

Elementos Alu en el análisis filogenético molecular del infraorden Platyrrhini, Primates

Bertha Ludeña, Juan Carlos Escobar, Jean-Christophe Pintaud

Laboratorio de Genética Molecular de Eucariotes
Pontificia Universidad Católica del Ecuador
17-01-2184 Quito-Ecuador.

Recibido 1 abril 2005, aprobado 15 de junio 2005

RESUMEN. Los marcadores moleculares Alu: STK1, VP y HBGF fueron utilizados en el presente trabajo para analizar la filogenia de algunas especies de platirrinos ecuatorianos. Los resultados positivos para la amplificación genómica de estos marcadores en las especies estudiadas: *Cebus albifrons*, *Saimiri sciureus*, *Ateles belzebuth*, *Ateles fusciceps*, *Alouatta palliata* y *Lagothrix lagotricha* revelan que eventos derivados de transposición de elementos Alu han tenido relación con la filogenia de los primates del Nuevo Mundo.

El análisis mediante Neighbor-joining de la información obtenida ratifica el posicionamiento de los géneros *Alouatta*, *Ateles* y *Lagothrix* en la familia Atelidae y sugiere una estrecha cercanía entre los géneros *Cebus* y *Saimiri* apoyando la inclusión de éstos en un clado.

PALABRAS CLAVE. Análisis filogenético, evolución, marcadores genómicos Alu, platirrinos.

ABSTRACT. Molecular markers Alu: STK1, VP and HBGF were applied to the phylogenetic analysis of some ecuadorian platyrrhines. PCR amplification for all three markers was positive in the analysed species: *Cebus albifrons*, *Saimiri sciureus*, *Ateles belzebuth*, *Ateles fusciceps*, *Alouatta palliata* and *Lagothrix lagotricha*. This shows that derived Alu-transpositions originated during New World monkey evolution.

Neighbor-joining analysis of this information supports the positioning of genera *Alouatta*, *Ateles* and *Lagothrix* in Atelidae family and a close affiliation between genera *Cebus* and *Saimiri* which could be considered as a clade.

KEYWORDS. Phylogenetic analysis, evolution, Alu generic markers, Platyrrhines.

INTRODUCCIÓN

Existe un consenso general respecto a la monofilia del grupo de los primates antropoideos, es decir que tanto Catarrhini (monos del Viejo Mundo) como Platyrrhini (monos del Nuevo Mundo) descienden de un ancestro común.

Respecto a la aparición de los Monos del Nuevo Mundo, los primeros registros fósiles datan del Deseadánico y Colhuehuagiano en Bolivia y Argentina (edades anteriores al Oligoceno). En aquella época Sud América era una isla separada de otros continentes por grandes expansiones de océano. Se sugiere que en los límites entre Eoceno y Oligoceno, tuvieron lugar cambios climáticos drásticos afectando el

nivel del mar. En este ambiente, las dorsales del sur del océano Atlántico quedaron al descubier-to formando islas, creando así vías que pudieron haber favorecido la migración de fauna desde Africa hacia el aislado continente de Sud América (1, 2).

Los monos del Nuevo Mundo así como otros mamíferos tienen relaciones de taxones hermanos con grupos africanos, por tanto la existencia de una relación faunística entre Africa y Sud América en la transición Eoceno, Oligoceno es fuertemente corroborada. (3).

Los platirrinos actuales se encuentran asignados a 16 géneros o subgéneros, 12 de los cuales pertenecen a tres grupos monofiléticos: los Pitheciidae/Pitheciinae, los Atelidae/Atelinae y los Callitrichidae/Callitrichinae.

De acuerdo a la clasificación taxonómica de Goodman *et al.* (4), estos grupos pueden ser considerados como subfamilias. Respecto a las relaciones filogenéticas de los géneros *Cebus*, *Saimiri*, *Callicebus* y *Aotus* hasta el momento resulta difícil definirlos.

Es importante señalar que existe una fuerte evidencia que indicaría un origen monofilético de los primates de América Central y América del Sur, sustentada en el análisis de secuencias de ADN (5, 6, 7, 8, 9).

En el Ecuador han sido descritas 19 especies de platirinos (10) representadas por los géneros: *Callithrix* (*Cebuella*), *Saguinus*, *Saimiri*, *Cebus*, *Aotus*, *Callicebus*, *Pithecia*, *Alouatta*, *Ateles* y *Lagothrix*.

En el presente trabajo se aborda la problemática filogenética en platirinos ecuatorianos mediante el análisis de los elementos Alu: en el gen de la Tirosina kinasa de Células Madre (STK1), en el intrón 4 del pigmento visual (VP) y en el precursor del factor del crecimiento similar a EGF de unión a la heparina (HBGF). Los mencionados marcadores genómicos hacen parte de una familia de elementos nucleares cortos interdispersos en el genoma de primates (SINES). Los SINES constituyen marcadores cladísticos que revelan sinapomorfías moleculares y son útiles para establecer relaciones de taxa en términos generales (11).

El presente análisis de elementos nucleares específicos de primates (SINES) ha sido efectuado en el genoma de individuos de las siguientes especies:

Cebus albifrons, *Saimiri sciureus*, *Ateles belzebuth*, *Ateles fusciceps*, *Alouatta palliata* y *Lagothrix lagotricha*

MATERIALES Y MÉTODOS

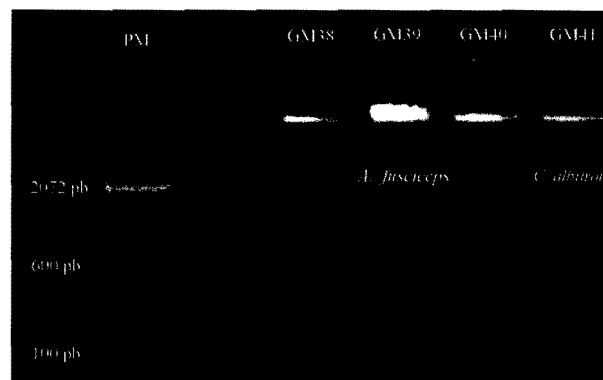
Muestras biológicas

El ADN para este estudio ha sido extraído a partir de sangre venosa periférica (alrededor de 1ml), tomada de individuos en cautiverio o cazados por indígenas.

De la sangre obtenida se ha procedido a realizar la extracción de DNA mediante shock hipotónico y digestión en presencia de proteínasa K. Los ácidos nucleicos han sido separados utilizando cloroformo: alcohol isoamílico y precipitados con etanol.

El material obtenido ha sido mantenido en Robert's buffer y su concentración y calidad han sido verificadas en gel de agarosa al 1% (Figura 1).

Figura 1. Resultados de extracción de ADN



El ADN extraído a partir de sangre periférica de primates del Nuevo Mundo es cuantificado y calificado en geles de agarosa al 1%. En la figura se ilustra los resultados obtenidos para dos individuos de *Ateles fusciceps* y dos individuos de *Cebus albifrons*.

Amplificación mediante PCR

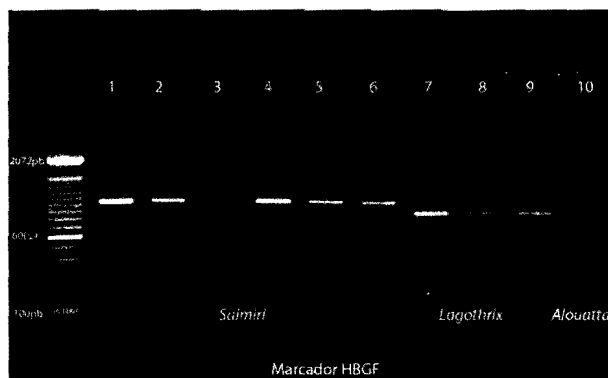
Para la amplificación de los elementos Alu, se utilizó los oligonucleótidos diseñados por Singer *et al.*, 2003. La reacción de PCR se efectuó en 12,5ul de volumen final incluyendo 30 ng de ADN, oligonucleótidos forward y reverse en concentración 20 mM, buffer FailSafe premix 1X (Epicentre, Madison, USA) y 0,5U de Platinum Taq polimerasa (Invitrogen). Los programas de amplificación correspondieron a 2 minutos de pre-denaturación a 92° C y 30 ciclos de 45 segundos de denaturación a 92° C, 60 segundos de acoplamiento a la temperatura correspondiente a cada par de oligonucleótidos y 60 segundos a 72° C para la extensión. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa junto a un marcador de peso molecular y registrados mediante fotografía (Figura 2). El análisis de las dimensiones de los amplificados

obtenidos fue hecho con el programa PhotoCapt MW V.10.01. Posteriormente la información obtenida fue tratada en términos de matriz y sometida al análisis con PAUP 4.0b.10 (12).

RESULTADOS

La amplificación mediante PCR de los elementos Alu: STK1, HBGF y VP permitió obtener productos ortólogos para cada especie con variación de relativamente pocos pares de bases dentro de cada una (Figura 2 y Tabla 1).

Figura 2. Amplificación del marcador Alu HBGF para *Saimiri sciureus*, *Lagothrix lagotricha* y *Alouatta palliata*



Los productos de amplificación mediante PCR para el marcador HBGF oscilan entre 1073, 1080 y 1093 pb para *Saimiri*. En *Lagothrix* se amplificó un producto de 948 pb, mientras que para *Alouatta* se obtuvo un producto de 968pb

Con esta información se procedió a realizar el análisis filogenético mediante Neighbor-joining. El árbol obtenido (Figura 3) permitió dilucidar relaciones de parentesco entre las especies analizadas.

DISCUSIÓN

El hecho de haber amplificado mediante PCR tres tipos de elementos Alu en el genoma de las especies de platirrininos analizadas en este trabajo respalda fuertemente la monofilia propuesta para el infraorden (5, 6, 7, 8, 9).

Por otra parte la presencia de productos de amplificación de diferentes dimensiones para cada especie estudiada sugiere que las transposiciones derivadas de este tipo de elementos Alu han tenido lugar durante la evolución de los monos del Nuevo Mundo.

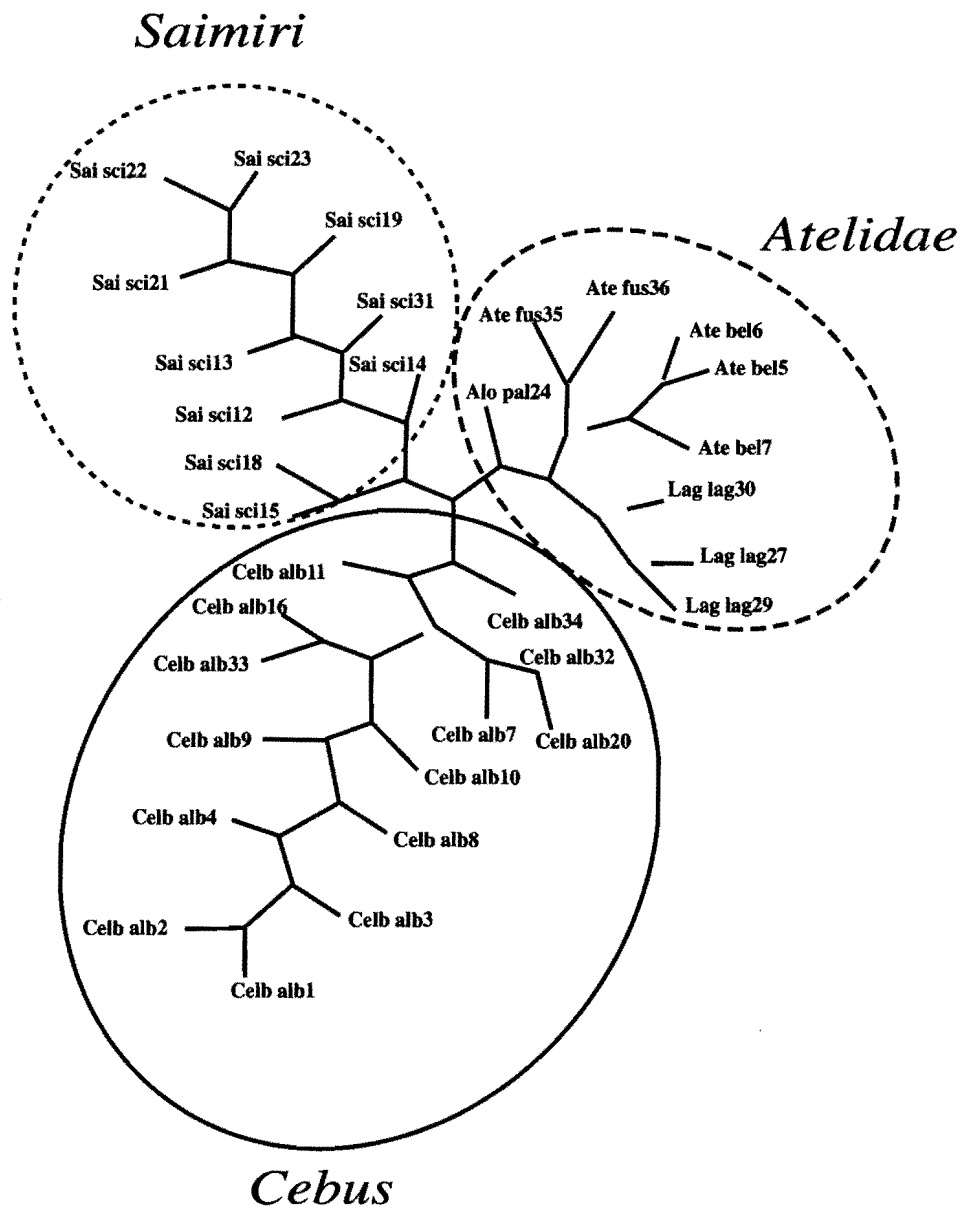
Las relaciones inferidas mediante el análisis de Neighbor-joining evidencian por una parte, mayor cercanía entre *Cebus* y *Saimiri*, sosteniendo el clado *Cebus* - *Saimiri* propuesto por evidencias citogenéticas (13) y moleculares (6, 7, 8, 14) y por otra entre *Lagothrix*, *Ateles* y *Alouatta* respaldando el posicionamiento de estos tres géneros en la familia Atelidae.

Considerando que los monos del Nuevo Mundo podrían con seguridad ser los protagonistas de un importante evento de radiación que

Tabla 1. Productos de amplificación mediante PCR para los elementos Alu STK1, HBGF y VP en varias especies de platirrininos ecuatorianos

Especie	Elemento Alu STK1	Elemento Alu HBGF	Elemento Alu VP
<i>Cebus albifrons</i>	1660 - 1686 pb	1040 - 1052 pb	870 - 880 pb
<i>Saimiri sciureus</i>	1514 - 1577- 1595 pb	1073 - 1080 - 1093 pb	818 - 858 - 880 pb
<i>Ateles belzebuth</i>	1215 pb	877 pb	890 pb
<i>Ateles fusciceps</i>	1200 pb	866 pb	890 pb
<i>Lagothrix lagotricha</i>	1159 - 1200 pb	948 pb	800 - 807 pb
<i>Alouatta palliata</i>	1277 pb	968 pb	882 pb

Figura 3. Arbol de Neigbor-Joining para los elementos Alu: HBGF, VP y STK1 analizados en las especies: *Cebus albifrons*, *Saimiri sciureus*, *Ateles belzebuth*, *Ateles fusciceps*, *Alouatta palliata* y *Lagothrix lagotricha*.



les permitió ocupar nichos ecológicos muy variados y divergir dramáticamente desde hace aproximadamente 40 millones de años, (11) es necesario abordar el análisis de su filogenia a la luz de varias fuentes de información genómica, así como de otros parámetros biológicos.

La información obtenida en el presente trabajo ha sido sin duda de interés para verificar la presencia de una dinámica transposicional con valor filogenético en el genoma de primates y para entender mejor las relaciones entre especies. No obstante esta información será

ampliada a un mayor número de especies y será integrada a aquella proveniente de otros marcadores genómicos, que están siendo utilizados ya al momento, con el fin de aclarar la intrincada filogenia de los platirrinos.

Agradecimientos

Se agradece al Dr. Andrés Ortega de la Fundación Zoológica de Guayllabamba por su colaboración en la obtención del material biológico utilizado en esta investigación.

REFERENCIAS

- 1.- TRTKOVA, K.; MAYER, W.; O'HUIGIN, C. & JAN KLEIN. Mhc – DRB genes and the origin of New World Monkeys. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 1995; **64**: 408 – 419.
- 2.- HOULE, A. The origin of Platyrrhines: an evaluation of the Antarctic scenario and the floating island model. **American Journal of Physical Anthropology**, 1999; **109**:541–559.
- 3.- SCHRAGO, C. & RUSSO, C. Timing the origin of New World Monkeys. **Molecular Biology and Evolution**, 2003; **20** (10):1620-1625.
- 4.- GOODMAN, M.; PORTER, C.; CZELUSNIAK, J.; PAGE, S.; SCHNEIDER, H.; SHOSHANI, J.; GUNNELL, G. & GROVES, C. Towards a phylogenetic classification of primates based on DNA evidence complemented by fossil evidence. **Molecular Phylogenetics Evolution**, 1998; **9**:585-598.
- 5.- HOROVITZ, I. & MEYER, A. Systematics of New World Monkeys (Platyrrhini, Primates) based on 16S mitochondrial DNA sequences: a comparative analysis of different weighting methods in cladistic analysis. **Molecular Phylogenetics Evolution**, 1995; **4**: 448-456.
- 6.- HOROVITZ, I.; ZARDOYA, R. & MEYER, A. Platyrrhine systematics: a simultaneous analysis of molecular and morphological data. **American Journal of Physical Anthropology**, 1998; **106**: 261-268.
- 7.- PORTER, C.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H.; SCHNEIDER, M.; CZELUSNIAK, J. & GOODMAN, M. Evidence on primate phylogeny from epsilon-globin gene sequences and flanking regions. **Journal of Molecular Evolution**, 1995; **40**:30-55.
- 8.- PORTER, C.; CZELUSNIAK, J.; SCHNEIDER, H.; SCHNEIDER, M.; SAMPAIO, L. & GOODMAN, M. Sequences of epsilon globin gene : implication for systematics of the marmosets and other New World primates. **Gene**, 1997; **205**:59-71..
- 9.- SCHNEIDER, H.; SCHNEIDER, M. P. C.; SAMPAIO, I.; HARADA, M. L.; STANHOPE, M.; CZELUSNIAK, J. & GOODMAN, M. Molecular phylogeny of the New World Monkeys (Platyrrhini, Primates). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 1993; **2**: 225.
- 10.- TIRIRA, D. (1999) Mamíferos del Ecuador. Publicación especial N° 2. Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito. pp. 67-72
- 11.- SINGER, S. S.; SCHMITZ, J.; SCHWIEGK, C. & ZISCHLER, H. Molecular cladistic markers in New World monkeys phylogeny (Platyrrhini, Primates). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 2002; **26**: 490-501
- 12.- SWOFFORD D., PAUP 4.0.b.10. Phylogenetic Analysis using Parsimony and other methods. Computer Program distributed by Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts. 2001.
- 13.- CHIARELLI, A. B., The karyology of South American Primates and their relationship to African and Asian species. In Ciochon, R.L., Chiarelli, A.B. (Eds.), *Evolutionary Biology of the New World Monkeys and Continental Drift*. Plenum Press. New York, 1980; pp 387-398.
- 14.- HARADA, M.; SCHNEIDER, H.; SCHNEIDER, M.; SAMPAIO, I.; CZELUSNIAK & J.; GOODMAN, M. DNA evidence on the phylogenetic systematics of New World Monkeys :support for the sister-grouping of *Cebus* and *Saimiri* from two unlinked nuclear genes. **Molecular Phylogenetics Evolution**, 1995; **4**: 331-349.