

Primates sin frontera: una visión desde la citogenética evolutiva

Dra. Marta Dolores Mudry, Dra. Mariela Nieves *

GIBE - FCEyN - UBA - CONICET

Cdad. Univ., Pab.II, Lab.46, 4to. Piso. (1428). Bs. A. Argentina

*Ambos autores participaron de manera equitativa en la preparación y ejecución del manuscrito

martamudry@yahoo.com.ar

mnieves@ege.fcen.uba.ar

ABSTRACT

The study of genetic variability, social organization and biogeography allows new interpretations of the speciation process. In Primates, in the decade of 80' the first cytogenetic studies conducted in Argentina, applied classical banding techniques (G, C, NOR). *Cebus sp.*, *Saimiri boliviensis*, *Aotus azarae* and *Callithrix jacchus* (Cebidae); *Ateles sp.*, *Alouatta sp.* (Atelidae), were characterized due to their high occurrence in Zoos and breeding centre. Chromosomal number together with G and C-banding patterns were established analyzing specimens in captivity as well as wild population ones confirming the species status. Our understanding of the complex Superfamily Ceboidea taxonomy has been enlightened by a multidisciplinary approach, including the analysis of chromosomal rearrangements involving heterochromatin, telomeric interstitial sequences and the potential pattern of human genomic conservation (G-C/FISH/CGH). The male meiotic characterization applying classical techniques and synaptonemal complex protein immunofluorescence collaborates defines the taxonomic diagnosis. Karyotypic characterization contributes to the better understanding of the genomic flexibility in these species. Chromosomal speciation are milestones for future conservation proposals related to this fauna in order to improve and to continue collaborative projects with breeding centres, zoos and museums, areas where the traditional morphological systematic found in genetics an irreplaceable tool. Multidisciplinary works allows the connection between wildlife data analysis and captive colonies programs to contribute of useful management, forming human resources and performing, for the first time, a new form of imaging registration and a data base considering the different karyosystematic and taxonomic parameters applied in Primates.

Keywords: Primates, Ceboidea, Evolutive Cytogenetics, Chromosomal evolution

RESUMEN

Estudiar las características de variabilidad genética, organización social y biogeografía, permite nuevas interpretaciones del proceso especiogénico. En Primates en particular, en los 80, se desarrollan los primeros estudios citogenéticos en Argentina, empleando tinción estándar, bandas G, C y NOR, citogenética en vigencia en aquella época. Se caracterizan *Cebus sp.*, *Saimiri boliviensis*, *Aotus azarae* y *Callithrix jacchus* (Cebidae); *Ateles sp.*, *Alouatta sp.* (Atelidae) por ser las especies más frecuentes en zoológicos y bioterios. Al igual que en ejemplares de especies de nuestra fauna analizados por muestreo en vida silvestre, se estableció 2N y patrones de bandas G y C en cada especie. El análisis de reordenamientos cromosómicos comprometiendo heterocromatina, localización de telómeros latentes y el posible patrón de conservación genómica (G-C/FISH/CGH) estudiado en poblaciones silvestres de Argentina y países limítrofes, contribuye a esclarecer la compleja taxonomía de los ceboideos (Primates, Platyrrhini). La caracterización meiótica masculina con técnicas tradicionales y con inmunofluorescencia de proteínas del complejo sinaptonémico colabora y define la diagnosis taxonómica. La caracterización cariotípica contribuye al mejor conocimiento de la flexibilidad genómica en estas especies. A la vez, permite continuar proyectos conjuntos con centros de cría, jardines zoológicos y museos, ámbitos donde la corroboración sistemática tradicionalmente morfológica, encontró en la genética, una herramienta insustituible. Los trabajos transdisciplinarios relacionan los hallazgos de vida silvestre, aplicándolos a la mejora del manejo en cautiverio, formando recursos humanos y realizando, por primera vez, una nueva forma de registro de imágenes y de banco de datos sobre variables de uso en cariosistemática y taxonomía de Primates.

Palabras claves: Primates, Ceboidea, Citogenética evolutiva, Evolución cromosómica

PRIMATES NEOTROPICALES EN LA FAUNA AUTÓCTONA ARGENTINA

Los ambientes subtropicales son áreas marginales que albergan numerosas especies de plantas y animales que encuentran en estas regiones sus límites meridionales de distribución. Cuando consideramos a los primates de los neotrópicos, la pérdida de selva tropical por actividades agrícolas, ganaderas, madereras e hidroeléctricas, constituyen la mayor amenaza para su supervivencia. La caza para consumo o venta y la captura de animales vivos para su comercio como mascotas y para fines biomédicos, también representa una amenaza para ciertas especies. Veintiocho de las 76 especies de Primates Neotropicales (PNM) se consideran en peligro de extinción (Rowe, 1996; Ryland, *et al.*, 2000)

En Argentina habitan cinco especies de PNM: *Alouatta caraya*, *Alouatta guariba*, *Cebus libidinosus*, *Cebus nigrinus* y *Aotus azarae*. Las más ampliamente estudiadas desde diferentes puntos de vista biológicos y de protección son *A. caraya*, *C. libidinosus* y *C. nigrinus* (Díaz, *et al.*, 2000). Según el “Libro Rojo” de especies de mamíferos y aves amenazados de la Argentina *Alouatta guariba* se considera “Amenazado–En Peligro” y *Aotus azarae*, “Amenazado–Vulnerable”, mientras que *Alouatta caraya* y *Cebus* son considerados de “Riesgo Bajo–Potencialmente Vulnerables”. *A. caraya* es un importante reservorio natural de Fiebre Amarilla Selvática, Dengue, hemoparásitos y parásitos intestinales. Tanto aulladores como otros primates suelen presentar varias virosis y parásitos intestinales en forma conjunta (Lombardo, 1980; Travis, 1985; Milozzi, *et al.*, 2010). Por tales características, en nuestro país constituiría un modelo de estudio en la prevención y control de enfermedades infecto-contagiosas de impacto considerable en la población rural y urbana, próximas a las grandes áreas selváticas. Otra de las especies de mayor abundancia, *C. libidinosus*, es ampliamente utilizada en biomedicina, en estudios de hemodinamia y diseño de prótesis cardíacas así como en estudios de ciclo reproductivo femenino y en actividades de asistencia a pacientes neurológicos avanzados dada su demostrada habilidad para el manejo de herramientas (Mudry de Pargament, 1989; Nagle, *et al.*, 1989; Nagle, *et al.*, 1994; Visalberghi, *et al.*, 1990)

En los zoológicos y centros de cría es frecuente encontrar especímenes de intercambio interinsti-

tucional, decomisos o donaciones que, en general, tienen origen geográfico desconocido. Los análisis taxonómicos constituyen herramientas fundamentales para la Biología de la Conservación. La diversidad genética intraespecífica está íntimamente relacionada con la reproducción. La caracterización cariotípica de ejemplares en cautiverio evita problemas de reducción de fertilidad en híbridos. En este contexto, si bien los caracteres mitóticos tienen valor diagnóstico mediante el 2N y la fórmula cromosómica, sólo los parámetros meióticos permiten confirmar la cariología e identificar inequívocamente el sistema de determinación sexual. La caracterización mitótica y meiótica se hacen imprescindibles en los planes de manejo y proyectos de conservación con distintas especies animales.

EL PROCESO ESPECIOGÉNICO EN PNM Y LA EVOLUCIÓN CROMOSÓMICA

Otro alcance, no menor de los estudios mitóticos-meióticos en los PNM es la notable contribución a la comprensión del proceso especiogénico. Los estudios cariológicos evidencian que en Primates, diferentes estrategias cromosómicas que hemos podido verificar, caracterizan a distintas especies aún dentro de un mismo género y familia.

En numerosas especies de Primates hay ausencia de caracterización de las células germinales y falta elucidar los procesos que conducen a la aparición y fijación de los sistemas de determinación sexual, tanto del sistema XX/XY, conocido como *human like*, como de sistemas sexuales múltiples diversos. La corroboración mitótico-meiótica de trivalentes, cuadrivalentes y posibles pentavalentes mantiene activa la investigación de la evolución cromosómica en estos primates ya que es en ellos donde es frecuente encontrar patrones complejos de determinación sexual. Varias de estas formas se estudiaron y describieron por primera vez en laboratorios de nuestro país. Hasta el presente se desconoce la forma ancestral que ha dado origen a los patrones de determinación sexual y como operaron los reordenamientos cromosómicos para ser lo suficientemente ventajosos, establecerse y mantenerse hoy observables en las especies en estado silvestre. La integración de las diferentes metodologías que progresivamente se incorporaron al laboratorio citogenético a fin de comprender la llamada flexibilidad

genómica es muy reciente. El análisis realizado a través del cariotipo como elemento de interpretación de la modulación del genoma observable a nivel nuclear, sea en células somáticas como germinales, caracterizando reorganizaciones cromosómicas, incorpora *a posteriori* el análisis de polimorfismos enzimáticos y de ADN mitocondrial. Los Primates se constituyen en un modelo de estudio exitoso al permitir indagar sobre la posible relación entre flexibilidad genómica y la hipótesis de especiación cromosómica que sostiene *un cariotipo –una especie*. Esto es posible dadas las estrategias diferenciales observables en las especies hoy vivas y ampliamente distribuidas en las regiones neotropicales propias de Argentina y de países vecinos. Brasil, Paraguay, Bolivia, en la distribución marginal sur, y Perú, Venezuela, Colombia o incluso México, donde estos dos últimos, constituyen el extremo norte de la distribución geográfica de los PNM.

CITOGÉNÉTICA Y PRIMATES. LOS ESTUDIOS INICIALES EN NUESTRO PAÍS

En el mundo de la genética el primer trabajo citológico en primates platirrininos data del comienzo de la pasada centuria ya que Painter (1922; 1924) publica el número cromosómico de especies de *Cebus* en sus trabajos sobre sistemas de determinación sexual en mamíferos. Con el avance de las técnicas de cultivo *in vitro* de células somáticas, comienza a aparecer una serie de descripciones cariotípicas de los ejemplares, no siempre de carácter taxonómico, siendo estudios fragmentarios y con animales de desconocida procedencia (De Boer, L. E. M., 1974)

Si revisamos la historia de la disciplina en nuestro país, los primeros trabajos relacionando genética y primates caracterizaron la línea celular VERO obtenida a partir de mono verde africano es decir un PVM (*Chlorocebus aethiops*), en la década del 70. Investigando las particularidades de la heterocromatina (Bianchi y Ayres, 1971) y aplicando las técnicas citológicas disponibles en ese momento, bandas C y G (Brieux de Salum, *et al.*, 1978) se demostró la presencia de heterocromatina centromérica y extracentromérica, describiendo cromosomas marcadores en distintos pasajes celulares. La variabilidad cariológica de las líneas celulares ampliamente discutida en la literatura, llega a sostener en esos tiempos que la variabilidad podría ser infinita (Hughes,

1978) La transformación de las líneas celulares *in vitro* se observaba, en general, junto a cambios en el complemento cromosómico. La cantidad y distribución de la heterocromatina eran evidencias de la ocurrencia de algunos de estos cambios (Zakharov, *et al.*, 1966; Moore y Randley, 1968). Sin embargo, la proliferación normal de los fibroblastos humanos se sabía que, *in vitro*, era limitada ya que se hacía referencia a un número máximo de pasajes conocido como el límite Hayflick (Hayflick y Moorhead, 1961; Hayflick, 1965). Las células cancerosas no cumplían con estas particularidades y crecían indefinidamente. Hayflick identificó en cada nueva división celular, un acortamiento progresivo de los telómeros. Su estudio tomó un protagonismo especial en el análisis del envejecimiento celular y del cáncer.

Si bien la citogenética veterinaria tuvo un rápido crecimiento, sus trabajos se centraron fundamentalmente en el estudio de los animales domésticos y no de los silvestres. Gustavsson describe el cariotipo del perro en 1964 (Gustavsson, 1964) investiga los patrones diferenciales de replicación en los cromosomas caninos tanto *in vivo* como *in vitro*, se adentra en el análisis de leucemias felinas e incluso en el estudio desde el punto de vista evolutivo del origen y mantenimiento de especies de cánidos silvestres, sus posibles híbridos y el papel de los reordenamientos cromosómicos en el mantenimiento de la variabilidad y expresión fenotípica en ciertos vertebrados (Fraccaro, *et al.*, 1964; Gustavsson y Sundt, 1967; Makinen y Gustavsson, 1982).

Para ese entonces ya no sólo las líneas celulares de simio constituían modelos experimentales de amplia aplicación en biomedicina sino los primates mismos. Tanto en el orden internacional como en el local, las especies de PVM eran a las que se recurría con más frecuencia en investigación. Donde la economía del país y la política científica imperantes así lo permitían, importantes criaderos de primates privados y nacionales vieron su máximo desarrollo en estas décadas. En el orden nacional, poco y nada se sabía acerca de una fauna autóctona con cinco especies nativas de PNM, siendo los 28 grados de latitud sur el límite extremo de su distribución natural. A nivel de la comunidad científica algunas especies ya se utilizaban como modelos de estudio por su alta cercanía filogenética con el hombre dando lugar a investigaciones básicas y aplicadas.

En el inicio, en la década de los 80' se realiza la primer caracterización citogenética de una línea celular a partir del cultivo en suspensión de linfocitos de sangre periférica de un PNM de cautiverio, procedente de Brasil, *Callitrix jacchus*, con el objetivo de obtener sustrato para preparación de vacunas para fiebre hemorrágica argentina (Mudry de Pargament, *et al.*, 1981). En esos años distintos centros se interesaron por la caracterización de otros monos, tal el caso de los trabajos en citogenética de *Cebus* e investigaciones de las homeologías con el humano (Matayoshi, *et al.*, 1986; Matayoshi, *et al.*, 1987).

Las técnicas de bandas de alta resolución, junto a la incorporación del secado al aire de los preparados, el aislamiento de ADN y el uso de endonucleasas de restricción, permitieron conocer una notable cantidad de familias de ADN y de secuencias específicas en sitios cromosómicos heteromórficos. En *Cebus* se caracterizaron las particularidades de la heterocromatina constitutiva como variabilidad intraespecífica, tanto a nivel cuantitativo como cualitativo (Mudry de Pargament, *et al.*, 1985; Mudry, M. D., 1990; Ferrucci, *et al.*, 1995).

CARIOSISTEMÁTICA, UNA VARIABLE NOVEDOSA EN EL CONCEPTO DE EVIDENCIA TOTAL

En la década del 80 es cuando se publican los primeros trabajos de cariosistemática propiamente dicha en PNM en general y en los de nuestra fauna en estado silvestre, en particular. Se considera el estudio de 3 especies de PNM. Se intenta analizar las relaciones entre especies a partir de los cromosomas atendiendo a su clasificación taxonómica y tratando de indagar acerca de su evolución. Se inicia el estudio con los conocidos en la zona del NEA como "Cai", pertenecientes al género *Cebus* (en ese entonces *Cebus apella paraguayanus*). Luego se abordan los "aulladores", que se sabía que llegaban en su distribución a los campos sembrados y casas en Chaco, Corrientes y Formosa, cuyo género era *Alouatta* (*A. caraya*) y el mono nocturno, mono lechuza o "mirikina", muy poco visto en la zona de Chaco y Formosa por sus hábitos nocturnos preferenciales, especie nativa *Aotus azarae* (Mudry, M. D., 1982). Se toma como marco teórico de interpretación de lo que se hallaba en la naturaleza, la hipótesis sobre un "cariotipo-una especie". En consecuencia, para cada especie referida se establece el 2N, el NF, la

fórmula cromosómica y los patrones de bandas G y C. Se continuó con el estudio de otras especies por estar en cautiverio de exhibición en jardines zoológicos, criaderos y bioterios experimentales, en la zona en que los anteriores vivían en estado silvestre. Se caracterizó cariológicamente a *Saimiri*, *Callitrix* y *Ateles*.

Entre 1990-1995 se relaciona la Cariosistemática y la Biogeografía dando como resultado la no verificación generalizada de un cariotipo –una especie. A medida que avanzan las caracterizaciones citogenéticas en distintos géneros y en un número considerable de animales muestreados en distintas localidades de origen, se detecta una gran variabilidad cromosómica entre y dentro de las poblaciones de estos primates nativos, siendo el más ilustrativo el caso de *Cebus* (Matayoshi, *et al.*, 1987; Mudry, 1990)

En esta década se comienzan a considerar los estudios cromosómicos como una de las herramientas más relevantes para una ajustada diagnosis taxonómica. Si bien la contribución de la citogenética no fue la misma para todos los taxa de primates, permitió la construcción y el manejo de los pedigrees y el monitoreo de la variabilidad genética. A nivel internacional, se comenzaron estudiando los PVM y es en los PNM donde los estudios cariotípicos encontraron la mayor diversidad de patrones cariológicos en coincidencia con una notable variabilidad fenotípica: *Aotus* (Ma, *et al.*, 1976; Piekzarka, *et al.*, 1998; Torres, *et al.*, 1998), *Alouatta* (Lima, *et al.*, 1991; Mudry, *et al.*, 1998), *Cebus* (Matayoshi, *et al.*, 1987; Mudry de Pargament, *et al.*, 1987; Mudry, 1990; Ponsà, *et al.*, 1995) Relacionar las variantes cariotípicas con los taxa determinados desde caracteres puramente morfométricos o de distribución geográfica encontró considerables escollos para el diagnóstico coherente y consistente (ej. *Aotus*, donde a partir del estudio cromosómico, 10 subespecies fueron elevadas a especies, con tan sólo dos formas claramente reconocibles).

En esos tiempos se intensificaron los estudios de electroforesis de isoenzimas examinando la variación en la composición en aminoácidos en las proteínas, una información sumamente útil y complementaria de la cariotípica, en las descripciones intra e intergenéricas, permitiendo caracterizar con otras herramientas los polimorfismos poblacionales. Fue una década de importante información en

cuanto a la posibilidad de analizar la variabilidad entre y dentro las poblaciones, campos del conocimiento que en Ceboidea no habían sido abordados activamente y de notable valor para comprender la dinámica poblacional y la estructura social. Estos datos son útiles para conservación y manejo de las especies en riesgo o potencialmente en riesgo, situaciones de las que se tomó real conciencia a partir de la década del 90. Los PVM y los PNM, ampliamente descritos en general en comparación con el hombre, quedaron más en descripciones que en interpretaciones evolutivas o taxonómicas donde los conocimientos permanecieron fragmentados, en parte por la imposibilidad de acceder a números importantes de ejemplares en vida silvestre sin alterar su equilibrio poblacional.

En 1989, Kluge introduce en los estudios de Sistemática animal la expresión *evidencia total*, tomando este concepto de manera lo suficientemente amplia como para abarcar el análisis de todos los caracteres disponibles (tomados como datos). Este autor consideró los datos en una única matriz que no sólo registrara caracteres morfológicos externos sino los genéticos, fisiológicos, ecológicos, comportamentales, entre otros, permitiendo alcanzar la mayor congruencia taxonómica posible. Con este nuevo marco de aportes multidisciplinarios se realizaron importantes contribuciones a la sistemática de cada especie y/o género. Bajo este concepto se reúnen los datos de cariología y de estudio de enzimas proteicas en sangre periférica realizadas hasta ese momento en las especies autóctonas, aportando nuevos conocimientos a la caracterización de las especies en más de los datos paleontológicos y biológicos de los que ya se disponían (Szapkievich, 2001).

LA CITOGENÉTICA MOLECULAR Y LA NUEVA CARACTERIZACIÓN CARIOSISTEMÁTICA

En los últimos diez años el advenimiento y aplicación de la citogenética molecular en cariosistemática, permitió caracterizar la conservación genómica en ceboideos de distribución marginal, estableciendo homeologías interespecíficas empleando FISH, GISH y CGH. El estudio estructural y comparado a nivel cariológico y genómico, considerando el comportamiento mitótico o meiótico, permite interpretaciones evolutivas que en los años más recién

tes, contribuyeron notablemente al esclarecimiento taxonómico y filogenético, colaborando incluso, en el manejo de especies en distintos estados de conservación: cautiverio, semicautiverio y libertad (Meffe y Carroll, 1994; Nieves, 2002). El análisis cromosómico estructural hoy se complementa con estudios moleculares, empleando la Hibridización *In Situ* Fluorescente (FISH) que localiza secuencias específicas del ADN en determinada región cromosómica. El análisis del citogenetista desde los patrones de bandas G, C, DAPI entre otros, permite identificar regiones particulares del genoma. Tanto las técnicas de bandas como el pintado cromosómico, por separado, tienen limitaciones para revelar aspectos de la organización estructural del genoma cuando identifica los posibles reordenamientos cromosómicos como responsables de los procesos especiogénicos. Sin embargo, la relación entre ambos, permite interpretaciones más ajustadas y la contrastación de hipótesis más complejas en los análisis de conservación genómica y detección de las posibles homeologías específicas (Wienberg y Stanyon, 1997; Consigliere, *et al.*, 1996; Mudry, *et al.*, 2001).

Con el análisis poblacional, regional y filogenético a nivel de ADNm y ADNn e incorporando datos de biogeografía y ecología regional, se estableció inicialmente que *A. caraya* presenta 2 clados mitocondriales principales divergentes hace 4 mil años y tanto en el pasado como en el presente, los ríos Paraná y Paraguay son rutas de migración para esta especie (Mudry, *et al.*, 1998; Mudry, *et al.*, 2001; Szapkievich, 2001; Szapkievich y Mudry, 2003; Asuncion, *et al.*, 2003c). Utilizando sondas humanas y aplicando FISH, se realizaron caracterizaciones de distintas especies de PNM en estado silvestre: *Cebus libidinosus*, *Alouatta caraya*, *Aotus azarae*, *Saimiri boliviensis* como en ejemplares de especies en cautiverio de diferentes zoológicos y estaciones de cría (Mudry, *et al.*, 2001; Mudry, *et al.*, 2007; Nieves, *et al.*, 2008) Se caracterizaron *Ateles* de diferentes especies de Zoo Bs.As., La Plata y Ezeiza. Se reclasificaron individuos de ambos sexos de *Ateles chamek* asignados erróneamente a *A. paniscus* y se corroboró el estatus específico de otros individuos. Se puso en evidencia la importancia de la identificación genética de los animales en cautiverio para su adecuado manejo, formación de grupos y reaseguro de posibles espacios de reproducción. Se estudiaron las homeologías posibles con otros géneros de la

misma familia (*Alouatta* y *Lagothrix*), observando un alto número de reorganizaciones cromosómicas ilustrativas de un proceso especiogénico complejo. Se confirmó por FISH la conservación del cromosoma 21 humano en 4 PNM y se corroboró la conservación de la sintenia 3/21 en estas mismas especies (Nieves, 2002; Nieves, *et al.*, 2001).

Recientemente, se caracterizó por primera vez el patrón de determinación sexual de ejemplares de cautiverio de *S. boliviensis*, observándose un bivalente XY del tipo *human like* (Steinberg, 2005; Steinberg, *et al.*, 2007) y el cariotipo mitótico y meiótico de *A. pigra*, describiéndose un sistema de determinación sexual cuadrivalente $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y_1Y_2$ (Steinberg, *et al.*, 2008).

Ante la falta total de homología por FISH con sondas humanas del cromosoma Y, contrapuesto a la conservación del X humano en mamíferos, se introdujeron metodologías moleculares (PCR) para analizar la dinámica del Y humano en estas especies (Nieves, *et al.*, 2003) Se observa la existencia de homeologías parciales de secuencia en *A. caraya*, *Ateles chamek*, *A. paniscus*, *Cebus libidinosus* y *S. boliviensis*. En concordancia con una reorganización del cromosoma Y entre los PVM y PNM (Nieves, *et al.*, 2003) - Figura 1 a, b -, los tamaños de los correspondientes fragmentos de secuencia homeóloga serían diferentes en cada especie respecto del SRY humano (299pb), incluso, entre especies de un mismo género.

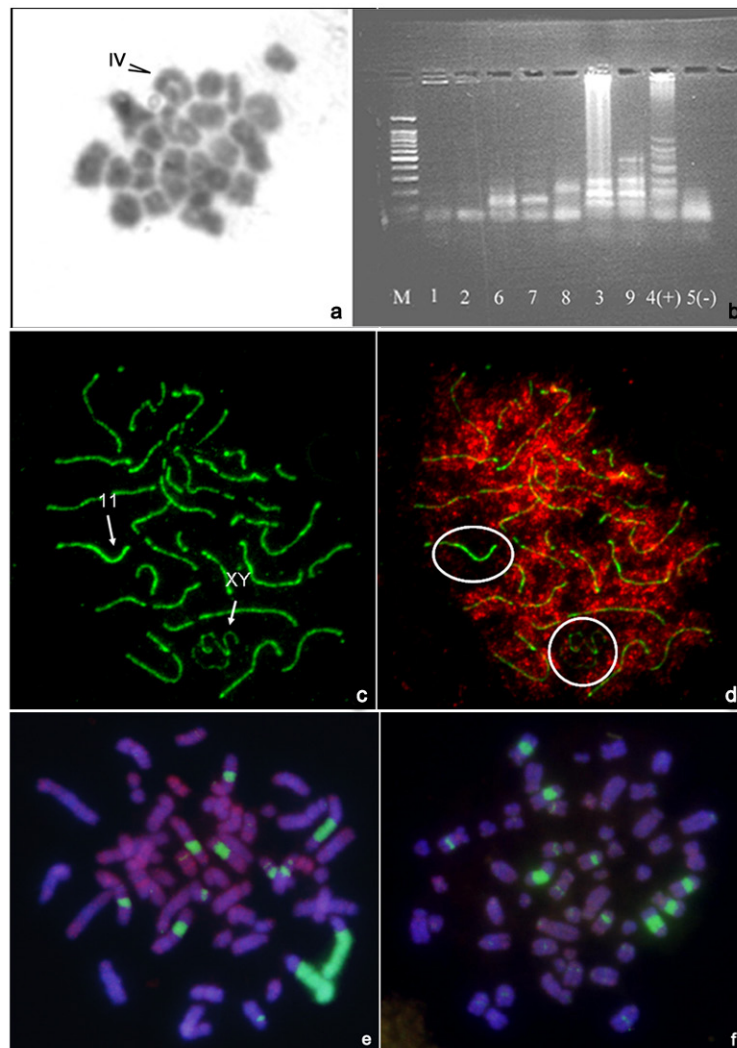


Figura 1. Aplicación de distintas metodologías cito-moleculares en células somáticas y germinales de Primates del Nuevo Mundo (PNM).

a) Espermatocito de *Alouatta caraya* en Metafase I. La línea indica el cuadrivalente (IV) sexual $X_1X_2Y_1Y_2$ observable en los machos. b) Estudio por PCR de la conservación del gen SRY

humano (299pb) en diferentes PNM. M= marcador de Peso Molecular; 1= *Ateles chamek*; 2= *Ateles chamek*; 4= control (+) HSA; 5= control (-); 6= *Ateles paniscus*; 7= *Cebus libidinosus*; 8= *Saimiri boliviensis*; 3 y 9= *Alouatta caraya*. Gel de agarosa (1,5%). c) Espermatocito de *Cebus libidinosus* en paquitene. La marca en verde corresponde a Rec8. Las flechas señalan el cromosoma 11 heterocromático con ausencia de desinapsis y el sexual XY. d) Se señala con círculos la falta de actividad de RNAPol (en rojo) tanto para el cromosoma 11 heterocromático como para el par sexual XY. e, f) Experimentos de CGH entre 2 especies de *Cebus*: *C. libidinosus* (CLI, en verde) y *C. nigrinus* (CNI, en rojo). e) CLI vs. CNI en metafases de CLI. f) CLI vs. CNI en metafases de CNI. Se ilustra la imagen combinada de tinción DAPI/Rojo/Verde de una metafase de cultivo de sangre periférica.

Abordando otra metodología para estudiar la meiosis masculina, se concretaron trabajos de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra proteínas del complejo sinaptonémico que permitieron analizar, a su vez, la dinámica cromosómica durante los estadios tempranos de la profase. Esto facilitó el estudio del proceso de sinapsis y recombinación de un individuo y distintos miembros de esta especie. La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha se concretaron en humanos, ratón o aves (Lynn, *et al.*, 2002; Codina-Pascual, *et al.*, 2005; Calderon y Pigozzi, 2006). Existía una vacancia de estos estudios en primates no-humanos, más aún de los posibles trabajos relacionados con la dinámica en la meiosis de los cromosomas sexuales. Se comenzó por tomar en cuenta los machos con determinación sexual *human like*, en particular biopsia testicular de macho adulto de *Cebus libidinosus* (= *C. paraguayanus*). Se caracterizó así la dinámica de las secuencias repetidas en espermatoцитos de *C. libidinosus* donde se observó ausencia de desinapsis. Asimismo, se observó un particular comportamiento del par sexual de *C. libidinosus* frente a RNAPol confirmando la estructura *human like*, con una cinética diferente (García-Cruz, *et al.*, 2009) - Figura 1 c, d -.

Durante los últimos años se avanzó notablemente en el conocimiento de la dinámica del genoma y su posible relación con ciertos reordenamientos cromosómicos. La concentración de roturas cromosómicas, de regiones particulares o bandas cromosómicas, con rol evolutivo en los cariotipos de los primates, sugiere que no todas las regiones son igualmente susceptibles a una reorganización (Ruiz-Herrera, *et al.*, 2005). Hoy en día los puntos de rotura que protagonizan los reordenamientos

cromosómicos implicados en la evolución de los primates (marcadores citogenéticos), han acercado notablemente nuevas regiones al análisis en orden de ilustrar los procesos subyacentes a nivel molecular a esos reordenamientos que observamos, tanto en células somáticas como germinales. Hoy podemos hablar de una alta coincidencia entre puntos de ataque al genoma que no ocurrirían al azar. Estos puntos cariológicos coincidentemente, protagonizan reordenamientos estructurales con rol evolutivo y al mismo tiempo son blanco de ataque de agentes físicos y químicos o incluso, son gatillo de alteraciones básicas en la mecánica mitótica o meiótica de enfermedades de importancia social en salud humana.

LA HETEROCROMATINA Y SU IMPACTO EN LA CITOGENÉTICA EVOLUTIVA DE PRIMATES DE DISTRIBUCIÓN EXTREMA SUD

Muchas de las roturas o reorganizaciones cromosómicas referidas previamente ocurren en regiones heterocromáticas con distintos nivel de repetición o próximas a ellas (secuencia LINE, SINE, STs, FS), otras en el límite entre una región eucromática y una heterocromática. Situaciones como las referidas están ampliamente demostradas en PNM como es el caso de *Cebus* (Borrell, *et al.*, 2010; Martínez, *et al.*, 2010; Mudry, *et al.*, 2010) o incluso, en PVM, como Pan, Gorilla y Gibbon (Ruiz-Herrera, *et al.*, 2005; Kehrer-Sawatzki y Cooper, 2008).

En el marco de las discusiones sobre la posible relación entre heterocromatina y especiación cromosómica, Nieves (2007) sugirió, a partir del desarrollo por microdissección cromosómica de una sonda de la región heterocromática extracentromérica del cromosoma 11 de *Cebus libidinosus*, que la heterocromatina extracentromérica descrita en *Cebus* es género-específica y de valor diagnóstico taxonómico (Nieves, *et al.*, 2005b). Dicha heterocromatina no mostró homeología en ninguna de las otras 14 especies de PNM analizadas así como tampoco en los individuos donantes voluntarios de *Homo sapiens* en los cuales también se aplicó la técnica de FISH con la sonda de 11qHet+CLI. En PNM, dos especies filogenéticamente muy próximas, que a su vez forman parte de la fauna autóctona de nuestro país, *Cebus libidinosus* y *C. nigrinus*, presentan un cariotipo altamente homeólogo donde la única diferencia

detectable con técnicas citogenéticas tradicionales es la ausencia total del bloque de heterocromatina terminal en 11q de *C. nigrinus*. A partir de la aplicación de Hibridación Genómica Comparada (CGH) entre *C. libidinosus* y *C. nigrinus*, se observaron diferencias en la proporción de ADN entre especies que no se debería exclusivamente a heterocromatina, sino que involucraría regiones genómicas diferentes (Figura 1 e, f). Se propuso que la divergencia evolutiva en *Cebus* estaría acompañada por pérdida de heterocromatina extracentromérica y ligera reducción del tamaño del genoma, con un activo movimiento genómico bajo la forma de polimorfismos y heteromorfismos a expensas de heterocromatina y reordenamientos a nivel de eucromatina evidenciables sólo aplicando CGH (Nieves, *et al.*, 2010). Asimismo, Fantini (2009) utilizó CGH en individuos de *Cebus* de cautiverio—específicamente un híbrido entre *C. libidinosus* y *C. nigrinus*—, con el fin de cuantificar la participación de cada genoma parental en el genoma híbrido. Así, su hallazgo más importante fue que el genoma híbrido presenta mayor cantidad de ADN repetitivo que el observable en ambas especies parentales, incluso con respecto a *C. libidinosus*, el parental con mayor proporción de heterocromatina.

Los estudios de Citogenética en PNM demostraron, en las últimas décadas, que estos mamíferos comprenden no sólo un grupo que, a nivel cromosómico es heterogéneo, sino que además es de rápida evolución (Stanyon, *et al.*, 2004). Como venimos comentando, el proceso de especiación parecería implicar cambios tanto a nivel intergenérico como intragenérico, con reordenamientos cromosómicos estructurales, a la vez que cambios importantes en las regiones heterocromáticas Seuáñez, *et al.*, 1986; Seuáñez, *et al.*, 2005; Matayoshi, *et al.*, 1987; Mudry, 1990; Ponsà, *et al.*, 1995; Pieczarka, *et al.*, 1996; Pieczarka, *et al.*, 2001). Esta gran variabilidad a nivel cromosómico estructural no se refleja directamente en cambios significativos en el tamaño del genoma si bien éste es considerado una constante especie-específica (Ronchetti, *et al.*, 1993; Redi, *et al.*, 2005). En *Primates* se describió una correlación positiva entre el contenido de ADN nuclear y la presencia de heterocromatina. En PNM en particular, se observa la mayor proporción de heterocromatina extracentromérica dentro del Orden. Durante los últimos 30 años la heterocromatina ha sido señalada

como uno de los posibles responsables de la diversificación cariológica en varios taxa de vertebrados. Los *Primates* no son la excepción, como ya se refirió anteriormente y si bien se realizaron numerosos trabajos en este sentido, aún quedan considerables interrogantes por responder.

En este contexto es que nos encontramos hoy en día, S XXI, abordando el tema de la especiogénesis de los PNM desde la Citogenética Evolutiva con un enfoque cuantitativo que permite contribuir y/o reinterpretar las inferencias realizadas partiendo de la citogenética clásica y molecular cualitativa. Así, el estudio comparativo de PVM y PNM, sean de vida silvestre o de cautiverio, a través de CGH y cuantificación del tamaño del genoma nos permitirá obtener nueva información acerca de los cambios que han ocurrido en el genoma de estos primates durante el proceso de divergencia.

AGRADECIMIENTOS

Los aportes al conocimiento sobre la citogenética evolutiva de PNM fueron posibles gracias a la colaboración desinteresada de los veterinarios de los distintos centros de exhibición o cría donde se muestrearon individuos de cautiverio en el orden nacional e internacional y de los colegas ecólogos que trabajaron en las distintas campañas de captura en estado silvestre, tanto en nuestra selvas como en las del extranjero. Para concretar estos hallazgos se dispuso de los subsidios otorgados por MDM-CO-NICET/UBACyT y convenios internacionales.

BIBLIOGRAFÍA

- Animal Genome Size Database. [Disponible en: <http://www.genomesize.com/>]
- Ascunce M, Oklander L, Mudry MD. Mitochondrial DNA phylogenies in wild Primates (Platyrrhini: Cebidae) comparing hair and blood sources. *Folia Primatol.* 2003a; 74: 165-167.
- Ascunce MS, Cortes-Ortiz L, Mudry MD. The mitochondrial control region of *Alouatta caraya* (Primates, Platyrrhini) and the development of new primers. *Molecular Ecology Notes* 2003c; 3(3):372-375.
- Ascunce MS, Hasson ER, Mudry MD. Description of the cytochrome oxidase subunit II gene in some genera of New World monkeys (Primates, Platyrrhini). *Ge-*

- netica 2002; 114:253-267.
- Bianchi NO, Ayres J. Heterochromatine location on chromosomes of normal and transformed cells from African green monkey (*Cercopithecus aethiops*). *Exp. Cell Res.* 1971; 68: 253-258.
- Borrell A, Ponsà M, Egozcue J, Rubio A, et al. Chromosome abnormalities in peripheral blood lymphocytes from *Cebus apella* (Cebidae, Platyrrhini) after X-ray irradiation. *Mutation Res.* 1998; 401: 65-76.
- Brieux de Salum S, Larripa I, Damonte E, et al. Análisis citogenético de líneas celulares VERO. *Medicina* 1978; 38: 517-518.
- Calderón PL, Pigozzi MI. MLH1-focus mapping in birds shows equal recombination between sexes and diversity of crossover patterns. *Chromosome Res.* 2006; 14:605-612.
- Codina-Pascual M, Oliver-Bonet M, Navarro J, Campillo M, et al. Synapsis and meiotic recombination analysis: MLH1 focus in the XY pair as an indicator. *Hum. Reprod.* 2005; 20(8): 2133-2139.
- Consigliere S, Stanyon R, Koehler U, et al. Chromosome painting defines genomic rearrangements between red howler monkey subspecies. *Chromosome Res.* 1996; 4: 264-270.
- De Boer LEM. Cytotaxonomy of the Platyrrhini (Primates). *Genen en Phaenen* 1974; XVII (1-2): 1-134.
- Díaz G, Ojeda R. Libro Rojo de Mamíferos y Aves amenazados de la Argentina. Mendoza: SAREM, 2000; 221 pp.
- Fantini L, Nieves M. Estudio genómico cuantitativo de híbridos de *Cebus* (Primates, Platyrrhini) en cautiverio. Resúmenes de las 9as. Jornadas Nacionales de Antropología Biológica, Puerto Madryn, Chubut, Argentina. 2009; p. 115.
- Ferrucci L, Romano E, Derme V, Nicolai F, et al. Restriction enzyme-induced bands in *Cebus*: a method for detecting intraspecific variability of satellite DNAs sequences. *Chromosome Res.* 1995; 3(1): 74.
- Fraccaro M, Gustavsson, I., Hulten M, Lindsten J, et al. DNA replication patterns of canine chromosomes in vivo and in vitro. *Hereditas* 1964; 52: 265-270.
- García-Cruz R, Robles P, Steinberg ER, Camats N, et al. Pairing and recombination features during meiosis in *Cebus paraguayanus*. *BMC Genetics* 2009; 10: 25. doi:10.1186/1471-2156-10-25.
- Gustavsson I, Sundt CO. Chromosome elimination in the evolution of the silver fox. *J. Hered.* 1967; 58: 74-78.
- Gustavsson I. The chromosome of the dog. *Hereditas* 1964; 51: 187-189.
- Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 1961; 25: 585-621.
- Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 1965; 37: 614-636.
- Hughes D. Cytogenetical polymorphism and evolution in mammalian somatic cell population in vitro and in vivo. *Nature* 1968; 217: 518-523.
- Kehrer-Sawatzki H, Cooper DN. Molecular mechanisms of chromosomal rearrangement during primate evolution. *Chromosome Res.* 2008; 16: 41-56.
- Kluge AG. A concere for evidence and a phylogenetic hypothesis of relationships among Epicrates (Boiidae, Serpentes). *Systemat. Zool.* 1989; 38: 7-25.
- Lima M, Seuánez HN. Chromosome Studies in the red howler monkey *Alouatta seniculus stramineus* (Platyrrhini, Primates): Description of an X1X2Y1Y2/X1X1X2X2 sex chromosome system and karyological comparisons with other subspecies. *Cytogenet. Cell Genet.* 1991; 57(2-3): 151-156.
- Lombardero OJ. Bibliografía comentada de los parasitos de los primates argentinos. *Bol. Primatol. Arg.* 1980; 1(1): 43-49.
- Lynn A, Koheler KE, Judis L, Chan ER, et al. Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates. *Science* 2002; 296: 2222-2225.
- Ma NSF, Elliot MW, Morgan L, et al. Translocation of the Y chromosome to an autosome in
- Makinen A, Gustavsson I. A comparative chromosome-banding study in the silver fox, the blue fox and their hybrids. *Hereditas* 1982; 97: 289-297.
- Martinez RA. Biomarcadores de genotoxicidad en el estudio de fragilidad genómica en el Orden Primates.

- Tesis Doctoral, FCEyN, UBA, 2003. 289pp.
- Matayoshi T, Howlin E, Nasazzi N, Nagle C, et al. Chromosome studies in *Cebus apella*: The standard karyotype of *Cebus apella paraguayanus* Fisher, 1829. *Am. J. Primatol.* 1986; 10:185-193.
- Matayoshi T, Seuáñez HN, Nasazzi N, Nagle C, et al. Heterochromatic variation in *Cebus apella* (Cebidae, Platyrrhini) of different geographic regions. *Cytogenet. Cell Genet.* 1987; 44:158-162.
- Meffe GK, Carroll CR. *Principles of Conservation Biology*. Sinauer Associates, Inc, 1994: 600pp.
- Milozzi C, Bruno G, López Santoro S, Mudry MD et al. Intestinal parasites of *Alouatta caraya* (Primates, Ceboidea): A coprological survey of the hosts in semi-captivity and the wild in Argentina. *Veterinary Parasitology* 2010 (En consideración).
- Moore R, Radley JM. The nature of aneuploid change in JU56 cells, and its relationship to continued cell proliferation. *Exp. Cell Res.* 1968; 49: 638-649.
- Mudry de Pargament M, Labal de Vinuesa M, Brioux de Salum S. Quantitative estimation of heteromorphism in C-bands of *Cebus apella*. *J. Hum. Evol.* 1985; 14:693-698.
- Mudry de Pargament M, Slavutsky I, Brioux de Salum S. Cytogenetic characterization of HVB 4156. A southamerican primate (*Callithrix jacchus*) cell line. *Rev. Arg. Microbiol.* 1981; 13(3):77-82.
- Mudry de Pargament M, Slavutsky I. Banding patterns of the chromosome of *Cebus apella* (Comparative studies between specimens from Paraguay and Argentina). *Primates* 1987; 28(1):111-117.
- Mudry de Pargament MD. Los primates, modelo animal en la investigación biomédica. *Medicina* 1980; 365-368.
- Mudry M, Rahn IM, Solari AJ. Meiosis and Chromosome Painting of Sex Chromosome Systems in Ceboidea. *Am. J. Primatol.* 2001; 54: 65-78.
- Mudry M, Rahn M, Gorostiaga M, Hick A, et al. Revised karyotype of *Alouatta caraya* (Primates: Platyrrhini) based on synaptonemal complex and banding analyses. *Hereditas* 1998; 128: 9-16.
- Mudry MD, Martinez R, Nieves M, Carballo MA. Biomarkers of Genotoxicity and Genomic Instability in a nonhuman primate *Cebus libidinosus* (Cebidae, Platyrrhini) exposed to Nitroimidazole derivatives. *Mutat Res.* 2011; 721: 108-113.
- Mudry MD, Nieves M, Bolzán AD. Chromosomal localization of the telomeric (TTAGGG)_n sequence in eight species of New World Primates (Neotropical Primates, Platyrrhini). *Cytogenet. Genome Res.* 2007; 119: 221-224.
- Mudry MD. Cytogenetic variability within across populations from *Cebus apella*. *Folia Primatol.* 1990; 54(3-4):206-216.
- Mudry MD. Estudios Citogenéticos en Cebidos Argentinos. Su proyección e Taxonomía y Evolución. Tesis doctoral FCEyN, UBA, 1982; 149pp.
- Nagle C, Paul N, Mazzoni I, Quiroga S, et al. Interovarian relationship in the secretion of progesterone during the lutean phase of the capuchin monkey (*Cebus apella*). *J. Reprod. Fertility* 1989; 85(2): 389-396.
- Nagle CA, Digiano L, Paul N, Terlato, et al. Interovarian communication for the control of follicular growth and corpus luteum Function in the *Cebus* Monkey. *Am. J. Primatol.* 1994; 34: 19-28.
- Nieves M, Ascunce MS, Rahn MI, Mudry MD. Phylogenetic relationships among some Ateles species: the use of chromosomal and molecular characters. *Primates* 2005a; 13 (3): 45-51.
- Nieves M, Mendez G, Ortiz A, Mühlmann M, et al. Karyological diagnosis of *Cebus* (Primates, Platyrrhini) in captivity: Detection of hybrids and management program applications. *An. Reprod. Sc.* 2008; 108: 66-78.
- Nieves M, Mudry MD, Copelli S. Conservación del cromosoma Y humano en Ceboidea (Primates: Platyrrhini). *Anales IV Jornadas Argentino-Chilenas, SAG. Córdoba, 2003; pp 52.*
- Nieves M, Mühlmann M, Mudry MD. Comparative Genomic Hybridization (CGH) analysis of *Cebus paraguayanus* and *C. nigrinus* (Primates, Platyrrhini). *Cytogenet. Genome Res.* 2010; 128: 214-220.
- Nieves M, Mühlmann M, Mudry MD. Heterochromatin and chromosome evolution: a FISH probe of *Cebus apella paraguayanus* (Primate: Platyrrhini) developed by chromosome microdissection. *Genet. Mol. Res.* 2005b; 4(4): 675-683.

- Nieves M. Contribución de la Citogenética para la identificación de especies animales en cautiverio: el ejemplo de los Primates Neotropicales. Tesis de Licenciatura FCEyN, UBA, 2002; pp 77.
- Nieves M. Heterocromatina y Evolución Cromosómica en Primates Neotropicales. Tesis doctoral, FCEyN-UBA, 2007; 200 pp.
- Painter TS. Studies in mammalian spermatogenesis IV. The sex chromosomes of monkeys. *J. Exper. Zool.* 1924; 39: 91-113.
- Painter TS. The sex chromosomes of the monkey. *Science* 1922; 56: 286-287.
- Pieczarka JC, Nagamachi CY, Barros RMS, Mattevi MS. Analysis of constitutive heterochromatin by in situ digestion with restriction enzymes in species of the group *Callithrix argentata* (Callitrichidae, Primates). *Cytogenet. Cell Genet.* 1996; 72(4): 325-330.
- Pieczarka JC, Nagamachi CY, Muniz JAPC, et al. Analysis of Constitutive Heterochromatin of *Aotus* (Cebidae, Primates) by Restriction Enzyme and Fluorochrome Bands. *Chromosome Res.* 1998; 6: 77-83.
- Pieczarka JC, Nagamachi CY, Muniz JAPC, et al. Restriction enzyme and fluorochrome banding analysis of the constitutive heterochromatin of *Saguinus* species (Callitrichidae, Primates). *Cytobios* 2001; 105: 13-26.
- Ponsà M, García M, Borrell A, et al. Heterochromatin and cytogenetic polymorphisms in *Cebus apella* (Cebidae, Platyrrhini). *Am. J. Primatol.* 1995; 37: 325-331.
- Redi CA, Zacharias H, Merani S, et al. Genome size in Afrotheria, Xenarthra, Euarchontoglires, and Laurasiatheria. *J. Hered.* 2005; 96(5): 485-493.
- Ronchetti E, Crovella S, Rumpler Y, et al. Genome size and qualitative and quantitative characteristics of C-heterochromatic DNA in *Eulemur* species and in a viable hybrid. *Cytogenet. Cell Genet.* 1993; 63: 1-5.
- Rowe N. *The Pictorial Guide To the Living Primates.* East Hampton, New York: Pogonias Press, 1996; 263 pp.
- Ruiz-Herrera A, García F, Mora L, Egozcue J, et al. Evolutionary conserved chromosomal segments in the human karyotype are bounded by unstable chromosome bands. *Cytogenet. Genome Res.* 2005; 108:161-174.
- Ryland AB, Schneider H, Langguth A, Mittermeier RA, et al. An assessment of the diversity of New World Primates. *Neotrop. Primates* 2000; 8: 61-93.
- Seuáñez HN, Armada JLA, Freitas L, et al. Intraspecific chromosome variation in *Cebus apella* (Cebidae: Platyrrhini). The chromosomes of the yellow breasted capuchin *Cebus apella xanthosternos* Wied, 1920. *Am. J. Primatol.* 1986; 10: 237-247.
- Seuáñez HN, Bonvicino CR, Moreira MAM. The primates of the Neotropics: genomes and chromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 2005; 108: 38-46.
- Stanyon R, Bigoni F, Slaby T, et al. Multi-directional chromosome painting maps homologies between species belonging to three genera of New World monkeys and human. *Chromosoma* 2004; 113: 305-315.
- Steinberg ER, Cortés-Ortiz L, Nieves M, Bolzán AD, et al. The karyotype of *Alouatta pigra* (Primates: Platyrrhini): mitotic and meiotic analyses. *Cytogenet. Genome Res.* 2008; 122:103-109.
- Steinberg ER, Nieves M, Mudry MD. Meiotic characterization and Sex Determination System of Neotropical Primates: Bolivian Squirrel Monkey *Saimiri boliviensis* (Primates: Cebidae). *Am. J. Primatol.* 2007; 69 (11): 1236-1241.
- Steinberg ER. La Citogenética y la morfología espermática como herramientas de valor taxonómico: el ejemplo del mono ardilla, *Saimiri boliviensis* (Primates: Platyrrhini). Tesis de Licenciatura, Universidad de Buenos Aires, Argentina, 2005.
- Szapkievich V, Mudry MD. Estudios de Polimorfismos en el mono aullador negro de Argentina (*Alouatta caraya*). *Historia Natural* 2003; II (7): 37-51.
- Szapkievich VB. El Río Paraná como modelador del ambiente de la distribución marginal sur de *Alouatta caraya* (Primates, Platyrrhini). Tesis doctoral FCEyN, UBA, 2001.
- the Bolivian owl monkey, *Aotus*. *Am. J. Phys. Anthropol.* 1976; 45: 191-202.
- Torres OM, Enciso S, Ruiz F, Silva E, et al. Chromosome

- diversity of the genus *Aotus* from Colombia. *Am. J. Primatol.* 1998; 44: 255-275.
- Travi B. Agentes infecciosos en primates. *Bol. Primatol. Arg.* 1985; 3(2): 41-49.
- Visalberghi E, Limongelli L. Acting and understanding: Tool use revisited through the minds of capuchin monkeys. En Russon AE, Bard KA, Parker ST (eds). *Reaching into thought: The minds of the great apes.* New York, NY, US: Cambridge University Press; 1989: 57-79.
- Visalberghi E. Tool use in *Cebus*. *Folia Primatol.* 1990; 54: 146-154.
- Wienberg J, Stanyon R. Comparative painting of mammalian chromosomes. *Curr. Op. Genet. Develop.* 1997; 7: 784-791.
- Zakharov AF, Kakpakova ES, Egolina NA. Interrelation of the numerical and structural karyotype variability in the culture Chinese hamster cells. *Tsitologiya* 1966; 8: 193-201.

- Received **20/05/2010**

- Accepted **01/08/2010**