en una cámara húmeda a 37 °C, durante 12 horas.

d) Tras el periodo de digestión, se eliminó el cubreobjetos mediante la inmersión de la preparación cromosómica en una cubeta con agua destilada.

e) Una vez seca se procedió a la tinción de la preparación cromosómica con la solución Leishman durante 3 minutos y transcurrido este tiempo se dejó secar.

f) Se procedió a la observación del portaobjetos al microscopio óptico y al fotografiado de las metafases.

g) Se realizaron copias en papel fotográfico de las metafases digeridas con los diferentes enzimas de restricción, y se procedió a su análisis.

Según la respuesta de la banda heterocromática a la digestión con el enzima de restricción tendremos:

(+) : heterocromatina resistente a la digestión con el enzima y que presenta, por tanto, una coloración intensa tras la tinción con Leishman.

(-) : heterocromatina sensible a la digestión con el enzima y que presenta, por tanto, una coloración débil tras la tinción con Leishman.

(\pm) : heterocromatina parcialmente sensible a la acción del enzima y que presenta una coloración débil tras la tinción con Leishman aunque más intensa que en los casos en los que es sensible.

III.2.4.2. Tinción fluorescente con DA/DAPI

Material necesario

SOLUCIONES

- Tampón McIlvaine (pH 7.0):

- 0,63 g de ácido cítrico
 - 6,19 g de Fosfato sódico dibásico
 - 500 ml de agua destilada

- Solución madre DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol):

- 1 mg DAPI (SIGMA)
 - 5 ml de agua destilada

- La solución madre DAPI se puede guardar en viales a -20°C , en oscuridad.

- Solución DAPI de trabajo:

- 50 μl de solución madre DAPI
 - 15 ml de tampón McIlvaine (pH 7.0)

- La solución DAPI de trabajo se prepara antes de realizar cada experimento.

- Solución de distamicina A (DA):

- 2 mg de DA (SIGMA)
 - 20 ml de Tampón McIlvaine (pH 7.0)

- La solución DA se puede guardar en viales a -20°C , en oscuridad.

- Solución de Cloruro de magnesio (50 mM)

- 100 mg de Cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
 - 10 ml de agua destilada

- Solución de montaje:

- 5 ml de Glicerol
 - 5 ml de Tampón McIlvaine (pH 7.0)
 - 50 μl de solución Cloruro de magnesio (50 mM)

- 2xSSC

- Detergente de tampón fosfato (PBD) (ONCOR)

MATERIAL DESECHABLE

- Cubreobjetos de vidrio

- Tubos Eppendorf

UTILLAJE

- Cámara húmeda

- Cubetas de vidrio

- Microscopio con filtro específico para DAPI, marca ZEISS modelo Axioplan

MATERIAL FOTOGRÁFICO

- El mismo que el descrito en el apartado III.2.2.

Protocolo

Este tipo de tinción se realizó sobre portaobjetos con extensiones cromosómicas recién hechas, o sobre preparaciones cromosómicas que habían sido almacenadas a -20°C inmediatamente después de realizar la extensión cromosómica. La técnica de **tinción DA/DAPI convencional** se realizó siguiendo el protocolo descrito por Schweizer y col. (1978):

- a) Se dispusieron unas gotas de la solución DA sobre el portaobjetos, y se colocó un cubreobjetos de vidrio. Esta tinción se realizó en oscuridad durante 15 minutos y a temperatura ambiente.
- b) Se eliminó la DA con agua destilada y se dejó secar la preparación.
- c) Se colocaron unas gotas de la solución DAPI, se colocó un cubreobjetos y transcurridos 25 minutos (en oscuridad), se eliminó el exceso de DAPI con agua destilada y se dejó secar la preparación cromosómica.
- d) Se colocaron unas gotas de la solución de montaje, se colocó un cubreobjetos de vidrio y se dejó estabilizar la tinción durante aproximadamente 2 horas. Transcurrido este periodo se procedió a la observación de la muestra al microscopio con el filtro específico para DAPI.

En los casos en los que todos los cromosomas no presentaban tinción DA/DAPI positiva, se aplicó la técnica de bandas G de forma secuencial a la de la tinción fluorescente. El protocolo seguido en este caso fue el siguiente:

- Se separó el cubreobjetos de la preparación cromosómica
- Se sumergió la preparación de forma consecutiva en dos cubetas, una con PBD durante 4 minutos y otra con $2\times\text{SSC}$ durante otros 4 minutos, en ambos casos a temperatura ambiente
- Se dejó secar el portaobjetos
- Se realizó el protocolo de obtención de bandas G detallado en el apartado III.2.2.

Además de la tinción convencional con DA/DAPI, se realizaron dos variantes de la técnica. La primera consistió en realizar la tinción con DA/DAPI siguiendo la técnica de Schweizer y col. (1978) anteriormente descrita pero, siguiendo el protocolo descrito por Bella y col., (1991), en preparaciones cromosómicas que previamente habían sido tratadas con la técnica de obtención de bandas C (**C+DA/DAPI**). La segunda variante consistió en realizar la tinción DA/DAPI en portaobjetos sometidos previamente a la

técnica de obtención de bandas *G-C* secuenciales (**G-C+DA/DAPI**). Como control, y para descartar posibles influencias del colorante sobre la acción de la tinción DA/DAPI, la mitad del portaobjetos fue teñida con el colorante correspondiente para poner de manifiesto las bandas *G* o *C* en cada caso, mientras que la otra mitad de la preparación no fue teñida. La comparación del resultado obtenido tras la tinción con DA/DAPI en las dos partes del portaobjetos, permitió eliminar la posible interacción de restos de colorante (Leishman o Wright) con los componentes utilizados en la tinción fluorescente. Además, en los experimentos realizados con las especies de primates no humanos se realizó un control adicional: en cada experimento se realizó también el mismo tipo de tinción fluorescente en cromosomas humanos. De esta forma, se obtuvo un control del estado del DAPI y la DA y de la fiabilidad del patrón de tinción obtenido.

Para hacer referencia a los tres tipos de tinción con DA/DAPI se ha seguido la siguiente nomenclatura:

DAPI¹ (D1): DA/DAPI en portaobjetos sin tratamiento previo

DAPI² (D2): bandas *C*+DA/DAPI

DAPI³ (D3): bandas *G-C* secuenciales+DA/DAPI

Según la respuesta de la banda heterocromática a la tinción con DA/DAPI tenemos:

(+) : heterocromatina DA/DAPI brillante o positiva

(-) : heterocromatina DA/DAPI no brillante o negativa

III.2.4.3. Nomenclatura de las bandas heterocromáticas

Para definir la posición de las bandas heterocromáticas en el cromosoma se ha establecido la siguiente nomenclatura:

Cen : heterocromatina de localización centromérica

Pericen : heterocromatina de localización pericentromérica

Ter p: heterocromatina de localización telomérica en el brazo p

Ter q: heterocromatina de localización telomérica en el brazo q

Int p : heterocromatina de localización intersticial en el brazo p

Int q : heterocromatina de localización intersticial en el brazo q

P : brazo p heterocromático

III.2.4.4. Análisis cladístico

Este estudio está basado en los datos obtenidos con la digestión *in situ* con los enzimas de restricción y con las tinciones fluorescentes con DA/DAPI (DAPI¹, DAPI² y

DAPI³), en las especies estudiadas. Para realizar este análisis hemos aplicado el programa PAUP 3.1.1 (Swofford, 1993; Borowik, 1995). El programa se ha utilizado aplicando las opciones:

Bootstrap Heuristic Search, (100 réplicas bootstrap)

Mulpars

Max tree = 100

Para elaborar la matriz hemos utilizado como caracteres:

- a) El tipo de heterocromatina
- b) La localización del tipo de heterocromatina
- c) El número de localizaciones en las que está presente el tipo de heterocromatina. Hemos definido las localizaciones como lugares en los que se encuentra cada tipo de heterocromatina, ya sea centromérica, intersticial, telomérica o en el brazo p. En el caso de que un mismo cromosoma presente el mismo tipo de heterocromatina en más de una localización, se han contabilizado todas ellas de forma independiente. Se han definido tres rangos para el número de localizaciones: 1-2, 3-15 y >15. Estos rangos se han definido *a posteriori* una vez analizada la distribución del número de localizaciones para cada tipo de heterocromatina que presentaban las especies analizadas.

Como se detalla en el apartado de resultados, de la especie *Aotus nancymai* (ANA), no se han obtenido datos concluyentes tras la digestión con el enzima *RsaI*. Por este motivo se han realizado dos análisis: uno incluyendo los resultados del análisis cualitativo de todas las especies estudiadas excepto ANA (matriz 1), y otro incluyendo a ANA pero sin tener en cuenta los datos de la digestión con *RsaI* en el resto de las especies analizadas (matriz 2). Las matrices se han construido asignando un valor de "1" para la presencia del carácter en cada taxón o especie y de "0" para la ausencia del mismo.

En la matriz 1 se han analizado 126 caracteres cuya definición, para el tipo I de heterocromatina, se presenta a continuación:

Carácter 1: presencia de heterocromatina de Tipo I, independientemente de su localización

Carácter 2: presencia de heterocromatina de Tipo I de localización centromérica

Carácter 3: presencia de heterocromatina de Tipo I de localización pericentromérica

Carácter 4: presencia de heterocromatina de Tipo I de localización terminal

Carácter 5: presencia de heterocromatina de Tipo I que ocupa el brazo p

Carácter 6: presencia de heterocromatina de Tipo I en 1-2 localizaciones

Carácter 7: presencia de heterocromatina de Tipo I en 3-15 localizaciones

Carácter 8: presencia de heterocromatina de Tipo I en >15 localizaciones

Los caracteres 1, 6, 7 y 8 se repiten para cada uno de los tipos de heterocromatina. Los caracteres 2 a 5 son específicos para cada uno de los tipos de heterocromatina ya que sólo se han representado las diferentes localizaciones cromosómicas en las que encontramos cada tipo de heterocromatina. Además, en la matriz no se han incluido todos los caracteres posibles, ya que se han desestimado aquellos que tienen valor "0" en todos los taxones o especies. En el apartado de resultados se detalla la definición de todos los caracteres utilizados para construir cada una de las dos matrices de datos.