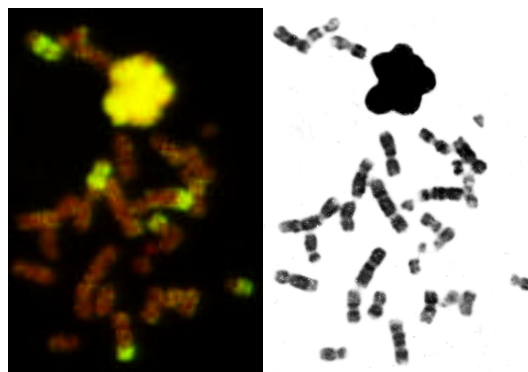


# EVOLUCIÓN CROMOSÓMICA EN SIMIIFORMES:

Homologías, Reorganizaciones y Heterocromatina



Francisca García Haro

2001

**EVOLUCIÓN CROMOSÓMICA EN SIMIIFORMES:  
HOMOLOGÍAS, REORGANIZACIONES Y  
HETEROCROMATINA**

Memoria presentada por Francisca García Haro para optar al grado de  
Doctor en Biología por la Universitat Autònoma de Barcelona

Francisca García Haro

Enero de 2001

Las Doctoras Montserrat García Caldés y Montserrat Ponsà i Fontanals,  
Catedráticas del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i  
Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICAN:

Que Francisca García Haro ha realizado bajo nuestra dirección, en la Unitat  
de Biologia Cel·lular de la Universitat Autònoma de Barcelona, el trabajo  
de Tesis Doctoral titulado:

**EVOLUCIÓN CROMOSÓMICA EN SIMIIFORMES:  
HOMOLOGÍAS, REORGANIZACIONES Y HETEROCROMATINA**

Para que así conste, firmamos el presente certificado.

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Enero de 2001.

Dra. Montserrat Garcia Caldés      Dra. Montserrat Ponsà i Fontanals

Enero de 2001

Son muchas las personas que, de una forma u otra, me han ayudado a lo largo de estos años. A todos ellos quisiera expresarles mi agradecimiento.

A mis directoras de tesis por su infinita paciencia. Montse Garcia siempre ha estado ahí cuando la he necesitado, ayudándome incluso en cuestiones ajenas a la tesis. Siempre ha entendido la dificultad de realizar un trabajo experimental, tras una larga jornada de trabajo fuera del departamento. Querría agradecerle especialmente, los domingos que me ha dedicado para darle las últimas pinceladas a esta tesis. A Montse Ponsà querría agradecerle que confiara en mí, me "acogiera", y me propusiera un tema de tesis, y su comprensión y paciencia en el tramo final de este trabajo, sobre todo en lo que respecta a las discusiones sobre el papel evolutivo de la heterocromatina.

A Josep Egozcue por tener siempre una frase para animarme, o simplemente para hacerme sonreír.

A Fanny por escucharme en momentos de "máxima tensión", y por quitarle hierro al asunto.

A Dolors, por su eterna sonrisa.

A Josep Santaló, por las veces que me ha hecho reír con sus salidas, la más memorable la de "una bleda" que se puede utilizar a modo de látigo!!. Pero sobre todo por la calidad de su docencia, que consiguió despertar en mí el interés por la Biología Celular.

A Leo, por haber estado ahí siempre que le he necesitado, ayudándome con esa técnica que no acaba de salir, con la estadística, y sobre todo con su sentido crítico.

A Carme, por las confidencias compartidas, por ayudarme, por animarme en los momentos bajos, y por iniciarme en el mundo de la FISH.

A Marc, por tener el medio de cultivo siempre a punto, y por sus ocurrencias durante las sobremesas.

A Silvia y Maica, por su buena disposición.

A Esther y Luz, por enseñarme a buscar metafases al micro, desvelarme los secretos de la Cámara Oscura, y enseñarme a cariotipar metafases humanas. A Luz además, tengo que agradecerle que me iniciara en el mundo del Diagnóstico Prenatal.

A las integrantes de las "cenas de niñas", que tanta curiosidad han despertado siempre entre los integrantes masculinos de la unidad: A Anna, por introducirme en el mundo de la citogenética de los primates, pero sobre todo por sus geniales equívocos (entre ellos el de un conocido cantante español y la marca de un lavavajillas). A Pilar, por sus historias sobre plumas estilográficas, por estar siempre dispuesta a echarme una mano, por ser como es. A Elena, por ser un modelo de orden y disciplina en el trabajo, y por esos "ataquillos" de risa incontenible que hemos sufrido juntas. A Emma y Mireia, por las muestras de amistad que de ellas he recibido a lo largo de estos años. Por los buenísimos ratos que hemos pasado juntas, bailando o simplemente hablando.

A Carles, por sus ánimos constantes, sobre todo en la etapa final de esta tesis, y por su inestimable ayuda con el Power Point. A Mark, por enseñarme cómo se ponen unos esquis, y sobre todo, por dejar que me acercara al LÍMITE ESTABLECIDO.

A Joan, por estar siempre dispuesto a prestarme su ayuda, por los ánimos constantes que de él he recibido durante la "estresante" etapa de escritura de esta tesis, y por ser un modelo a seguir (con sus "20" Blanco et al. a cuestas). A Tomás, por maravillarme con sus conocimientos de literatura, y por ampliar mis horizontes musicales descubriéndome a Metálica durante las interminables horas de microscopio. Al "Pepitu" por dejar su trabajo al instante y ayudarme cuando me ha visto "nerviosa perdida" porque se me había "colgado" el ordenador, por cambiar la impresora de sitio tantas veces como lo he necesitado, por cuidarme tanto. A Cristina, por su espontaneidad, por su sinceridad, y sobre todo por su confianza. A Esther, por preocuparse de mi forma física. A Naíma, por sus ánimos, y por su excelente Cuscus. A Aurora, por despertar mis raíces Andaluzas, por compartir rabietas y alegrías, y por devolverme la "confianza en la humanidad" al escoger un tema de investigación básica (citogenética y primates), para realizar su tesis.

A los nuevos "machacas" de la Unidad, por haber soportado mis nervios y mis prisas, y por cederme el ordenador siempre que lo he necesitado.

A Paquito, Sergio y Asumpta, por ayudarme con la FISH.

A María Ribas, por las largas conversaciones sobre la digestión *in situ* con los enzimas de restricción, por su energía desbordante, y por encontrar siempre el lado bueno de las cosas.

A Ana Corominas, por haber conseguido que me animara de nuevo con este trabajo, por sus consejos, por su amistad.

A mis compañeros del PAS del IBF: Teresa, Juan, Vicens, Amelia, y especialmente a Nati, por sus ánimos constantes, y por hacer agradable mi trabajo allí.

A Toni Iborra con el que he compartido tantas cosas desde que comenzamos la carrera, desde el Renault 6 que nos dejaba tirados cada dos por tres, hasta el estrés en la última etapa de escritura de nuestras tesis.

A Angeles, Aurora, Dolors, Luisa, Sonia y Tere. Por haber mantenido hasta hoy una amistad que comenzó en los primeros años de carrera. Por tantas confidencias, por tantas cenas, por tantas risas, por su cariño.

A Regina Barros, Alfredo Medeiros y sus colaboradores, por haber realizado la caracterización citogenética de los *Ateles paniscus* y *A. belzebuth marginatus* que aparecen en esta tesis y que sirvieron, además, para publicar un trabajo conjunto.

Al Dr. Luigi Ferrucci, por acogerme en su laboratorio, y por sus charlas sobre los enzimas de restricción.

Al personal del Parc Zoològic de Barcelona, especialmente a Teresa Abelló, por el interés que ha mostrado en todo momento en colaborar con nosotras. A la veterinaria Liliana Monsalve, y al Personal del ZOO de la Casa de Campo de Madrid, especialmente a Manuel López. Todos ellos nos han proporcionado las muestras de sangre de los ejemplares estudiados en este trabajo.

A Gilberto Gil, Carlos Jobim, Ella Fitzgerald, Mercedes Sosa, Peter Frampton, y al MAESTRO Joaquín Sabina, entre otros, por haber amenizado con su música las largas horas que he pasado durante la realización de esta tesis.

A mi familia. Ellos son los protagonistas de este capítulo de agradecimientos. A mis padres, por su apoyo constante a lo largo de estos años. Ellos han sido mi estímulo en las horas bajas, y gracias a su esfuerzo, he podido llegar hasta aquí y realizar este trabajo de tesis. A mi hermana quiero agradecerle que haya soportado estoicamente el hecho de no vernos durante semanas, y el apoyo que he recibido de su parte en todo momento. A Felipe, por soportar mis nervios y mi mal humor durante estos últimos meses, y por haberme entendido y apoyado durante los largos años que ha durado este trabajo.

# ÍNDICE

## I. INTRODUCCIÓN

I.1. CROMOSOMAS Y EVOLUCIÓN.....	3
I.2. CAMBIOS CROMOSÓMICOS.....	3
I.2.1. Reorganizaciones cromosómicas y evolución.....	4
I.2.2. Heterocromatina constitutiva .....	9
I.2.2.1. Análisis cuantitativo de la heterocromatina constitutiva en primates.....	11
I.2.2.2. Análisis cualitativo de la heterocromatina constitutiva en primates.....	11
I.3. CARACTERÍSTICAS CITOGÉNÉTICAS DE LOS PRIMATES.....	15
I.3.1. Infraorden Platyrrhini.....	19
I.3.2. Infraorden Catarrhini.....	20
I.4. LUGARES FRÁGILES.....	25
I.5. SENSIBILIDAD CROMOSÓMICA AL EFECTO DE LAS RADIACIONES IONIZANTES .....	26
I.6. SECUENCIAS TELOMÉRICAS INTERSTICIALES .....	27

## II. OBJETIVOS 31

## III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	35
III.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	36
III.2.1. Obtención de cromosomas metafásicos .....	36
III.2.2. Bando cromosómico y obtención del cariotipo.....	38
III.2.3. Homologías y reorganizaciones cromosómicas evolutivas.....	40
III.2.3.1. Homologías cromosómicas: bandas G.....	40
III.2.3.2. Homologías cromosómicas: ZOO-FISH y bandas G secuenciales.....	41
III.2.3.3. Reorganizaciones cromosómicas evolutivas.....	47
III.2.4. Análisis cualitativo de la heterocromatina constitutiva .....	48
III.2.4.1. Digestión <i>in situ</i> con enzimas de restricción.....	48
III.2.4.2. Tinción fluorescente con DA/DAPI.....	50
III.2.4.3. Nomenclatura de las bandas heterocromáticas .....	52
III.2.4.4. Análisis cladístico .....	53



## IV. RESULTADOS

IV.1. HOMOLOGÍAS Y REORGANIZACIONES CROMOSÓMICAS EVOLUTIVAS .....	57
IV.1.1. EL GÉNERO <i>Cebus</i> .....	57
IV.1.2. EL GÉNERO <i>Ateles</i> .....	60
IV.1.3. Homologías y reorganizaciones cromosómicas: <i>Homo sapiens</i> Y <i>Cebus apella</i> .....	64
IV.1.4. Homologías y reorganizaciones cromosómicas: <i>Homo sapiens</i> Y <i>Ateles belzebuth hybridus</i> .....	77
IV.1.5. Homologías y reorganizaciones cromosómicas: <i>Cebus apella</i> Y <i>Ateles belzebuth hybridus</i> .....	92
IV.1.6. Bandas implicadas en reorganizaciones cromosómicas evolutivas.....	100
IV.2. ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA .....	109
IV.2.1. Caracterización de la heterocromatina constitutiva de los Hominoidea .....	109
IV.2.1.1. <i>Homo sapiens</i> .....	109
IV.2.1.1.a. Características cariológicas.....	109
IV.2.1.1.b. Análisis cualitativo de la heterocromatina constitutiva.....	109
IV.2.1.2. <i>Pan troglodytes</i> .....	114
IV.2.1.2.a. Características cariológicas.....	114
IV.2.1.2.b. Análisis cualitativo de la heterocromatina constitutiva.....	114
IV.2.1.3. <i>Gorilla gorilla</i> .....	120
IV.2.1.3.a. Características cariológicas.....	120
IV.2.1.3.b. Análisis cualitativo de la heterocromatina constitutiva.....	122
IV.2.1.4. <i>Hylobates syndactylus</i> .....	126
IV.2.1.4.a. Características cariológicas.....	126
IV.2.1.4.b. Análisis cualitativo de la heterocromatina constitutiva.....	127
IV.2.2. Caracterización de la heterocromatina constitutiva de la familia Cercopithecidae.....	131
IV.2.2.1. Tribu Papionini.....	131
IV.2.2.1.a. Características cariológicas.....	131
IV.2.2.1.b. Análisis cualitativo de la heterocromatina constitutiva.....	132
IV.2.2.2. Tribu Cercopithecini .....	141
IV.2.2.2.a. Características cariológicas.....	141
IV.2.2.2.b. Análisis cualitativo de la heterocromatina constitutiva.....	141
IV.2.3. Caracterización de la heterocromatina constitutiva de la familia Cebidae.....	150
IV.2.3.1. <i>Cebus apella</i> .....	150
IV.2.3.1.a. Características cariológicas.....	150
IV.2.3.1.b. Análisis cualitativo de la heterocromatina constitutiva.....	150

IV.2.3.2. <i>Ateles belzebuth hybridus</i> .....	154
IV.2.3.2.a. Características cariológicas.....	154
IV.2.3.2.b. Análisis cualitativo de la heterocromatina constitutiva.....	154
IV.2.3.3. <i>Aotus azarae</i> .....	158
IV.2.3.3.a. Características cariológicas.....	158
IV.2.3.3.b. Análisis cualitativo de la heterocromatina constitutiva.....	159
IV.2.3.4. <i>Aotus nancymai</i> .....	162
IV.2.3.4.a. Características cariológicas.....	162
IV.2.3.4.b. Análisis cualitativo de la heterocromatina constitutiva.....	163
IV.2.4. Análisis de la heterocromatina en el conjunto de las especies analizadas.....	167
IV.2.5. Análisis cladístico.....	175

## V. DISCUSIÓN

### V.1. HOMOLOGÍAS Y REORGANIZACIONES CROMOSÓMICAS EVOLUTIVAS

V.1.1. Homologías cromosómicas.....	189
V.1.1.1. Asociaciones cromosómicas.....	189
V.1.1.2. Filogenia cromosómica en los Platyrrhini.....	190
V.1.1.3. Cariotipo ancestral de los Platyrrhini.....	214
V.1.2. Reorganizaciones cromosómicas evolutivas.....	217
V.1.3. Bandas implicadas en reorganizaciones cromosómicas evolutivas.....	221
V.1.3.1. Relación entre bandas implicadas en reorganizaciones cromosómicas evolutivas y localización de Lugares Frágiles.....	229
V.1.3.2. Relación entre bandas implicadas en reorganizaciones cromosómicas evolutivas y bandas sensibles al efecto de las radiaciones ionizantes.....	229
V.1.3.3. Relación entre bandas implicadas en reorganizaciones cromosómicas evolutivas y secuencias teloméricas intersticiales.....	231

### V.2. ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA

V.2.1. Origen de la heterocromatina constitutiva.....	235
V.2.1.1. Heterocromatina intersticial y/o terminal.....	235
V.2.1.2. Heterocromatina pericentromérica.....	237
V.2.1.3. Heterocromatina centromérica.....	238
V.2.2. Evolución de la heterocromatina centromérica con respecto a la eucromatina.....	240
V.2.3. Heterocromatina y especiación.....	244
V.2.4. Análisis cladístico.....	246

## VI. CONCLUSIONES..... 251

## VII. BIBLIOGRAFÍA..... 255



**I. INTRODUCCIÓN**

**Hembra del género *Papio* con su cría.**

Fuente: Primates. Nuestros antepasados

Editorial Folio 1997

## I.1. CROMOSOMAS Y EVOLUCIÓN

Los cambios genotípicos son los eventos básicos que proporcionan el material para el proceso evolutivo, ya que pueden producir nuevos fenotipos que, mediante interacciones con los factores ambientales, y a través de varias generaciones, pueden originar nuevas especies. Los cambios en el genoma pueden ser cambios génicos o cambios cromosómicos (que también pueden implicar cambios génicos).

A pesar de que se pueden identificar las reorganizaciones cromosómicas que explicarían la separación entre especies, la existencia de reorganizaciones cromosómicas no son, obviamente, la única causa de especiación. Sin embargo, en los primates y en los mamíferos en general, la mayoría de las especies se caracterizan por presentar un cariotipo propio, lo que indica que se han producido cambios cromosómicos causantes de su divergencia, o posteriores a la misma, que se han fijado en las diferentes especies. En la literatura existen numerosas publicaciones que inciden en la implicación de las reorganizaciones cromosómicas en el proceso de especiación (Wilson y col. 1975; Coyne 1984; Larson y col. 1984; Baker y col. 1987; King 1987).

La **citogenética evolutiva** estudia las formas cromosómicas de las especies actuales y, mediante la comparación de sus cariotipos, hace inferencias sobre los cambios cromosómicos (reorganizaciones) que se han podido producir a lo largo del proceso evolutivo de los diferentes grupos taxonómicos, sean o no la causa del proceso de divergencia de las especies.

## I.2 CAMBIOS CROMOSÓMICOS

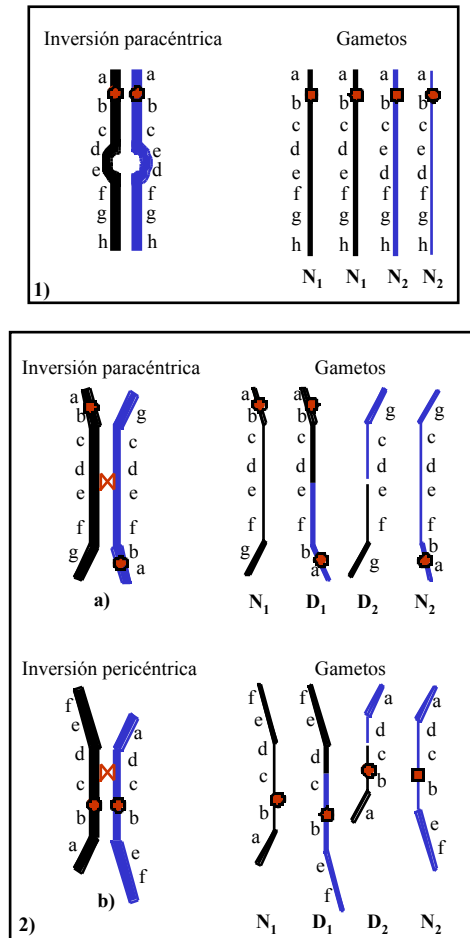
Los mecanismos de reparación del DNA no siempre son eficaces en la reparación de las lesiones producidas; por ello, tras una rotura cromosómica se pueden producir reorganizaciones de la cromatina. Las roturas cromosómicas son generalmente reparadas volviendo a unir los extremos rotos, y dejando a los cromosomas intactos. Sin embargo, los extremos rotos pueden unirse a otros extremos rotos en el mismo cromosoma o a extremos rotos de otros cromosomas no homólogos. Las roturas cromosómicas que favorecerán la formación de reorganizaciones, pueden ser inducidas experimentalmente mediante radiaciones ionizantes (Evans 1962; 1974; Caballín 1981; Borrell y col. 1998a y b). Sin embargo, los cromosomas también pueden presentar roturas, sin la acción de agentes externos conocidos, probablemente debido a errores en la maquinaria de replicación y de reparación del DNA.

La mayoría de autores está de acuerdo en considerar que las reorganizaciones cromosómicas podrían ser uno de los factores implicados en la divergencia de las especies, produciendo una barrera de fertilidad que podría actuar como mecanismo de aislamiento reproductivo. Las reorganizaciones cromosómicas pueden interferir en el curso de la meiosis, y provocar la formación de gametos desequilibrados en el individuo heterocigoto (White 1973; Dutrillaux 1975; Lejeune 1975; Fredga 1977; Lande 1979; Bengston 1980). Sin embargo no todas las reorganizaciones cromosómicas producen gametos desequilibrados en la meiosis y en consecuencia, disminución en la fertilidad del híbrido. De hecho, en algunas especies de Primates (García y col. 1979; Ponsà y col. 1995) y en roedores del género *Ctenomys* (García y col. 2000), se han observado numerosos cambios cromosómicos intraespecíficos que se conservan como polimorfismos, y que parecen no tener consecuencias reproductivas importantes que puedan provocar aislamiento.

Desde un punto de vista teórico se pueden clasificar los cambios cromosómicos en dos categorías: a) reorganizaciones cromosómicas (inversiones, translocaciones recíprocas, activaciones/inactivaciones centroméricas, fusiones y fisiones) que pueden tener consecuencias en el comportamiento meiótico de los mamíferos y b) cambios cromosómicos (variaciones cuantitativas y de localización de la heterocromatina constitutiva) sobre los que no hay evidencias claras que determinen su implicación en el aislamiento reproductivo.

### **I.2.1. REORGANIZACIONES CROMOSÓMICAS Y EVOLUCIÓN**

En la figura 1.1 se presenta un ejemplo de algunos de los posibles productos meióticos de las inversiones. En función del tamaño de la inversión, de la zona y el tipo de apareamiento y de la localización de los quiasmas, los gametos pueden ser diferentes (normales, portadores de la inversión, acéntricos, dicéntricos y/o desequilibrados (con deficiencias y duplicaciones)).



**Figura 1.1. Productos meióticos de las inversiones.**

1) **ejemplo** de lo que puede suceder en la meiosis si se produce una pequeña inversión: se observa un predominio del apareamiento de la región no invertida sobre el de la zona invertida. Puesto que la zona invertida no aparea no se produce en ella ningún quiasma. Si se produce un quiasma en la zona apareada (no invertida) los gametos resultantes serían iguales a los cromosomas originales.

N<sub>1</sub> : gameto normal

N<sub>2</sub> : gameto portador de la inversión

2) **ejemplo** de lo que puede suceder en la meiosis si la inversión implica a una región mayor y se observa un predominio del apareamiento de la región invertida sobre el de la zona no invertida. Para simplificar, no se representa el asa de inversión. La formación de quiasmas en la zona invertida producirá gametos desequilibrados.

a) En el caso de que la inversión sea paracéntrica:

N<sub>1</sub> : gameto normal

N<sub>2</sub> : gameto portador de la inversión

D<sub>1</sub> : gameto desequilibrado: dicéntrico y con deficiencias y duplicaciones

D<sub>2</sub> : gameto desequilibrado: acéntrico y con deficiencias y duplicaciones

b) En el caso de que la inversión sea pericéntrica:

N<sub>1</sub> : gameto normal

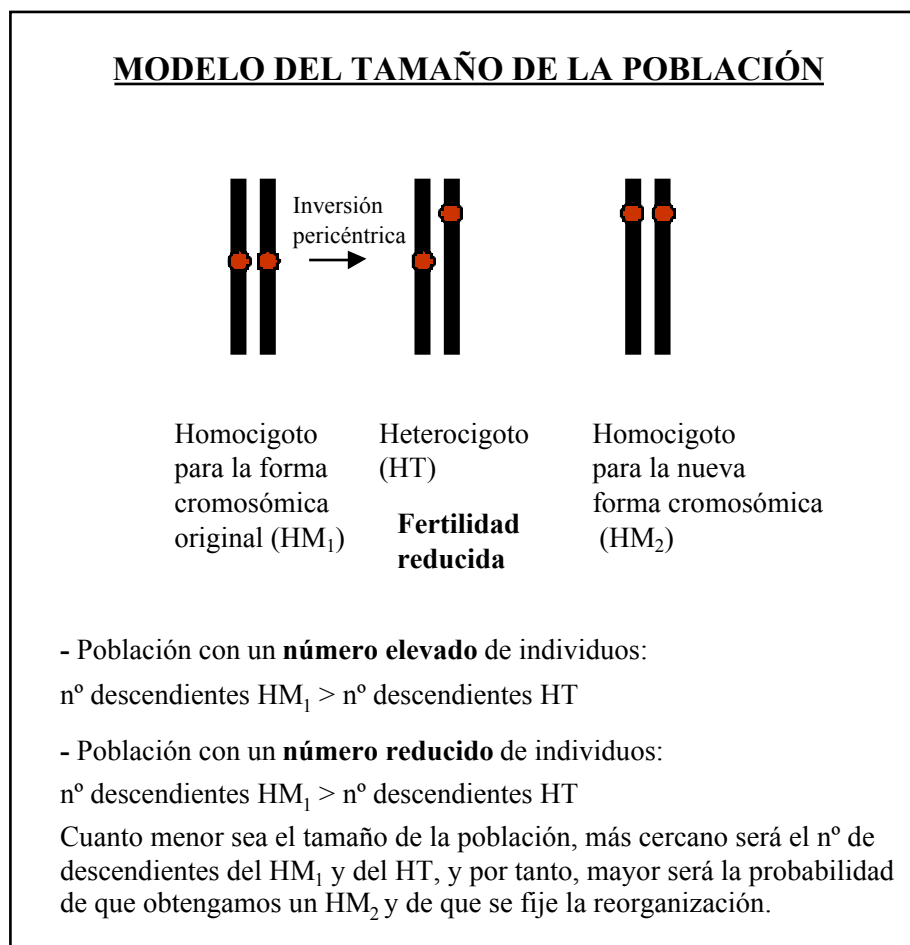
N<sub>2</sub> : gameto portador de la inversión

D<sub>1</sub> : gameto desequilibrado: con deficiencias y duplicaciones

D<sub>2</sub> : gameto desequilibrado: con deficiencias y duplicaciones

Si el heterocigoto tiene reducida su capacidad reproductiva, ¿cómo puede llegar a fijarse una reorganización cromosómica? Existen dos modelos que explicarían la fijación de la nueva forma cromosómica en estos casos:

**a) Modelo del Tamaño de la Población** (Lande 1979, 1984): está basado en las observaciones de Wright (1941) sobre la disminución en la fertilidad de los híbridos para algunas reorganizaciones cromosómicas, con respecto a los homocigotos para la forma cromosómica original o para la nueva forma cromosómica. Si el tamaño de la población en la que ha aparecido la nueva forma cromosómica es grande, hay pocas posibilidades de que ésta se fije. En cambio, si el tamaño de la población es pequeño, o se trata de un grupo semiaislado dentro de una población grande, hay más posibilidades de que se originen individuos homocigotos para la nueva forma cromosómica y por tanto, de que ésta se fije en la población. Este hecho podría conducir a la separación de los individuos homocigotos para la forma cromosómica original, de los homocigotos para la nueva.

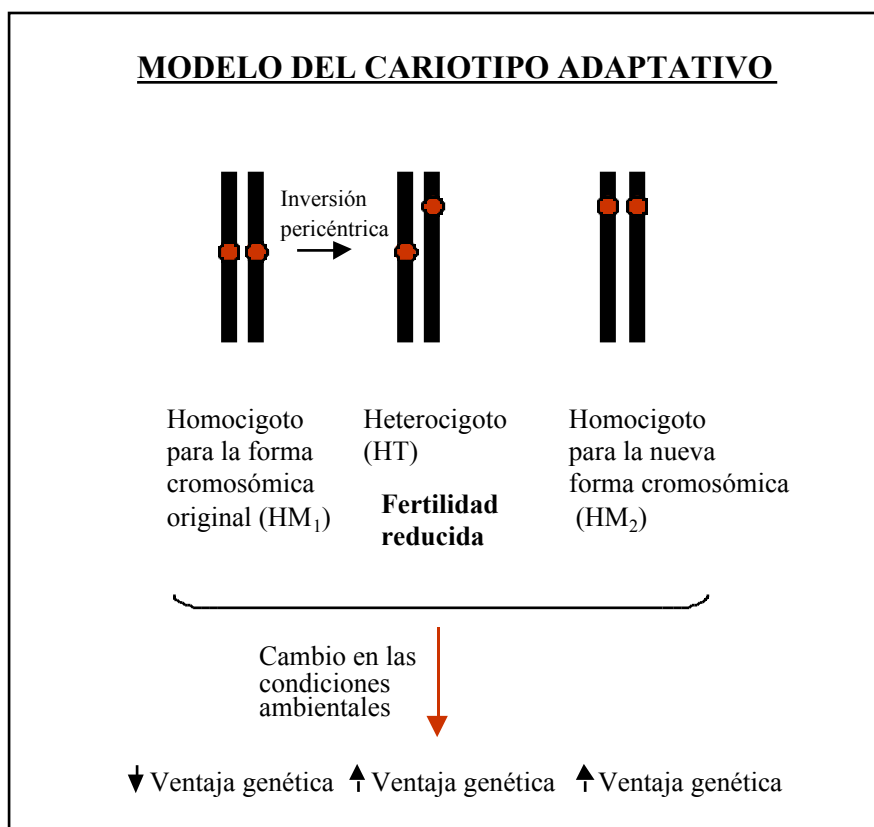


**Figura 1.2.** Esquema del modelo del Tamaño de la Población.



Una variante de este modelo sería el caso de especies que presentan una estructura social con un grupo numeroso pero con un macho dominante. En este caso, a pesar de existir varios machos, el dominante es el que tiene más posibilidades de reproducirse, y por tanto, un cambio cromosómico en los gametos del macho dominante podría propagarse en la población y por tanto, podría fijarse.

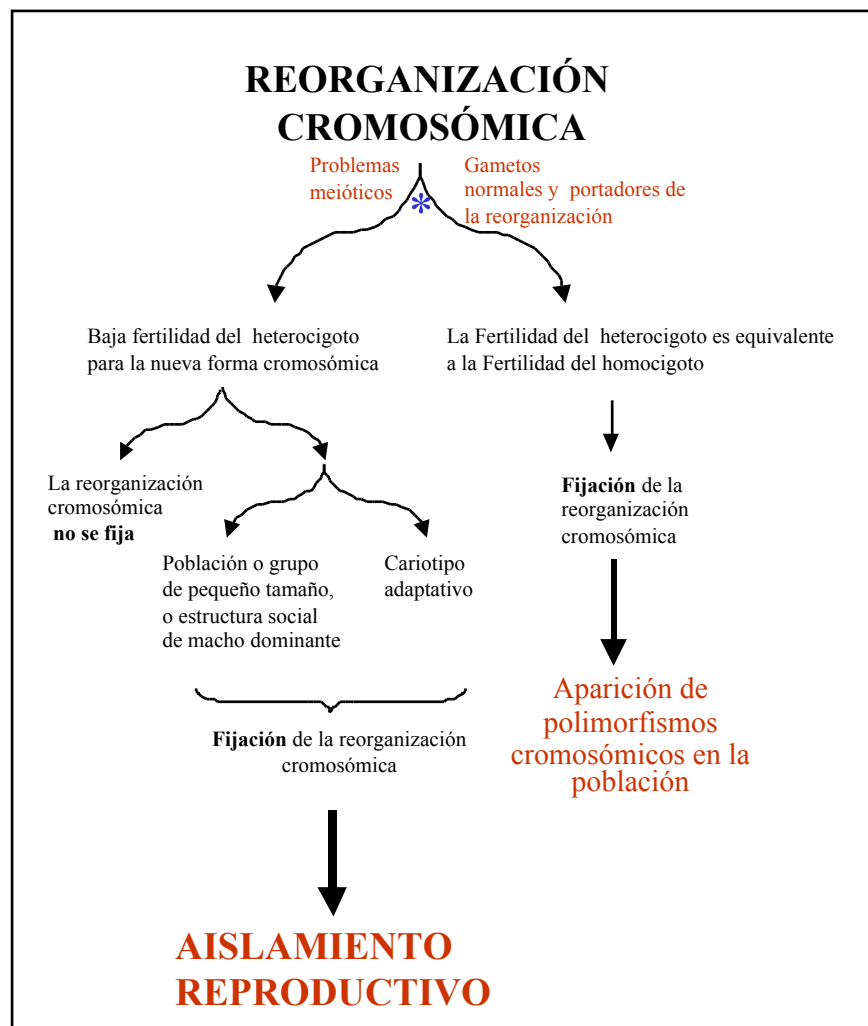
**b) Modelo del Cariotipo Adaptativo** (Bickham y Baker 1979): es una extensión de la teoría de la selección natural de Darwin. Este modelo está basado en la idea de que el cariotipo es adaptativo y bajo determinadas circunstancias, la selección natural puede favorecer la incorporación de una nueva forma cromosómica. Este modelo se puede aplicar sólo si se cumplen tres premisas: 1) la nueva forma cromosómica proporciona al poseedor un beneficio genético; 2) el beneficio genético lo poseen tanto el heterocigoto como el homocigoto para la nueva forma cromosómica y 3) la magnitud del beneficio es mayor que la disminución en la fertilidad del heterocigoto. En este modelo, el tamaño de la población no es un factor importante ya que la ventaja del heterocigoto es mayor que la del homocigoto para la forma cromosómica original. Además, el homocigoto para la nueva forma cromosómica posee las ventajas que le confiere la nueva forma cromosómica, y carece de los problemas meióticos del heterocigoto.



**Figura 1.3.** Esquema del modelo del Cariotipo Adaptativo.

Como se acaba de detallar, las reorganizaciones cromosómicas pueden simplemente establecerse de forma polimórfica en la población, y no originar, por tanto, problemas meióticos, o pueden provocar la aparición de gametos desequilibrados, y por tanto aislamiento reproductivo. Una reorganización cromosómica compleja puede aparearse de formas diferentes y segregar de forma equilibrada en un individuo y de forma desequilibrada en otro. Por tanto, el que se produzcan problemas meióticos o no como consecuencia de una reorganización cromosómica parece depender, además del tipo de reorganización, del proceso meiótico de cada individuo.

A modo de resumen, se pueden establecer cuales serían las condiciones para que una reorganización cromosómica que puede provocar problemas meióticos, y por tanto iniciar el proceso de especiación mediante el aislamiento reproductivo, pueda fijarse en una población (figura 1.4).



**Figura 1.4.** Condiciones para la fijación de una reorganización cromosómica.

\*: depende del tipo de reorganización y del proceso meiótico de cada individuo.

## I.2.2. HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA

La existencia de la heterocromatina es un enigma biológico desde que Heitz la describió en 1928 (John 1988). Heitz estableció el término *heterocromatina* para describir la condensación que presentaban durante la interfase, algunos segmentos cromosómicos.

La heterocromatina constitutiva, a diferencia de la eucromatina, está compuesta principalmente por DNA repetitivo no codificante. Lima de Faria y Jaworska (1968) demostraron además, que las regiones heterocromáticas son de replicación tardía.

A pesar de que la ausencia de transcripción de las regiones heterocromáticas ha sido siempre un hecho plenamente aceptado, se ha detectado que ciertas regiones heterocromáticas contienen algunos genes en *Drosophila* (Hennig 1985), en plantas (Nagl y Schmitt 1985), en anfibios (Varley y col. 1980), y en mamíferos (Sperling y col. 1987). El significado funcional de la transcripción de estas regiones heterocromáticas se desconoce.

Sumner (1990) argumenta que las principales características de la heterocromatina son su universalidad (casi todos los cromosomas de prácticamente todos los eucariotas poseen heterocromatina) y su variabilidad (diferencias en la cantidad de heterocromatina en los diferentes cariotipos, y variabilidad intraespecífica e interespecífica de sus propiedades y su naturaleza)

No se han podido asignar, de forma satisfactoria, funciones específicas a la heterocromatina constitutiva, aunque se han descrito varios efectos de su presencia (John 1988). Sumner (1990) destaca la importancia de distinguir entre efecto y función. La palabra *función* implica que la heterocromatina está presente para producir los resultados observados, mientras que la palabra *efecto* no implica una correlación funcional directa. Entre los diferentes **efectos** provocados por la presencia de **heterocromatina** se pueden destacar (John 1988):

### 1) *Efectos somáticos*

- apareamiento ectópico: la heterocromatina de los cromosomas no homólogos pueden mostrar cierta tendencia a asociarse en células somáticas
- variegación: una reorganización cromosómica puede variar la posición de una región eucromática, resituándola en la proximidad de una región heterocromática. Como consecuencia, se puede producir el efecto de variegación que es el resultado de la silenciamiento de los genes que contiene esa región eucromática.

## 2) Efectos en línea germinal

- efectos en el apareamiento meiótico: las regiones heterocromáticas pueden asociarse de forma inespecífica durante la profase de la primera división meiótica. En *Gryllus argentinus* (Drest y Stoll 1974) se han observado asociaciones de las regiones de heterocromatina terminal, implicando a dos o más bivalentes, durante el paquiteno.

- efectos en la recombinación meiótica: se pueden observar dos tipos de efectos de la heterocromatina en la recombinación meiótica: 1) en las regiones homólogas que poseen heterocromatina no se forman quiasmas; y 2) en casos de polimorfismos heterocromáticos, hay una redistribución de los quiasmas en los bivalentes portadores del polimorfismo.

**Distribución de la heterocromatina dentro del genoma:** Sumner (1990) destaca la existencia de dos reglas generales que podrían gobernar la distribución de la heterocromatina en el genoma:

a) la heterocromatina tiende a acumularse en similares localizaciones, en cromosomas no homólogos del mismo cariotipo ("equilocalización"). Esta afirmación se apoya en la observación de que en la mayoría de especies, la heterocromatina se localiza en los telómeros y/o en los centrómeros.

b) cuando se observan regiones heterocromáticas en posición distal y centromérica en la misma especie, normalmente difieren en su composición

Es decir, no sólo existe una cierta tendencia a que las regiones heterocromáticas se acumulen en determinadas regiones cromosómicas, sino que además su composición refleja su localización. De esto se deduce que podrían existir diferentes mecanismos capaces de generar secuencias de DNA repetitivo similares, o idénticas, en lugares equivalentes en cromosomas no homólogos de un cariotipo. Estos mecanismos podrían tener un papel importante en el origen y la evolución de la heterocromatina. Según Sumner (1990) estos mecanismos podrían ser los siguientes:

1) Amplificación de secuencias similares en lugares específicos del genoma

2) Amplificación de una secuencia de DNA repetitivo en una región cromosómica concreta, seguida de dispersión de esa secuencia amplificada a otras regiones equivalentes de cromosomas no homólogos, aprovechando la proximidad cromosómica. Este mecanismo implica que la distribución de las secuencias heterocromáticas refleja la organización cromosómica y la interacción física de los cromosomas en el núcleo.

Hasta ahora no se ha podido explicar el hecho de que algunas especies hayan sido capaces de incrementar su contenido de DNA repetitivo, y por tanto su cantidad de

heterocromatina, mientras que en otras no se ha producido este incremento, a pesar de ser especies cercanas filogenéticamente. Es igualmente inexplicable, el hecho de que algunos cromosomas presenten una distribución de la heterocromatina diferente a la del resto de los cromosomas del mismo cariotipo.

### **I.2.2.1. Análisis cuantitativo de la heterocromatina constitutiva en primates**

La técnica de bandas C permite determinar la localización y el tamaño de los bloques de heterocromatina constitutiva en el cariotipo de una especie. Es imprescindible aplicar esta técnica de bandeado cromosómico de forma secuencial con la de obtención de bandas G, para poder determinar a qué par cromosómico del cariotipo corresponde cada uno de los pares de la metafase con bandas C.

Como ya se ha comentado cuando se han definido las características citogenéticas de los platirrininos, en *Cebus apella* se pueden observar diferencias en la localización y en el tamaño de los bloques de heterocromatina constitutiva. Estas diferencias pueden ser intraespecíficas e intraindividuales. Uno de los escasos trabajos publicados sobre estudios meióticos en Platyrrhini es el de Seuánez y col. (1983) en *Cebus apella*. Los resultados muestran que las diferencias en el tamaño de los bloques de heterocromatina constitutiva en esta especie no generan problemas meióticos. Otros estudios realizados en el roedor *Uromys caudimaculatus* (Baverstock y col. 1982), y en los saltamontes *Atractomorpha similis* (John y King 1983) y *Cryptobothrus chrysophorus* (John y King 1980) confirmarían esta observación, ya que no se observa reducción en la fertilidad de los híbridos que poseen cariotipos con diferencias en la cantidad y la localización de los bloques de heterocromatina constitutiva, en estas especies.

### **I.2.2.2. Análisis cualitativo de la heterocromatina constitutiva en primates**

Las diferencias en la localización y el tamaño de los bloques de heterocromatina constitutiva no parecen disminuir, en general, la fertilidad del ejemplar que las presenta en heterocigosis y por tanto, parece que en la mayoría de los casos, no son capaces de establecer barreras reproductivas que puedan iniciar el proceso de especiación. ¿Podrían existir diferencias cualitativas en la heterocromatina que pudieran estar implicadas en el proceso de especiación?

Las técnicas citogenéticas utilizadas para analizar cualitativamente la heterocromatina constitutiva de los primates son, básicamente:

- 1) La tinción cromosómica con fluorocromos
- 2) La digestión *in situ* con enzimas de restricción

### Tinción cromosómica con fluorocromos

En citogenética se utilizan fluorocromos que se unen al DNA para realizar tinciones cromosómicas. Existen dos tipos de fluorocromos: los que se unen de forma específica a regiones ricas en A-T (4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), y Hoechst 33258), y los que se unen de forma específica a regiones ricas en G-C (Cromomicina A3) (Schweizer 1981). El uso de contracolorantes mejora notablemente el contraste de la tinción con el fluorocromo o colorante primario (Schweizer 1981).

En la tabla 1.1 se detallan los fluorocromos y contracolorantes más utilizados, su especificidad y la longitud de onda de absorción y de emisión, de cada uno de ellos.

**Tabla 1.1.** Características de algunos de los fluorocromos y contracolorantes utilizados en la bibliografía (adaptado de Sweizer 1981).

Colorante	Especificidad	Absorción (nm)	Emisión (nm)
DAPI	A-T	355	450
Hoechst 33258	A-T	356	465
Distamicina A (DA)	A-T	340	no fluorescente
Verde Metil	A-T	638	no fluorescente
Quinacrina	baja	455	495
Cromomicina A3	G-C	430	570
Actinomicina D	G-C	455	no fluorescente

En los primates se ha utilizado ampliamente la tinción con fluorocromos: en orangután (Schweizer y col. 1979), en la especie humana (Schweizer 1980), en chimpancé (Schmid y Haaf 1984; Wienberg y Stanyon 1988; Luke y Verma 1995), en gorila (Schmid y col. 1986), en varias especies de Catarrhini y en algunos prosimios (Wienberg y Stanyon 1987), en varias especies del género *Callithrix* (Pieczarka y col. 1996, 2000) y en *Aotus* (Pieczarka y col. 1998). La tinción con fluorocromos ha permitido detectar heterogeneidad en la heterocromatina constitutiva, de algunas especies de primates.

Bella y Gosálvez (1994) y Bella y col. (1995) realizaron la tinción DA/DAPI y Cromomicina A3 (CMA3)/DA sobre cromosomas humanos y de ratón que habían sido previamente tratados con la técnica de obtención de bandas C. Con esta técnica de bandeo secuencial observaron diferencias con el patrón de tinción fluorescente

obtenido utilizando únicamente la tinción con DA/DAPI o CMA3/DA. La técnica de bandas C implica la extracción de proteínas y aproximadamente del 60% del DNA de las regiones eucromáticas (C negativas) (Comings y col. 1973; Pathak y Arrighi 1973; Holmquist 1979). Bella y col. (1994 y 1995) atribuyen la tinción DA/DAPI positiva de todas las regiones heterocromáticas, a cambios estructurales y a la extracción de proteínas de las regiones heterocromáticas, como consecuencia de la aplicación de la técnica de obtención de bandas C. Estos cambios podrían afectar a las propiedades de unión de los fluorocromos a estas regiones.

### **Digestión *in situ* con enzimas de restricción**

Los enzimas de restricción de tipo II reconocen secuencias de DNA relativamente cortas (4-6 pares de bases normalmente), y producen cortes en el DNA en lugares específicos. Debido a su estricta especificidad, los enzimas de restricción han sido ampliamente utilizados en biología molecular.

La primera aplicación de los enzimas de restricción en cromosomas metafásicos la llevó a cabo Lima de Faria y col. (1980). Desde entonces, el bandeo con enzimas de restricción ha sido ampliamente utilizado ya que son capaces de producir diferentes patrones de tinción, en regiones heterocromáticas. Entre los primates estudiados aplicando la técnica de digestión *in situ* con enzimas de restricción sobre cromosomas metafásicos, podemos encontrar: *Homo sapiens* (Babu y Verma 1988, 1990; Babu y col. 1988; Ludeña y col. 1991; De Cabo y col. 1991; Fernández-Piqueras y col. 1991; Tagarro y col. 1992; Luke y Verma 1995), chimpancé (Ferrucci y col. 1987; Luke y Verma 1995), gorila (Ferrucci y col. 1987), *Macaca* (DeStefano y Ferrucci 1986; Stuppia y col. 1991), *Cercopithecus aethiops* (Stuppia y col. 1991), *Alouatta caraya* (Mudry y col. 1994), *Callithrix* (DeStefano y Ferrucci 1986; Pieczarka y col. 1996, 2000) y *Aotus* (Pieczarka y col. 1998).

Los cromosomas metafásicos fijados sobre un portaobjetos pueden ser digeridos con un enzima de restricción, y teñidos a continuación con un colorante como el Giemsa o el Leishman. Las regiones cromosómicas que contienen DNA con un gran número de secuencias de reconocimiento para un enzima de restricción concreto, pueden sufrir cortes tras la digestión con ese enzima, generándose cortos fragmentos de DNA que pueden ser extraídos. La extracción de DNA da como resultado la pérdida de intensidad en la tinción con Giemsa o Leishman. Se ha estimado que si los fragmentos de DNA generados son mayores de 1000 pares de bases, éstos no pueden separarse del cromosoma mientras que fragmentos de un tamaño menor pueden ser extraídos (Miller y col. 1983). Bianchi y col. (1985) demostraron que los enzimas con una alta frecuencia de secuencias de reconocimiento, son capaces de generar fragmentos cortos de DNA y

producir, por tanto, una gran pérdida de DNA. La pérdida de DNA está directamente asociada con una disminución en la intensidad de tinción. Este dato sugiere que la extracción diferencial de DNA es la principal causa de las bandas inducidas por enzimas de restricción.

Está claro que la digestión de una región cromosómica con un enzima de restricción es la consecuencia directa de la presencia, en esa región, de secuencias diana del enzima. Sin embargo, en la ausencia de digestión cromosómica por parte de un enzima de restricción pueden estar implicados varios factores:

1) *La condensación diferencial de la heterocromatina* : el alto grado de condensación del DNA heterocromático podría ser un factor determinante para la accesibilidad del enzima a las secuencias diana. Existen algunos estudios sobre este particular. Babu y Verma (1986) observaron que las regiones heterocromáticas de los cromosomas humanos 1, 9, 16 e Y, que permanecen descondensadas tras el tratamiento con 5-Azacidina, presentan una digestión similar a las de los cromosomas sin tratar. Martínez y col. (1995), sin embargo, observaron diferencias en la digestión con los enzimas *NdeII* y *Sau3A*, de las regiones heterocromáticas de los cromosomas 1, 9, 15 y 16 descondensadas, respecto a las no descondensadas.

2) *El tamaño de la molécula del enzima* : se ha postulado que enzimas de restricción de gran tamaño podrían ser incapaces de penetrar en la estructura compacta de la heterocromatina, y por tanto, no podrían digerir el DNA heterocromático. Los isoesquizómeros son enzimas de restricción que tienen la misma secuencia diana, a pesar de tener estructura y origen diferente. Gosálvez y col. (1989) observaron diferencias en el patrón de digestión de cromosomas humanos y de ratón utilizando los isoesquizómeros *MboI/Sau3A* y *EcoRII/BstNI*. Estos autores sugieren que la estructura molecular del enzima de restricción así como la localización de su centro activo, podrían estar implicadas en la capacidad de digestión del enzima de restricción.

3) *La interacción DNA-proteínas*: las proteínas que forman parte de la estructura de la heterocromatina, podrían influir en la capacidad de digestión de los enzimas de restricción. El enzima *BstNI* no es capaz de digerir el DNA satélite, en cromosomas de ratón no fijados (Burkholder 1989). Este autor propone que la ausencia de digestión podría ser la consecuencia de la presencia de proteínas que pueden desaparecer durante la fijación cromosómica. Los estudios realizados por Peretti y col. (1990) en cromosomas no fijados van en el mismo sentido, ya que parece que la extracción de determinadas proteínas producida durante el proceso de fijación, es esencial para la digestión por parte de los enzimas de restricción.



Los enzimas de restricción más utilizados para estudiar la heterocromatina son aquellos que poseen secuencias de reconocimiento de 4 pares de bases. Se supone que estos enzimas generarán fragmentos de pequeño tamaño ya que es más probable que existan secuencias de 4 pares de bases que secuencias de 6 pares de bases.

### I.3. CARACTERÍSTICAS CITOGENÉTICAS DE LOS PRIMATES

El primer estudio cromosómico de un primate fue el publicado por Painter en 1922. Este autor describió el número diploide y la morfología de los cromosomas sexuales de un ejemplar del género *Cebus*.

En las décadas de los 50 y 60 aparecen numerosos trabajos que describen el cariotipo de diversas especies de primates, con el método clásico de tinción. Sin embargo, la **tinción uniforme** aporta información acerca del número de cromosomas, el tamaño relativo de los mismos, la posición del centrómero y la presencia de satélites (constricciones secundarias), pero apenas proporciona información sobre homologías cromosómicas.

A partir de 1970, aparecen las **técnicas de bandeo cromosómico** que permiten la diferenciación longitudinal de los cromosomas y la caracterización específica de cada par cromosómico (**bandas G, R y Q**), y determinar la localización y el tamaño de los bloques de heterocromatina constitutiva (**bandas C**). Los métodos de bandeo permiten definir y describir el cariotipo de una especie, no tan sólo por el número y la morfología de sus cromosomas, sino también por sus patrones de bandas. En general, algunos patrones de bandas son constantes para todos los miembros de una especie (bandas G, R, Q), mientras que otros pueden presentar variaciones intraespecíficas en forma de polimorfismos (C, NOR).

La aparición de las técnicas de bandeo cromosómico permitió comparar el cariotipo de diferentes especies (Turleau y col. 1972, Egozcue y col. 1973), y establecer las homologías cromosómicas que en general, son más numerosas cuanto más cercanas filogenéticamente son las especies comparadas. Una vez conocidas las homologías se pueden establecer las reorganizaciones cromosómicas que habrían tenido lugar durante el proceso evolutivo de las especies.

El siguiente paso fue realizar la técnica de obtención de **bandas C** de forma **secuencial** a la de obtención de **bandas G**. De esta forma se podía asignar un patrón de bandas C a un par cromosómico concreto.

Hasta finales de los 80 en el campo de la citogenética evolutiva sólo se habían aplicado las **técnicas citogenéticas de bandeo**: bandas R, G, C, NOR y la tinción fluorescente con fluorocromos (Quinacrina, DAPI, Cromomicina A3). A finales de los 80 y principalmente en la década de los 90, las publicaciones que aparecen sobre citogenética evolutiva empiezan a aplicar las **técnicas** que se denominaron **citogenético-moleculares**. La más ampliamente utilizada es la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), en concreto el pintado cromosómico (*Painting*) (Lichter y col. 1988; Pinkel y col. 1988; Collins y col. 1991). La aplicación de esta técnica en citogenética evolutiva pasa a denominarse genéricamente **ZOO-FISH**: hibridación *in situ* utilizando las sondas de cromosomas humanos sobre cromosomas metafásicos de otras especies. Hay que destacar que es necesario aplicar la técnica de obtención de **bandas G** de forma **secuencial** con la técnica de **ZOO-FISH**, para poder identificar cuáles son los cromosomas o segmentos cromosómicos que presentan señal de hibridación.

La aplicación de la técnica de ZOO-FISH y bandas G secuenciales ha permitido determinar, de forma más precisa, las homologías cromosómicas de la especie humana con otros primates: con Platyrrhini (*Cebus capucinus* Richard y col. 1996; *Alouatta Consigliere* y col. 1996, 1998; *Ateles geoffroyi* Morescalchi y col. 1997; *Callithrix jacchus* Sherlock y col. 1996), con Catarrhini (*Cercopithecus aethiops* Finelli y col. 1999; *Macaca fuscata* Wienberg y col. 1992; *Colobus guereza* Bigoni y col. 1997b; *Presbytis cristata* Bigoni y col. 1997a; *Hylobates* Jauch y col. 1992; Koehler y col. 1995). De esta forma se han podido confirmar o redefinir las homologías que habían sido previamente descritas, mediante la laboriosa comparación de los patrones de bandas G o R.

La aplicación de la técnica de ZOO-FISH ha supuesto un gran avance en los estudios de citogenética evolutiva. Sin embargo, esta técnica tiene limitaciones, ya que no es capaz de detectar si en los cromosomas o segmentos cromosómicos homólogos se han producido reorganizaciones intracromosómicas (inversiones o activación/inactivación centromérica). Es necesario realizar la posterior comparación del patrón de bandas G de esas regiones cromosómicas homólogas, para definir las homologías de bandas, y determinar las reorganizaciones cromosómicas que explicarían estas homologías. Prácticamente todas las publicaciones que existen en la literatura aplicando la técnica de ZOO-FISH para determinar homologías cromosómicas, no realizan la comparación posterior de los patrones de bandas.

A continuación se detallan las características citogenéticas de los grupos de primates Simiiformes: Platyrrhini y Catarrhini (figura 1.5).

<b>ORDEN Primates</b>	
<b>SUBORDEN Anthroipoidea (Simiiformes)</b>	
<b>INFRAORDEN Platyrrhini</b>	
Superfamilia Ceboidea	
Familia Cebidae	
Subfamilia Cebinae	Género <i>Cebus</i>
Subfamilia Atelinae	Género <i>Ateles</i>
	Género <i>Lagothrix</i>
	Género <i>Brachyteles</i>
Subfamilia Aotinae	Género <i>Aotus</i>
Subfamilia Saimirinae	Género <i>Saimiriri</i>
Subfamilia Callicebinae	Género <i>Callicebus</i>
Subfamilia Alouattinae	Género <i>Alouatta</i>
Subfamilia Pitheciinae	Género <i>Pithecia</i>
	Género <i>Chiropotes</i>
	Género <i>Cacajao</i>
Familia Callithrichidae	
Subfamilia Callithrichinae	Género <i>Callithrix</i>
	Género <i>Saguinus</i>
	Género <i>Leontopithecus</i>
	Género <i>Cebuella</i>
Subfamilia Callimiconinae	Género <i>Callimico</i>
<b>INFRAORDEN Catarrhini</b>	
Superfamilia Cercopithecoidea	
Familia Cercopithecidae	
Subfamilia Cercopithecinae	
Tribu Ceropithecini	Género <i>Cercopithecus</i>
	Género <i>Erythrocebus</i>
	Género <i>Miopithecus</i>
Tribu Papionini	Género <i>Papio</i>
	Género <i>Macaca</i>
	Género <i>Cercocebus</i>
Subfamilia Colobinae	Género <i>Colobus</i>
	Género <i>Presbytis</i>
	Género <i>Nasalis</i>
	Género <i>Rhinopithecus</i>
	Género <i>Simias</i>
	Género <i>Pygathrix</i>
Superfamilia Hominoidea	
Familia Hylobatidae	Género <i>Hylobates</i>
	Género <i>Symphalangus</i>
Familia Hominidae	
Subfamilia Ponginae	Género <i>Pongo</i>
	Género <i>Gorilla</i>
	Género <i>Pan</i>
Subfamilia Homininae	Género <i>Homo</i>

**Figura 1.5.** Clasificación de los Primates Simiiformes (adaptada de la clasificación propuesta por Napier y Napier 1985, y de la de Ponsà y Caballín 1981).

### I.3.1. INFRAORDEN PLATYRRHINI

Los estudios cromosómicos en el grupo de los Platyrrhini son de especial interés ya que los primates de este grupo presentan además de una gran diferencia en su número diploide (de  $2n=20$  a  $2n=62$ ), una gran variabilidad cariotípica no sólo interespecífica sino también intraespecífica. Esta variabilidad se ha observado en *Saimiri sciureus*, *Alouatta seniculus*, *Ateles geoffroyi*, *Aotus trivirgatus* y *Aotus seniculus* (de Boer 1971; Brumback y col. 1971; Jones y col. 1973; Garcia y col. 1975, 1978, 1979; Ma y Jones 1975; Ma y col. 1976; Yunis y col. 1976; Reumer y de Boer 1980; Freitas y Seuánez 1982; Mudry y col. 1985, 1987; Seuánez y col. 1986; Ponsà y col. 1995).

En las especies de la familia Cebidae se han detectado inversiones pericéntricas y paracéntricas que se pueden presentar tanto en heterocigosis como en homocigosis. Algunas de estas reorganizaciones pueden relacionarse con la localización geográfica de los ejemplares que las presentan (en *Ateles* Medeiros y col. 1997), aunque en la mayoría de los casos no se puede establecer esta relación (en *Saimiri sciureus* Garcia y col. 1979; Miró 1981 y en *Cebus apella* Torres de Caballero y col. 1976; Garcia y col. 1978; Ponsà y col. 1995).

El género *Cebus* es uno de los géneros de la familia Cebidae más estudiados con diversos tipos de bandeo cromosómico (Torres de Caballero y col. 1976; Garcia y col. 1978, 1983; Cambefort y Moro 1978; Dutrillaux 1979; Dutrillaux y Rumpler 1980; Dutrillaux y Couturier 1981; Freitas y Seuánez 1982; Mudry y col. 1985; Matayoshi y col. 1986, 1987; Clemente y col. 1987; Ponsà y col. 1995). Se considera que el género *Cebus* posee un cariotipo muy primitivo, que sólo se diferenciaría del cariotipo ancestral de los platirrininos mediante algunas inversiones y translocaciones (Dutrillaux y col. 1979, 1981; Clemente y col. 1990). Una peculiaridad de este género es la presencia de grandes bloques de heterocromatina, básicamente de localización intersticial y terminal. El tamaño y la localización de estos bloques de heterocromatina presentan gran variabilidad intraespecífica e intraindividual (Garcia y col. 1983; Mudry y col. 1985; Clemente y col. 1987; Matayoshi y col. 1987; Ponsà y col. 1995).

Richard y col. (1996) han aplicado la técnica de ZOO-FISH en metafases de *Cebus capucinus*. Los resultados han redefinido o confirmado (en la mayoría de los casos) las homologías cromosómicas de la especie humana con *Cebus capucinus* que habían sido previamente descritas mediante la comparación de los patrones de bandas de ambas especies.

El género *Ateles* está relacionado con los géneros *Brachyteles* y *Lagothrix* incluidos en la subfamilia Atelinae. El cariotipo de *Ateles* es muy diferente al del resto de los Platyrrhini, incluyendo las especies de los dos géneros con los que forma la subfamilia Atelinae. Dutrillaux y col. (1986) proponen que *Ateles* y *Lagothrix* comparten el mismo tronco evolutivo antes de su divergencia, lo que lleva a concluir que ambos géneros poseen reorganizaciones cromosómicas comunes. El número diploide del género *Ateles* es de  $2n=34$  en todas las especies excepto en *A. paniscus* que es de  $2n=32$  (Egozcue y col. 1969; Garcia y col. 1975; Pieczarka y col. 1989; Medeiros y col. 1997). La aplicación de la técnica de ZOO-FISH en *Ateles geoffroyi* (Morescalchi y col. 1997) ha permitido establecer las homologías cromosómicas entre la especie humana y este platirrino. Este trabajo ha confirmado el alto grado de reorganización del cariotipo de *Ateles*.

El género *Aotus* es el único género perteneciente a la subfamilia Aotinae. Los estudios citogenéticos han demostrado que este género posee 12 cariotipos diferentes, con un número diploide que va de  $2n=46$  a  $2n=56$  (Ma 1981; Torres y col. 1998). En *A. azarae* y en *A. nigriceps* se ha observado la translocación del cromosoma Y en un autosoma (Ma 1981), lo que hace que tengan un peculiar sistema de transmisión del sexo.

Las inversiones, fundamentalmente pericéntricas, son las reorganizaciones que se observan con mayor frecuencia al comparar el cariotipo de diversas especies de Cebidae. Sin embargo, también se han observado frecuentemente otros tipos de cambios cromosómicos como las variaciones en la cantidad y la localización de heterocromatina constitutiva y la activación/inactivación centromérica (Dutrillaux y Couturier 1981; Miró 1981; Garcia y col. 1983; Clemente y col. 1987; Mudry y col. 1994; Ponsà y col. 1995).

Stanyon (1999) propone el cariotipo ancestral para los Platyrrhini, basándose en los resultados proporcionados por la técnica de ZOO-FISH. Este cariotipo tendría un número diploide de  $2n=56$ , y en función de sus homologías con los cromosomas humanos, este autor describe el cariotipo ancestral de los Platyrrhini como sigue: 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 3a, 3b, 3/21, 4, 5, 6, 7, 8a, 8b/18, 9, 10a, 10b/16, 11, 12, 13, 14/15b, 15a, 16a, 17, 19, 20, 22, X, Y.

### **I.3.2. INFRAORDEN CATARRHINI**

En este apartado se ha incluido únicamente la información citogenética de los grupos a los que pertenecen las especies analizadas en este trabajo.

### **Familia Cercopithecidae: Tribu Papionini**

Los géneros pertenecientes a esta tribu se caracterizan por poseer una gran homogeneidad en su cariotipo. Todos ellos poseen el mismo número diploide ( $2n= 42$ ). Además, la comparación del patrón de bandas de los cariotipos de las especies de estas tribus ha revelado que son prácticamente idénticos (Dutrillaux y col. 1979; Clemente y col. 1990). Este dato podría explicar la existencia, en cautividad, de híbridos fértiles en este grupo.

El género *Macaca* se distribuye en el continente asiático y el género *Papio* en el continente africano. La hipótesis que se maneja para explicar el proceso de especiación en este grupo es que éste se habría producido por mutaciones génicas, ya que no se observan prácticamente reorganizaciones cromosómicas. En este grupo, la presencia de barreras geográficas habría sido la causa del aislamiento reproductivo de las poblaciones, y no los cambios cromosómicos.

La socioecología y el tamaño de la población de las especies, pueden determinar la tasa de evolución cromosómica en las mismas (Wilson y col. 1975; Marks 1983). Algunas especies de la tribu Papionini viven en grandes grupos sociales de más de 100 individuos y son polígamas. Por tanto, el flujo génico entre estos individuos es bastante fluido (Brown y col. 1986). Según el modelo del Tamaño de la Población (Lande 1979, 1984) descrito en el apartado I.2.1., cuanto mayor sea el tamaño de una población, menor será la probabilidad de que se fije una reorganización cromosómica. Este modelo parece que se adapta bastante bien a las características socioecológicas y citogenéticas de este grupo.

Dutrillaux y col. (1982) y Ponsà y col. (1986) han realizado un estudio filogenético de los Cercopithecidae, y consideran que el cariotipo actual de la tribu Papionini es muy similar al del cariotipo ancestral de todos los Cercopithecidae.

Se han realizado estudios comparativos del cariotipo de las especies de esta tribu con el de la especie humana, mediante la comparación de los patrones de bandas G o R (Dutrillaux, 1979; Dutrillaux y col. 1979; Ponsà y col. 1986; Clemente y col. 1990). Wienberg y col. (1992) aplicando la técnica de ZOO-FISH con sondas de cromosomas humanos, han confirmado las homologías que habían sido previamente establecidas comparando los patrones de bandas.

### **Familia Ceropithecidae: Tribu Cercopithecini**

En esta tribu existen 24 especies agrupadas en 3 géneros diferentes: *Cercopithecus*, *Erythrocebus*, y *Miopithecus*. Las características cariotípicas en este caso son más complejas que en la tribu Papionini. En las diferentes especies de esta tribu se observa una gran variabilidad en el número diploide (desde  $2n=58$  en *Cercopithecus nigroviridis* y  $2n=54$  en *Erythrocebus patas*, hasta  $2n=72$  en *Cercopithecus pogonias*).

La comparación de los patrones de bandas de las diferentes especies indica la presencia de reorganizaciones cromosómicas, aunque también se observa la existencia de un alto grado de homología entre ellas (Dutrillaux y col. 1980, 1982; Ponsà 1980; Ponsà y col. 1980, 1981, 1986; Sineo y col. 1986). Las especies de esta tribu presentan hábitats muy próximos, en algunos casos coincidentes, y forman grupos sociales mixtos. El aislamiento reproductivo observado en estas especies podría ser debido a la existencia de reorganizaciones cromosómicas que diferencian sus cariotipos (Ponsà 1980).

Las reorganizaciones cromosómicas más frecuentemente observadas al comparar las especies de esta tribu son, según los diferentes autores: fisiones e inversiones pericéntricas (Dutrillaux y col. 1980), fusiones/fisiones y translocaciones de tipo centrómero/telómero (Ponsà y col. 1986). Clemente y col. 1990 detectan además cambios de heterocromatina yuxtacentromérica y desplazamientos de la localización del centrómero activo.

Los estudios comparativos de las especies de la tribu Cercopithecini con la especie humana mediante la comparación de los patrones de bandas (Dutrillaux y col. 1979; Ponsà 1980; Ponsà y col. 1986) han permitido establecer las homologías con los cromosomas humanos. Hasta el momento sólo hay un estudio que aplique la técnica de ZOO-FISH con sondas humanas en una especie de esta tribu: *Cercopithecus aethiops* (CAE) (Finelli y col. 1999). Con la aplicación de esta técnica citogenético-molecular se han podido confirmar o redefinir las homologías cromosómicas entre la especie humana y CAE que habían sido previamente descritas comparando los patrones de bandas de ambas especies.

### **Familia Hylobatidae**

Los hilobates están clasificados junto con el hombre y los grandes monos en la misma suprafamilia (Hominoidea). Sin embargo, el origen, la filogenia y las homologías de sus cromosomas son poco conocidas (Wienberg y col. 1990; Jauch y col. 1992; Ried y col. 1993). En las diferentes especies de este grupo hay una gran variabilidad en el número



diploide ( $2n=38,44,50$  y  $52$ ), y las homologías entre las diferentes especies son muy difíciles de definir mediante la comparación de los patrones de bandas cromosómicas.

Las especies de esta familia han sido sistemáticamente excluidas de las filogenias cromosómicas de los primates ya que las homologías cromosómicas han sido difíciles o imposibles de establecer (Stanyon y Chiarelli 1983; Van Tuinen y Ledbetter 1983). La aplicación de la técnica citogenético-molecular de ZOO-FISH (Lichter y col. 1988; Pinkel y col. 1988; Collins y col. 1991), ha permitido establecer las homologías cromosómicas entre la especie humana y algunas de las especies del género *Hylobates* (Wienberg y col. 1990, 1992; Jauch y col. 1992; Stanyon y col. 1992; Koehler y col. 1995). Esta comparación ha permitido establecer que el cariotipo de estas especies ha sufrido un gran número de reorganizaciones inter e intracromosómicas (33 translocaciones en *H. syndactylus* según Koehler y col. 1995, desde la separación con el tronco común con la especie humana).

La razón por la que los *Hylobates* tienen un cariotipo tan reorganizado no está clara. No se conoce si los *Hylobates* tienen una alta tasa de mutación cromosómica o si simplemente las reorganizaciones cromosómicas que se producen son fijadas más fácilmente en este grupo que en otros, o ambas posibilidades. El modelo del Tamaño de la Población indica que cuanto más pequeña sea una población, mayores son las probabilidades de que una reorganización cromosómica se fije. Contrariamente a lo que se proponía para las especies de la tribu Papionini, la estructura social de los *Hylobates*, monogamia y una alta territorialidad, pueden haber contribuido a la fijación de las reorganizaciones cromosómicas (Jauch y col. 1992, Koehler y col. 1995).

### **Familia Hominidae**

La comparación del patrón de bandas de los cromosomas del hombre, chimpancé, gorila y orangután reveló una gran similitud en los cromosomas de estas especies (Turleau y col. 1972; Egozcue y col. 1973; Caballín 1981; Yunish y Prakash 1982).

Los cariotipos de estas especies difieren en pocas reorganizaciones. Se ha determinado que la inversión pericéntrica es la reorganización más frecuente en este grupo, seguida de variaciones en la heterocromatina constitutiva y una fusión telomérica con la inactivación centromérica correspondiente (Turleau y col. 1972; Egozcue y col. 1973; Caballín 1981; Yunish y Prakash 1982).

Stanyon (1999) propone el cariotipo ancestral de los Catarrhini, basándose en los resultados proporcionados por la técnica de ZOO-FISH. Este cariotipo tendría un número diploide de  $2n=46$ , y en función de sus homologías con los cromosomas humanos,

este autor describe el cariotipo ancestral de los Catarrhini de la siguiente manera: 1, 2a, 2b, 3-13, 14/15, 16-22, X, Y.

Es interesante remarcar la importancia de incluir la **activación/inactivación centromérica** como un tipo de reorganización. La activación centromérica es un importante mecanismo en la evolución cariotípica, y ha sido ocasionalmente observado en algunas reorganizaciones cromosómicas humanas (Sacchi y col. 1996). En los primates, la primera evidencia de la posible existencia de un centrómero intersticial inactivo la proporcionó la comparación de los cromosomas del hombre y del chimpancé. El centrómero del cromosoma 2 humano (HSA), originado por la fusión telomérica de dos cromosomas del chimpancé (PTR), correspondería al centrómero de PTR 2p, mientras que el centrómero de PTR 2q permanecería como un centrómero inactivo en la banda 2q21 de HSA (Lejeune y col. 1973; Yunish y Prakash 1982). Los cromosomas inactivos o latentes no pueden ser detectados mediante la técnica de obtención de bandas C. Baldini y col. (1993) han demostrado, mediante hibridación *in situ*, la presencia de DNA alfoide en la región 2q21 de HSA, que podría ser los restos del centrómero ancestral presente en PTR 2q que se inactivó tras la fusión.

Otro caso de posible fenómeno de activación/inactivación centromérica lo encontramos en el trabajo publicado por Tihy y col. (1996). Estos autores realizaron experimentos de hibridación *in situ* con la sonda del gen del retinoblastoma (RB1) localizado en la banda 13q14 en la especie humana, en algunas especies de primates. El resultado ha permitido establecer la posición de la banda 13q14 humana en las especies de primates estudiadas, y determinar que la reorganización cromosómica que separa al cromosoma 13 humano de su homólogo en los Cercopithecidae, no es una inversión pericéntrica, como se sugirió en trabajos previos. La reorganización sugerida por estos autores es una activación/inactivación centromérica.

La activación/inactivación centromérica ha sido también propuesta como una reorganización frecuente en la evolución de los Cercopithecidae (Dutrillaux y col. 1982), de los Prosimios (Rumpler y col. 1983) y de los Platyrrhini (Viegas-Pequignot y col. 1985; Clemente y col. 1987).

La existencia de centrómeros latentes ha sido propuesta por varios autores (Dutrillaux 1975, 1979; Holmquist y Dancis 1980; Clemente y col. 1987). Holmquist y Dancis (1980) han demostrado que algunas reorganizaciones cromosómicas implican la activación de un centrómero latente y la inactivación del centrómero original. Ya que el desplazamiento de un centrómero en heterocigosis puede originar problemas en la segregación meiótica, podemos considerar este fenómeno como un tipo de

reorganización que como en el caso de inversiones, translocaciones, etc, puede haber tenido un papel importante en la evolución cromosómica.

## I.4. LUGARES FRÁGILES

Los lugares frágiles (LF) se presentan como *gaps* o discontinuidades en la estructura de los cromosomas, y se manifiestan *in vitro* bajo condiciones específicas de cultivo. En una metafase, no es posible distinguir entre un lugar frágil y una rotura cromosómica producida al azar. Sólo la recurrencia estadísticamente significativa de una lesión en la misma banda cromosómica, y bajo las mismas condiciones de cultivo, define la existencia de un lugar frágil. La expresión citogenética de un lugar frágil es la manifestación de la inestabilidad genómica generada por las secuencias de DNA en el lugar frágil.

Los lugares frágiles se clasifican en función de su frecuencia en la población y de los agentes que inducen su expresión (Sutherland y col. 1999) (tabla 1.2). Los LF comunes (LF-c) parecen ser parte de la estructura cromosómica normal, y están presentes probablemente en las mismas bandas, en todos los individuos. Sin embargo, la frecuencia de expresión de un LF-c puede presentar variaciones en diferentes individuos e incluso entre diferentes tipos celulares. Los LF raros (LF-r) varían en frecuencia (mucho más que los LF-c), y no están presentes en todos los individuos de una misma especie o población.

**Tabla 1.2.** Clasificación de los Lugares Frágiles en la especie humana (según Sutherland y Richards 1999).

Clase	Agente inductor	Reconocidos
<b>Raros:</b>		
1. Sensibles a folato	- Bajas concentraciones de folato , FudR, MTX, y altas concentraciones de timidina	23
2. Inducibles por Distamicina A	- a)Distamicina A y BrdU	2
	- b)Antibióticos que se unen al surco menor del DNA	3
3. Inducibles por BrdU	- BrdU o BrdC	2
<b>Comunes:</b>		
4. Inducibles por Afidilcolina	- Afidilcolina	76
5. Inducibles por 5-Azacididina	- 5-Azacididina	4
6. Inducibles por BrdU	- BrdU	6
7. Inducible por Adenovirus 12	- Adenovirus 12	4

La existencia de LF parece ser una característica universal en el genoma de los mamíferos. Se han observado LF en el genoma de primates (Yunis y Soreng 1984;

Schmid y col. 1985; Smeets y van de Klundert 1990; Mudry y col. 1995; Fundia y Mudry 1987; Fundia y col. 1991) así como en otros mamíferos como *Peromiscus*, (Dominguez y col. 1995).

Se ha postulado el posible papel de los lugares frágiles en el proceso oncogénico, ya que se ha observado una asociación entre lugares frágiles comunes y cáncer (Yunis y Soreng 1984; Miró y col. 1987; Clemente y col. 1990). También se ha postulado el posible papel de los LF en la evolución cromosómica de los primates (Miró y col. 1987). Con los resultados obtenidos en este trabajo, se pretende comprobar esta última hipótesis (capítulo de Objetivos).

## **I.5. SENSIBILIDAD CROMOSÓMICA AL EFECTO DE LAS RADIACIONES IONIZANTES**

Las radiaciones ionizantes generan iones y radicales libres que producen lesiones celulares. De entre todas las moléculas que pueden quedar afectadas por el efecto de las radiaciones ionizantes, la del DNA es la más importante, debido a las consecuencias que de ello se pueden derivar.

Las roturas en la doble hebra de DNA son las lesiones dominantes en la formación de alteraciones cromosómicas debidas a las radiaciones ionizantes (Phillips y Morgan 1993; Savage 1993). Hay que tener en cuenta que la mayoría de las alteraciones sencillas son reparadas por los enzimas celulares, de forma que la alteración final depende de la eficacia del proceso de reparación y de la naturaleza de la lesión inicial. Las alteraciones cromosómicas constituyen uno de los efectos de las radiaciones ionizantes más estudiados.

En la literatura hay diversos trabajos que estudian los efectos de las radiaciones ionizantes en primates, tanto *in vivo* (en la especie humana: Dutrillaux y col. 1983; Tanaka y col. 1983; Barrios y col. 1989; Martin y col 1989; Ohtaki 1992; en *Macaca fascicularis*: Guedeney y col. 1989) como *in vitro* (en la especie humana: Cooke y col. 1975; Bauchinger y Götz 1979; Caballín 1981; Dutrillaux y col. 1981, 1983; Kano y Little 1986; en chimpancé: Caballín 1981; Paravatov-Petsota y col. 1985; en gorila: Caballín 1981; en *Macaca fascicularis*: Muleris y col. 1984 y Borrell y col. 1998b; en *Erythrocebus patas*: Borrell y col. 1998b; en *Cebus apella*: Borrell y col. 1998a). Los trabajos de Barrios y col. (1989) y Borrell y col. (1998a y b) definen las bandas cromosómicas de los cariotipos de la especie humana y *Macaca fascicularis*, *Erythrocebus patas* y *Cebus apella* respectivamente, que son sensibles al efecto de las radiaciones ionizantes.

Para que se origine una reorganización cromosómica es necesario que se produzca una o más roturas cromosómicas (a excepción de las activaciones/inactivaciones centroméricas). Uno de los objetivos de este trabajo es estudiar si existe algún tipo de relación entre las bandas implicadas en reorganizaciones cromosómicas evolutivas y las bandas sensibles al efecto de las radiaciones ionizantes. Si las bandas estuviesen relacionadas en ambos casos, se podría pensar que las roturas implicadas en las reorganizaciones cromosómicas evolutivas no son al azar sino que se producen en regiones cromosómicas que son también sensibles al efecto de las radiaciones ionizantes.

## I.6. SECUENCIAS TELOMÉRICAS INTERSTICIALES

Los telómeros son regiones cromosómicas que contienen secuencias de DNA, requeridas para que la replicación se produzca de forma correcta, y para estabilizar los extremos cromosómicos. Los datos publicados por varios autores han demostrado que la secuencia (TTAGGG) repetida "n" veces, constituye el telómero funcional de los vertebrados (Moyzis y col. 1988; Meyne y col. 1989; Riethman y col. 1989).

En la última década se han publicado numerosos trabajos en los que se ha observado la presencia de la secuencia telomérica en otras regiones cromosómicas, y se han denominado genéricamente secuencias teloméricas intersticiales (STI). Se han observado STI en diferentes especies de vertebrados (Meyne y col. 1990), en anfibios (Wiley y col. 1992), en reptiles (Smidt y col. 1994), en primates no humanos (Garagna y col. 1997 y Go y col. 2000) y en la especie humana (Azzalin y col. 1997).

Se ha sugerido que las STI pueden estar asociados con fenómenos de inestabilidad genómica, ya que pueden ser lugares que presentan fragilidad cromosómica (Hastie y Allshire 1989). Boutouil y col. (1996) describen un nuevo lugar frágil en un cromosoma formado a partir de una translocación *de novo* (Y;13) en un paciente de 13 años de edad. El nuevo lugar frágil coincide con la localización de una secuencia telomérica intersticial en el mismo punto, que es el punto de la fusión de los cromosomas 13 e Y. Esta coincidencia hace sugerir a los autores que la presencia de una STI, puede promover la formación de un nuevo lugar frágil.

Otros estudios que relacionan a las STI con roturas cromosómicas son los trabajos publicados por Alvarez y col. (1993), Bertoni y col. (1994) y Slijepcevic y col. (1996). En estos trabajos se observa que las STI de líneas celulares de hamster chino son regiones propensas a romperse tanto de forma espontánea como inducida.

De cualquier forma lo que sí parece claro es que, tengan o no las STI una mayor tendencia a la fragilidad, una rotura en una secuencia telomérica intersticial seguida de una reorganización cromosómica, podría proporcionar estabilidad a la nueva forma cromosómica. La STI situada en posición terminal en la nueva forma cromosómica podría proporcionar el molde para la actuación de la telomerasa, generándose así, un telómero funcional. Esta estabilidad en la nueva forma cromosómica contribuirá a la fijación de la reorganización, y por tanto, ésta podría llegar a desencadenar un proceso de especiación.

Hasta ahora, se desconoce el origen de las secuencias teloméricas intersticiales (STI), y se han postulado dos hipótesis, que no tienen porqué ser mutuamente excluyentes, para intentar explicar su existencia (Meyne y col. 1990):

- a) las STI se habrían originado mediante la amplificación de la secuencia (TTAGGG)<sub>n</sub> presente en regiones no teloméricas en los cariotipos ancestrales. Estas STI podrían funcionar como telómeros funcionales después de una reorganización, estabilizándola
- b) las STI se habrían originado mediante la fusión telomérica de cromosomas ancestrales. En este caso la presencia de una STI podría ser una cicatriz de esa fusión

La presencia de la secuencia telomérica en la banda 2q13 humana, indica que esa STI podría ser una cicatriz de la fusión telomérica que originó el cromosoma 2 humano (Ijdo y col. 1991). Azzalin y col. (1997) han descrito un gran número de secuencias teloméricas intersticiales en los cromosomas de la especie humana. Uno de los objetivos de este trabajo es relacionar la presencia de STI en el cariotipo humano, con cicatrices de reorganizaciones cromosómicas evolutivas.