Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Evolución cromosómica y divergencia de especies en Cebus y Ateles (Primates: Platyrrhini) desde un enfoque citogenético molecular

Fantini, Lucía

2015-12-04

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Fantini, Lucía. (2015-12-04). Evolución cromosómica y divergencia de especies en Cebus y Ateles (Primates: Platyrrhini) desde un enfoque citogenético molecular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Fantini, Lucía. "Evolución cromosómica y divergencia de especies en Cebus y Ateles (Primates: Platyrrhini) desde un enfoque citogenético molecular". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-12-04.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, Genética y Evolución

Evolución cromosómica y divergencia de especies en Cebus y Ateles (Primates: Platyrrhini) desde un enfoque citogenético molecular

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

en el área Ciencias Biológicas

Lucía Fantini

Directora de tesis: Mariela Nieves

Consejera de estudios: Marta D. Mudry

Buenos Aires, Agosto 2015

Fecha de defensa: 4 de diciembre de 2015

Evolución cromosómica y divergencia de especies en Cebus y Ateles (Primates: Platyrrhini) desde un enfoque citogenético molecular

Resumen

La diversidad de los primates neotropicales (Platyrrhini), analizada en el GIBE a partir de la diversidad cariotípica, ha permitido plantear, al menos, dos posibles "estrategias especiogénicas" generales. Según una de ellas, las inversiones y la variación en heterocromatina constituirían los reordenamientos y cambios distintivos entre especies. La especiación en Platyrrhini, además, ocurriría acompañada de cambios cuantitativos en el genoma. Como ejemplo, *Cebus* y *Ateles,* los géneros con mayor proporción de heterocromatina, comparten además un patrón específico de distribución geográfica coincidente con la proporción y presencia de heterocromatina en sus genomas. En este trabajo se analizó la diversidad de especies en *Cebus* y *Ateles* tomando como eje la variabilidad en el tamaño del genoma y su influencia en parámetros fenotípicos como la diversidad cariotipíca y la distribución y proporción de heterocromatina. Fueron estimados los tamaños de genoma (Valor C) de 13 especies, entre ellas 3 pertenecientes al género *Ateles* y 6 del género *Cebus.* Por medio de Hibridación Genómica Comparativa se identificaron las regiones cromosómicas correspondientes a las diferencias cuantitativas entre los genomas, dentro de cada género. En *Ateles,* éstas se ubican principalmente en regiones heterocromáticas, aunque también en regiones eucromáticas. Los genomas de menor valor C de *Ateles* estarían completamente incluidos en los genomas de mayor tamaño, mientras que las regiones de ganancia de ADN detectadas en las especies de mayor valor C sólo corresponderían a amplificaciones o repeticiones del mismo tipo de secuencias, y no a secuencias especie-específicas. Las únicas diferencias cuantitativas entre las especies de *Cebus* analizadas se hallaron en el cromosoma Y. Como parte del estudio de la evolución del cariotipo primate se estableció el mapa de homologías cromosómicas de *A. chamek* y *Cebus* sp. respecto del cariotipo humano, así como también se obtuvo el primer registro de homología entre el cromosoma Y humano y un primate neotropical, mediante FISH con el gen ZFY en *Ateles paniscus*. Finalmente, se discuten los resultados obtenidos y la divergencia de especies en cada género en el contexto de la citogenética molecular, respecto de la presencia y proporción de heterocromatina y tamaño del genoma. Los hallazgos citogeneticos y los datos genómicos aquí presentados podrían estar indicando que durante los procesos especiogénicos en *Cebus* y *Ateles* el genoma se modula complementariamente entre regiones de eucromatina y heterocromatina, pero compensado de distinta manera según el género considerado.

Palabras clave: *Cebus*, *Ateles*, Valor C, Genoma, CGH, Evolución del cariotipo

Chromosomal evolution and species divergency in Cebus and Ateles (Primates: Platyrrhini) from a molecular cytogenetic approach.

Abstract

The karyotype diversity of Neotropical primates (Platyrrhini) has enabled us to propose at least two possible general "speciation strategies." According to one, chromosomal inversions and variation in heterochromatin are the distinctive chromosomal rearrangements and changes between karyotypes. Also, speciation in Platyrrhini appears to be accompanied by quantitative changes in the genome at inter- e intrageneric level. As an example, *Cebus* and *Ateles*, both genus with the highest proportion of heterochromatin, share a specific pattern of geographic distribution corresponding to the presence and proportion of heterochromatin in the genome. In this work, species diversity in *Cebus* and *Ateles* was analyzed taking variability in genome size and its influence on phenotypic parameters such as karyotypic diversity and distribution and proportion of heterochromatin as main axis. Genome size (C value) of 13 species were estimated, including 3 belonging to the genus *Ateles* and 6 of the genus *Cebus*. Using Comparative Genomic Hybridization (CGH) chromosomal regions associated with quantitative differences among species genomes were identified. In *Ateles,* these regions are mainly heterochromatic but also euchromatic.. The genomes of *Ateles* species with small C value are completely included in the genomes of the species with bigger C value. Regions of gained DNA in the bigger genomes represent amplifications or repetitions of sequences of the same type, not species-specific sequences. The only quantitative differences between *Cebus* genomes were located in chromosome Y. Regarding chromosomal evolution in Primates, an homeology map between karyotypes of *A. chamek, Cebus* sp. and the human is presented. Also the first record of homeology between human chromosome Y and that of a neotropical primate was observed with hybridization of human gene ZFY in *A. paniscus.* Finally, results and species divergence are discussed in a molecular cytogenetic context, relative to presence and proportion of heterochromatin and genome size. All in all, the cytogenetic and genomic findings and species characterizations here presented seems to point out that genomes, during a speciation process in *Cebus* and *Ateles*, are modulated in a complementary fashion between euchromatic and heterochromatic regions, but distinctively balanced in the genus considered.

Key words: *Ateles*, *Cebus*, C value, genome, CGH, karyotype evolution

Agradecimientos

A Mae, mi directora, porque me enseñó y me ayudó, siempre con muchísima paciencia. Por ser el empuje para que este proyecto saliera adelante, continuara y llegase a su fin. Por sus consejos y la predisposición para ayudarme en todo lo que le pedí. Por los momentos que compartimos, ya sea mirando al microscopio, frente a la compu, en el laboratorio, en los zoológicos, o paseando por ahí cuando se podía, y siempre con un mate de por medio (sobre todo si ya son las tres). Por siempre gracias!

A Marta Mudry, directora del GIBE, por otorgarme su confianza y completo apoyo para realizar esta tesis y completar mi doctorado. Por las oportunidades, el acompañamiento y la motivación, muchas gracias!

A Nancy, Eliana, Ana, Diana, Gigí y Lele, mis queridos compañeros de trabajo en el GIBE. Gracias por su ayuda, su compañerismo y sus consejos; por compartir el lugar de trabajo de todos los días de la mejor manera posible. De verdad, gracias!

A Edivaldo Oliveira y a Fafá Lima de Assis, y todo el equipo de trabajo del laboratorio de cultivo de tejidos de la sección de Medio Ambiente del Instituto Evandro Chagas, por recibirme durante mi estadía en Belém, Brasil, y ayudar a completar una parte importantísima de este trabajo de tesis. Muy especialmente a Fafá y su hermana Célia, y a toda su familia, por recibirme en sus casas, acompañarme y hacerme parte en todos sus eventos y reuniones como una sobrina más. Infinitas gracias.

A Marta Bueno por recibirnos en su laboratorio en la Universidad Nacional de Colombia y en su casa en Bogotá, durante mi primera estadía buscando muestras de monos. Por la ayuda imprescindible para conseguir las primeras muestras biológicas y procesarlas; por llevarnos de paseo a Mariela y a mí; por cuidarme cuando me intoxiqué. De corazón, gracias.

A Alejandro Laudicina por su invaluable ayuda en la obtención de las sondas utilizadas en buena parte de este trabajo. Por prestar su tiempo, su laboratorio y sus insumos. Muchísimas gracias!

Gracias aroma
azul,
fogata
encelo.
Gracias pelo
caballo
mandarino.
Gracias pudor
turquesa
embrujo
vela,
llamarada
quietud
azar
delirio.
Gracias a los racimos
a la tarde,
a la sed
al fervor
a las arrugas,
al silencio
a los senos
a la noche,
a la danza
a la lumbre
a la espesura.
Muchas gracias al humo
a los microbios,
al despertar
al cuerno
a la belleza,
a la esponja
a la duda
a la semilla
a la sangre
a los toros
a la siesta.
Gracias por la ebriedad,
por la vagancia,
por el aire
la piel
las alamedas,
por el absurdo de hoy
y de mañana,
desazón
avidez
calma
alegría,
nostalgia
desamor
ceniza
llanto.
Gracias a lo que nace,
a lo que muere,
a las uñas
las alas

A Paola Pierossi, Nick Jeffery y Ryan Gregory por su colaboración en la realización de las estimaciones de tamaño de genoma. Thank you!

A María José Bressa por su colaboración en el entrenamiento en la técnica de bandas fluorescentes DAPI-CMA. Gracias.

A los veterinarios, colaboradores y responsables de los zoológicos, centros de cría y de rescate, y bioterios, por su importantísima colaboración y buena predisposición en la obtención de las muestras biológicas. Gracias.

A mis grandes y queridísimos amigos que han acompañado y enriquecido este largo y sinuoso, pero también hermoso, camino. A las chicas de la facultad, a los chicos de la fundación, a mis amigos de Olavarría, a los que no entran en ninguna de esas categorías. Gracias totales!

A mi familia entera, mamá Susana y papá Roberto, que me inculcaron el amor y el asombro por la naturaleza y siempre me apoyaron para que siga estudiando. A mis hermanos Nico, Vero y Agustín, y mis cuñados Gabi y Santi. A mi sobrinita Emma y al proximx por llegar. A mi amado Palilu y su familia. Sólo por ser, y siempre estar, muchas gracias por todo. Muchas gracias.
Lucía Fantini, agradecida.

las hormigas,
los reflejos
el viento
la rompiente,
el olvido
los granos
la locura.
Muchas gracias gusano.
Gracias huevo.
Gracias fango,
sonido.
Gracias piedra.
Muchas gracias por todo.
Muchas gracias.
Oliverio Girondo,
agradecido

Este trabajo de tesis se desarrolló en el marco de los subsidios CONICET PIP 112 20080100744 (2009-2011), PIP 0572 (2012-2014) y UBACyT X154 (2008-2011), UBACYT 01/W136 (2011-2014) , con el apoyo de las becas internas de doctorado tipo I y II del CONICET.

Abreviaturas

AAZ: *Aotus azarae*

ABE: *Ateles belzebuth*

ACA: *Alouatta caraya*

ACH: *Ateles chamek*

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AGE: *Ateles geoffroyi*

APA: *Ateles paniscus*

CAL: *Cebus albrifrons*

CAP: *Cebus apella*

CCY: *Cebus cay*

CGH: del inglés *Comparative genomic hybridization.* Hibridación genómica comparada

CLI: *Cebus libidinosus*

CMA3: Cromomicina A3

CNI: *Cebus nigritus*

COL: *Cebus olivaceus*

CXA: *Cebus xanthosternos*

C_f: concentración final

c/n: cantidad necesaria

DAPI: 4 ',6-diamino-2-fenilindol

DOP-PCR: del inglés *Degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction*

FISH: del inglés *Fluorescent in situ hybridisation*. Hibridación *in situ* fluorescente

FITC: Isotiocianato de fluoresceína o fluoresceína-5-isotiocianato

GISH: del inglés *Genomic in situ hybridization.* Hibridación *in situ* genómica

HSA: *Homo sapiens*

Indels: inserción/deleción de ADN

PCR: del inglés *Polymerase chain reaction. R*eacción en cadena de la polimerasa

VC: Valor C

V_f: Volumen final

WCP: del ingles *Whole chromosome paints. P*intado de cromosoma entero

ZFY: del inglés *Zinc finger protein Y-linked.* Proteína de dedo de cinc ligada a Y

Zoo-FISH: del inglés *Fluorescent in situ hybridisation*. Hibridación *in situ* fluorescente entre especies diferentes

Índice

INTRODUCCIÓN 16

I: 1 Sobre el genoma 18

I: 1.1 ¿Qué es un genoma? Una breve disgresión etimológica 18

I: 1.2 Una caracterización cuantitativa: el valor C o tamaño del genoma 19

I: 1.3 El tamaño del genoma importa 22

I: 1.4 Sobre el valor C: Patrón de variación en animales y sus efectos 23

1.4.1 Variación del tamaño del genoma en Primates y sus efectos 25

I: 1.5 Evolución del tamaño del genoma: algunas explicaciones 26

1.5.1 Nunca menos: El tamaño del genoma en aumento 27

1.5.2 Genomas a medida: teorías del tamaño óptimo de ADN 28

1.5.2 Neutralidad y equilibrio de mutación en la evolución del tamaño del genoma 28

I: 2 Citogenética y Evolución 30

I: 2.1 Cambios cromosómicos y especiación 31

I: 2.2 Heterocromatina 32

I: 3 Platyrrhini: Los primates del nuevo mundo 34

I: 3.1 Características generales 34

I: 3.2 Citogenética de los primates del nuevo mundo 36

3.2.1 Patrones citogenéticos comunes en los primates neotropicales: Cebus y Ateles 38

I: 3.3 *Cebus* y *Ateles*: Características generales 39

3.3.1 Ateles 39

3.3.2 Cebus 42

I: 3.4 Filogenia y Sistemática de los géneros *Cebus* y *Ateles* *44*

3.4.1 Ateles 44

3.4.2 Cebus 46

OBJETIVOS E HIPÓTESIS 49

MATERIALES Y MÉTODOS 51

III: 1 Material biológico e individuos utilizados 52

III.1.1 Obtención de las muestras 54

III: 2 Metodología de trabajo 55

III: 2.1 Cultivos celulares y obtención de fijaciones cromosómicas 56

2.1.1 Cultivo de linfocitos de sangre periférica 56

2.1.2 Cultivo de fibroblastos 57

III: 2.2 Obtención de extendidos cromosómicos 58

III: 2.3 Cuantificación del tamaño de genoma 58

III: 2.4 Citogenética Clásica 59

III: 2.5 Obtención y marcado de sondas de ADN para FISH y CGH 61

III: 2.6 Citogenética Molecular 65

2.6.1 Hibridación in situ fluorescente (FISH) y variantes. Consideraciones técnicas 65

2.6.2 Protocolos de hibridación in situ: FISH, GISH y CGH 67

III: 2.7 Procesamiento y análisis de las imágenes de hibridación genómica comparada 69

2.7.1 Análisis de imágenes, medición de intensidad de fluorescencia e identificación de regiones cromosómicas de ganancia/pérdida relativa de ADN 69

2.7.2 Establecimiento de valores límite de ganancia/pérdida de ADN en CGH 70

RESULTADOS 72

IV: 1 Caracterización citogenética de los ejemplares 73

IV: 1.1 Rendimiento de cultivos y número cromosómico 73

IV: 1.2 Técnicas de bandas cromosómicas para la determinación de especie 76

IV: 1.3 Análisis de homologías cromosómicas entre *Homo sapiens* y las especies de interés 88

IV: 2 Heterocromatina y valor C 94

IV: 2.1 Proporción de Heterocromatina 94

IV: 2.2 Valor C 96

IV: 2.3 Variación del tamaño del genoma y porcentaje de heterocromatina en el cariotipo de las especies de *Cebus* y *Ateles* *98*

IV: 3 Comparaciones genómicas: CGH entres especies de *Cebus* y *Ateles* 99

IV: 3.1 Sondas genómicas 99

IV: 3.2 Determinación de los límites del rango dinámico de hibridación: *A. chamek* vs *A. chamek* y *C. nigritus* vs *C. nigritus* *100*

IV: 3.3 Hibridación genómica comparada entre especies de *Ateles* con diferencias en valor C 101

IV: 3.4 Hibridación genómica comparada entre especies de *Cebus* *116*

DISCUSIÓN 122

V: 1 Cariología 123

V: 1.1 Homologías cromosómicas entre especies 124

1.1.1 Cromosoma Y 126

V: 1.2 Heterocromatina 128

V: 1.3 Cariología y Sistemática de los monos capuchinos: *Cebus* vs. *Cebus* y *Sapajus* *131*

V: 2 Tamaño del genoma 132

V: 2.1 Tamaño de genoma y Heterocromatina 134

2.1.1 Variación del tamaño del genoma y porcentaje de heterocromatina en el cariotipo de las especies de interés 134

2.1.2 Variación del tamaño del genoma y composición heterocromática 139

V: 2.2 Localización cromosómica de las diferencias en el tamaño del genoma entre las especies de *Cebus y Ateles 140*

2.2.1 Diferencias cuantitativas de ADN en regiones eucromáticas 146

2.2.2 Diferencias cuantitativas de ADN en el cromosoma Y 147

V: 3 Divergencia de especies en *Cebus y Ateles* *150*

V: 3.1 Respecto de citogenética molecular, heterocromatina y tamaño del genoma 150

V: 3.2 respecto de la biogeografía histórica 151

V: 4 Conclusiones finales 156

BIBLIOGRAFÍA 157

ANEXO 170

Índice de Figuras

Figura 1: Variación del valor C entre algunos de los principales grupos de seres vivos.

Figura 2: Distribución geográfica y filogenia de los primates neotropicales.

Figura 3: Especies del género *Ateles* y su distribución geográfica.

Figura 4: Especies del género *Cebus* y su distribución geográfica.

Figura 5: Hipótesis filogenéticas propuestas para el género *Ateles*.

Figura 6: Procedimientos generales.

Figura 7: Diagrama de procedimientos de CGH.

Figura 8: Rango dinámico de hibridación y límites superior e inferior (Li-Ls) en relación a los valores de intensidad de fluorescencia rojo: verde.

Figura 9: Cariotipo con bandas G-Wright de las especies de *Ateles* analizadas.

Figura 10: Cariotipo con bandas G-Wright de las especies de *Cebus* analizadas.

Figura 11: Ideograma y las variantes cromosómicas previamente descritas, observadas en los ejemplares de *Ateles* analizados.

Figura 12: Fenotipo externo del ejemplar de *Cebus xanthosternos* analizado en este trabajo.

Figura 13: Ideograma de bandas C e identificación de bloques de heterocromatina en los cromosomas de *Ateles chamek, A. belzebuth, A. geoffroyi* y *A. paniscus.*

Figuras 14: Identificación de bloques de heterocromatina en los cromosomas de las especies de *Cebus* analizadas y esquema de variantes de los bloques heterocromatínicos en las distintas especies.

Figura 15: Algunas de las variantes polimórficas en los bloques heterocromáticos de *Cebus cay* y *C. nigritus.*

Figura 16: Bandas DAPI-CMA3 en las especies de *Ateles* analizadas.

Figura 17: Bandas DAPI-CMA3 en las especies de *Cebus* analizadas.

Figura 18: Homologías cromosómicas entre *Ateles chamek* y *Homo sapiens.*

Figura 19: Ideograma de *Ateles chamek* mostrando las homologías con los cromosomas humanos.

Figura 20: Homologías cromosómicas entre *Cebus* sp. y *Homo sapiens.*

Figura 21: Ideograma de *Cebus cay* mostrando las homologías con los cromosomas humanos.

Figura 22: Análisis de homologías en el cromosoma Y de *Cebus* y *Ateles* con sondas humanas: Xpter-Ypter y Xqter-Yqter.

Figura 23: Análisis de homologías en el cromosoma Y de *Cebus* y *Ateles* con sondas humanas: gen ZFY.

Figura 24: Porcentaje de heterocromatina y valor C en las especies de *Cebus* y *Ateles.*

Figura 25: Sondas genómicas de *Ateles* utilizadas en CGH.

Figura 26: CGH entre especies de *Ateles* con diferencias de valor C: *A. chamek vs. A. paniscus y A. chamek vs. A. geoffoyi.*

Figura 27: CGH entre especies de *Ateles* con diferencias de valor C: *A. belzebuth* vs. A. *geoffroyi* y *A. belzebuth vs. A. paniscus*.

Figura 28: Análisis de CGH entre *Ateles chamek y A. paniscus* en los cromosomas de *A. chamek.*

Figura 29: Análisis de CGH entre *Ateles chamek y A. paniscus* en los cromosomas de *A. paniscus.*

Figura 30: Análisis de CGH entre *Ateles chamek y A. geoffroyi* en los cromosomas de *A. chamek.*

Figura 31: Análisis de CGH entre *Ateles chamek y A. geoffroyi* en los cromosomas de *A. geoffroyi.*

Figura 32: Análisis de CGH entre *Ateles belzebuth y A. geoffroyi* en los cromosomas de *A. belzebuth.*

Figura 33: Análisis de CGH entre *Ateles belzebuth y A. geoffroyi* en los cromosomas de *A. geoffroyi.*

Figura 34: Análisis de CGH entre *Ateles belzebuth y A. paniscus* en los cromosomas de *A. paniscus.*

Figura 35: CGH entre *Cebus nigritus y C. xanthosternos.*

Figura 36: CGH entre *Cebus nigritus* y *C. olivaceus.*

Figura 37: Análisis de CGH entre *Cebus nigritus y C. xanthosternos* en los cromosomas de *C. nigritus*.

Figura 38: Análisis de CGH entre *Cebus nigritus y C. xanthosternos* en los cromosomas de *C. xanthosternos.*

Figura 39: Análisis de CGH entre *Cebus nigritus y C. olivaceus* en los cromosomas de C. *nigritus.*

Figura 40: Análisis de CGH entre *Cebus nigritus y C. olivaceus* en los cromosomas de *C. olivaceus.*

Figura 41: Optimización del carácter cuantitativo "Tamaño de genoma (pg.)" para la hipótesis filogenética de Morales-Jimenez et al. (2015) del género *Ateles.*

Figura 42: Explicación compatible con la observación de regiones heterocromáticas con diferencias de ADN.

Figura 43: Hipótesis biogeográfica propuesta por Morales-Jimenez y colaboradores (2015) para las especies de *Ateles.*

Figura 44: Hipótesis biogeográfica propuesta por Lynch Alfaro y colaboradores (2012) para las especies de *Cebus.*

Índice de Tablas

Tabla 1: Individuos analizados en esta tesis y material biológico inicial.

Tabla 2: Otros ejemplares analizados en esta tesis, pertenecientes a otros géneros de Platyrrhini.

Tabla 3: Conjunto de sondas de ADN utilizadas en esta tesis en hibridación *in situ* fluorescente.

Tabla 4: Resultados de cultivos celulares de los ejemplares de *Ateles.*

Tabla 5: Resultados de cultivos celulares de los ejemplares de *Cebus.*

Tabla 6: Porcentaje de heterocromatina en el complemento cromosómico de las especies de *Ateles* analizadas.

Tabla 7: Porcentaje de heterocromatina en el complemento cromosómico de las especies de *Cebus* analizadas.

Tabla 8: Cuantificación del valor C de las especies muestreadas pertenecientes a los géneros *Cebus, Ateles, Alouatta, Saimiri* y *Aotus.*

Tabla 9: Sondas genómicas elaboradas para CGH.

Tabla 10: Valores estimados para el rango dinámico de hibridación en CGH "control" *Ateles chamek* vs *A. chamek* y *Cebus nigritus* vs. *C. nigritus.*

Tabla 11: Experimentos de CGH realizados entre las especies de *Ateles.*

Tabla 12: Experimentos de CGH realizados entre las especies de *Cebus.*

Tabla 13: Coeficiente de correlación lineal de Pearson, *r*, para las variables tamaño de genoma y porcentaje de heterocromatina en el cariotipo de las especies de *Cebus* y *Ateles* analizadas.

Tabla 14: Diferencias de valor C expresadas en megabases (Mb) entre las especies de *Ateles* y *Cebus* analizadas mediante CGH.

Introducción

Los primeros estudios cromosómicos en Primates en la Argentina se desarrollaron en la década de 1980, tratándose de descripciones a nivel de especie con ejemplares mantenidos en zoológicos y bioterios (Mudry de Pargament and Labal de Vinuesa, 1988; Mudry et al., 1987; Mantecón et al., 1984). Algunas de estas especies se utilizaban como modelo de estudios biomédicos por su cercanía filogenética con el humano, dando lugar a investigaciones básicas y aplicadas. En los siguientes 20 años se produjo un salto notable, tanto metodológico como de marco teórico, con la incorporación y establecimiento de la línea de investigación en el Grupo de Investigación en Biología Evolutiva (GIBE), al considerar el nivel poblacional en la discusión acerca de qué es una especie y las relaciones evolutivas entre ellas. Se profundizó en el conocimiento de los reordenamientos de valor evolutivo en las especies de Argentina a partir de la descripción de polimorfismos de heterocromatina –una característica distintiva en algunos géneros–, al mismo tiempo que se describieron reordenamientos estructurales particulares, tales como los sistemas de determinación sexual, caracterizados mediante estudios meióticos, y el análisis de conservación genómica utilizando Hibridación *In situ* Fluorescente (FISH) (Steinberg et al., 2014; Nieves et al., 2011; Steinberg et al., 2009; Nieves et al., 2005; Martinez et al., 2002; Mudry et al., 2001; Ponsà et al., 1995).

Durante los últimos 30 años, el desarrollo de esta línea de trabajo y sus matices ha producido una importante acumulación de datos citogenéticos de los primates de Argentina y los países limítrofes, que no sólo ha resultado en una amplia producción científica, sino que también ha permitido el desarrollo de nuevas preguntas así como el establecimiento de posibles patrones de análisis. Entre ellos, se ha establecido que la diversidad cariotípica de los primates neotropicales que en el GIBE se han analizado se podría clasificar en, al menos, dos grupos que parecen mostrar patrones de divergencia citogenéticos diferentes: Por un lado, aquellos géneros en los cuales los reordenamientos cromosómicos predominantes son las fusiones y fisiones, y presentan sistemas múltiples de determinación sexual, de los cuales los géneros *Aotus* y *Alouatta* representan ejemplos conocidos de este caso (Steinberg et al., 2014; Oliveira et al., 2002; Mudry et al., 2001; Torres et al., 1998; entre otros). Por el otro, aquellos grupos donde las inversiones paracéntricas y pericéntricas, y la variación en heterocromatina constituyen los cambios distintivos, de los que *Ateles*, *Cebus* y *Saimiri* son ejemplos distintivos (Nieves et al., 2005; García et al., 2003, 2002; Medeiros et al., 1997; Mudry, 1990; Moore et al., 1990; Dutrillaux B et al., 1978; Ma and Jones, 1975; entre otros).

Como anticipa el título de este trabajo, el desarrollo principal de esta tesis se enmarca en dicha línea de investigación, dentro de la Citogenética, es decir el análisis de las características cromosómicas de las especies –en particular de ciertas especies de primates neotropicales con características cariotípicas peculiares–. Sin embargo, el aporte original aquí presentado consiste en la incorporación de

datos no tradicionalmente considerados en las comparaciones citogenéticas: la cantidad total de ADN involucrada en la conformación de los cariotipos en cada caso comparado. De esta manera, se ha llevado a cabo un estudio que involucra dos niveles distintos de análisis, el genómico y el cromosómico, que no sólo los interpela sino que también busca complementarlos entre sí.

Así, el desarrollo de esta tesis gira en torno de tres grandes ejes: A nivel genómico, el genoma, su análisis cuantitativo y su evolución, por un lado; a nivel cromosómico: el análisis citogenético y las comparaciones entre especies, por otro lado; y por último, el modelo particular elegido, los primates neotropicales –y particularmente como se explicará y justificará más adelante, los géneros *Cebus* y *Ateles*–. De esta manera, la siguiente introducción es presentada desde estos tres aspectos, los cuales serán desarrollados a lo largo del trabajo y luego serán retomados en la discusión.

I: 1 SOBRE EL GENOMA

I: 1.1 ¿Qué es un genoma?: Una breve disgresión etimológica

El gran desarrollo de disciplinas como la Biología, y en particular dentro de ella la Genética, ha sido uno de los aspectos científicos más característicos de por lo menos el último medio siglo. Incluso, en los últimos 25 años, las nociones de ADN, genes y genoma se han vuelto conceptos biológicos casi o tan cotidianos como el de evolución, ya no sólo en boca de académicos y científicos sino también de periodistas y comunicadores, estudiantes de todos los niveles y curiosos en general. El advenimiento de las técnicas de secuenciación de ADN, la clonación, los alimentos transgénicos, las herramientas biotecnológicas, el proyecto genoma humano, entre muchos otros, son algunos de los desarrollos científico-técnicos que dan cuenta del gran impacto y crecimiento de este área del conocimiento.

Sin embargo, el estudio del genoma no es una novedad que haya surgido aparejada a lo que puede ser considerado el inicio de todo este gran desarrollo en las ciencias biológicas –el descubrimiento de la estructura del ADN por Watson y Crick en 1953–, sino que tiene antecedentes que se remontan varios años atrás, cuando los esfuerzos en biología estaban más abocados al estudio de las células bajo microscopía. Así, el término "*genoma*" fue acuñado en 1920 por el botánico Hans Winkler como un acrónimo de las palabras *gen* y *cromosoma*. En este sentido original del término, "*genoma*" hace referencia, entonces, al conjunto cromosómico haploide que caracteriza a una especie. Tiempo después, esta conceptualización del término fue cuestionada y ligeramente modificada: Rieger et al. (1991) definieron "*genoma*", en eucariotas, como el conjunto cromosómico básico (monoploide) que consta de un número especie-específico de grupos de ligamiento y los genes contenidos en ellos. Sin

embargo, el uso actual del término genoma no se encuentra restringido a las definiciones estrechas de Winkler ni las de Rieger y colaboradores, sino que "*genoma*" puede ser usado en sentidos más o menos inclusivos (Greilhuber et al. 2005).

Una lectura alternativa interpreta la etimología del término como una combinación de *gen* y el sufijo –*oma* (en inglés –*ome*), significante del conjunto de todas las unidades que forman un todo –en este caso, la colectividad de los genes de una célula o especie– (Lederberg and McCray, 2001). En relación a esta etimología alternativa, junto con el advenimiento de la genómica y la era post-genómica, resulta claro que el término parece ahora estar más relacionado con secuencias de bases en el ADN y sus constructos, los genes, más que con una denominación citológica como la conceptualización inicial de Winkler. Ambas explicaciones etimológicas son legítimamente válidas, y hacen referencia a aspectos diferentes, aunque no incompatibles, en la comprensión de los genomas.

A propósito de este trabajo esta breve digresión sobre etimologías alternativas cobra relevancia porque, como será expuesto más adelante, buena parte de los objetivos de esta tesis se basan en aspectos que las interpelan en sus dos sentidos. En primer lugar, porque se toman en consideración aspectos cuantitativos del genoma, considerando la masa total por célula, característica de una especie; en segundo lugar, porque estos aspectos cuantitativos se analizan desde una perspectiva citogenética, considerando además el ordenamiento particular del genoma en superestructuras discretas, los cromosomas.

I: 1.2 Una caracterización cuantitativa: El valor C o tamaño del genoma

Al considerar el genoma de un conjunto de especies cercanamente emparentadas el análisis de las diferencias en los mismos puede abordarse, al menos, desde dos niveles de análisis —uno cualitativo y otro cuantitativo— ya sea abarcando pequeñas regiones génicas o bien involucrando reorganizaciones y reconstrucciones a gran escala. Los aspectos cualitativos serían aquellos que hacen referencia, por ejemplo, a nivel molecular, a la secuencia de bases en el ADN o las proteínas específicas que interactúan con dicha secuencia, y a nivel cromosómico, aquellos que describen la morfología de los cromosomas, el patrón de bandas cromosómico característico de una especie, o el sistema de determinación sexual, entre muchas otras variables de interés, no mensurables numéricamente. Por el contrario, al referirnos a aspectos cuantitativos de interés en el análisis de un genoma, podemos mencionar variables a nivel molecular como proporción de bases o frecuencia de aparición de una determinada unidad de repetición, y número cromosómico, relación de brazos o proporción de heterocromatina versus eucromatina a un nivel cromosómico, entre otras variables cuantitativas. Una

de estas últimas, que ha resultado de gran interés, es el tamaño del genoma, es decir la cantidad o masa total de ADN contenida en un núcleo celular.

El tamaño del genoma, en términos prácticos, refiere a la *masa* del genoma (generalmente en picogramos) o a su *longitud* (expresado en pares de bases). Estas unidades de medida son intercambiables debido a que la masa de un único par de bases es sabida, de manera que:

(I) Número de pares de bases = masa ADN (pg) x 0,9869 x 10^9

En muchos casos, "*tamaño del genoma"* puede ser usado como sinónimo de *"valor C"*. Sin embargo, es importante destacar que ambos términos emergieron de marcos teóricos completamente diferentes (Gregory 2002). Examinando la literatura sobre el tema es posible notar que el término *"tamaño del genoma"* ha sido utilizado con diferentes significados. Se lo ha utilizado tanto para el contenido de ADN del complemento cromosómico completo (con número cromosómico *n*), para el que otros también utilizan "valor C", así como para el contenido de ADN de un set cromosómico monoploide (con número de cromosomas *x*) (Greilhuber et al. 2005). Cabe destacar que solo si se trata de especies diploides los términos *"tamaño del genoma"* y *"valor C"* serán equivalentes, no así para especies poliploides. Al analizar sólo especies diploides, en este trabajo se hará referencia a la primera acepción mencionada, utilizando tamaño del genoma y valor C como conceptos sinónimos al aludir a la masa de ADN contenida en el complemento cromosómico haploide, con número cromosómico *n*.

Definido de esta manera el valor C es, entonces, una variable especie-específica. Su determinación se ha realizado desde mediados del siglo XX (Vendrely & Vendrely, 1949) y con el tiempo, y gracias a la ampliación de los datos a un mayor número de especies, se ha convertido en un parámetro citológico en el análisis e interpretación de los procesos evolutivos (Redi & Capanna 2012; Gregory 2004; Cavalier-Smith 1982; Pellicciari et al. 1982; Manfredi Romanini 1973). Incluso a nivel de Orden y Supra Orden el valor C resulta una herramienta citotaxonómica muy útil (Redi & Capanna 2012)

El tamaño del genoma de una gran cantidad de taxones varía en un amplio rango aunque sin estar correlacionado con el nivel de complejidad organísmica (considerando esta última como una aproximación del número de genes de una especie) **(Figura 1)**. En 1971, Thomas describió este desconcertante (y aparente) problema como "la paradoja del valor C": Por ese entonces se esperaba un mayor número de genes a mayor complejidad del organismo, y se asumía que la constancia de ADN en el núcleo de una célula resultaba de la suma de todos los genes (y nada más que todos los genes de una especie). Sin embargo, la paradoja fue resuelta con el descubrimiento de que la mayor parte del ADN en el núcleo eucariota es de tipo no codificante. A partir de entonces, y debido a que la variación en valor C

no deja de ser un tema complejo, la "paradoja del valor C" ha sido reformulada por Gregory (2001) como "el enigma del valor C", según el cual no existe una relación entre tamaño de genoma y número de genes o complejidad organísmica.

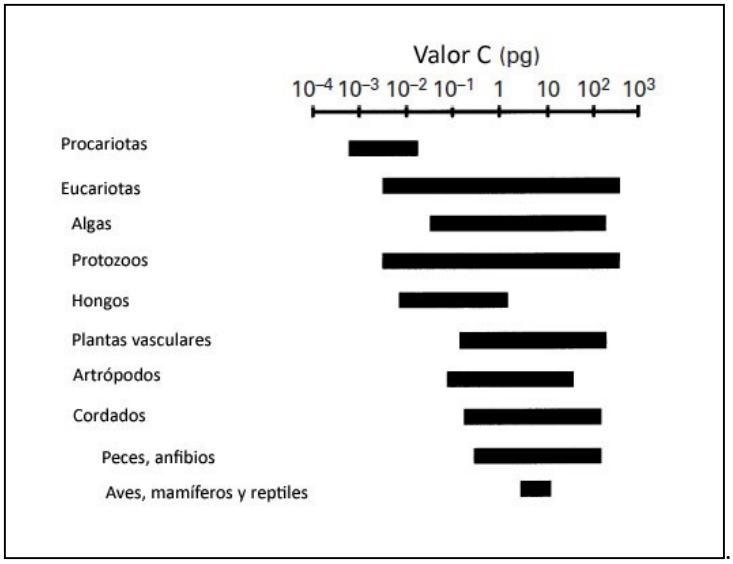

Figura 1. Variación del valor C entre algunos de los principales grupos de seres vivos. *Tomado de Gregory, 2001.*

Uno de los aspectos de interés del "enigma" se relaciona con el rango de variación del valor C, el cual no se distribuye aleatoriamente entre grupos y aparece como el resultado de procesos diferentes –algunos claramente saltacionales, como la poliploidización-. Sin embargo, cuando las diferencias en el contenido de ADN no son suficientemente significativas como para considerarlas en términos de duplicaciones o amplificaciones masivas dicha variación no es fácilmente interpretable. A su vez, la variación, generalmente pequeña, del tamaño del genoma entre especies cercanas es consistente con mecanismos de diversificación del cariotipo, por ejemplo fusiones y fisiones cromosómicas (Ronchetti et al., 1993).

En términos de composición, la mayor parte de la variación en el valor C es atribuida a la fracción repetitiva del genoma, siendo su redundancia la clave para entender la evolución del tamaño del genoma (Redi et al. 2001). En la mayoría de los mamíferos, las regiones codificantes constituyen meramente el 2% del genoma. El resto está compuesto de porciones equivalentes de ADN repetitivo y secuencias únicas, generalmente de función desconocida. Son estos elementos repetitivos ubicuos,

citogenéticamente detectables o no, quienes darían cuenta de los tamaños de genomas variables entre taxones cercanamente relacionados (Redi and Capanna 2012).

Así entendida, la problemática del valor C engloba preguntas relevantes en relación a la variación en el tamaño del genoma. Estas preguntas incluyen: ¿qué tipo de ADN es responsable de los diferentes tamaños de genoma? ¿Cuál es el origen y cómo es la transferencia intra- e intergenómica de este ADN? Y por último ¿cuáles son, si es que existen, las funciones (a cualquier nivel de organización) que estas secuencias de ADN poseen? Como se expondrá más adelante, el desarrollo de esta tesis se enmarca dentro de la primera pregunta del enigma desde una perspectiva citogenética.

I: 1.3 El tamaño del genoma importa

La masa es tal vez una de las propiedades más fundamentales de cualquier entidad física. Expresado como una cantidad en picogramos (1 pg=10^{-12}g) o en número de pares de bases (1 pg = 978 Mb), el tamaño del genoma posee una importancia significativa en genómica así como en los análisis de biodiversidad basados en la caracterización de genomas completos, ya que es una característica primordial de la estructura del mismo (Gregory et al. 2007). Tal es así que una apropiada caracterización cualitativa y cuantitativa del genoma es deseable previo al comienzo de cualquier proyecto de secuenciación, a modo de estimación de tiempo y costos *grosso modo.* De hecho, las estimaciones del tamaño del genoma han sido citadas como uno de los criterios de selección de los futuros proyectos de secuenciación en especies de insectos, junto con la importancia en la biodiversidad, impacto sobre la salud humana de la especie de interés, y aplicaciones en biotecnología y agricultura, como otros criterios importantes (Evans y Gundersen-Rindal 2003).

El tamaño del genoma como variable a analizar también reviste importancia en otras disciplinas, como Evolución y Desarrollo (o como se la conoce en inglés, *evo-devo*). Así ha sido considerado por Jenner y Wills (2007), por ejemplo, en una revisión acerca de los criterios a tomar en cuenta para la incorporación de nuevos modelos de estudio en *evo-devo*. Los autores destacan que, debido a los costos que impone una secuenciación completa de genoma, existe la posibilidad de que muchas de las conclusiones generales sobre la evolución del genoma y sus correlatos genéticos, morfológicos, fisiológicos y ecológicos, sean, en realidad, particularidades de los genomas pequeños que efectivamente han sido secuenciados en su totalidad. Las bases genéticas del desarrollo tienen implicaciones obvias para la medicina, así como también el conocer las bases genéticas de agentes causantes de enfermedades, de manera que el tamaño del genoma es visto, cada vez más, como una variable importante. En relación a esto resulta interesante mencionar, por ejemplo, las conclusiones de

Projan (2007) en cuanto a los genomas de las bacterias, según las cuales el fenotipo de resistencia a múltiples antibióticos es función del tamaño del genoma de la bacteria –una conclusión que algunos han cuestionado por ser casi tan obvia como trivial, pero que no ha sido articulada sino recientemente, al no considerarse un mayor set de datos que incluya bacterias con mayor y menor tamaño de genoma-.

Por otro lado, incluso los análisis genéticos de menor escala parecen estar influidos por la cantidad de ADN nuclear, por lo que el conocimiento de esta variable vuelve a destacar su importancia. Por ejemplo, se ha demostrado un fuerte efecto negativo del tamaño del genoma en las amplificaciones de microsatélites por PCR (Garner, 2002). Posteriormente, Barbará y colaboradores (2007) demostraron que las posibilidades de una transferencia exitosa de marcadores microsatélites nucleares entre distintas especies son mayores cuando el tamaño del genoma en la especie diana es pequeño en comparación con la especie de origen del marcador. El aumento del tamaño del genoma de la nueva especie diana podría afectar negativamente el rendimiento de la amplificación debido a que disminuye la relación entre "ADN blanco: ADN no blanco", o bien a un efecto de dilución del *primer* disponible debido a uniones inespecíficas (Barbará et al., 2007; Garner, 2002).

I: 1.4 Sobre el valor C: patrón de variación en animales y sus efectos

La mayoría de las preguntas inherentes al valor C requieren para su respuesta una gran cantidad de datos de tamaño de genoma de amplia diversidad taxonómica. Para los eucariotas se ha reportado que el tamaño del genoma varía alrededor de 300.000 veces, siendo la ameba la especie con mayor valor C registrado: 700pg. En el Reino Animal, el tamaño del genoma oscila unas 3.300 veces, y sólo en los vertebrados esta variación es de al menos 350 veces (Gregory, 2004, 2015).

Para los mamíferos, la media del valor C es aproximadamente 3,5 pg, con un mínimo de 1,73 pg. en el murciélago de cueva *Miniopterus schreibersi* (Mammalia: Chiroptera) (Kato et al., 1980) y un máximo de 8,40 pg. en la rata vizcacha colorada *Tympanoctomys barrerae* (Mammalia: Rodentia) (Gallardo et al., 1999). El valor C del humano, junto con el de otros primates, muestra en general poca variación, con valores cercanos a la media de los mamíferos (de hecho, el tamaño del genoma humano es 3,5pg) (Gregory, 2004, 2015).

Desde las primeras investigaciones sobre el patrón de variación del valor C, aquí ligeramente expuestas, se destacó la relación entre tamaño de genoma y tamaño celular (Mirsky & Ris, 1951). Esta relación es el efecto más universal de un aumento en el tamaño de genoma, comprobado en protistas, plantas, invertebrados, anfibios, reptiles, peces, aves y mamíferos (Dufresne & Jeffery, 2011 y

referencias alli incluídas), siendo el ejemplo más ilustrativo y evidente de esta relación el caso de las especies poliploides, que muestran células de mayor tamaño que las especies con ellas emparentadas (Gregory, 2002a). El tamaño de genoma tiene, además, efectos positivos en el tamaño del núcleo celular, y negativos en la tasa de división celular –es decir, los genomas más grandes (¿o mejor dicho pesados?)– se encuentran en células grandes de división lenta (Gregory, 2004). Algunas hipótesis se han propuesto para explicar estas relaciones, las cuales serán presentadas y brevemente explicadas en la siguiente sección de esta Introducción *(I: 1.5 Evolución del tamaño del genoma: algunas explicaciones).*

El tamaño celular, y por extensión el tamaño del genoma, está potencialmente relacionado a varios parámetros a nivel organísmico. Uno de ellos, y tal vez el más obvio y directo, es el tamaño corporal, pues los cuerpos de los animales están compuestos de células. De hecho, en diversos grupos invertebrados, el tamaño del genoma está correlacionado positivamente con el tamaño corporal, aunque ésta no sea una regla universal y no aplique a muchos otros taxones (Gregory et al., 2000).

En cuanto a la tasa metabólica se ha encontrado una clara correlación inversa con el tamaño del genoma/tamaño celular en mamíferos y aves (Gregory, 2002b, 2000; Vinogradov, 1995). La hipótesis que se ha propuesto para explicar esta relación tiene que ver con las fuertes restricciones sobre el tamaño celular impuestas por las demandas metabólicas de la homotermia. Por otro lado, también se han hallado correlaciones negativas entre el tamaño del genoma y la tasa de desarrollo, tasa de crecimiento y regeneración de miembros en varios grupos, especialmente anfibios y plantas (Gregory, 2002c, 2002d; Roth et al., 1994).

Si bien los efectos a nivel celular de los cambios en el tamaño del genoma parecen, en muchos ejemplos, ser universales, las implicancias específicas a nivel organísmico varían en demasía de acuerdo a la biología del grupo particular en cuestión. Identificar los efectos específicos de la variación del tamaño del genoma en distintos animales es otra de las grandes cuestiones en relación al llamado enigma del valor C.

I: 1.4.1 Variación del tamaño del genoma en Primates y sus efectos

En el Orden Primates la norma es observar una escasa variabilidad en la cantidad de ADN nuclear (Manfredi Romanini, 1972; Pellicciari et al., 1982). Desde sus inicios, el análisis del tamaño del genoma en Primates fue tomado como un elemento a considerar tanto en sí mismo para el establecimiento del estatus taxonómico de una especie, así como un elemento portador de un significado más amplio en relación a la variabilidad cariotípica (Manfredi Romanini, 1972). Así, contenido de ADN y variables cariotípicas, se proponían como parámetros a usar concurrente y comparativamente al analizar mecanismos subyacentes a la especiación en este Orden (Pellicciari et al., 1982).

Los primeros análisis se enfocaron en la relación del tamaño del genoma con características citogenéticas básicas como el número y morfología cromosómica (a través del número fundamental, por ejemplo), encontrándose que la evolución dentro de los diferentes grupos de primates –lémures, monos del nuevo mundo y monos del viejo mundo, por ejemplo– se produjo afectando cada parámetro de distintas maneras (Manfredi Romanini, 1972; Pellicciari et al., 1982; Ronchetti et al., 1993). Sin embargo, lo que resultó evidente de estos primeros análisis es que la especiación en los Platyrrhini (monos del nuevo mundo, ver *Introducción I:3*) parece haber sido acompañada de importantes cambios cuantitativos en el genoma. De estos primeros trabajos en el tema, y en cierta forma a modo de corolario, surgió la propuesta de que las modificaciones cuantitativas en la heterocromatina habrían sido las causales del aumento general del tamaño del genoma en algunas especies de primates (Formenti, 1975; Pellicciari et al., 1982, 1988, 1990; Ronchetti et al., 1993).

En este sentido, posteriormente fue comprobado para ciertos grupos de primates una correlación directa entre el contenido de ADN nuclear y la presencia de heterocromatina (Pellicciari et al., 1988; Manfredi Romanini et al., 1991; Ronchetti et al., 1993). Esta correlación entre cantidad de ADN nuclear y heterocromatina se ha visto, asimismo, en roedores (Gamperl et al., 1982; Walker et al., 1991).

Como se mencionó previamente, las relaciones y los efectos del tamaño del genoma en características celulares y organísmicas son complejas y muy dependientes de la biología del grupo estudiado en particular. Según Morand & Ricklefs (2005), si fuera cierto que el tamaño del genoma ejerce alguna influencia sobre características importantes de un organismo como la tasa de desarrollo de sus células y la tasa metabólica, esto tendría consecuencias en la aptitud para el organismo y probablemente restringirían la evolución del tamaño del genoma. Siguiendo este razonamiento, analizaron la relación entre la variación del tamaño del genoma en el Orden Primates con la variación

en características de historia de vida entre las especies (tales como masa corporal, masa cerebral, tiempo de gestación, edad de la madurez sexual y la longevidad), pero no obtuvieron resultados que apoyen una relación entre ambas tipos de variables (Morand and Ricklefs, 2005).

En los Primates, la mayor parte de la variación en el tamaño del genoma hasta ahora registrados está concentrada al nivel taxonómico de géneros dentro de familias (Gregory, 2015; Morand and Ricklefs, 2005). Sin embargo, las características relacionadas con la historia de vida muestran una amplia variación, incluso a nivel de especies dentro de géneros. La amplia diferencia en el orden de magnitud de la variación entre valor C y los rasgos de historia de vida sugiere que estos últimos no se encontrarían influenciados por el tamaño del genoma, a la vez que advierte sobre la posible existencia de otro tipo de restricciones en la regulación del tamaño del genoma, por ejemplo metabólicas (Morand and Ricklefs, 2005).

I: 1.5 Evolución del tamaño del genoma: algunas explicaciones

A pesar de que la temática no es ni nueva ni trivial, el origen y las consecuencias evolutivas de la variación del tamaño del genoma continúan siendo discutidos en los últimos años (Redi y Capanna, 2012; Lynch, 2011, 2007; Oliver et al., 2007; Cavalier-Smith, 2005, 1982; Gregory, 2004, 2001; Lynch and Conery, 2003; Petrov, 2002, 2001).

Como la presencia de ADN no codificante ha sido de las primeras y principales razones identificadas como posible explicación a la variación del tamaño del genoma, uno de los aspectos más ampliamente abordados en las interpretaciones consiste, justamente, en los mecanismos mediante los cuales estas secuencias de ADN se han originado y son mantenidas diferencialmente en los genomas eucariotas. En este sentido, dos tipos de explicaciones han sido propuestas: las hipótesis de ADN "basura" (del inglés *junk DNA*) y las hipótesis adaptativas (Petrov, 2002, 2001; Ohno, 1972, 1970; Cavalier-Smith, 2005, 1982). En ambos tipos de explicaciones, de una u otra forma, se apela a la selección natural actuando a nivel celular u organísmico como el mecanismo modulador de la variación en valor C.

Posteriormente, la variación del tamaño del genoma fue considerada más allá de la cuestión de la función (o la falta de función) del ADN no codificante, apelándose también a la importancia de mecanismos de evolución neutral como la deriva génica (Lynch and Conery, 2003; Petrov, 2001). Esta idea considera que el tamaño poblacional determina el tamaño del genoma, a partir de que en aquellas especies con poblaciones pequeñas las mutaciones que aumentan el tamaño del genoma podrían

fijarse, mientras que en especies con poblaciones más grandes, en las cuales operaría más eficientemente la selección natural, estas mutaciones serían eliminadas.

I: 1.5.1 Nunca menos: El tamaño del genoma en aumento

Por un lado, como se mencionó anteriormente, es posible reconocer hipótesis basadas en el aumento del tamaño del genoma como consecuencia de la expansión de ADN denominado "egoísta" o ADN denominado "basura". En conjunto, estas hipótesis proponen que en ausencia de restricciones selectivas los genomas tienden, en el transcurso del tiempo, a aumentar de tamaño. Según estas explicaciones, existe una presión de mutación que actúa constantemente aumentando el valor C, siendo tolerantes a un nivel mayor de acumulación de ADN sólo aquellas especies que poseen células grandes o que se dividen lentamente. El tamaño del genoma resultante sería, entonces, un producto entre el aumento por mutación y la tolerancia del organismo al ADN no codificante gravoso.

Dentro de este grupo están incluídas las explicaciones que consideran al ADN no codificante literalmente como sobras o basura genética, por un lado, y aquellas que lo consideran como ADN "egoísta" por el otro. Ambos conceptos (ADN basura y ADN egoísta) son ahora bastante discutibles, sobre todo por su uso extendido para referirse a ADN no codificante por antonomasia. Estrictamente, el ADN "basura" hace referencia a los pseudogenes, es decir, las copias extintas no funcionales de genes codificantes. En cuanto el término "egoísta" hace referencia a fragmentos de ADN que se replican como si fueran "parásitos" del genoma hospedador, entre ellos los cromosomas B y los elementos transponibles.

La "hipótesis del ADN basura" para la evolución del tamaño del genoma fue desarrollada a partir de las discusiones de Susumu Ohno acerca del rol en la evolución de las duplicaciones génicas (Ohno, 1972). Si bien su planteo original considera a la duplicación génica como un pre-requisito en la diversificación evolutiva del genoma, Ohno (1970) destacó que la mayor parte de las mutaciones en los genes duplicados no redundan en nuevas funciones sino en la inactivación, en una transición a lo que él denominó "ADN basura". De esta manera, los genomas tenderían a aumentar su tamaño constantemente hasta el punto que éste redunde en un efecto negativo.

En el mismo sentido, se proponen las hipótesis que identifican a ciertas porciones de ADN como "egoísta", según las cuales la expansión de unidades autorreplicantes produciría también un aumento constante del tamaño del genoma sólo restringido cuando esta masa genética se vuelve insostenible para la célula "huésped" (Szathmáry & Smith, 1995; Doolittle & Sapienza, 1980). Las células

grandes y de división lenta serían las más tolerantes a estas expansiones. Ambos tipos de hipótesis, entonces, consideran la relación entre tamaño de genoma, volumen celular y tasa de división celular como meramente coincidentes.

I: 1.5.2 Genoma a medida: Hipótesis del tamaño óptimo de ADN

Este grupo de teorías consideran que el ADN posee roles tanto cualitativos como cuantitativos en la determinación de la aptitud del organismo, siendo el valor C un reflejo de la optimización por selección natural. El énfasis en estas explicaciones está puesto no tanto en el origen del ADN que da cuenta de los diferentes tamaños de genoma, sino en el mantenimiento diferencial de esta variabilidad en las diferentes especies. Cabe destacar que la identificación de estas teorías como del "tamaño óptimo del genoma" no quiere decir que el contenido de ADN nuclear sea estrictamente el óptimo, sino que estas explicaciones se diferencian de las anteriores en la forma en que explican la relación entre el tamaño del genoma y tamaño celular.

En primer lugar podemos mencionar a la teoría nucleoesqueletal, presentada por Cavalier-Smith (1978) como la solución a la paradoja del valor C. Según esta teoría el ADN no codificante sirve como un "nucleoesqueleto" alrededor del cual el núcleo celular está montado, de forma tal que la cantidad de ADN no codificante y su empaquetamiento influye sobre el tamaño nuclear. De esta manera, el volumen celular estaría determinado genéticamente, mediante una modulación asociada al volumen nuclear. Desde esta perspectiva, la masa de ADN ejerce un efecto causal en los parámetros celulares y está, por lo tanto, sujeto a una modulación adaptativa por selección natural operando a través de fenotipos celulares y organísmicos. De manera similar, se ha propuesto el término "nucleotipo" para enunciar aquellas condiciones del núcleo que afectan el fenotipo de un individuo, independientemente del contenido informacional del ADN (Bennett, 1972). Según esta última teoría, la cantidad total de ADN tiene un efecto causal sobre el tamaño nuclear e influye directamente sobre el tamaño nuclear y celular, y entonces puede ser ajustada por selección de las diferencias en tamaños celulares. En este sentido, las relaciones entre tamaño de genoma y volumen celular son entendidas como producto de coevolución (Gregory, 2001).

I: 1.5.3 Neutralidad y equilibrio de mutación en la evolución del tamaño del genoma

Este tipo de explicaciones es diferente de los dos anteriormente citados en el sentido de que no asume que el tamaño del genoma sea mantenido en un tamaño óptimo por una selección

estabilizadora o positiva–como en las teorías nucleoesqueletal y nucleotípica- , ni por una selección purificadora en contra de la acumulación de ADN no codificante –como en las teorías de ADN “basura” o “egoísta”-. En cambio, se propone que la evolución del tamaño del genoma ocurre por un equilibrio entre mutaciones neutrales (Petrov, 2002), por un lado, y considerando este equilibrio de mutación en un contexto poblacional donde el tamaño de la población y la deriva génica tienen roles más preponderantes que la selección natural (Lynch and Conery, 2003), por el otro.

Petrov (2002) sugirió que el espectro observable de tamaños del genoma se determinaría por un equilibrio entre la pérdida de ADN sesgada en favor de pequeñas deleciones frente a pequeñas inserciones, y la ganancia de ADN preponderantemente por una tendencia a acumular inserciones de ADN por transposición de elementos genéticos "egoístas". Este equilibrio entre fuerzas mutacionales a diferente escala implica un sesgo entre las pequeñas deleciones y las inserciones, que en inglés se denominan *indels*. En la deducción de esta hipótesis se asume al tamaño del genoma como un carácter completamente neutral, lo cual no sería necesariamente correcto (Petrov, 2002), pero que sin embargo, su relajamiento no modifica las conclusiones a las que el autor arriba.

En el contexto de esta tesis, resulta interesante destacar que la tasa y el tamaño de las *indels* depende de factores asociados al empaquetamiento y composición de la cromatina, la replicación y reparación del ADN. Sin embargo, lo importante es que según este modelo la funcionalidad (o no funcionalidad) del ADN no codificante no es una cuestión primaria ni fundamental.

Por otro lado, según Lynch (2007) cualquier explicación evolutiva de un patrón de variación, en este caso el del tamaño del genoma, debe ser consistente con los mecanismos genético poblacionales básicos. Mientras que las teorías adaptativas y de ADN basura se apoyan en la selección natural, la propuesta de Lynch y Conery (2003) toma las ideas de equilibrio mutacional de Petrov (2002), a la vez que supone que muchas de las modificaciones en el genoma emergieron de forma pasiva en respuesta a las reducciones a largo plazo del tamaño poblacional efectivo que acompañó al aumento de tamaño de los organismos (sobre todo en referencia a la transición procariota – eucariota, aunque no exclusivamente). Al magnificar la influencia de la deriva genética, la reducción de tamaño poblacional ofrecería un entorno permisivo para la proliferación de características genómicas que de otro modo serían eliminadas por la selección natural, entre ellas la proliferación de ADN no codificante en el genoma, mientras que en linajes con tamaño poblacional efectivo grande, la selección seguiría “purificando” las mutaciones deletéreas que aumentan el tamaño del genoma (Lynch, 2011; Lynch and Conery, 2003). Sin embargo, esta propuesta, ha sido fuertemente cuestionada al no considerar los efectos producidos por la falta de independencia filogenética entre las especies analizadas, entre otros aspectos (Whitney et al., 2011; Whitney and Garland, 2010).

I: 2 CITOGENÉTICA Y EVOLUCIÓN

La citogenética evolutiva es la rama de la Citogenética que analiza las formas cromosómicas de las especies actuales y, a través de la comparación de los cariotipos, hace inferencias sobre los cambios cromosómicos que se pudieron haber producido a lo largo del proceso evolutivo en los distintos grupos taxonómicos. Para ello se vale de diversas técnicas de tinción diferencial que permiten analizar, con distinto alcance resolutivo, los cambios cromosómicos. Cada una da origen a un patrón de bandas de proporción e intensidad de tinción específicos para cada cromosoma, según el tratamiento y el tipo de colorante utilizados (Bandas G, C, R, NOR, Q, entre otras). La Citogenética con técnicas mixtas, tomando ciertos principios de la biología molecular, permite la localización de secuencias específicas del ADN en una determinada región cromosómica a través de Hibridización *In Situ* Fluorescente (FISH).

En la caracterización citogenética de una especie o un grupo de especies, contar con información provista desde distintos enfoques metodológicos permite, por un lado, destacar y describir de forma más exhaustiva las características propias de cada una de ellas. Por otro lado, facilita las comparaciones entre cariotipos de las especies de un mismo género o entre géneros diferentes, las cuales pueden realizarse de numerosas maneras. En la actualidad, los estudios de evolución cromosómica en mamíferos y en particular en primates, se basan en la hibridación cruzada utilizando sondas de pintado total y de regiones específicas de cromosomas tanto de humano como de las especies de interés (Zoo-FISH), permitiendo la identificación precisa de áreas de homeología específica en los cromosomas de una y otra especie.

Sin embargo, la mayoría de las metodologías de FISH sólo permiten distinguir cualitativamente las similitudes entre dos muestras, pero no permiten determinar positivamente las diferencia entre ellas, ni la ubicación de las mismas en los cromosomas. La hibridación genómica comparativa (CGH, por su sigla en inglés) es una técnica derivada de FISH que enfatiza y resalta las diferencias genómicas entre las muestras estudiadas a la vez que permite obtener información cuantitativa sobre esas diferencias (Kallioniemi et al., 1992). El conocimiento de las similitudes cualitativas es importante al momento de realizar comparaciones de tipo cuantitativo entre los genomas. Conocer previamente las homologías cromosómicas entre las especies en estudio permite analizar luego los resultados de CGH con mayores certezas, ya que esta técnica destaca lo que es distinto entre las especies comparadas pero no dice nada acerca de su composición. La información de las homologías cromosómicas establecidas por FISH permite distinguir si las diferencias detectadas por CGH corresponden únicamente a diferencias en la

cantidad de una porción del cariotipo de igual composición, o bien a diferencias en la composición misma de dicha porción.

La técnica de CGH inicialmente fue desarrollada para el análisis citogenético-molecular de tumores sólidos humanos (Kallioniemi et al. 1992), aunque con el tiempo su uso se ha extendido a estudios evolutivos y descriptivos en diferentes especies (Yu et al., 2012; Fantini et al., 2011; Gosálvez et al., 2010; Nieves et al., 2010; Neusser et al., 2005; Dávila-Rodríguez et al., 2009; Sahara et al., 2003; Dunham et al., 2002; Traut et al., 1999; Toder et al., 1998). La utilidad de la técnica de CGH radica en que evidencia las diferencias entre los genomas en estudio en un solo experimento, las cuales no podrían detectarse con la aplicación repetida de otras técnicas de citogenética molecular, a la vez que permite realizar un enfoque cuantitativo en el análisis evolutivo del genoma. Esta característica fundamenta su elección como metodología de análisis de especies muy cercanas entre sí con diferencias en el tamaño del genoma.

Sin duda, una diferencia crucial entre la citogenética y otras aproximaciones genómicas es que se necesitan células vivas, las cuales generalmente se obtienen por cultivo celular *in vitro*, porque los cromosomas se ven sólo durante la división celular. Esta limitación hace al muestreo más difícil debido a que una extracción de sangre o biopsia es necesaria, mientras que el ADN puede ser extraído de excreciones corporales, pelos, y otros métodos no invasivos. Esta desventaja se compensa con el hecho de que la citogenética molecular comparativa es un método mucho más económico y rápido en la inspección y análisis del genoma (Stanyon et al., 2012).

I: 2.1 Cambios cromosómicos y especiación

El rol de los cambios cromosómicos en la evolución ha sido objeto de numerosas discusiones. Existen grupos animales y vegetales para los cuales los cambios cromosómicos han demostrado una directa y causal relación con la evolución del grupo, en donde la generación y mantenimiento de determinados cambios se han visto asociados directamente con la divergencia del grupo en estudio y con ellos se han postulado distintos modelos de evolución cromosómica (King, 1993).

Los cambios cromosómicos pueden considerarse en una de dos categorías: aquellos que afectan la morfología de los cromosomas o estructurales (inversiones, traslocaciones, fusiones, deleciones y duplicaciones, amplificación y reducción de segmentos heterocromáticos); y los numéricos, aquellos que afectan la cantidad de cromosomas. Estos últimos incluyen las aneuploidías (aumento o disminución del

número cromosómico por cromosomas individuales) y las euploidías (multiplicación del número cromosómico completo).

Los distintos tipos de cambios cromosómicos no producen efectos equivalentes en la divergencia de un grupo de especies. En general, sólo aquellos que sean *heteróticos negativos* o con el potencial para serlo, podrían tener un papel en el proceso cladogénico. Estos cambios son aquellos que dan lugar a una mala segregación en la meiosis de los híbridos, o cualquier reorganización que interrumpa la meiosis, constituyendo así un mecanismo de aislamiento reproductivo *post-cigótico*. Sin embargo, los cambios cromosómicos no son una condición *sine qua non* para la especiación. Existen linajes en los cuales se observan cambios cromosómicos que podrían haberse originado sin necesidad de establecer una relación directa con los eventos cladogénicos del grupo.

El cariotipo, el ordenamiento pareado de todos los cromosomas, es una instantánea de todo el genoma de una especie eucariota, y, en cierto sentido, puede considerarse un mapa de baja resolución del mismo. Es así que muchos de los cambios que suceden en el genoma simultánea y/o posteriormente a un evento de divergencia especiogénica –independientemente de cuál fuere su causa– pueden eventualmente manifestarse o ser observables a nivel cromosómico. Incluso en casos en que los cambios cromosómicos no son la razón causal de la divergencia de especies, el citogenético representa un enfoque no sólo válido sino también valioso.

I: 2.2 Heterocromatina

La heterocromatina fue definida originalmente a partir de observaciones citológicas realizadas por el botánico Heitz (1928) como el conjunto de regiones cromosómicas que se tiñen intensamente en profase y mantienen una organización compacta a lo largo de todas las fases del ciclo celular. Desde entonces, en una amplia variedad de células eucariotas, se ha observado la existencia de porciones cromosómicas importantes, incluso cromosomas enteros, compuestos por heterocromatina.

Posteriormente a las observaciones de Heitz, la heterocromatina fue clasificada en facultativa y constitutiva (Brown, 1966). Tradicionalmente se ha considerado constitutiva a la heterocromatina ubicada usualmente en los centrómeros que contiene ADN satélite, y facultativa, a las regiones inactivas en ciertas etapas del desarrollo de algunos linajes celulares. Estrictamente la heterocromatina facultativa corresponde a regiones eucromáticas cuya estructura y actividad están sujetos a ciertos controles epigenéticos de manera que pueden estar alternativamente funcionales o silenciadas durante fases específicas del desarrollo (Plath et al., 2002). Por el contrario, lo que ha sido reconocido como heterocromatina constitutiva se encuentra comúnmente en grandes bloques, muchas veces cerca de los centrómeros y telómeros, y mantiene su organización característica en ambos cromosomas

homólogos (Dimitri et al., 2009).

Sumner (2008) sostiene que la heterocromatina se caracteriza por dos aspectos: su universalidad, ya que casi todos los cromosomas de prácticamente todos los eucariotas poseen heterocromatina, y su variabilidad –entendida como las diferencias en la cantidad de heterocromatina en los diferentes cariotipos, y la variabilidad intraespecífica e interespecífica de sus propiedades y su naturaleza–.

A nivel citológico, la heterocromatina se encuentra distribuída en los genomas de manera especie-específica. En los eucariotas superiores, los centrómeros y telómeros generalmente contienen heterocromatina, y el ADN que la compone es usualmente de tipo repetitivo. Cuando se analiza el patrón de bandas C, que muestra la localización de la heterocromatina en el cariotipo, ésta puede ser observada, entre otros, en la región centromérica y pericentromérica de un amplio número de taxones animales (roedores, insectos, anfibios, entre otros), en la región telomérica en las cebras de Hartmann, a lo largo de un brazo en algunos cromosomas de primates no humanos, en el cromosoma Y de los humanos, en el cromosoma X inactivo de las hembras de mamífero y en los cromosomas 4 e Y de *Drosophila melanogaster* (Redi et al., 2001; Park and Kuroda, 2001; Eissenberg and Elgin, 2000). Aún teniendo en cuenta la existencia de grandes agrupamientos o *clusters* de heterocromatina, el ADN repetitivo se encuentra disperso a lo largo del complemento en proporciones relativamente pequeñas. La masa crítica de ADN repetitivo necesaria para dar una marca positiva con bandas C, ha sido evaluada entre 10,5 y 17,5 Mb (Redi et al., 2001). Esto significa que los “paquetes” de ADN deben contener un mínimo de repeticiones para poder ser visualizados a nivel citológico con microscopía óptica (Nieves, 2007; Redi et al., 2001).

Más alla de su visualización citogenética, existe, además, un conjunto de características y propiedades que han definido a la heterocromatina en prácticamente todos los animales y plantas en los que se la ha estudiado. Entre estas características se encuentran niveles muy reducidos de recombinación meiótica, baja densidad génica, replicación tardía durante la fase S, inactividad transcripcional, enriquecimiento en secuencias altamente repetitivas de ADN satélite y remanentes de elementos móviles, y la inactivación de la expresión de genes de regiones eucromáticas cuando éstas quedan cerca de la heterocromatina, un fenómeno conocido como efecto de posición variegado (Dimitri et al., 2009).

Así, resulta ahora claro que las propiedades de la heterocromatina no dependen únicamente de la presencia de una secuencia específica de ADN. La heterocromatina es una estructura mucho más compleja: se trata de un ordenamiento en mosaico compuesto por diferentes tipos de secuencias mediana y altamente repetitivas, satélites e incluso, secuencias únicas empaquetadas dentro de la misma heterocromatina (Avramova, 2002). Estas repeticiones no necesariamente tienen propiedades

comunes en cuanto a la secuencia de bases o el tamaño de la unidad de repeticion, sino que pueden variar de una composición rica en A+T a una rica en G+C, y longitudes de repetición de 2pb a unidades repetidas de cientos o miles de pares de bases. Sin embargo, a pesar de la compleja definición a partir de su secuencia y unidades de repetición, la heterocromatina muestra como patrón común y consistente la metilación de citocinas y la presencia de ciertas proteínas específicas (Sumner, 2008). A partir de lo expuesto, es posible notar como la conceptualización del término heterocromatina ha adoptado los cambios metodológicos y las formas de aproximación a su análisis, siendo actualmente considerada también como un fenómeno molecular, y no sólo citogenético.

En cuanto al origen de la heterocromatina en un cariotipo determinado, este parece haber tenido lugar en paralelo con, o como consecuencia misma de, el aumento de tamaño de algunos genomas eucariotas (Avramova, 2002). La distribución sesgada de cierto tipo de repeticiones y pseudogenes en las regiones heterocromáticas podrían reflejar la mayor tolerancia hacia nuevas inserciones en estas regiones (Dimitri et al., 2009; Gregory, 2004). Las regiones densamente compactadas pueden haber surgido, entonces, como consecuencia de acomodar el exceso de ADN. Estas ideas son compatibles con la idea de una naturaleza epigenética de la formación de la heterocromatina (Avramova, 2002)

I: 3 PLATYRRHINI: LOS PRIMATES DEL NUEVO MUNDO

I: 3.1 Características generales

Los Platyrrhini se distribuyen en las regiones boscosas de América desde el sur de México hasta el norte de Argentina **(Figura 2)**, adaptados a la vida arborícola. Coloquialmente se los denomina monos neotropicales o del nuevo mundo. Desde el punto de vista taxonómico, se considera que están representados por tres familias: Atelidae, Pithecidae y Cebidae, e incluyen a todos los primates americanos cuya distribución está caracterizada por un clima estacional y ecosistemas fluctuantes a lo largo de las estaciones (Schneider y Sampaio, 2015). Presentan una gran diversidad en sus historias de vida, ecología, comportamiento y genética.

Se trata de un grupo monofilético cuya divergencia del ancestro común con los monos del viejo mundo (i.e. Catarrhini) habría ocurrido hace unos 40 Ma (Jameson Kiesling et al., 2015; Perelman et al., 2011). Una vez en América del Sur los primates neotropicales habrían atravesado múltiples radiaciones y eventos de extinción, que explicarían la diversidad hasta ahora reconocida en 125 especies distribuídas en 15-17 géneros (Aristide et al., 2015; Perez et al., 2012).

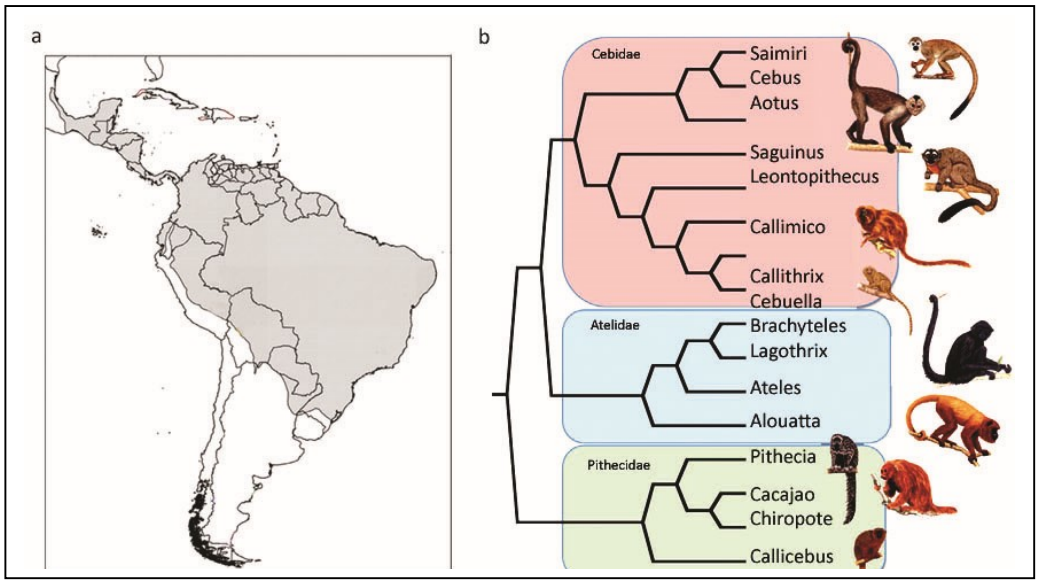

Figura 2. a. *Distribución geográfica de los primates neotropicale*s. **b.** *Cladograma de los géneros de primates neotropicales actuales (tomado de Kay* (2015)*)*

Se han propuesto una serie de hipótesis generales para explicar los orígenes y la diversidad de especies de primates neotropicales. En relación a la diversificación fenotípica, Arístide et al. (2015) proponen la hipótesis de que el tempo y el modo de evolución en los platyrrhini parece estar caracterizada por una diferenciación temprana y profunda en el tamaño corporal relacionada a un modelo de nicho multidimensional, seguido de un período de escaso cambio (es decir, la estasis) en el tamaño corporal.

En cuanto a la biogeografía, se han propuesto también diversas hipótesis para explicar la distribución de las especies de primates en Sudamérica. La hipótesis de la barrera paleogeográfica sugiere que la especiación es causada por cambios en la distribución de la tierra o el paisaje debido a los movimientos tectónicos o las fluctuaciones del nivel del mar, resultando en el aislamiento de las poblaciones y la posterior diferenciación genética. La hipótesis de los ríos como barrera propone que los ríos amazónicos afectaron a la diversificación de ciertos taxones aislando esas poblaciones. La hipótesis de los refugios sugiere que los cambios en las precipitaciones globales causadas por los ciclos de glaciación durante el Pleistoceno dieron como resultado el aislamiento de las especies en parches de selva tropical húmeda y la consecuente diferenciación genética. La hipótesis de río-refugios propone que una combinación del efecto barrera de los ríos y los cambios en la vegetación durante los ciclos de glaciación del Pleistoceno tendrían el mismo efecto de aislamiento que conduciría a la posterior diversificación (Haffer, 2008). Según un reciente análisis filogenético y biogeográfico, la diversificación

que dió origen a las distintas especies de Platyrrhini habría ocurrido concurrentemente con el establecimiento y la diversificación de la selva amazónica (Jameson Kiesling et al., 2015). Según estos autores, la expansión del ambiente selvático amazónico, más que aislamiento geográfico en refugios o las regiones delimitadas por los ríos, sería el factor conducente en la divergencia de especies de primates neotropicales.

En cuanto a la citogenética, no se han postulado hipótesis generales que expliquen la diversificación de especies desde una causalidad cromosómica, aunque sí se han propuesto modelos particulares de divergencia de especies que incluyen la variación cromosómica (por ejemplo Medeiros et al. (1997) para el caso del mono araña, *Ateles*). Sin embargo, las notables características citogenéticas de los primates neotropicales, han provocado una gran atención hacia el mismo desde principios del siglo XX, con la consiguiente acumulación de datos para muchísimas especies diferentes. La cercanía filogenética entre los primates neotropicales y el humano ha provocado que estos datos sean siempre considerados e interpretados en un marco filogenético. En la siguiente sección se describen algunos de los aspectos más destacados.

I: 3.2 Citogenética de los primates del nuevo mundo

El primer análisis citogenético de un primate neotropical fue llevado a cabo por Painter (1922), quien describió el número diploide y la morfología de los cromosomas sexuales de un ejemplar de *Cebus sp*. Sin embargo no fue hasta la década del '70 que este tipo de análisis tuvieron su auge. Desde entonces, y debido al amplio rango de números cromosómicos –16 cromosomas en el mono titi *Callicebus lugens* hasta 62 en el mono lanudo *Lagothrix lagotricha*–, la mayoría de las especies primates neotropicales han sido analizadas mediante técnicas citogenéticas clásicas de bandas. Posteriormente, la introducción de las técnicas de Zoo-FISH entre diferentes especies de primates (entre ellas la humana) revolucionó el campo de la citogenética comparativa, estableciéndose los primeros mapas de homología cromosómica a una resolución de 3-5 Mb (Müller, 2006; Wienberg & Stanyon, 1998). Hasta el momento, se han publicado mapas de este tipo para 40 especies pertenecientes a 16 géneros de Platyrrhini, y existen datos de pintado cromosómico de más de 50 especies (Oliveira et al., 2012; Stanyon et al., 2008), lo cual demuestra que a pesar de la gran variabilidad cariotípica de los primates neotropicales existen importantes regiones de homología.

Los datos de pintado cromosómico muestran que la mayoría de los reordenamientos cromosómicos que distinguen a los primates neotropicales del cariotipo primate ancestral ocurrieron en el último ancestro común de todas estas especies. Tales datos permitieron, además, la reconstrucción

del cariotipo ancestral de los monos del Nuevo Mundo (Dumas et al., 2007), apoyando el origen monofilético del grupo desde la citogenética. Las metodologías de citogenética molecular han confirmado, además, la hipótesis de que los Platyrrhini tienen una alta tasa de evolución cromosómica, los cuales muestran números diploides que varían entre 2n=16 a 2n=62. La asociación de los segmentos homólogos a los cromosomas humanos 5/7, 8/18 y 10/16 son asociaciones derivadas comunes a todos los primates neotropicales analizados hasta el momento (Sineo y Stanyon, 2006).

En el cariotipo ancestral inferido de los primates neotropicales de 2n=54 cromosomas (Oliveira et al., 2012; Stanyon et al., 2008; Müller, 2006; Neusser et al., 2001) los homólogos de los cromosomas humanos 4, 6, 9, 11, 12, 13, 17, 19, 20, 22 y X se encuentran conservados, cada uno como un cromosoma separado. Los homólogos de los cromosomas 5, 14, 18 y 21 muestran sintenias conservadas asociados a otros homólogos (5/7a, 14/15a, 8a/18 y 3a/21), y el resto de los homólogos humanos se encuentran fragmentados: 1a, 1b, 1c, 2a, 2b/16b, 3b, 3c, 7b, 8b, 10a/16a, 10b y 15b (Oliveira et al., 2012; Stanyon et al., 2008; Müller, 2006; Neusser et al., 2001).

La variabilidad cariotípica de los Platyrrhini comprende reordenamientos cromosómicos estructurales, mayoritariamente fusiones, fisiones e inversiones (Seuánez et al., 2005, 1986; Ponsà et al., 1995; Mudry, 1990; Pieczarka et al., 1989). A pesar de los notables reordenamientos, las regiones eucromáticas se hallan altamente conservadas; mientras que las regiones heterocromáticas son muy variables tanto en cantidad como en localización y distribución cromosómicas (Nieves et al., 2011; García et al., 2003; Pieczarka et al., 2001, 1996; Matayoshi et al., 1987; Mudry de Pargament and Labal de Vinuesa, 1988; Mudry de Pargament et al., 1985).

Dentro de la familia Pithecidae los cariotipos muestran una gran diversidad. Las especies del género *Callicebus* presentan cariotipos con números cromosómicos que varían desde 2n=50 (Rodrigues et al., 2001) a 2n=16 (Bonvicino et al., 2003). Semejante reducción del número cromosómico es explicada por medio de fusiones cromosómicas evidenciadas por comparaciones citogenéticas realizadas por pintado cromosómico (Bonvicino et al. 2003). En el género *Cacajao* las hembras presentan 46 cromosomas y los machos 45, debido a una translocación del cromosoma Y (Finotelo et al., 2010; Moura-Pensin et al., 2001). En *Pithecia* los cariotipos de las especies hasta ahora descritas presentan 48 cromosomas, y en el género *Chiropotes* 54 cromosomas (Finotelo et al., 2010; Moura-Pensin et al., 2001). Stanyon et al. (2004) mostraron que el cariotipo de *Chiropotes* retiene todas las asociaciones sinténicas homólogas a los cromosomas humanos propuestas para el cariotipo ancestral de Platyrrhini, pero que también presentan formas cromosómicas derivadas que son exclusivas de este género.

La familia Atelidae forma un grupo monofilético indiscutible desde los datos cromosómicos, ya que presentan reordenamientos cromosómicos sinapomórficos como la fisión del homólogo del

cromosoma 1 y el 4, o la inversión 7/5/7 (Oliveira et al., 2005; de Oliveira et al., 2002). El cariotipo ancestral inferido para esta familia incluye 62 cromosomas, los cuales se mantienen en los géneros *Lagothrix* y *Brachyteles.* En *Ateles* 17 fusiones Robertsonianas y una fisión explican la considerable reducción del número cromosómico a 34 (o 32 en *A. paniscus),* mientras que en el género *Alouatta* además de una considerable reorganización cariotípica que origina numerosa autapomorfías cromosómicas, se evidencias translocaciones Y-autosoma que dan origen a sistemas múltiples de determinación sexual (Steinberg et al., 2014; Oliveira et al., 2012).

Para la familia Cebidae los números cromosómicos son prácticamente constantes dentro de cada género, aunque existen algunas excepciones. Por ejemplo dentro del género *Aotus* que muestra una variación de 2n=46 a 2n=59, y que además muestra variación en el número cromosómico entre machos y hembras debido a translocaciones Y-autosoma que originan sistemas cromosómicos múltiples de determinación sexual (Sineo y Stanyon, 2006; Ma, 1981; Ma et al., 1976). En *Saimiri* el número cromosómico es constante con un 2n= 44, aunque se han descrito variantes geográficas del cariotipo debidas exclusivamente a inversiones pericéntricas (Moore et al., 1990). Por su parte, los callitrícidos (*Cebuella*, *Callithrix*, *Saguinus* y *Leontopithecus*) muestran también un rango estrecho de variación en el número cromosómico (de 44 a 46 cromosomas) cuya radiación se encuentra acompañada por contados reordenamientos cromosómicos como las asociaciones sinapomórficas 2/15, 13/9, 13/22 y 13/17 (Oliveira et al., 2012; Sineo y Stanyon, 2006; Neusser et al., 2001; Nagamachi et al., 1997). Por último el género *Cebus* pareciera no mostrar ningún cambio respecto del cariotipo ancestral inferido para los primates neotropicales (Oliveira et al., 2012), al menos en *C. capucinus* (2n=54). En las especies con 2n=52, fusiones cromosómicas especie-específicas dan cuenta de la reducción del número cromosómico (Amaral et al., 2008).

I: 3.2.1 Patrones citogenéticos comunes en los primates neotropicales: Cebus y Ateles

Como se mencionó al inicio de esta introducción, algunas características citogenéticas de los primates neotropicales nos han permitido asociar géneros que muestran patrones comunes. Entre ellos se encuentran *Cebus* y *Ateles,* dos de los géneros con mayor proporción de heterocromatina. Los monos del género *Cebus* conservan un cariotipo con características casi idénticas al cariotipo ancestral de los primates neotropicales (Oliveira et al., 2012; Amaral et al., 2008; García et al., 2000; Richard et al., 1996), mientras que las especies de *Ateles* (Platyrrhini, Atelidae), presentan cariotipos con una importante cantidad de reordenamientos (Oliveira et al., 2005; García et al., 2002).

Ambos géneros presentan un estrecho rango de variación en el número cromosómico (2n): *Ateles* presenta 32 en *A. paniscus,* o 34 cromosomas en el resto de las especies; mientras que en *Cebus* la mayoría de las especies presenta 54 cromosomas, excepto *C. olivaceus*, *C. albifrons* y *C. kaapori* con

52. Ambos géneros presentan sistema de determinación sexual de tipo XY, a diferencia de otros géneros como *Alouatta* o *Aotus* con sistemas múltiples de determinación sexual (Nieves et al., 2005; Mudry et al., 2001). Entre los cariotipos de las especies de cada género los reordenamientos más frecuentemente observados son las inversiones, mientras que las fisiones/fusiones son más comunes cuando se realiza la comparación entre géneros (García et al., 2002).

Se ha comprobado que la composición de las regiones cromosómicas heterocromáticas es distinta entre ambos géneros. En particular, se ha visto por medio de FISH con sonda de la heterocromatina del cromosoma 11 de *Cebus paraguayanus*[1] que esta heterocromatina es la misma en todas las especies de *Cebus* y no se encuentra en ninguna de las otras especies de Platyrrhini analizadas, considerándose género-específica (Nieves et al., 2011; Nieves, 2007).

Además de tratarse de dos géneros con una importante presencia de heterocromatina en sus cariotipos, la proporción de la misma en cada una de las especies se distribuye asociada a patrones geográficos de distribución, de manera tal que las especies distribuidas al norte del Río Amazonas muestran mayor proporción de heterocromatina, mientras que las que poseen menor proporción de heterocromatina habitan al Sur (Nieves, 2007; Martinez et al., 2002; Medeiros et al., 1997). En *Cebus*, además, es posible identificar un gradiente geográfico decreciente de Oeste a Este y de Norte a Sur (Nieves, 2007).

I: 3.3 *Cebus* y *Ateles*: características generales

I: 3.3.1 Ateles

El género *Ateles* incluye a los monos que comúnmente se conocen como monos araña, maquisapas, marimondas, marimonos, koatás o atelos. Las distintas especies actualmente reconocidas son alopátridas y, en conjunto, se distribuyen ampliamente desde el sur de México al norte de Bolivia **(Figura 3),** por lo que su presencia en Argentina se limita al cautiverio en zoológicos. Por lo general son animales grandes de entre 7-10 kg, con largas extremidades que les proporcionan su aspecto similar a una araña, y de ahí su nombre vernáculo más frecuente. Excepto por los genitales –en la hembra se reconoce un clítoris conspicuo y colgante-, no existen diferencias morfológicas entre los sexos.

Prácticamente llevan una vida exclusivamente arborícola –aunque en cautiverio suelen caminar en el suelo- y algunas características corporales se asocian a esta forma de vida y su locomoción. Poseen una cola prensil y callosa ventralmente, la cual permite un buen agarre, así como no poseen

[1] *C. paraguayanus* =*C. cay* según la nomenclatura taxonómica utilizada en ese trabajo

pulgares, o son vestigiales (Defler, 2004). Se alimentan principalmente de frutas, pero en ocasiones en que éstas son escasas pueden alimentarse de flores, hojas, semillas e insectos. Forman grupos sociales de tipo fisión-fusión, de unos pocos individuos hasta grupos entre 25-50 individuos.

Según la World Conservation Union (IUCN: http://www.iucnredlist.org) las especies del género *Ateles* se encuentran todas en diferentes estados de riesgo, desde "críticamente en peligro", "en peligro" o "vulnerable". Debido a su gran tamaño y su dieta a base de frutas son los monos más cazados para alimentación por poblaciones nativas del continente, así como por su percibido valor medicinal (Hines, 2005). La pérdida de hábitat o la conversión del mismo (para pasturas, por ejemplo), la caza para comida y medicina así como el tráfico de fauna son las principales amenazas para los *Ateles* en estado silvestre (Hines, 2005; Wilson & Reeder, 2005; Defler, 2004; Kellogg & Goldman, 1944).

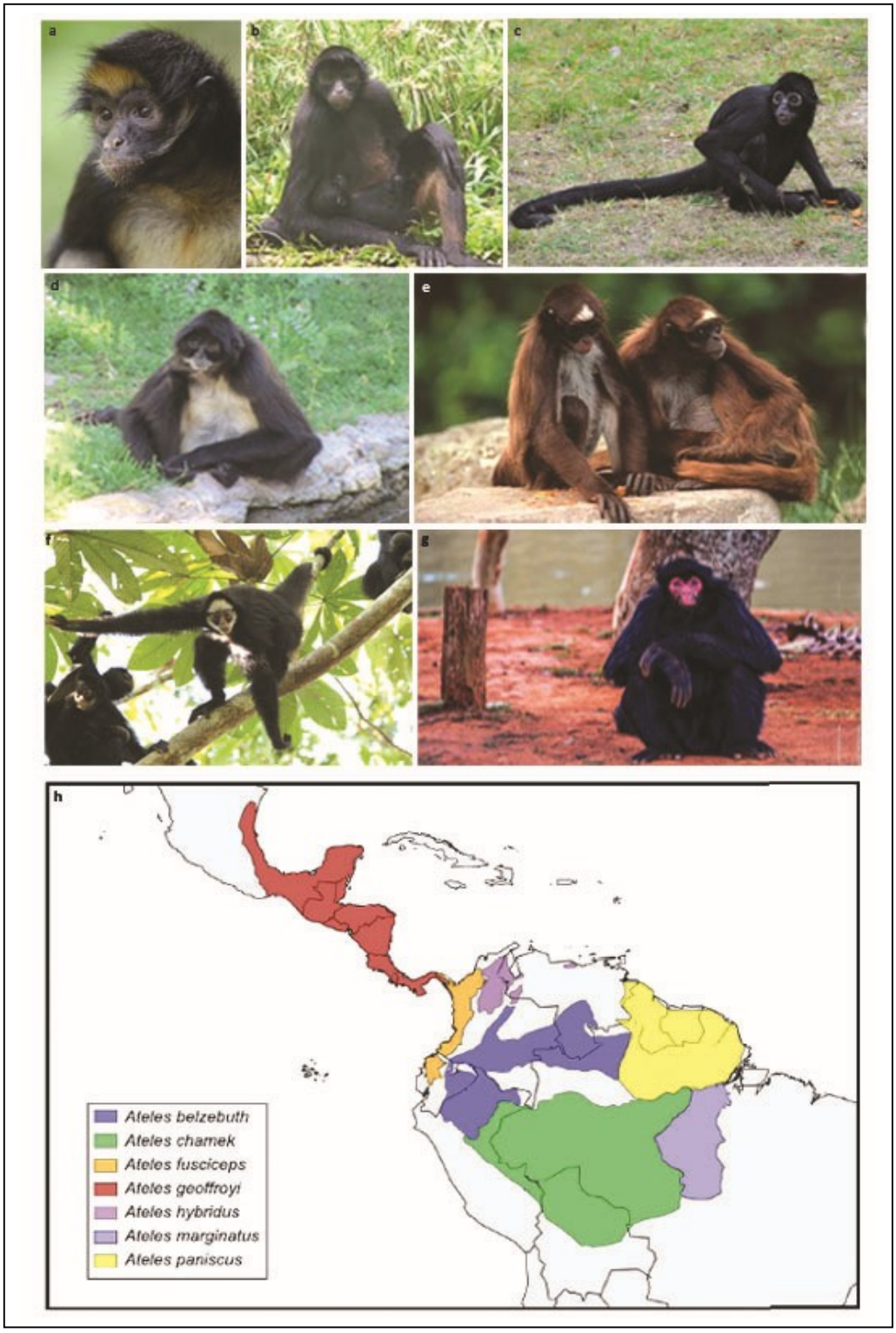

Figura 3. *Especies del género Ateles y su distribución geográfica actual.* ***a.*** *A. belzebuth* ***b.*** *A. chamek* ***c.*** *A. fusciceps* ***d.*** *A. geoffroyi* ***e.*** *A. hybridus* ***f.*** *A. marginatus* ***g.*** *A. paniscus (fuente: Google imágenes, excepto foto d): Lucía Fantini)* ***h.*** *Mapa de Mesoamérica y norte de Sudamérica mostrando la distribución geográfica de las especies (modificado de Morales-Jiménez et al. 2015)*

I: 3.3.2 Cebus

El género *Cebus* incluye a los monos coloquialmente conocidos como monos capuchinos o cairaras. Es uno de los géneros de distribución geográfica más amplia entre los primates neotropicales, abarcando desde Honduras en Centroamérica hasta las selvas del norte argentino, las Yungas en las provincias de Salta y Jujuy y la Selva Paranaense al norte de la provincia de Misiones (Wilson and Reeder, 2005). Su extensa distribución está marcada por una notable diversidad fenotípica –particularmente en la coloración del pelaje– **(Figura 4)**, aunque también se manifiesta genética, ecológica, comportamental y morfológicamente, lo que ha llevado a una compleja historia taxonómica

Se trata de animales relativamente pequeños, de entre 2 y 4,5 kg de peso, cuadrúpedos y esencialmente arborícolas, aunque a veces descienden al suelo. Poseen una cola prénsil que utilizan para aferrarse a las ramas de los árboles (Defler, 2004). Los grupos sociales están constituidos por varios machos adultos y hembras con sus crías. Son animales muy inquietos e inteligentes, con una dieta omnívora que puede ser muy variada y adaptable a las condiciones del ambiente (Defler, 2004).

De todo el conjunto de monos capuchinos, 9 taxones han sido catalogados por la IUCN como "críticamente en peligro" o "en peligro" (IUCN http://www.iucnredlist.org). Todas las poblaciones conocidas de capuchinos son cazadas, principalmente para el tráfico de fauna, y todas ellas enfrentan la pérdida de hábitat debida a la deforestación, en la selva amazónica o en la selva atlántica, o a la desertificación en las áreas de Cerrado y Caatinga (Brasil) (Lynch Alfaro et al., 2014).

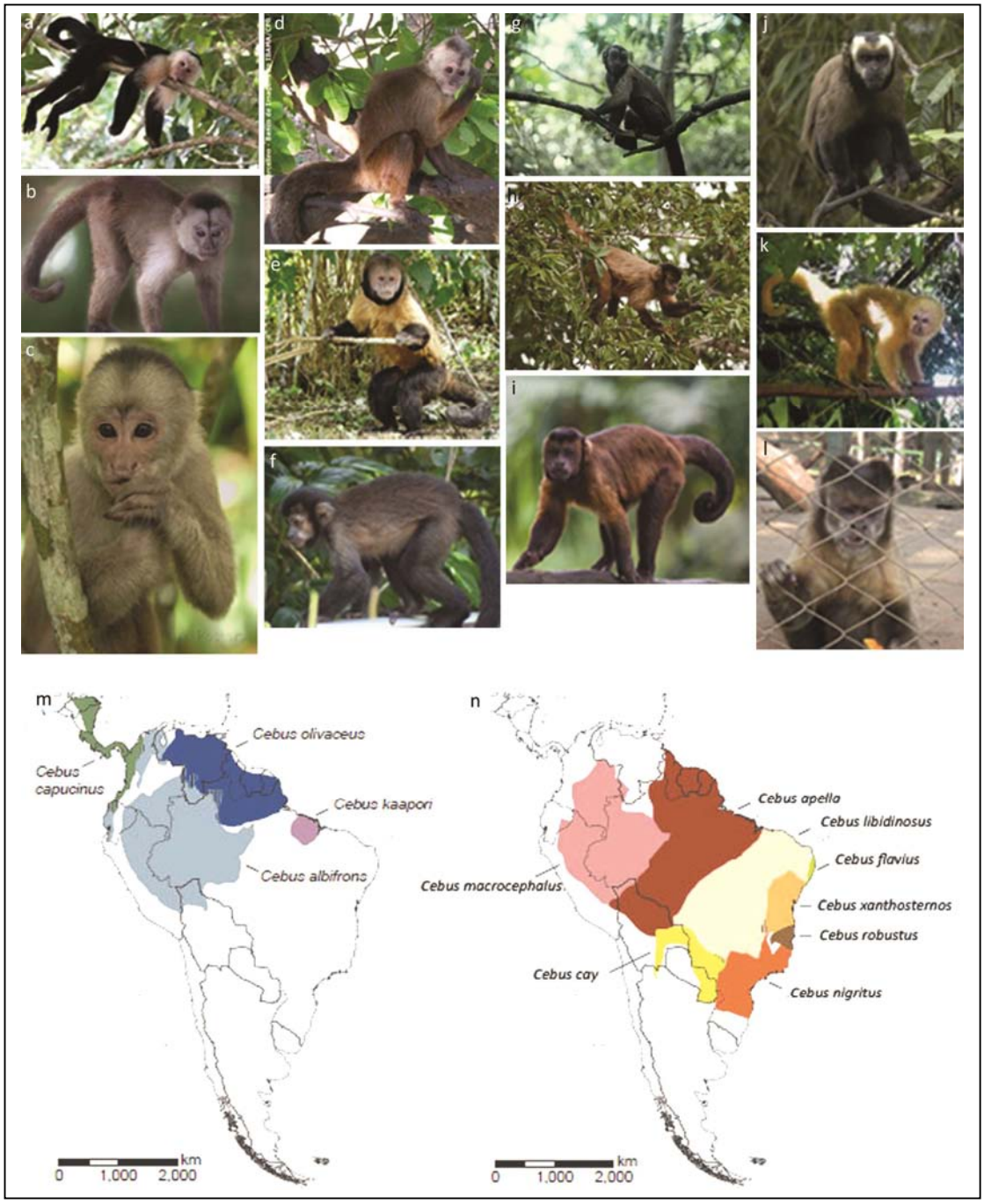

Figura 4. *Especies del género Cebus y su distribución geográfica actual.* ***a.*** *C. capucinus* ***b.*** *C. olivaceus* ***c.*** *C. albifrons* ***d.*** *C. kaapori* ***e.*** *C. xanthosternos* ***f.*** *C. nigritus* ***g.*** *C. apella* ***h.*** *C. libidinosus* ***i.*** *C. robustus* ***j.*** *C. macrocephalus* ***k.*** *C. flavius* ***l.*** *C. cay (fuente: Google imágenes, excepto fotos f: L. Wolfenson y l: GIBE)* ***m*** *distribución de las especies gráciles, subgrupo Cebus* ***n*** *distribución de las especies robustas, subgrupo Sapajus (tomado y modificado de Lynch Alfaro et al. 2012).*

I: 3.4 Filogenia y sistemática de *Cebus* y *Ateles*

Distintos estudios coinciden en señalar que, entre las tres familias de primates del nuevo mundo antes mencionadas, Cebidae y Atelidae conformarían un grupo hermano. La divergencia entre ellas habría ocurrido hace 20 a 24 Ma (Jameson Kiesling et al., 2015; Perez et al., 2012; Perelman et al., 2011). El género *Cebus* sería el más antiguo entre los dos aquí considerados, con una divergencia entre sus especies de 5,2 Ma, mientras que las especies de *Ateles* habrían divergido hace 3,7 Ma (Jameson Kiesling et al., 2015). Aunque otros estudios sugieren que el ancestro común de las especies actuales de *Ateles* data de aproximadamente 6,7 Ma (Morales-Jimenez et al., 2015).

I: 3.4.1 Ateles

Actualmente se reconocen 7 especies dentro del género: *Ateles geoffroyi, A. paniscus, A. hybridus, A. belzebuth, A. chamek, A. marginatus* y *A. fusciceps* (Groves, 2005).

Desde la aparición del primer trabajo de revisión taxonómica de *Ateles* (Kellogg and Goldman, 1944) a la actualidad se han propuesto diferentes esquemas de clasificación dentro del género, con un número variable de especies reconocidas que han incluido entre 1, 4 a 7 especies distintas (Morales-Jimenez et al., 2015; Collins and Dubach, 2001, 2000a; Medeiros et al., 1997; Froehlich et al., 1991). Sin embargo, es importante destacar que el esquema taxonómico de 7 especies antes mencionado es el que mejor refleja las relaciones filogenéticas dentro del género (Morales-Jimenez et al., 2015; Groves, 2005).

Un problema recurrente en los artículos publicados cuyo objetivo ha sido establecer las relaciones filogenéticas y/o explicar el patrón de distribución biogeográfico de las especies de *Ateles* es la incompletitud del muestreo de especies –un problema tampoco ajeno a esta tesis, como se verá más adelante– **(Figura 5)**. Asimismo, la distinción diferencial de cuáles son las especies que conforman el género a lo largo del tiempo es un problema asociado al anterior, y muchas veces dificulta la comparación entre diferentes hipótesis filogenéticas. Sin embargo, es posible mencionar algunas de sus conclusiones más importantes.

El primer análisis filogenético fue realizado por Froehlich et al. (1991) a partir de caracteres morfológicos del cráneo y los dientes. Según estos autores la diversidad de especies es principalmente explicada por la distribución de los ríos actuando como barreras al flujo génico. Posteriormente Medeiros y colaboradores (1997), a partir de datos citogenéticos interpretados en el marco de la hipótesis de refugios, propusieron que el origen del género habría ocurrido en el sudoeste de la cuenca

amazónica y que *A. chamek* sería la especie basal, mientras consideraban a *A. paniscus* la especie más derivada del género. Contrariamente, Collins y Dubach (2000a, 2000b) a partir de datos de secuencias mitocondriales y Nieves et al. (2005), a partir de datos cromosómicos y de ADN mitocondrial, sostienen que *A. paniscus* es el taxón hermano y basal al resto de las especies de *Ateles.* Collins y Dubach (2000b) también propusieron que este taxón fue el primero en aislarse, debido a la separación de la región Guayana de la Amazonía alrededor de 3,3 a 3,6 Ma. Por último, la más reciente revisión filogenética del grupo propone a *A. marginatus* –una especie no incluida en ninguno de los trabajos anteriores– como el taxón hermano de todas las especies de *Ateles* y un origen en el Sur del Amazonas para el género (Morales-Jimenez et al., 2015). Según estos autores, además, el ancestro común del clado *A. belzebuth+A. chamek* habría sido el siguiente linaje en divergir luego de la separación del linaje de *A. marginatus.*

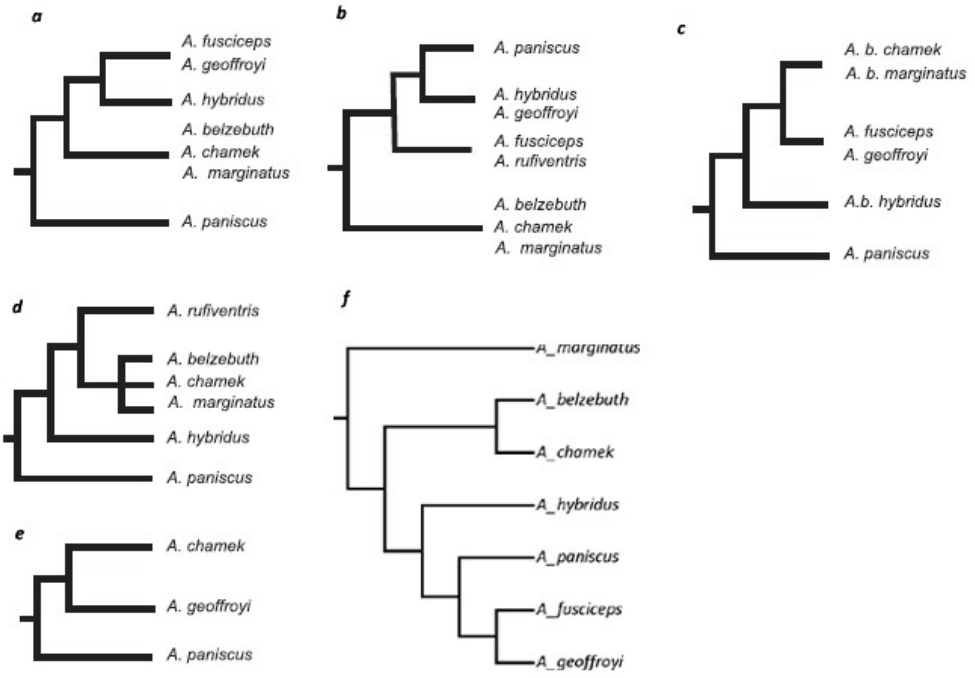

Figura 5. Hipótesis filogenéticas propuestas para el género *Ateles.* a. Froelich et al. 1991 b. Medeiros et al. 1997 c. Collins y Dubach 2000a, 2000b d. Nieves et al. 2005 (citogenética) e. Nieves et al. 2005 (ADN mitocondrial) f. Morales-Jimenez et al., 2015. Modificado de Morales-Jimenez et al., 2015.

I: 3.4.2 Cebus

La taxonomía del género *Cebus* es y ha sido históricamente compleja y confusa. Si bien existe una propuesta taxonómica que ha sido lo suficientemente reconocida como para ser utilizada en muchos de los artículos más recientes (Penedo et al., 2014; Lynch Alfaro et al., 2012a; Lynch Alfaro et al., 2012b; Izar et al., 2012; Garber et al., 2012; Matthews, 2011; Casado et al., 2010; entre otros), existe también cierto disenso entre los primatólogos (Jameson Kiesling et al., 2015; Rosenberger, 2012; Ruiz-García et al., 2012; Wildman and Goodman, 2004).

A continuación, y brevemente, se presenta el desarrollo temporal de la problemática clasificación de *Cebus*.

Históricamente, *Cebus* fue dividido en dos grandes grupos. Basándose en características del pelaje, Elliot (1913) los separó en un grupo "con copete en los machos" (refiriéndose a un penacho de pelo oscuro, que a veces se observa como dos crestas a los lados de la cabeza) y otro grupo sin copete en los machos. Hershkovitz (1949) adoptó esta división y reconoció 4 especies: *Cebus apella* como la única representante del grupo con copete, y *C. albifrons, C. capucinus* y *C. nigrivittatus* del grupo sin copete. Sin embargo, ambos autores reconocen que la presencia o ausencia del copete no parece ser un carácter que separe definitivamente a ambos grupos. Cabrera (1957) y luego Hill (1960) incluyeron a todos los taxones con copete en una única especie, *C. apella*, aunque reconociendo dentro de ella 11 subespecies uno y 16 el otro, respectivamente. Asimismo, si bien no presentó un esquema de clasificación, Torres de Assumpcão (1988) identificó diferencias fenotípicas entre los capuchinos con copete de distintas regiones.

Silva Jr. (2001) retomó la distinción según la presencia de copete. Según su tesis, la divergencia entre estos dos grupo realmente existe y la diferencia radica esencialmente en la morfología del cráneo y postcráneo, siendo el grupo con copete más robusto que el grupo sin copete. A partir de su análisis, propuso que las diferencias entre los dos grupos son tan notables que justifican la división en dos subgéneros: *Cebus*, que incluye 4 especies de monos gráciles sin copete (*albifrons, capucinus*, *olivaceus* y *kaapori*); y *Sapajus,* que incluye otras 8 especies de monos con copete (*apella, macrocephalus, libidinosus, nigritus, cay, xanthosternos* y *robustus,* y el posteriormente descrito *flavius*).

Alternativamente, basándose principalmente en la coloración del pelaje y la forma del copete, Groves (2005, 2001) reconoce 8 especies en un esquema donde eleva a nivel de especie a las subespecies reconocidas de *C. apella,* considerando al grupo "robusto" con cuatro especies: *C. apella, C. libidinosus, C. xanthosternos* y *C. nigritus*. Para el grupo sin copete reconoce otras cuatro especies, agregando *C. kaapori* a las 3 ya aceptadas por Hershkovitz.

Actualmente, ambas revisiones taxonómicas hechas a partir de la morfología y coloración y distribución del pelaje, muestran claras diferencias en cuanto al número de especies reconocidas, aunque aún más notablemente a nivel de subespecies.

Posteriormente, a partir de análisis de secuencias de ADN mitocondrial, se estimó el tiempo de divergencia entre los dos subgrupos "con copete" y "sin copete" en 6,2 Ma (Lynch Alfaro et al., 2012a) y se propuso que los subgéneros propuestos por Silva Jr. (2001) se elevaran a nivel de género, reconociendo cada clado como uno diferente: *Cebus* y *Sapajus.* Diferentes características etológicas y ecológicas han sido incorporadas como referencias para justificar la división (Lynch Alfaro et al., 2012b; Lynch Alfaro et al., 2011). Recientemente, esta decisión se vio sostenida también desde la morfometría geométrica (Wright et al., 2015; Cáceres et al., 2014).

Como casi cualquier caracterización biológica, el conocimiento de la historia filogenética de los monos capuchinos no es ajena a la problemática antes mencionada en la taxonomía. Los estudios más completos de este tipo son escasos, y en algunos casos se encuentran íntimamente involucrados en las decisiones taxonómicas (Lynch Alfaro et al., 2012a). La divergencia entre los grupos gráciles y robustos de 6,7 Ma ha sido estimada utilizando secuencias de genes mitocondriales. Según esta hipótesis, cada linaje se habría originado producto del aislamiento producido por el establecimiento del río Amazonas. Los ancestros del subgrupo *Cebus* habrían quedado en el macizo guayanés y los del subgrupo *Sapajus* en el macizo brasileño. A partir de ahí cada subgrupo habría divergido en diferentes especies en el amazonas, los gráciles, y en la selva atlántica, los robustos. Posteriormente, la expansión de los bosques húmedos en el Pleistoceno, uniendo la selva amazónica y la atlántica, explicaría la expansión del subgrupo *Sapajus* hacia el Amazonas, y la presencia actual de algunas especies allí (Lynch Alfaro et al., 2012).

Sin embargo un re análisis de los datos utilizados por Lynch Alfaro y colaboradores (2012), agregando secuencias de *Sapajus xanthosternos* y *Sapajus flavius*[2], no sólo no recuperó la misma filogenia compatible con la mencionada hipótesis biogeográfica, sino que todos los análisis realizados mostraron un arreglo polifilético entre las especies, que los autores adjudican a *lineage sorting* incompleto (Nascimento et al., 2015). Por otro lado, a partir del análisis de secuencias genómicas no

[2] Según la nomenclatura del autor (Nascimento et al., 2015). En la nomenclatura usada aquí corresponderían a *Cebus xanthosternos* y *Cebus flavius*

génicas en un estudio que contemplaba sólo algunas de las especies de *Cebus* Jameson Kiesling et al. (2015) hallaron una divergencia de 5,2 Ma entre el linaje grácil y robusto. Si bien obtienen dos clados plenamente separados al igual que Lynch Alfaro , estos autores se apoyan en las reglas establecidas por Wildman y Goodman (2004) según las cuales los taxones que comparten un ancestro en común entre 4 -6 Ma deben formar parte del mismo género.

Frente a las evidencias expuestas en los citados artículos todo parece indicar que el complicado problema de la taxonomía de los capuchinos estaría resuelto. Sin embargo no existe un acuerdo completo entre los primatólogos, tanto por la decisión taxonómica en si misma (Rosenberger, 2012), como por cuestionamientos a la metodología utilizada (Nascimento et al., 2015; Ruiz-García et al., 2012) o a las interpretaciones efectuadas (Jameson Kiesling et al., 2015; Wildman and Goodman, 2004). E incluso desde la citogenética, el género *Cebus* (*sensu lato*) muestra una gran homogeneidad que lo distingue de otros géneros, como por ejemplo la presencia de un tipo de heterocromatina género-específica (Nieves et al., 2011; Nieves, 2007). Teniendo en cuenta el importante impacto que esta decisión taxonómica ya ha tenido, y seguramente seguirá teniendo a futuro, en este trabajo de tesis se ha tomado la decisión de nombrar las especies aquí utilizadas según el esquema original de Silva Jr. (2001), en el cual se reconoce la divergencia dentro del género, y se mantiene al género *Cebus* completo en su sentido más similar al original.

Objetivos e Hipótesis

Objetivo General

El objetivo general de esta tesis es analizar el proceso de divergencia evolutiva en los géneros *Cebus* y *Ateles* (Primates: Platyrrhini) tomando como eje de análisis la variabilidad en el tamaño del genoma y su influencia en la diversidad del cariotipo, y la proporción y composición de ADN repetitivo en cada genoma a nivel citogenético.

Para esto se plantearon los siguientes **Objetivos Específicos:**

1. Cuantificar el tamaño del genoma de las especies pertenecientes a los géneros *Cebus* y *Ateles.*

2. Analizar cualitativamente la distribución y composición de heterocromatina en el cariotipo de las especies de los géneros *Cebus* y *Ateles*.

3. Identificar mediante Hibridación Genómica Comparada (CGH) las regiones cromosómicas relacionadas con las diferencias en el tamaño del genoma entre las especies con mayor y menor contenido de ADN nuclear, dentro cada género.

Hipótesis

1. Existe variación en el tamaño del genoma de las especies *Cebus* y *Ateles*, y estas diferencias se relacionan con la divergencia de las especies de cada género.

2. La variabilidad en el tamaño del genoma se relaciona directamente con la proporción y distribución de heterocromatina en el cariotipo de cada especie

3. Las diferencias en el tamaño del genoma entre especies se localizan tanto en regiones heterocromáticas como eucromáticas.

Materiales y Métodos

III: 1 MATERIAL BIOLÓGICO E INDIVIDUOS UTILIZADOS

Los estudios realizados en este trabajo de tesis se llevaron a cabo a partir de muestras de sangre fresca o congelada, biopsias de tejido subepidérmico o bien fijaciones cromosómicas previamente obtenidas, de 76 ejemplares en cautiverio pertenecientes a los géneros *Cebus* y *Ateles.* La **Tabla 1** resume la información detallada sobre las especies analizadas, el número de ejemplares, sexo, procedencia y material biológico inicial.

Especie	Cantidad de ejemplares	Id ejemplar	Procedencia[a]	Sexo	Material biológico inicial[b]
Cebus nigritus	12	656	EP, Argentina	H	S
		657	EP, Argentina	M	S
		677	EP, Argentina	H	S
		645	EP, Argentina	M	S
		644	EP, Argentina	H	S
		712	EP, Argentina	M	S
		707	EP, Argentina	H	S
		734	EP, Argentina	M	S
		760	GO, Argentina	M	S
		761	GO, Argentina	H	S
		762	GO, Argentina	H	S
		770	JZBA, Argentina	M	B
C. cay	28	547	EBCO, Argentina	M	FC
		636	JZC, Argentina	M	S
		658	EP, Argentina	M	S
		659	EP,Argentina	M	S
		660	EP, Argentina	H	S
		674	EP, Argentina	M	S
		675	EP, Argentina	H	S
		676	EP, Argentina	M	S
		737	JZBA, Argentina	M	S
		738	JZBA, Argentina	M	S
		739	JZBA, Argentina	M	S
		740	JZBA, Argentina	H	S
		741	JZBA, Argentina	M	S
		763	HM, Argentina	H	S
		764	HM, Argentina	H	S
		765	HM, Argentina	H	S
		773	EFA, Argentina	M	S
		775	EFA, Argentina	M	S
		776	EFA, Argentina	M	S
		777	EFA, Argentina	M	S
		778	EFA, Argentina	H	S
		779	EFA, Argentina	M	S
		780	EFA, Argentina	M	S
		781	EFA, Argentina	H	S
		782	EFA, Argentina	M	S
		783	EFA, Argentina	M	S
		784	EFA, Argentina	M	S
		790	JZBA, Argentina	H	S

Especie	Cantidad de ejemplares	Id ejemplar	Procedencia[a]	Sexo	Material biológico inicial[b]
C. cay (cont.)		791	JZBA, Argentina	M	S
C. apella	2	681	URRAS, Colombia	H	FC
		751	CNP, Brasil	H	FC
C. libidinosus	1	753	CNP, Brasil	M	S
C. xanthosternos	1	755	CNP, Brasil	M	S
C. olivaceus	1	754	CNP, Brasil	M	S
C. albifrons	5	538	ZC, México	H	FC
		539	ZC, México	H	FC
		680	URRAS, Colombia	H	S
		682	URRAS, Colombia	H	S
		683	URRAS, Colombia	H	S
Ateles chamek	12	516	JZC, Argentina	M	FC
		669	JZBA, Argentina	H	S, B
		670	JZBA, Argentina	M	S, FC
		671	JZBA, Argentina	M	S, B
		672	GLE, Argentina	H	S
		673	GLE, Argentina	H	S
		678	GLE, Argentina	H	S
		679	GLE, Argentina	M	S
		715	JZBA, Argentina	M	S
		716	JZBA, Argentina	H	S
		767	HM, Argentina	H	S
		768	HM, Argentina	M	S
A. geoffroyi	10	361	EBUV, México	M	SC
		688	EBUV, México	M	S
		689	EBUV, México	M	S
		690	EBUV, México	H	S
		691	EBUV, México	H	S
		692	EBUV, México	M	S
		693	EBUV, México	H	S
		694	EBUV, México	M	S
		695	EBUV, México	H	S
		705	JZBA, Argentina	H	S
A. paniscus	2	161	ZLP, Argentina	M	SC
		752	CNP, Brasil	M	FC
A. belzebuth	1	749	JZBA, Argentina	M	S
Total	**76**				

Tabla 1. Individuos analizados en esta tesis y material biológico inicial. [a] *EFA: Estación de Fauna Autóctona, Salta, Argentina; URRAS: Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres, Bogotá, Colombia; JZBA: Jardín Zoológico de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina; HM: Reserva Horco Molle, Tucumán, Argentina; EBUV: Estación Biológica de la Universidad Veracruzana, Catemaco, México; GLE: Granja La Esmeralda, Santa Fe, Argentina; JZC: Jardín Zoológico de Córdoba, Córdoba, Argentina; ZC: Zoológico de Chapultepec, Dirección General de Zoológicos de la Ciudad de México, México; CNP: Centro Nacional de Primatas, Belém, Brasil; EBCO: Estación Biológica de Corrientes, Corrientes, Argentina; EP: El Puma, Misiones, Argentina; GO: Güirá-Oga Misiones, Argentina.* [b] *S: Sangre; SC: sangre congelada; FC: fijación cromosómica; B: biopsia de tejido subepidérmico.*

En ocasiones, también fue posible obtener muestras sanguíneas de otras especies de primates neotropicales, fuera de los objetivos de esta tesis, las cuales se utilizaron para cuantificación de tamaño de genoma. En la **Tabla 2** se detallan estos otros ejemplares muestreados

Especie	Cantidad de ejemplares	Id ejemplar	Procedencia[a]	Sexo
Alouatta guariba	2	718	CSB, Brasil	M
		719	CSB, Brasil	H
Alouatta caraya	9	721	JZBA, Argentina	H
		722	JZBA, Argentina	M
		723	AZ, Argentina	H
		724	AZ, Argentina	M
		725	AZ, Argentina	M
		726	AZ, Argentina	H
		727	AZ, Argentina	M
		728	AZ, Argentina	M
		766	HM, Argentina	M
Aotus azarae	1	786	EFA, Argentina	H
Saimiri boliviensis	1	785	EFA, Argentina	H

Tabla 2. Otros ejemplares analizados en esta tesis pertenecientes a diferentes géneros de Platyrrhini. [a]AZ: Arroyo Zacarías, Corrientes, Argentina (27˚ 31′ 04 S, 58˚ 38′ 49 O) gentileza de G. Zunino; CSB: Criadero São Braz, Santa María, Brasil; EFA: Estación de Fauna Autóctona, Salta, Argentina; HM: Reserva Horco Molle, Tucumán, Argentina; JZBA: Jardín Zoológico de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

III: 1.1 Obtención de las muestras

La mayoría de las muestras utilizadas fueron obtenidas especialmente para el desarrollo de esta tesis, durante las jornadas de control sanitario de las instituciones en las que los ejemplares se encuentran alojados o bien durante campañas organizadas especialmente en colaboración. Una porción del material utilizado (6 muestras) proviene de trabajos anteriores desarrollados en nuestro laboratorio, lo que explica que para algunas muestras el material inicial sea sangre congelada o fijación cromosómica.

En los casos en los que el material biológico fue obtenido directamente de los ejemplares, éstos fueron anestesiados con Ketamina (Parke Davis 10 mg/kg peso). Las muestras fueron tomadas por el equipo veterinario de cada institución colaboradora. Por venipunción femoral con jeringas descartables estériles heparinizadas (Heparina Sobrius, 500UI/ml) se extrajeron de 3 a 5 ml de sangre venosa para realizar los cultivos celulares de linfocitos de sangre periférica. Paralelamente, de algunos individuos también se obtuvieron biopsias de tejido subepidérmico de muslo para realizar cultivo de fibroblastos.

III: 2 METODOLOGÍA DE TRABAJO

Los procedimientos generales aplicados se representan en la **figura 6:**

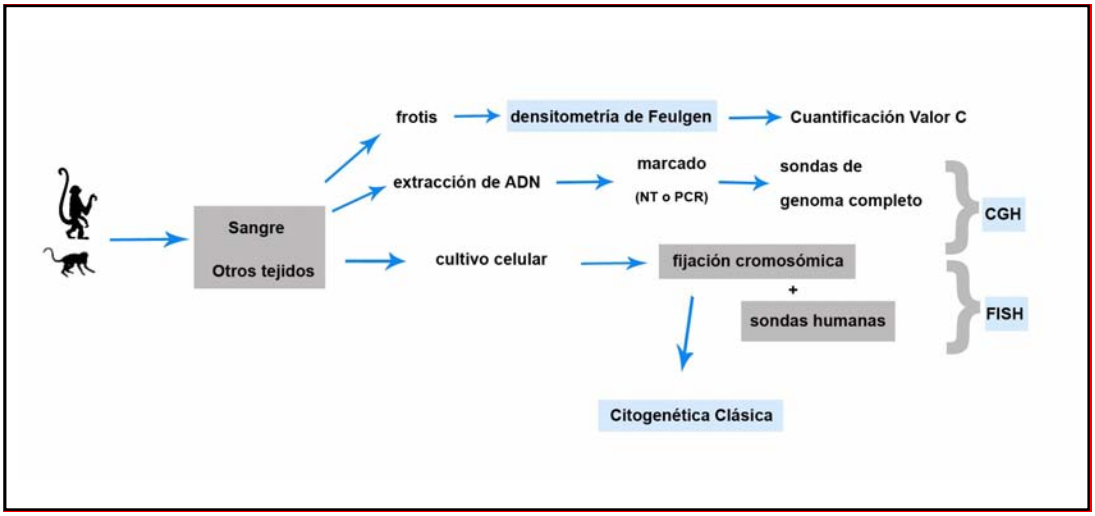

Figura 6. Procedimientos generales. *Materiales (gris) y métodos (celeste) principales aplicados en esta tesis. Detalles y consideraciones metodológicas en el texto.*

III: 2.1 Cultivos celulares y obtención de fijaciones cromosómicas

III: 2.1.1 Cultivo de linfocitos de sangre periférica

Se realizó cultivo de linfocitos de sangre periférica por duplicado a partir de las muestras de sangre referidas anteriormente, según técnica estándar modificada (Steinberg et al 2014) con el objetivo de obtener células mitóticas en división en gran concentración:

- En frascos de cultivo estériles se colocó 7,5 ml de medio de cultivo Ham F10 (GIBCO BRL.); 1,5 ml de Suero Fetal Bovino (Bioser); 0,2 ml de antibiótico (Penicilina/Estreptomicina GIBCO BRL.); 0,2 ml de Fitohemaglutinina (GIBCO BRL.) y 1 ml de sangre entera, con un volumen final de 10 ml. Los frascos de cultivo se mantuvieron durante 72hs en estufa de cultivo a 37°C.

- Se agregó 0,1 ml de Colchicina (100µl/ml) (Merck) y se incubó en estufa de cultivo a 37°C por 40 minutos más, a fin de acumular células en metafase. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 1400 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante.

- El botón celular fue resuspendido en solución hipotónica KCl (0,075M) e incubado a 37°C durante 30 minutos.

- Se agregaron unas gotas de fijador Carnoy (metanol: ácido acético glacial en proporción 3:1) y nuevamente se centrifugaron las muestras descartando el sobrenadante.

- Se resuspendió el *pellet* en 6 ml de Carnoy para el fijado del material a 4°C durante 20 minutos. Se repitió la centrifugación y resuspensión en fijador para lavar el botón celular hasta obtener un sobrenadante translúcido.

III: 2.1.2 Cultivo de fibroblastos

Se colectaron muestras de tejido subepidérmico de muslo de aproximadamente 3x3 mm de superficie utilizando bisturí y aguja estéril. Las biopsias fueron conservadas en medio de cultivo DMEM-CO_2 independiente (GIBCO BRL) hasta su procesamiento en el laboratorio, en el caso que el procesamiento del material se hiciera el mismo día de la obtención de la muestra. Cuando esto no fue posible, las biopsias fueron conservadas en medio de cultivo y 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO, SIGMA-ALDRICH), en nitrógeno líquido hasta su procesamiento.

- Los trozos de tejido subepidérmico se lavaron con PBS y se disgregaron con pinzas y bisturí. Luego los trozos más pequeños se distribuyeron a frascos de cultivo de 25 mL.

- Se agregó 5 mL de medio de cultivo Leibovitz (GIBCO BRL) con 12% de suero fetal bovino (Bioser), 0,4-1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomicina GIBCO BRL) y 0,15% de Fungizone (Amphotericina B 250 µg/mL, GIBCO BRL), y se dejaron en estufa de cultivo a 37°C entre 3-20 días.

- Cada 24-48hs se realizó el control de los cultivos por coloración de medio, densidad y morfología celular empleando un microscopio de contraste de fases (TCM400, Labomed, USA). Se hicieron cambios periódicos de medio de cultivo y se controló la aparición de células adheridas a la placa.

- Alcanzada la confluencia se realizaron, según el caso y las condiciones, hasta 5 repiques, usando 2 mL de Tripsina 0,25% (GIBCO BRL) durante 3-5 minutos a 37°C.

- En el momento del sacrificio del cultivo se agregó 100µl de Colchicina por frasco (100µl/ml) (Merck) y se los incubó por 1h 30min a 37°C. Posteriormente se repitió el proceso de tripsinización, recuperando el volumen completo en un mismo tubo de centrífuga. Se centrifugó 5min a 990rpm y se descartó el sobrenadante. Al botón celular resultante se le realizó el mismo procedimiento de fijado y lavado antes descrito (Ver *Cultivo de linfocitos de sangre periférica*).

III: 2.2 Obtención de extendidos cromosómicos

Los extendidos mitóticos se realizaron en portaobjetos de vidrio limpios, previamente desengrasados y luego mantenidos en etanol 96%. Los preparados se realizaron a partir de 20µl de fijación celular, resuspendida en Carnoy o ácido acético 60% (dependiendo de la presencia de restos de citoplasma), sobre portaobjetos humedecidos con vapor de agua. De cada fijación cromosómica se preparó al menos una lámina control, a la cual se le realizó tinción convencional con colorante Giemsa al 3% con el objetivo de establecer dos parámetros:

- Índice mitótico (IM): Porcentaje de células en metafase sobre un total de 1000 núcleos.
- Número cromosómico modal (2n): Cantidad de cromosomas por célula. Idealmente se contabiliza un mínimo de 50 células.

III: 2.3 Cuantificación del tamaño de genoma

Con el objetivo de determinar el tamaño del genoma de cada especie en estudio se realizaron frotis sanguíneos de la mayor cantidad posible de individuos distintos. Por cada muestra individual de sangre fresca se realizaron, según la disponibilidad de material, entre 1 y 5 frotis, los cuales se prepararon en el momento del manejo de los animales y fueron conservados a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

Los datos de contenido de ADN se obtuvieron a través de análisis de imágenes por densitometría de Feulgen (Hardie et al. 2002). Brevemente, esta técnica se basa en que la cantidad de colorante detectado es directamente proporcional a la cantidad de ADN presente en la muestra. A su vez, la cantidad de colorante se determina en base a la cantidad de luz que este absorbe, es decir su densidad óptica. El protocolo incluye la unión del reactivo de Schiff a grupos aldehídos del ADN luego de una depurinación con ácido fuerte (HCl). Por último, los datos de densidad de coloración son transformados a valor C a partir de una curva de regresión entre el tamaño de genoma conocido de especies de referencia y los valores de densidad óptica.

Por cada individuo analizado se midió un mínimo de 30 núcleos de linfocitos. Los datos de densidad óptica fueron convertidos a tamaño de genoma en picogramos, usando también linfocitos provenientes de muestras de *Gallus gallus domesticus* (1.25pg) y *Sus scrofa domesticus* (2.91pg) como estándares de comparación. La reacción de Feulguen se llevó a cabo según Hardie et al. (2002), incluyendo una incubación en HCl 5M por 2 horas como condiciones de hidrólisis y 2 horas a

temperatura ambiente para la exposición al reactivo de Schiff. Luego, los núcleos coloreados se fotografiaron utilizando un microscopio Leica DM2500 acoplado a una cámara digital, y se utilizó el programa de análisis de imágenes BioQuant Life Science versión 8.40.20.MR para medir el tamaño del genoma. El desarrollo experimental de esta sección fue llevado a cabo en colaboración por el laboratorio de investigación del Dr. Gregory, en la Universidad de Guelph, Canadá.

Por último los datos de los distintos individuos de las diferentes especies fueron comparados a través de análisis de la varianza (ANOVA) de 2 factores anidados, usando el software InfoStat, versión 2013 (InfoStat Group, FCA Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

III: 2.4 Citogenética clásica

Los preparados destinados al análisis por citogenética clásica mediante patrones de bandas fueron goteados como ya se mencionó y se dejaron “envejecer” a temperatura ambiente por un período variable de hasta 7 días.

Para todos los ejemplares de los cuales se disponía de fijación cromosómica se realizó la caracterización citogenética tradicional utilizando las técnicas de tinción diferencial de Bandas G-Wright y Bandas C, con el fin de confirmar la diagnosis taxonómica realizada a partir de características fenotípicas (Steinberg et al 2014). En particular, las bandas G-Wright, al diferenciar a cada cromosoma por su patrón, permiten reconocer reordenamientos cromosómicos de baja frecuencia —que determinan variantes cromosómicas dentro de cada especie— y cuyo conocimiento puede ser de relevancia en las posteriores comparaciones. Además para establecer parámetros de comparación entre las especies analizadas en este trabajo de tesis se realizó la técnica de bandas DAPI/CMA3.

A continuación se detallan los protocolos de las técnicas de bandas, optimizados para el trabajo con cromosomas de primates:

A. Bandas G-Wright

- Incubación en 2xSSC a 60˚C durante 5-10 segundos.
- Enjuague con agua destilada a temperatura ambiente.
- Incubación en solución Wright con buffer Sorensen (1:3) a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- Enjuague con agua destilada.
- Observación en microscopio óptico.

B. Bandas C

- Incubación en HCl 2N a temperatura ambiente durante 10-20 minutos.
- Enjuague con agua.
- Incubación en $Ba(OH)_2$ a 50˚C durante 0,5-1 minutos.
- Enjuague con agua.
- Incubación en 2xSSC a 60˚C durante 1 hora.
- Tinción con Giemsa 3%.
- Observación en microscopio óptico.

C. Bandas DAPI-CMA_3

- Incubación en Metanol a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego dejar secar.
- Lavado con buffer Mc Ilvaine.
- Incubación en cámara húmeda en oscuridad durante 20 minutos con 75 µl de solución DAPI (0.01 mg/ml).
- Lavado con agua destilada, buffer Mc Ilvaine y nuevamente con agua destilada.
- Incubación en cámara húmeda en oscuridad durante 1 hora y media con 50 µl de CMA_3 (0,6 mg/ml en buffer Mc Ilvaine).
- Lavado con agua destilada, buffer Mc Ilvaine y nuevamente con agua destilada.
- Montaje y observación en microscopio de fluorescencia.

Para cada uno de los individuos estudiados se fotografiaron entre 5 y 25 metafases por cada una de las técnicas aplicadas. Se armaron los cariogramas de bandas G y se compararon con los cariotipos descritos en la bibliografía. Asimismo, se identificaron los patrones más conspicuos y característicos de bandas C y DAPI/CMA3. A partir de las imágenes de bandas C se determinó el porcentaje del cariotipo correspondiente a heterocromatina (% Het) por individuo y especie utilizando el programa MicroMeasure 3.3 (Colorado State University, USA).

III: 2.5 Obtención y marcado de sondas de ADN para FISH y CGH

Las sondas para CGH fueron desarrolladas a partir de ADN genómico extraído de las mismas muestras de sangre mencionadas en la **tabla 1**, partiendo de al menos 200 µl de sangre (*DNABlood mini kit*, QIAGEN y *JETquick*, GENOMED). Posteriormente se cuantificó la concentración de ADN en cada muestra (espectrofotómetro AQ-07 Ampliquant). A partir de los valores de concentración y pureza de ADN (absorbancia 260/280nm) como indicadores de calidad, y considerando además el sexo del individuo muestreado, de cada especie a analizar se eligió una o dos muestras para continuar con el protocolo de marcado.

Para el análisis de sintenias cromosómicas a través de FISH se utilizaron sondas cromosómicas humanas (*Homo sapiens whole chromosome paints:* HSA-WCP) obtenidas a partir de la marcación de ADN de cada cromosoma (Coriell Institute, NJ, USA). Además, se trabajó con sondas específicas de genes ubicados en el cromosoma Y humano (Lexel LIVe) **(Tabla 3).**

Sonda	Tipo	Fluorocromo de marcado	Protocolo de marcado
ACH	Genoma total	FITC & Rodamina	NT
APA	Genoma total	FITC & Rodamina	NT
AGE	Genoma total	FITC & Rodamina	NT
ABE	Genoma total	FITC & Rodamina	NT
COL	Genoma total	FITC	PCR
CXA	Genoma total	Rodamina	PCR
CLI	Genoma total	FITC	PCR
CNI	Genoma total	FITC & Rodamina	PCR & NT
HSA 1	WCP	Rodamina	NT
HSA 2	WCP	Rodamina	NT
HSA 3	WCP	Rodamina /FITC	NT

Sonda	Tipo	Fluorocromo de marcado	Protocolo de marcado
HSA 4	WCP	FITC	NT
HSA 5	WCP	FITC	NT
HSA 6	WCP	FITC	NT
HSA 7	WCP	Rodamina	NT
HSA 8	WCP	Rodamina/ FITC	NT
HSA 9	WCP	Rodamina	NT
HSA 10	WCP	FITC /Rodamina	NT
HSA 11	WCP	Rodamina	NT
HSA 12	WCP	FITC	NT
HSA 13	WCP	Rodamina	NT
HSA 14	WCP	Rodamina	NT
HSA 15	WCP	Rodamina	NT
HSA 16	WCP	FITC/Rodamina	NT
HSA 17	WCP	Rodamina	NT
HSA 18	WCP	Rodamina	NT
HSA 19	WCP	Rodamina	NT
HSA 20	WCP	FITC	NT
HSA 21	WCP	FITC	NT
HSA 22	WCP	FITC	NT
HSA X	WCP	FITC	NT
AZFb	Subcromosómica	Rodamina	No corresponde
AZFc	Subcromosómica	FITC	No corresponde
AZF CDY2A-2B	Subcromosómica	Rodamina	No corresponde
X-Y pter	Génica	FITC	No corresponde
X-Y qter	Génica	Rodamina	No corresponde
ZFY	Génica	Rodamina	No corresponde
SRY	Génica	Rodamina	No corresponde
USP9Y	Génica	FITC	No corresponde

Tabla 3 (páginas 61-62). Conjunto de sondas de ADN utilizadas en esta tesis en hibridación *in situ* fluorescente. *Las sondas genómicas y cromosómicas fueron obtenidas en el laboratorio como parte del trabajo experimental de esta tesis, las sondas génicas son comerciales (Lexel LIVe).*

A continuación se detallan los protocolos de amplificación y marcado utilizados en la obtención de las sondas:

A. *Marcado por "Nick translation"*

- En un tubo de 200 µl, se preparó en frío (~4°C) la mezcla de reacción con un volumen final de 50 µl por cada 1,5 µg de ADN a marcar:

	Vol.	**C_f**
Buffer Polimerasa 10X	5 µl	1x
Ditioteitrol (DTT) 1M	0,5 µl	10mM
dNTP 400 µM (A, C, G)	5 µl	40 µM
dTTP 100 µM	2,5 µl	5 µM
DNAsa	0,5 µl	0,05U
ADN polimerasa	1,5 µl	15U
Rho/FITC dUTP 1mM	0,5 µl	10 µM
Agua	c/n	-

- Se incubó a 15°C durante 90 minutos.
- Se incubó a 94°C durante 5 minutos y posteriormente se agregaron 5 µl de EDTA 500 µM.

B. *Marcado por PCR*

B1. Amplificación genómica DOP-PCR (sin incorporación de nucleótidos marcados, para aumentar la concentración de ADN genómico a marcar).

- Mezcla de reacción (Vol. Final= 25 µl):

	Vol.	**C_f**
Buffer PCR 10X –$MgCl_2$ +KCl	2,5 µl	1X
$MgCl_2$ 25mM	2,5 µl	25mM
dNTP (A, C, G, T) 2mM c/u	2,5 µl	0,2mM
Primers DOP 10 µM (5' – CCGACTCGAGNNNNNNATGTG – 3')	2,5 µl	1 µM
TAQ polimerasa 5U/ µl	0,5 µl	
ADN	2 µl	
Agua	13,5 µl	

- Programa:

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Precalentamiento	94°C	2 minutos	1
Desnaturalización	94°C	1,5 minutos	
Alineamiento (annealing)	37°C	2 min	12
Alineamiento en rampa (37-72°C)	T°C +3,5°C	15 segundos	
Elongación final	72°C	2 minutos	1

- El producto de esta reacción se controló por electroforesis en un gel de agarosa al 2% durante 45 minutos a 90 Volts permitiendo corroborar la presencia de ADN en el producto obtenido como un pool de fragmentos de entre 300 y 500 pb aproximadamente.

B2. Marcado DOP-PCR

- Mezcla de reacción (Vol. Final 50 µl):

	Vol.	C_f
Buffer PCR 10X –$MgCl_2$ +KCl	5 µl	1X
$MgCl_2$ 25mM	1,5 µl	25mM
dNTP (dATP,dCTP,dGTP 2mM; dTTP 1mM) 2,5 µl	0,2mM/ 0,1mM	
FITC/RHO-dUTP 1mM	2,5 µl	0,1mM
Primers DOP 10 µM (5' – CCGACTCGAGNNNNNNATGTG – 3')	3 µl	0,6 µM
TAQ polimerasa 5U/ µl	0,5 µl	
ADN (amplificado = **B1**)	2 µl	
Agua	34 µl	

- Programa:

	Temp.	Tiempo	Nº ciclos
Precalentamiento	94 °C	2 minutos	1
Desnaturalización	94 °C	30 segundos	
Alineamiento (annealing)	58 °C	45 segundos	25
Extensión	72 °C	30 segundos	
Finalización	15 °C	5 minutos	1

- El producto de esta reacción y su correcto marcado se corroboró directamente realizando hibridación *in situ* fluorescente (FISH) sobre extendidos mitóticos de la misma especie cuyo ADN fue utilizado como molde.

III: 2.6 Citogenética molecular

III: 2.6.1 Hibridación in situ fluorescente (FISH) y variantes: Consideraciones técnicas.

Las técnicas de citogenética molecular utilizadas en este trabajo de tesis incluyen distintas modificaciones al protocolo tradicional de hibridación *in situ* fluorescente. Las diferentes variantes empleadas responden tanto a los intereses específicos establecidos en los objetivos —como por ejemplo la detección de regiones de homología o por el contrario la detección de diferencias entre especies—, como también a cuestiones metodológicas inherentes a las técnicas y materiales empleados. En este sentido, uno de los principales factores que determinaron la elección de uno u otro protocolo tiene que ver con el tipo de sonda utilizada, ya sea ésta génica, cromosómica o genómica. Sin embargo el material y especie diana también fueron factores influyentes en la elección de protocolos alternativos de hibridación.

A grandes rasgos, las técnicas de hibridación *in situ* fluorescente permiten determinar la localización de una secuencia de ADN en una muestra a partir de la hibridación entre un segmento de ADN marcado (sonda) con un determinado ADN blanco, ya sean núcleos interfásicos o cromosomas. Las variaciones entre las diferentes estrategias para llevar a cabo la hibridación tienen que ver principalmente con las condiciones de desnaturalización de ambas muestras de ADN (sonda y blanco). Este proceso puede llevarse a cabo simultáneamente o por separado, utilizando una combinación de agentes químicos desnaturalizantes y temperatura. Como los tratamientos de desnaturalización pueden llevar a la pérdida de morfología de los cromosomas y afectar la señal de hibridación, se debe prestar particular atención tanto al tiempo como a la temperatura de desnaturalización. La concentración de los agentes desnaturalizantes utilizados, en este caso Formamida o NaOH, también está relacionada con la temperatura de desnaturalización del ADN. La presencia de Formamida en la mezcla de hibridación y en la solución de desnaturalización reduce la temperatura de desnaturalización del ADN permitiendo trabajar a temperaturas menores, conservando así la morfología cromosómica.

La Hibridación Genómica Comparativa es una técnica de citogenética molecular que permite la comparación cuantitativa de genomas completos a partir de la hibridación competitiva de dos muestras de ADN, sin necesidad de contar con información de secuencias **(Figura 7)**. La técnica consiste en que ambos genomas a utilizar como sondas se colocan en cantidades iguales en condiciones que permitan la co-hibridación de los mismos. De esta manera, las secuencias comunes a las dos muestras, al hibridarse entre si quedan fuera del análisis —de aquí la razón por la cual la CGH enfatiza las diferencias más que las similitudes—. Luego se utiliza esta solución para hibridar sobre metafases blanco de cada una de las muestras en estudio, en una reacción de FISH convencional. Finalmente, se fotografían las metafases hibridadas y, utilizando un programa de análisis de imágenes, se mide la intensidad de fluorescencia a lo largo de cada uno de los cromosomas, en cada metafase analizada. A partir de los datos crudos de cada medición se calcula un cociente de intensidad rojo/verde (R/V) para cada cromosoma, donde un cociente r/v=1 indica igual cantidad de ADN entre ambos genomas en estudio para dicho cromosoma.

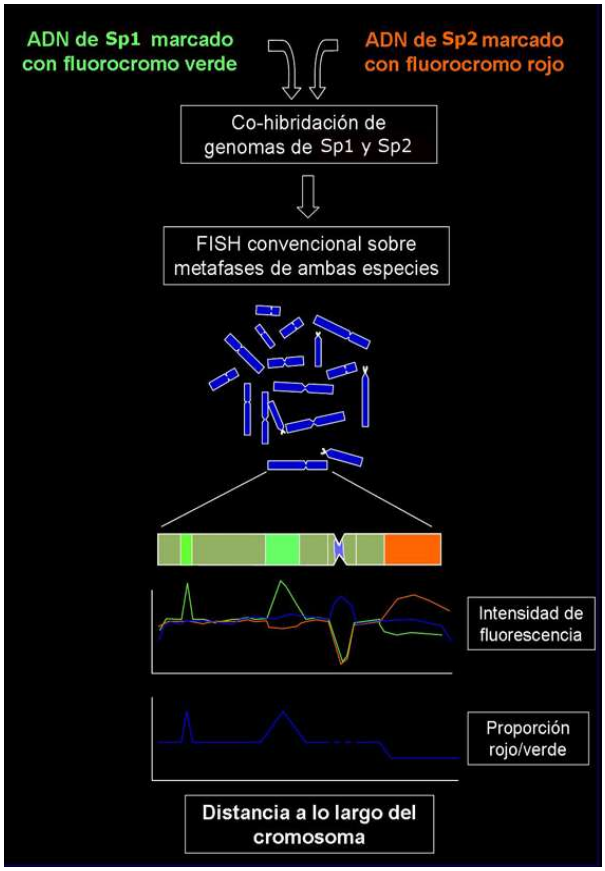

Figura 7. Diagrama de procedimientos de CGH.

III: 2.6.2 Protocolos de hibridación in situ: FISH, GISH y CGH

Para las hibridaciones con sondas génicas, cromosómicas o genómicas (es decir FISH o GISH) es posible realizar indistintamente cualquiera de las alternativas de desnaturalización. Sin embargo para CGH, como es pre-requisito realizar la cohibridación de las dos sondas genómicas, necesariamente se debe utilizar un protocolo de desnaturalización por separado para las sondas y el ADN blanco. La elección entre utilizar Formamida o NaOH como agente desnaturalizante en este trabajo dependió de la especie blanco a ser utilizada. Para las especies de *Ateles* se utilizó la desnaturalización con NaOH, mientras que para las de C*ebus* se utilizó Formamida.

En todos los casos las láminas se prepararon en el mismo día y se dejaron secar al aire, a temperatura ambiente. Se utilizó un *buffer* de hibridación comercial (Lexel LIVe) en una proporción 0,5:2,5 sonda – *buffer*, respectivamente. En los casos que se usaron dos sondas simultáneamente la proporción fue 1:1:3,5. Los protocolos de hibridación fueron ajustados a las especies a analizar tomando en cuenta trabajos anteriores en el laboratorio donde se desarrolló esta tesis así como las recomendaciones propias del proveedor de las sondas comerciales.

A continuación, se presentan las 3 alternativas de hibridación utilizadas y finalmente el protocolo de revelado y montaje:

A. **Desnaturalización simultánea**

a. Envejecer las láminas 30min a 70°C en placa térmica.

b. Gotear la mezcla de sondas y buffer sobre la lámina. Colocar cubreobjetos y sellar.

c. Co-desnaturalizar 12min a 71°C en placa térmica.

d. Hibridar en cámara húmeda a 37ºC (al menos 4h, o hasta el día siguiente).

B. **Desnaturalización por separado con Formamida**

a. Envejecer las láminas en estufa 1h a 37°C.

b. Incubar en 2xSSC 30min a 37°C.

c. Desnaturalizar el ADN cromosómico en la lámina con Formamida 70%/2xSSC 2min a 66-68°C.

d. Enjuagar en Etanol 70% frío.

e. Deshidratar en alcoholes (70%, 90% y 100%): 2min cada uno.

f. Por separado, desnaturalizar la mezcla de sondas y buffer: 70°C 7min. En el caso de las sondas genómicas para CGH, posteriormente a la desnaturalización permitir la co-hibridación durante al menos 2h a 37 °C.

g. Gotear sondas sobre la lámina, cubrir, sellar e hibridar en cámara húmeda a 37°C hasta el día siguiente.

C. **Desnaturalización por separado con NaOH**

a. Envejecer las láminas en estufa 1h a 37°C.

b. Incubar en 2xSSC 30min a 37°C.

c. Enjuagar en Etanol 70%.

d. Desnaturalizar con NaOH 100mM/Etanol 70% 4min a temperatura ambiente.

e. Enjuagar en etanol 70%.

f. Deshidratar en alcoholes (70%, 90% y 100%): 2min cada uno.

g. Por separado, desnaturalizar la mezcla de sondas y buffer: 70°C 7min. En el caso de las sondas genómicas para CGH, posteriormente permitir la co-hibridación durante al menos 2h a 37 °C.

h. Gotear sondas sobre la lámina, cubrir, sellar e hibridar en cámara húmeda a 37°C hasta el día siguiente.

Independientemente del protocolo de desnaturalización, al finalizar la incubación se realizó revelado y montaje para la observación en microscopio de fluorescencia según como se describe a continuación:

Revelado y montaje

a. Incubación en 0,4xSSC/0,3% Tween 2min a 70°C.

b. Incubación 2XSSC/0,1% Tween 2 min a temperatura ambiente.

c. Montaje con DAPI+ *antifading.*

III: 2.7 Procesamiento y análisis de las imágenes de Hibridación Genómica Comparada

III: 2.7.1 Análisis de imágenes, medición de intensidad de fluorescencia e identificación de regiones cromosómicas de ganancia/pérdida relativa de ADN

De cada metafase se obtuvieron 3 fotografías, una con cada filtro específico: A (para DAPI, azul), I3 (para FITC, verde), N2.1 (para Rodamina, rojo) —en los dos últimos se capturó la imagen con el mismo valor de exposición (≈1ms)—, utilizando una cámara Leica DFC 340 FX acoplada a un microscopio Leica DMLB. En cada experimento de CGH se analizó un mínimo de 4 metafases, teniendo en cuenta factores como la calidad de la metafase, morfología cromosómica y homogeneidad de la hibridación, entre otros.

Para cada imagen se normalizó la escala de grises con ImageJ (Rasband, W.S. US National Institutes of Health, Maryland, USA). Luego se coloreó y se superpusieron las imágenes en rojo y verde, utilizando PhotoShop CS3 Extended 10.0 (Adobe System Incorporated) e Image Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics).

A partir de la imagen en DAPI de cada metafase a analizar se identificaron cada uno de los cromosomas y se armaron los cariotipos con las imágenes “rojo-verde”. Utilizando el programa Image Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics) se midió la intensidad de fluorescencia para cada fluorocromo en cada uno de los cromosomas de las metafases analizadas y los valores de intensidad de fluorescencia se exportaron a planilla de cálculo (Microsoft Office Excel 2007). Se excluyeron del análisis los cromosomas superpuestos o torcidos.

Posteriormente los valores de intensidad de fluorescencia se corrigieron entre homólogos, descartándose aquellos puntos (pixeles) que entre homólogos presentaran un desvío estándar mayor a 0,2 (Kallioniemi et al., 1994; Karhu et al., 1998). El rango de intensidad de fluorescencia correspondiente a ganancia/pérdida relativa entro los genomas se determinó experimentalmente (ver adelante sección III: 2.7.2 **Figura 8**).

Como último control de calidad de las metafases hibridadas se consideró el caso particular de los cromosomas sexuales. En un experimento ideal de CGH entre muestras (sondas) de distinto sexo —de la misma especie o especies muy cercanas— es esperable que todos los autosomas muestren una razón R:V alrededor de 1 mientras que para el cromosoma X sea de 0.5, ya que este valor representa la razón macho: hembra del número de copias para este cromosoma. Así, teniendo en cuenta la homología cromosómica del cromosoma X en los mamíferos se corroboró que este

cromosoma, en las metafases a analizar, presentara valores de intensidad de fluorescencia coherentes con la combinación de sondas utilizadas en cada caso.

Finalmente, de las metafases elegidas, en los cromosomas identificables y no superpuestos con otros, se consideraron como ganancias/pérdidas relativas entre los genomas a aquellas regiones que presentaran pixeles válidos con valores mayores o menores de intensidad de fluorescencia a los límites establecidos para el rango dinámico de hibridación.

III: 2.7.2 Establecimiento de valores límite de ganancia/pérdida de ADN en CGH

Previamente a la realización de las comparaciones pareadas por CGH entre especies distintas, se realizó el análisis del rango dinámico de hibridación (Karhu et al 1997) de las sondas genómicas a utilizar. En términos generales, el rango dinámico refiere a la proporción entre los valores máximos y mínimos de las cantidades de una variable, como por ejemplo la intensidad de luz en una imagen.

En el caso particular de los experimentos de CGH el rango dinámico de hibridación se relaciona con los valores de intensidad de fluorescencia rojo: verde (R/V). Idealmente se espera que cuando no existen diferencias cuantitativas entre las muestras, la proporción R/V sea igual a 1, y que las variaciones en este índice (i.e. el rango dinámico de hibridación) indiquen proporcionalmente ganancias o pérdidas relativas entre los genomas comparados **(Figura 8)**. En este sentido, resulta conveniente determinar los límites de dicho rango para el conjunto de reactivos (sondas) y fijaciones cromosómicas a utilizar. En la bibliografía existen valores de referencia que sirven como una aproximación *a priori,* pero con pequeñas variaciones entre ellas. Por ejemplo, Kallionemi et al 1992 proponen 0,85- 1,15; Siu & Kwong (1999/2000) recomiendan 0,75-1,25; Neusser (2005) usan 0,8 – 1,2, entre otros.

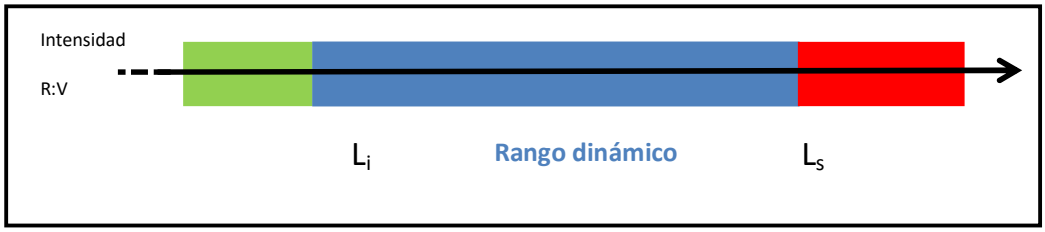

Figura 8. Rango dinámico de hibridación y límites inferior-superior (L_i - L_S) en relación a los valores de intensidad de fluorescencia R/V. *El color azul sobre la escala representa el rango de valores de intensidad de fluorescencia en donde no existen diferencias cuantitativas, así como el rojo y verde representan las ganancias/pérdidas relativas entre los genomas. En este trabajo los valores L_i y L_S fueron determinados experimentalmente para las sondas utilizadas, según se explica en la sección 2.7.2.*

En este trabajo, los valores límite fueron determinados experimentalmente comparando entre sí genomas sin diferencias a nivel cromosómico. Así, se eligieron sondas genómicas de individuos del mismo sexo y especie, sin variaciones en su cariología. Cuando fue posible, no se tuvieron en cuenta en esta parte del trabajo individuos con variantes cromosómicas notables determinadas por citogenética clásica, como los polimorfismos en los bloques de heterocromatina. Se realizaron dos experimentos de CGH "control". Por un lado para el conjunto de especies de monos capuchinos se usaron sondas y fijaciones de machos de CNI; para los monos araña se trabajó con sondas y fijaciones celulares de machos de ACH. La hibridación y análisis de imágenes de estos experimentos se realizaron según ya fue explicado en la sección 2.7.1.

A continuación se detallan los pasos realizados para obtener los valores de rango dinámico:

1. Se estimó el Desvío Estándar de intensidad de fluorescencia R/V entre homólogos de cada metafase.

2. Se descartaron los puntos (pixeles) de cada homólogo cuyos desvíos fueran mayores a 0,20 (Kallioniemi et al 1994, Karhu et al 1997), obteniéndose datos de intensidad de fluorescencia R/V corregidos para cada cromosoma.

3. Se determinó el valor mínimo, el máximo y la moda en cada cromosoma de las metafases analizadas.

4. Se obtuvo el promedio de los valores mínimo, máximo y moda considerando los datos de todas las metafases analizadas en su conjunto. Estos valores se tomaron como estimaciones de los límites inferior (L_i), superior (L_s) y del valor central del rango dinámico, respectivamente (**Tabla 11 y 12**, Anexo).

Resultados

IV: 1 CARACTERIZACIÓN CITOGENÉTICA DE LOS EJEMPLARES

IV: 1.1 Rendimiento de cultivos celulares y número cromosómico

El análisis completo por citogenética clásica realizado para los individuos utilizados en este trabajo permitió confirmar el diagnóstico taxonómico de 19 de los 25 ejemplares de *Ateles* **(Tabla 4)** y 42 de los 51 ejemplares de *Cebus* **(Tabla 5)** en estudio. Entre los ejemplares de *Ateles*, en 5 casos no hubo crecimiento celular y en otros 2 hubo crecimiento de linfocitos aunque con contaminación bacteriana, que impidió la utilización de dichas fijaciones. Entre los ejemplares de *Cebus*, hubo mejores rendimientos: sólo en 5 casos no hubo crecimiento celular y en otros 4 se observó contaminación del cultivo.

El índice mitótico se tomó como un indicador del rendimiento del cultivo en aquellos casos en los que se obtuvieron células en cultivo exitosamente **(Tabla 4 y 5)**. Los valores obtenidos muestran la respuesta diferencial esperable de los individuos a la estimulación debido a las condiciones de muestreo, el estado general de salud de los ejemplares y otros factores.

El número diploide descrito para la mayoría de las especies de *Ateles* es de 34 cromosomas, excepto *Ateles paniscus* que tiene 32 cromosomas debido a una translocación robertsoniana entre los cromosomas 4 y 12. En *Cebus* el número diploide más común es 54 cromosomas, excepto para *C. albifrons, C. olivaceus* y *C. kaapori* con 52 cromosomas.

Todos los individuos analizados en esta tesis mostraron un número cromosómico modal (2n) concordante con la especie asignada desde el fenotipo, en al menos 50% de células contabilizadas **(Tabla 4 y 5)**. En ciertos casos, debido a la mala calidad de las metafases obtenidas —cromosomas superpuestos o muy alongados, presencia de restos de membrana, etc. —, no fue posible alcanzar el mínimo de 50 células para la determinación adecuada del número modal según los criterios estándares en citogenética animal. De todas maneras, excepcionalmente para estos ejemplares, los cromosomas fueron contabilizados cuando así fue posible, y en todos los casos se obtuvo un porcentaje mayor al 55% de células con el 2n esperado para la especie.

ESPECIE	INDIVIDUO	IM (%)	2n	Nº de células	%2n
Ateles chamek	516	8,3[a]	34, XY[a]	51[a]	72,5[a]
	669	Sin crecimiento	no det	no det	no det
	670	3	34, XY	30 [b]	69
	671	Sin crecimiento	34, XY	25 [a b]	72
	672	3,7	34, XX	50	84
	673	2,4	34, XX	71	55
	678	Sin crecimiento	no det	no det	no det
	679	3,8	34, XY	50	60
	715	Contaminación!	no det	no det	no det
	716	Contaminación!	no det	no det	no det
	767	3,57	34, XX	37[b]	55
	768	2,1	34, XY	12[b]	55
A. geoffroyi	361	--	34; XY[a]	20[a, b]	55[a]
	688	<1	34, XY	18[b]	89
	689	1,9	34, XY	28[b]	78,5
	690	<1	34, XX	10[b]	80
	691	<1	34, XX	14[b]	78,5
	692	2,8	34, XY	50	70
	693	Sin crecimiento	no det	no det	no det
	694	<1	34, XY	10[b]	80
	695	Sin crecimiento	no det	no det	no det
	705	1,9	34, XX	15[b]	60
A. paniscus	161	--	32, XY[a]	50[a]	88[a]
	752	3,2	32, XY	50	80
A. belzebuth	749	<1	34, XY	33b	78,8
Total	**25 ejemplares analizados**	**16 cultivos exitosos**	**19 ejemplares confirmados taxonómicamente por citogenética**		

Tabla 4. Resultados de cultivos celulares de los ejemplares de *Ateles*: Índice mitótico (IM) y Número modal (2n), para cada muestra. Nº de células: cantidad de células contabilizadas por muestra; %2n: porcentaje de células con el número diploide descrito en la bibliografía. *a. Valores determinados previamente al inicio de esta tesis. b. Excepciones al conteo de 50 células para determinación de 2n debido a la mala calidad de las metafases. No det: no determinado (--): sólo se recuperaron los datos de 2n de trabajos previos en el laboratorio.*

ESPECIE	INDIVIDUO	IM (%)	2n	Nºcél.	%2n
Cebus nigritus	656	5,5	54, XX	101	59,4
	657	2,5	54, XY	103	52,4
	677	3,2	54, XX	54	52
	645	6,6	54, XY	50	80
	644	3,5	54, XX	50	72
	712	3,6	54, XY	50	68
	707	3,2	54, XX	50	58
	734	1,9	54, XX	50	76
	760	Sin crecimiento	no det	no det	no det
	761	Contaminado!	no det	no det	no det
	762	Contaminado!	no det	no det	no det
	770	<1	no det	no det	no det
C. cay	547	3,8	54, XY	50[a]	61,8[a]
	636	7,0	54, XY[a]	50[a]	76[a]
	658	2,5	54, XY	50	62
	659	5,3	54, XY	50	64
	660	4,4	54, XX	50	66
	674	<1,0	no det	no det	no det
	675	2,6	54, XX	56	51,8
	676	4,1	54, XY	64	60,9
	737	3,6	54, XY	90	54,4
	738	2,2	54, XY	50	56
	739	4,3	54, XY	50	64
	740	2,1	54, XX	50	58.
	741	1,5	54, XY	51	62.7
	763	3,1	54, XX	51	63,4
	764	2,6	54, XX	50	66
	765	3,8	54, XX	50	70
	773	3,9	54, XY	72	53
	775	4,5	54, XY	50	58
	776	3,0	54, XY	50	64
	777	2,7	54, XY	50	60
	778	Contaminado!	no det	no det	no det
	779	3,5	54, XY	52	54
	780	2,2	54, XY	50	58
	781	Contaminado!	no det	no det	no det
	782	3,5	54, XY	50	60
	783	2,3	54, XY	52	59,6
	784	Sin crecimiento	no det	no det	no det
	790	6,7	54, XX	51	72,5
	791	9,1	54, XY	50	70
C. apella	681	<1,0	No det	No det	No det
	751	<1,0	54, XY	59	50,8
C. libidinosus	753	3,9	54, XY	50	64
C. xanthosternos	755	2,0	54, XY	50	66
C. olivaceus	754	<1,0	52, XY	50	52
C. albifrons	538	1,8[a]	52,XX[a]	50[a]	64[a]
	539	5,1[a]	52,XX[a]	50[a]	70[a]
	680	2,1	52, XX	50	60
	682	2,6	52, XX	50	52
	683	3,5	52, XX	50	65
TOTAL	**51 ejemplares analizados**	**44 cultivos exitosos**	**42 ejemplares confirmados taxonómicamente por citogenética**		

Tabla 5 (pág. anterior). Resultados de cultivos celulares de los ejemplares de *Cebus*: Índice mitótico (IM) y Número modal (2n), para cada muestra. *Nº de células: cantidad de células contabilizadas por muestra; %2n: porcentaje de células con el número diploide descrito en la bibliografía a. Valores determinados previamente al inicio de esta tesis. b. Excepciones al conteo de 50 células para determinación de 2n debido a la mala calidad de las metafases. no det: no determinado.*

IV: 1.2 Técnicas de bandas cromosómicas para la determinación de especie

El análisis citogenético a partir de las técnicas de bandas permitió confirmar la diagnosis taxonómica de todos los individuos analizados, así como también caracterizar cromosómicamente a cada uno de ellos. A continuación se presentan los cariotipos con bandas G-Wright de las especies en estudio **(Figura 9 y 10)**, así como las variantes cromosómicas halladas. Los polimorfismos y variantes cromosómicos observados en los ejemplares estudiados se encuentran dentro de la variabilidad descrita para cada género.

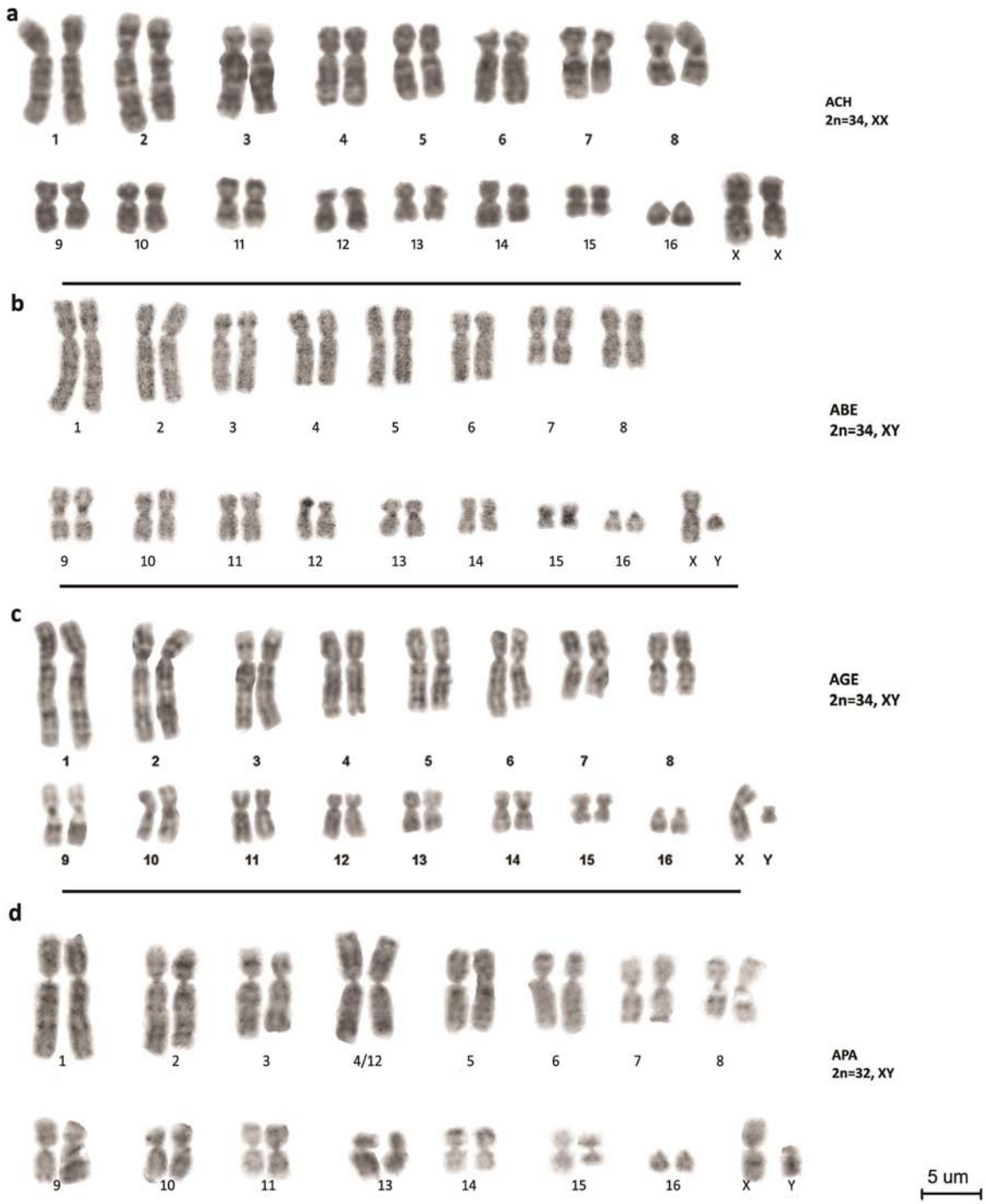

Figura 9. Cariotipos con bandas G de las especies de *Ateles* analizadas. *a. A. chamek (ACH) b. A. belzebuth (ABE) c. A. geoffroyi (AGE) d. A. paniscus (APA)*

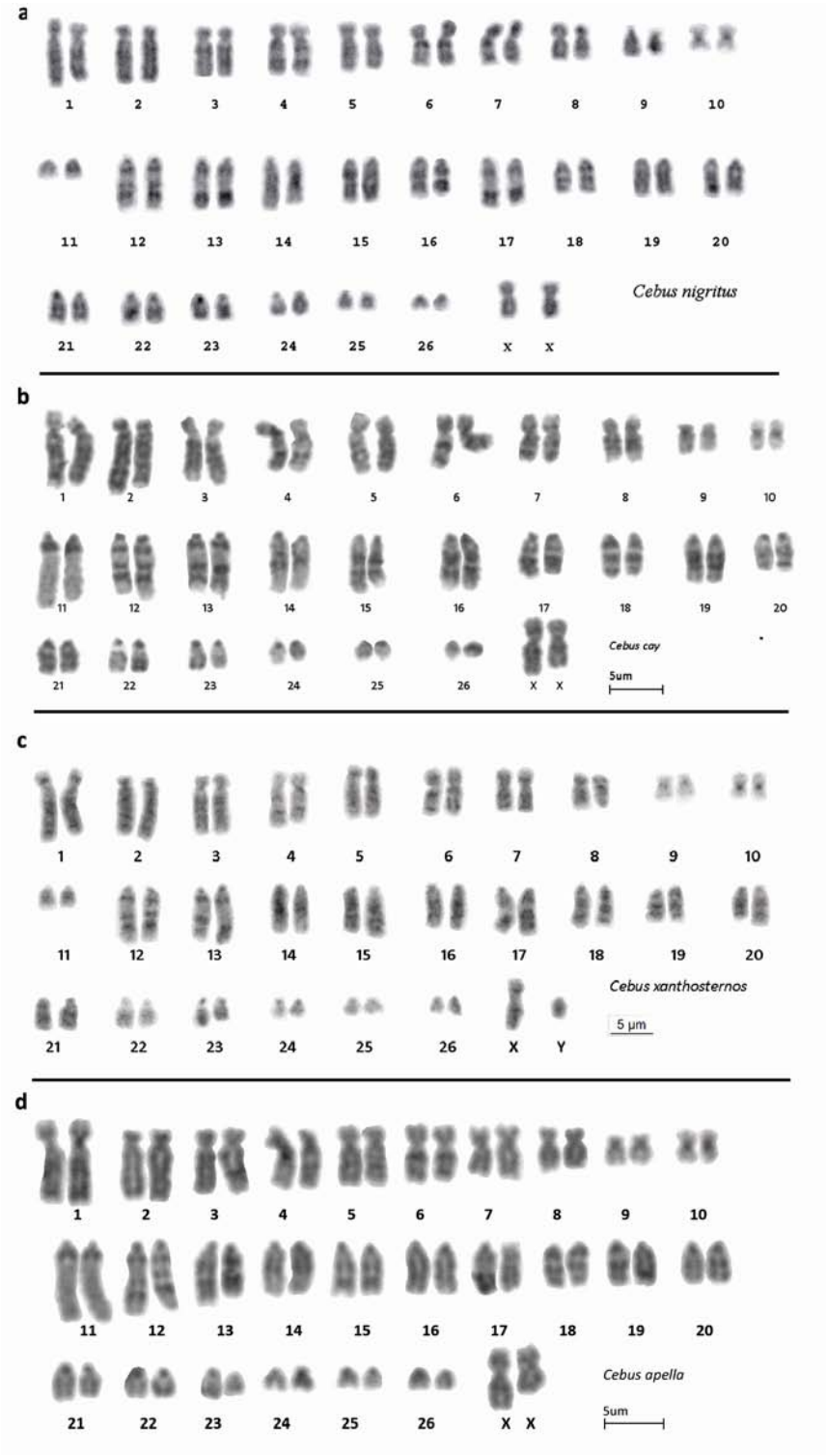

Figura 10. Cariotipos con bandas G de las especies de *Cebus* analizadas. *a. C. nigritus b. C. cay c. C. xanthosternos d. C. apella*

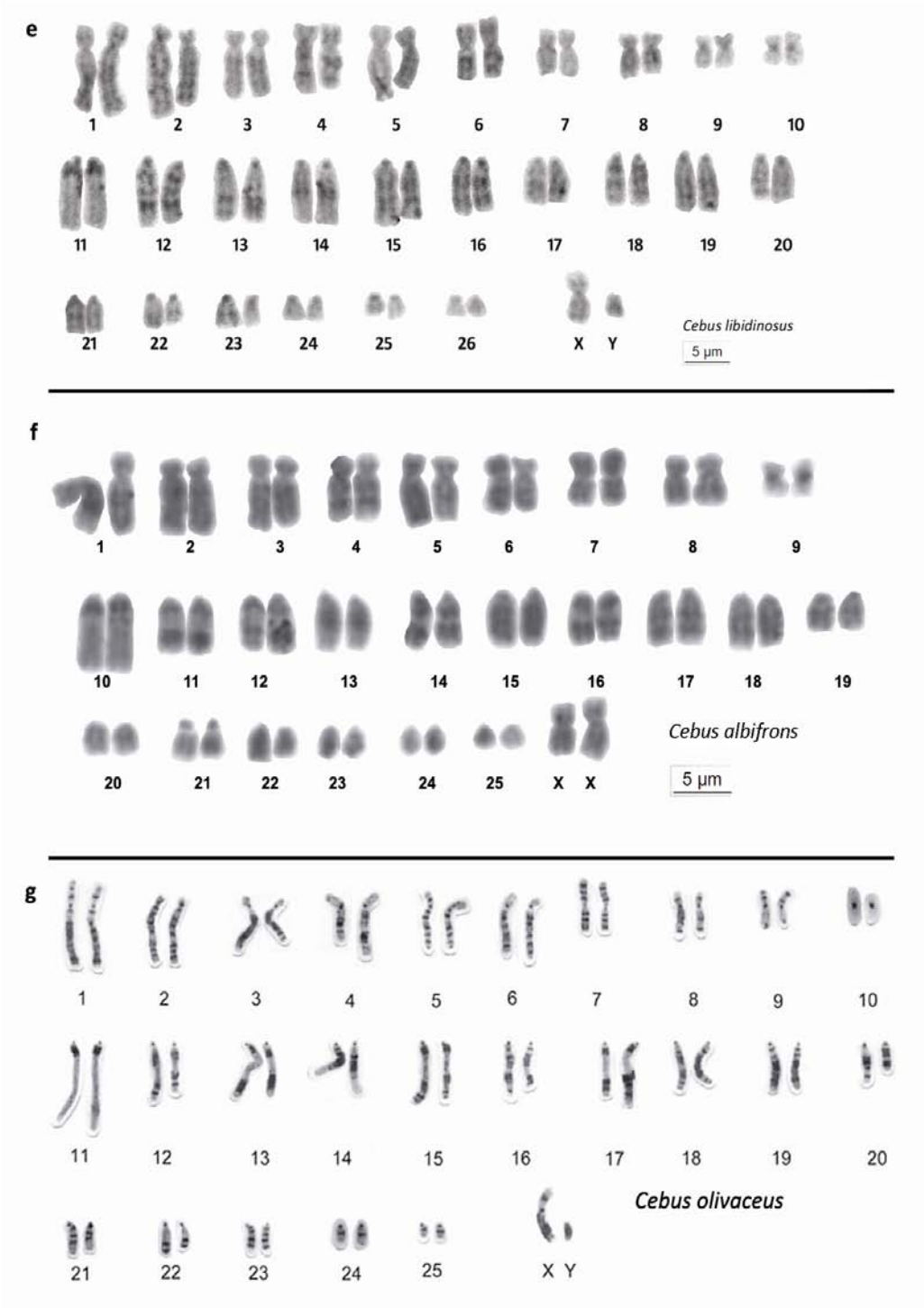

Figura 10 (continuación). Cariotipos con bandas G de las especies de *Cebus* analizadas. *e. C. libidinosus f. C. albifrons g. C. olivaceus*

Entre los ejemplares de *Ateles* analizados se encontraron las variantes cromosómicas ya descritas para los cromosomas 5, 6 y 7, y las distintas morfologías y tamaños para el cromosoma Y **(Figura 10)**. Por otro lado, en concordancia con la bibliografía, sólo en los ejemplares de *A. paniscus* se observó el cromosoma resultante de la fusión entre el cromosoma 4 y el 12 **(Figura 11)**.

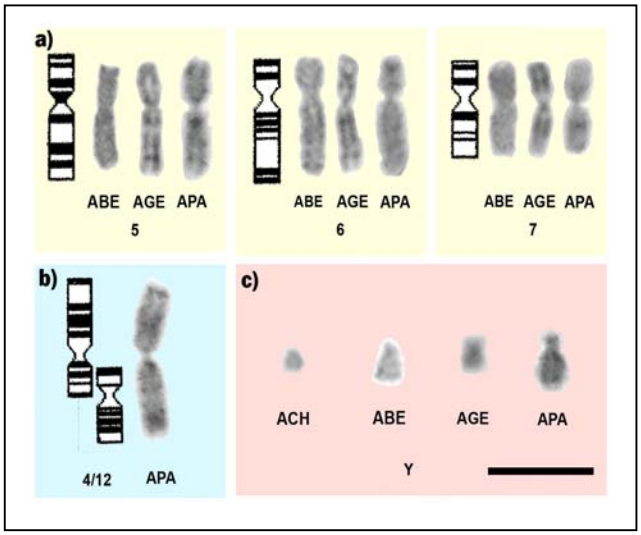

Figura 11. Ideograma (*A. chamek)* y las variantes cromosómicas previamente descritas, observadas en los ejemplares de *Ateles* analizados. *a) En los cromosomas 5, 6 y 7 se observan ligeras alteraciones en el patrón de bandas G-Wright, y variaciones en el largo de los brazos p-q. b) Cromosoma resultante de la translocación entre los cromosomas 4 y 12 característica del cariotipo de A. paniscus. c) Variantes del cromosoma Y en cada especie (Escala: 5µm).*

Entre los ejemplares de *Cebus* analizados, los patrones de bandas G observados fueron concordantes con los ya descritos para cada especie en la bibliografía. No obstante, un ejemplo importante a destacar lo constituye el ejemplar de *C. xanthosternos,* el único de esa especie que pudo ser analizado en esta tesis **(Figura 10c)**. Dicho ejemplar muestra en su cariotipo una variante de cromosoma 11 sin el bloque heterocromático intersticial que en otros ejemplares de esa especie ocupa buena parte del brazo *q,* como ya ha sido descrito previamente (Seuánez et al., 1986). Sin embargo, para esta especie también se ha descrito cierta variabilidad en cuanto al tamaño y presencia de los bloques heterocromáticos, en especial en este cromosoma (Penedo et al., 2014), aunque en heterocigosis. Teniendo en cuenta que la variabilidad heterocromática es una constante que atraviesa la diversidad de las especies del género *Cebus*, a los efectos de este trabajo se aceptó la ausencia del bloque heterocromático del cromosoma 11 en *C. xanthosternos* como una variante

más. Las razones de esta argumentación se sustentan también en la observación del fenotipo externo del individuo, el cual se corresponde con las descripciones del tipo específico (Groves, 2005; Cabrera, 1957) **(Figura 12).**

Figura 12. Fenotipo externo del ejemplar de *C. xanthosternos* analizado en este trabajo. *Vista ventral (a) y lateral (b). Se observa el pelaje del pecho y hombros marcadamente amarillos, y el lomo, patas y cola de pelaje negro, características típicas de esta especie, entre otras.*

La caracterización citogenética se completó con las técnicas de bandas C **(Figura 13 y 14)**, que revelan los bloques de heterocromatina. Además de caracterizar los ejemplares de cada especie a partir del patrón de bandas C, se analizó el esquema de variación cualitativa y cuantitativamente.

Para los ejemplares de *Ateles* se observó, en general, un patrón uniforme dentro de cada una de las especies, con bloques heterocromáticos de posición y tamaño similar consistentemente en los mismos cromosomas según la especie **(Figura 13).**

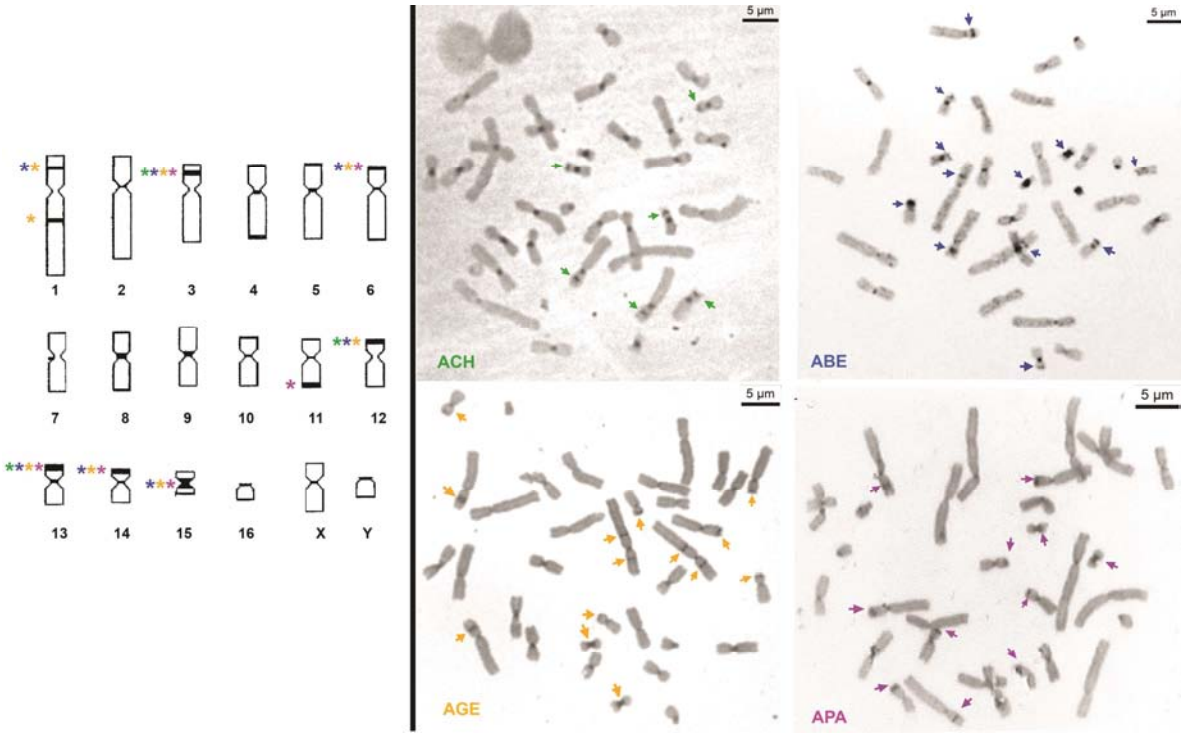

Figura 13. Ideograma de bandas C (izq.) e identificación de bloques de heterocromatina en los cromosomas de *A. chamek* (ACH, verde), *A. belzebuth* (ABE, azul), *A. geoffroyi* (AGE, naranja), *A. paniscus* (APA, fucsia) (der.). *En el ideograma, los asteriscos a la izquierda de cada cromosoma indican la presencia de la banda C+ correspondiente y su color hace referencia a la especie. Las flechas señalan los bloques heterocromáticos en las metafases (Bandas C+).*

En las especies de *Cebus*, en cambio, se observó un esquema de variación cualitativa ligeramente mayor. Dentro de las distintas especies analizadas –en especial en aquellas con las que se cuenta mayor número de ejemplares muestreados, particularmente *C. cay*- se observaron ejemplares con variantes en el tamaño de los bloques heterocromáticos o bien con una posición diferente dentro del mismo cromosoma (**Figura 14 y 15**).

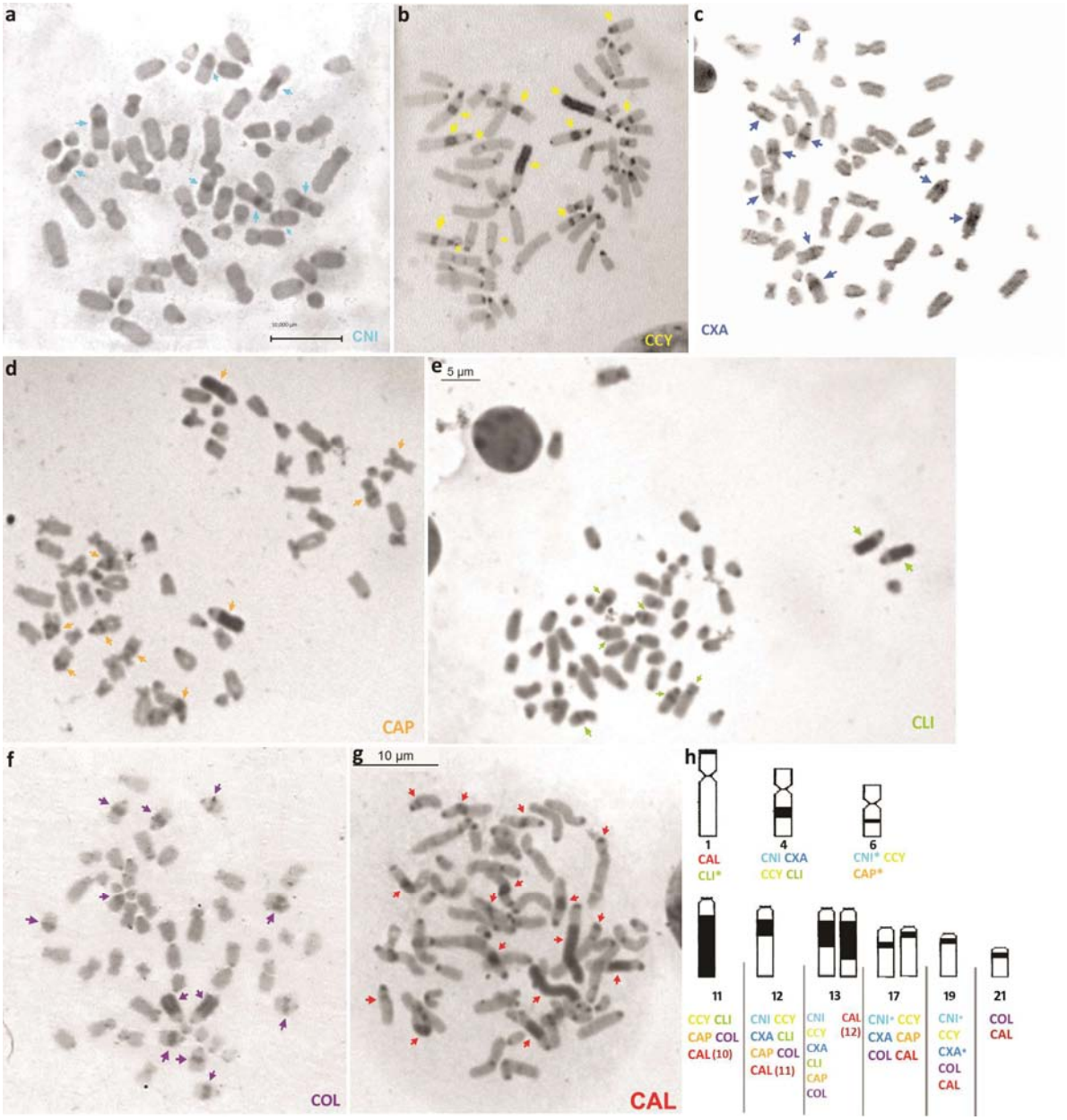

Figura 14. Identificación de bloques de heterocromatina en los cromosomas de las especies de *Cebus* analizadas y esquema de variantes de los bloques heterocromáticos en las distintas especies. *a. C. nigritus (CNI, celeste), b. C. cay (CCY, amarillo), c. C. xanthosternos (CXA, azul), d. C. apella (CAP, naranja), e. C. libidinosus (CLI, verde), f. C. olivaceus (COL, violeta), g. C. albifrons (CAL, rojo), h. Esquema de los cromosomas con bloque heterocromático para las 7 especies de Cebus analizadas, debajo de cada una se nombran las especies en las que cada bloque está presente. Las especies en las que se observaron bloques heterocromáticos polimórficos se marcan con asterisco.*

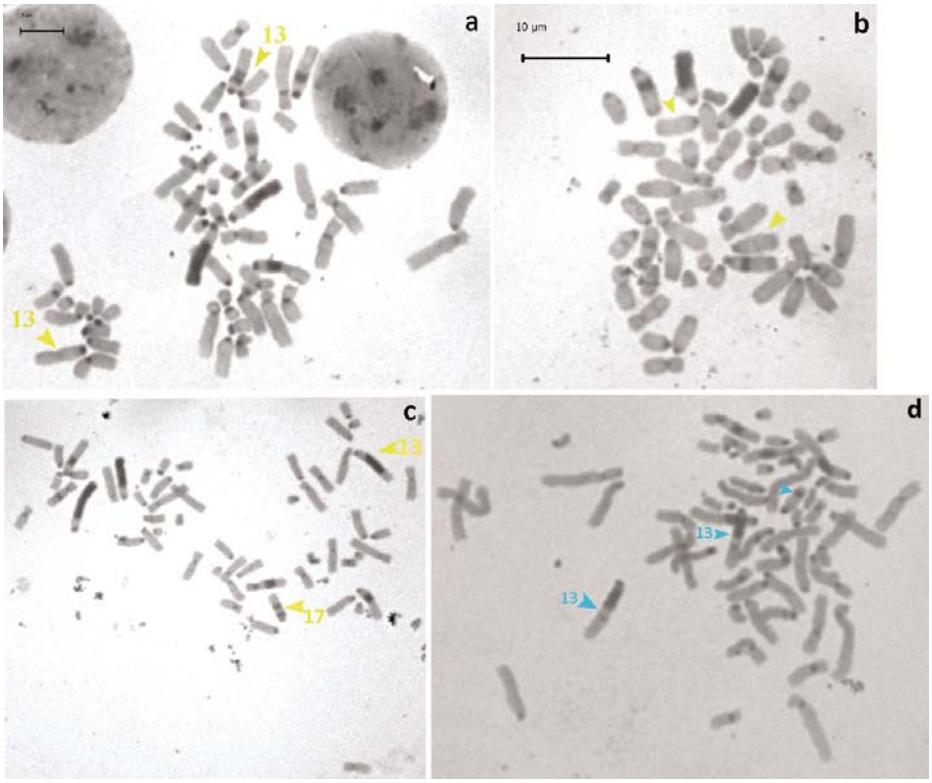

Figura 15. Algunas de las variantes polimórficas en los bloques heterocromáticos de *Cebus cay* (a-c) y *C. nigritus* (d). *a. Ejemplar de C. cay que presenta bloque heterocromático en sólo un cromosoma del par 13. b. Ejemplar de C. cay con ausencia completa del bloque heterocromático del par 13 (flechas). c. Ejemplar de C. cay con bloque extendido en el par 13, y doble banda en uno de los cromosomas del par 17. d. Ejemplar de C. nigritus con inversión en homocigosis en el par 13, que produce doble banda heterocromática, y en heterocigosis en el par 17 que modifica la posición de la banda heterocromática. (Nieves comunicación personal).*

Al profundizar el análisis cualitativo de la heterocromatina y su composición a través de las bandas fluorescentes DAPI-CMA3 no se hallaron diferencias conspicuas entre las especies dentro de cada género **(Figura 16 y 17)**. Sin embargo, la caracterización cualitativa a través de las bandas DAPI-CMA3 muestra diferencias considerables entre ambos géneros. Según esta descripción, la composición heterocromática en cada género es completamente opuesta: en *Cebus* la heterocromatina se marca fuertemente con CMA3 y en *Ateles* se marca fuertemente con DAPI.

Entre las especies de *Ateles* **(Figura 16)**, las señales DAPI (+) mostraron coincidencia con las bandas G (+) o C (+). Las bandas CMA3 (+) más conspicuas se observaron en: el cromosoma portador de la región organizadora del nucléolo (NOR, cromosoma 8 de *A. chamek* y *A. paniscus*, y 9 de *A. geoffroyi* y *A. belzebuth*), en el cromosoma 13 y en regiones telómericas e intersticiales de la mayoría de los cromosomas (**Figura 16,** columna "superposición"). Sin embargo, ninguna de las señales CMA3 (+) detectadas coinciden con los bloques heterocromáticos, en ninguna de las especies, indicativo de una composición heterocromática rica en adenina y timina.

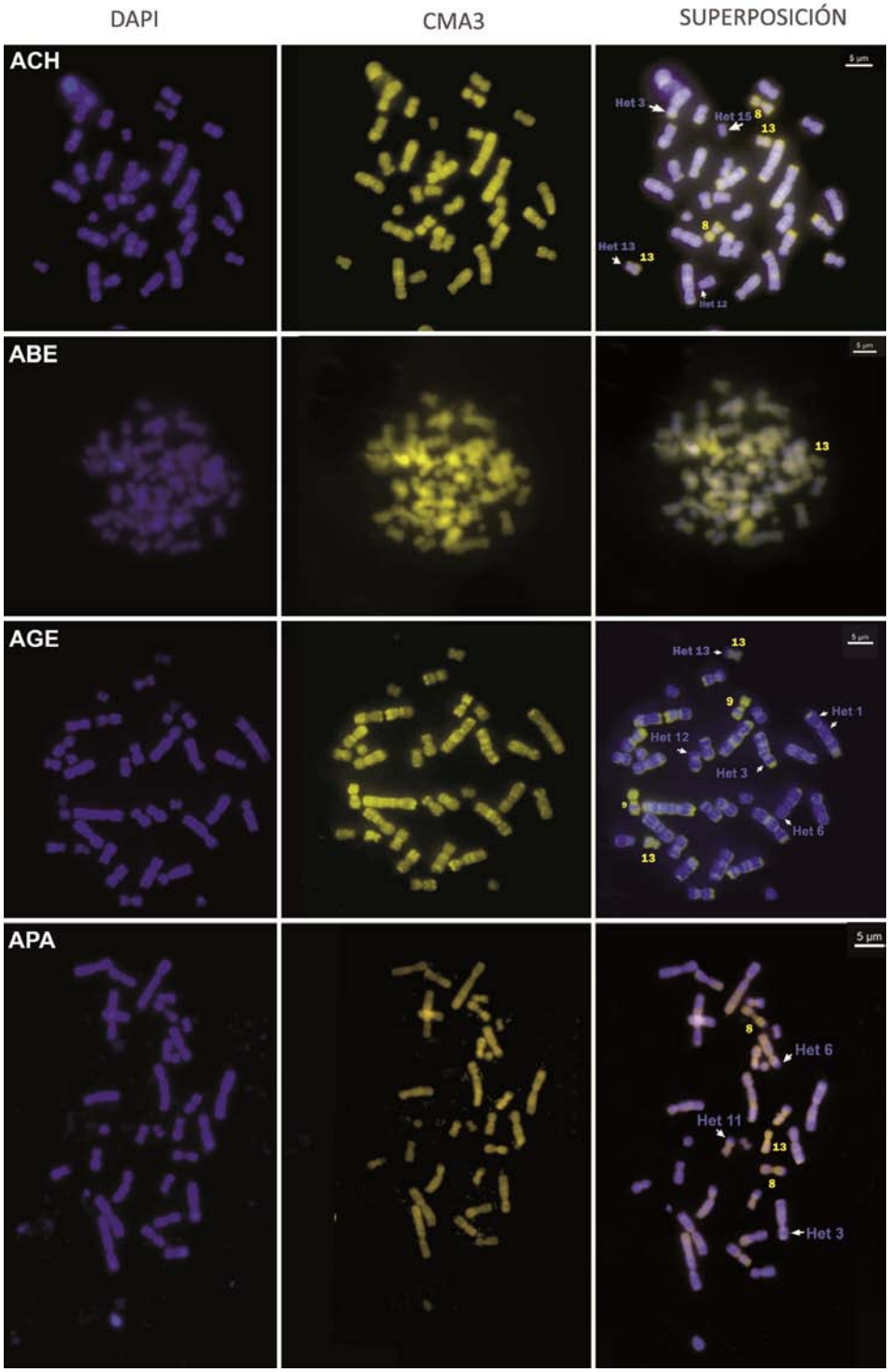

Figura 16. Bandas DAPI-CMA3 en las especies de *Ateles* analizadas: *A. chamek* (ACH), *A. belzebuth* (ABE), *A. geoffroyi* (AGE), *A. paniscus* (APA). *Se observa un patrón de bandas similar entre las especies. En las imágenes superpuestas se indican los cromosomas con las bandas más conspicuas de DAPI (+), en azul, y CMA3 (+), en amarillo.*

Entre las especies de *Cebus*, las señales DAPI (+) no mostraron un patrón consistente con otros patrones de bandas, como ocurre en *Ateles* con las bandas G o C. Contrariamente las bandas CMA3 (+) en las especies de *Cebus* coincidieron en todas ellas con los bloques heterocromáticos, los cuales se observan fuertemente marcados en amarillo **(Figura 17)** así como también otras regiones. Este patrón, entonces, señala en *Cebus* una composición heterocromática rica en guanina y citosina.

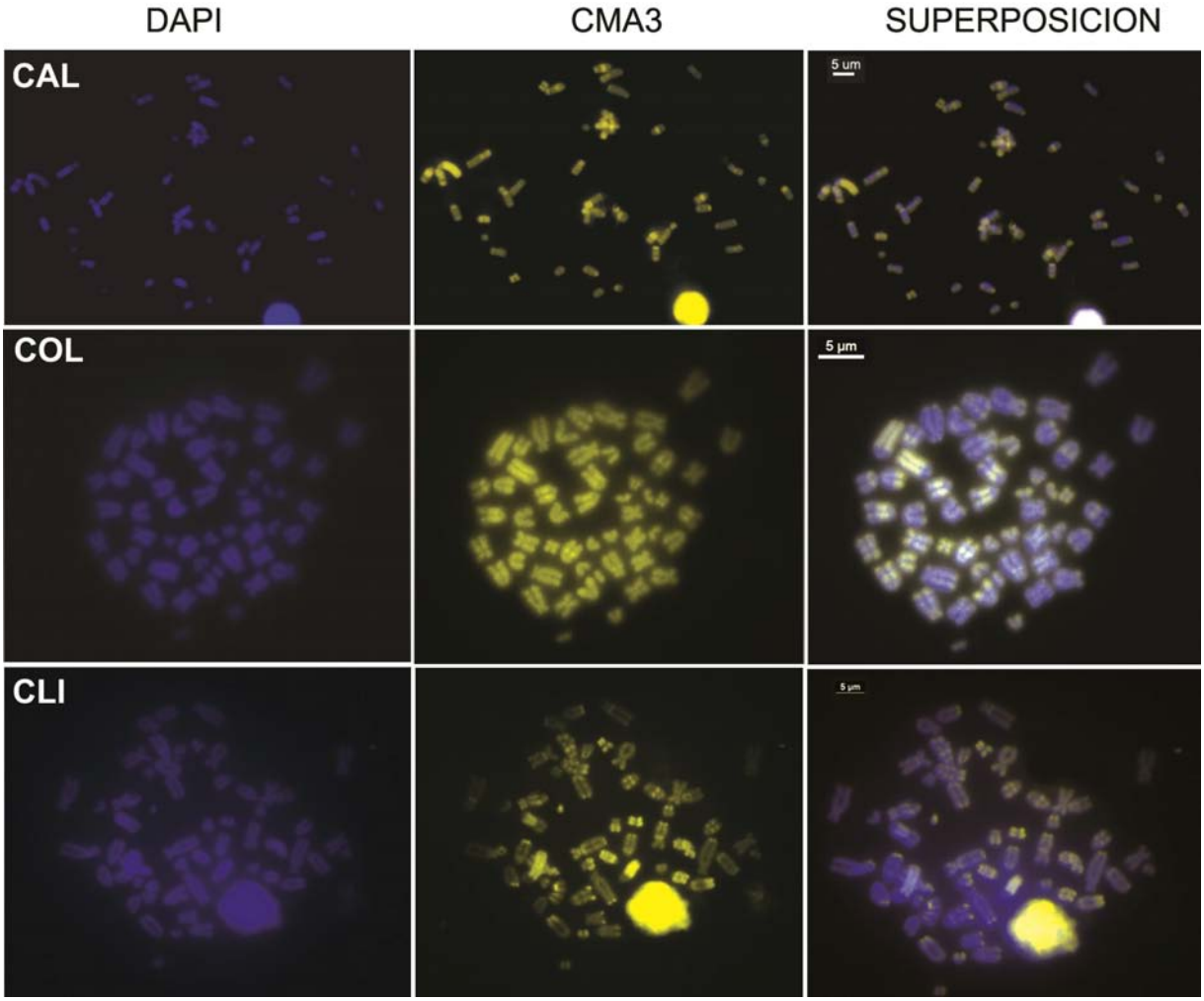

Figura 17. Bandas DAPI-CMA3 en las especies de *Cebus* analizadas. *C. albifrons* (CAL), *C. olivaceus* (COL), *C. libidinosus* (CLI). *Se observa un patrón de bandas similar entre las especies, los bloques heterocromáticos característicos de cada especie se observan con bandas intensas CMA3 (+).*

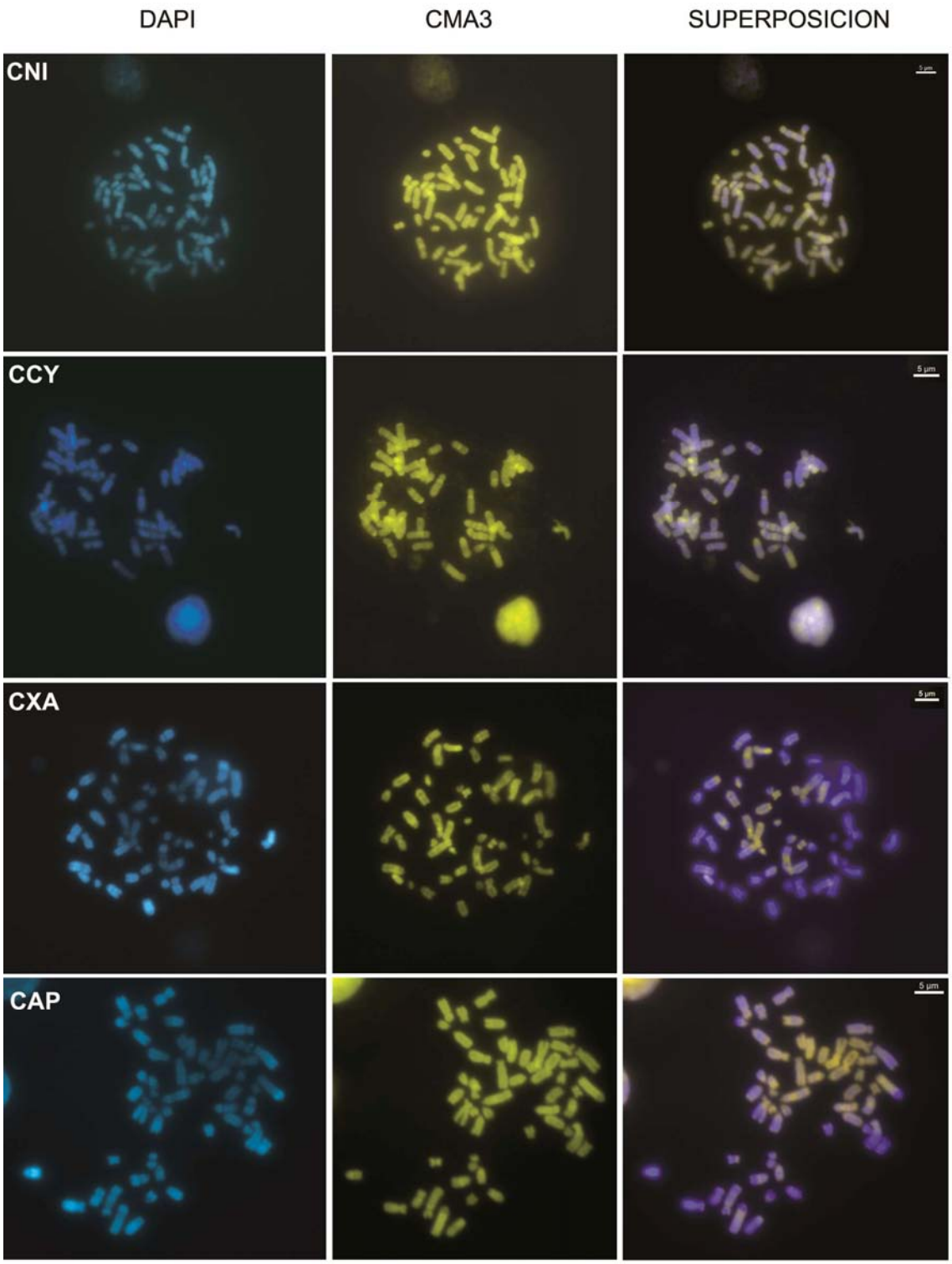

Figura 17 (continuación). Bandas DAPI-CMA3 en las 7 especies de *Cebus* analizadas. *C. nigritus* (CNI), *C. cay* (CCY), *C. xanthosternos* (CXA), *C. apella* (CAP). *Se observa un patrón de bandas similar entre las especies, los bloques heterocromáticos característicos de cada especie se observan con bandas intensas CMA3 (+) (amarillo).*

IV: 1.3 Análisis de homologías cromosómicas entre *Homo sapiens* y las especies de interés.

Previo al comienzo de este trabajo ya habían sido establecidas las homologías cromosómicas entre el cariotipo humano y el cariotipo de *Ateles paniscus*, *A. belzebuth* y *A. geoffroyi* (Oliveira et al. 2005; Morescalchi et al. 1997), y faltaba establecerlas para *A. chamek.* Por otra parte, en el género *Cebus* también había registro del análisis de homologías cromosómicas en algunas especies (*C. capucinus, C. albifrons, C. olivaceus* (Amaral et al., 2008; García et al., 2000; Richard et al., 1996)), pero no se contaba con información para muchas de las especies que fueran previamente consideradas subespecies de *C. apella*, o bien la información existente (por lo menos hasta el momento de la presentación de esta tesis) incluye gran confusión en cuanto a la nomenclatura taxonómica utilizada.

Entonces, utilizando sondas humanas de cada cromosoma completo se analizó el cariotipo de *Ateles chamek* **(Figura 18 y 19)** y de algunas de las especies de *Cebus (C. xanthosthernos, C. cay, C. nigritus y C. olivaceus*) **(Figura 20).** Las hibridaciones se realizaron generalmente de a pares de sondas, procurando analizar simultáneamente sintenias cromosómicas ya reconocidas en Platyrrhini, cuando fuera posible. Algunos ejemplos de pares utilizados son 3/21, 14/15, 3/15, 1/6, 15/22, 2/16, 16/10, 19/20[3], entre otras.

En la **Figura 18** se observan algunas de las señales detectadas. En la **Figura 19** se identifica su posición en el cariotipo de *Ateles chamek* tomando en cuenta la nomenclatura utilizada por Oliveira et al. 2005. Todas las sondas humanas utilizadas mostraron señal de hibridación en los cromosomas de *A. chamek* excepto el cromosoma Y humano —cuya homología no ha sido verificada en ninguna especie de primate neotropical— y los cromosomas 4 y 8, aunque las razones de esta ausencia de hibridación parecen responder más a cuestiones técnicas que de homología (ver más adelante en Discusión)— (**Figura 19**, signos rojos). A su vez, otros cromosomas humanos mostraron ligeras variaciones respecto de lo que se ha observado previamente en las otras especies de *Ateles*, como por ejemplo la sonda HSA18 en el cromosoma 1 de *A. chamek* **(Figura 18f)**, con una posición diferente, y la sonda HSA7, con sólo una señal terminal **(Figura 19,** signos azules).

Para las especies de *Cebus* analizadas mediante FISH los resultados fueron más disparejos y lamentablemente la homología entre algunas regiones no pudo ser comprobada. Se obtuvo señal de hibridación con las sondas humanas 3, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 21 y X **(Figura 20)** que

[3] La numeración de los cromosomas corresponde a la del cariotipo humano

mostraron homología con regiones cromosómicas que en otras especies ya habían sido comprobadas (Amaral et al., 2008). En la f**igura 21** se ubica la posición en los cromosomas de *C. cay* de las señales detectadas. Las sondas cromosómicas humanas restantes fueron testeadas, pero no fue posible obtener señal de hibridación (**Figura 21**, signos rojos).

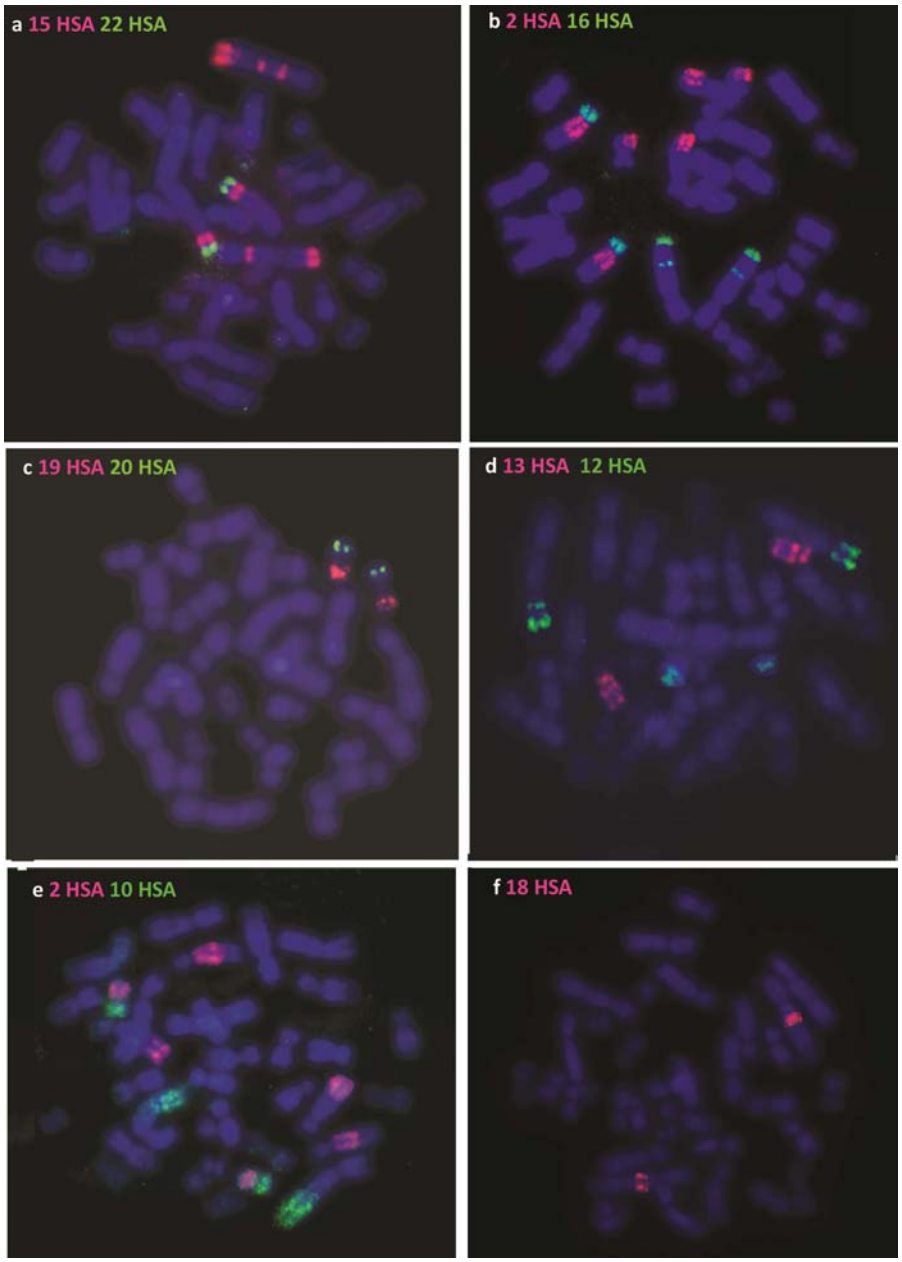

Figura 18. Homologías cromosómicas entre *Ateles chamek* y *Homo sapiens* (HSA). *FISH con sondas humanas de pintado cromosómico en metafases de A. chamek. Se muestran las sintenias más representativas. Los números corresponden a los cromosomas humanos y el color indica el fluorocromo de marcado (Rojo: rodamina, Verde: FITC).*

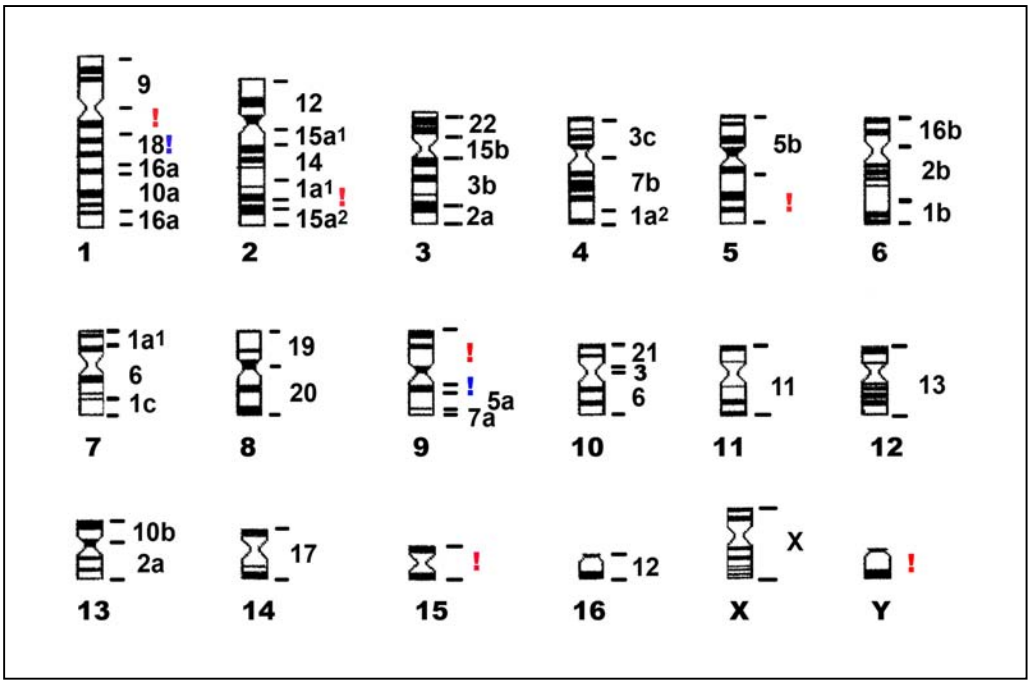

Figura 19. Ideograma de *Ateles chamek* mostrando las homologías con los cromosomas humanos. *Los números inferiores identifican los cromosomas de ACH, los número laterales identifican los cromosomas o segmentos de cromosomas humanos. Signo de exclamación azul indica una ligera variación en la posición respecto a otras especies de Ateles; signo de exclamación rojo indica ausencia de señal (ver texto). Modificado a partir de Oliveira et al. 2005.*

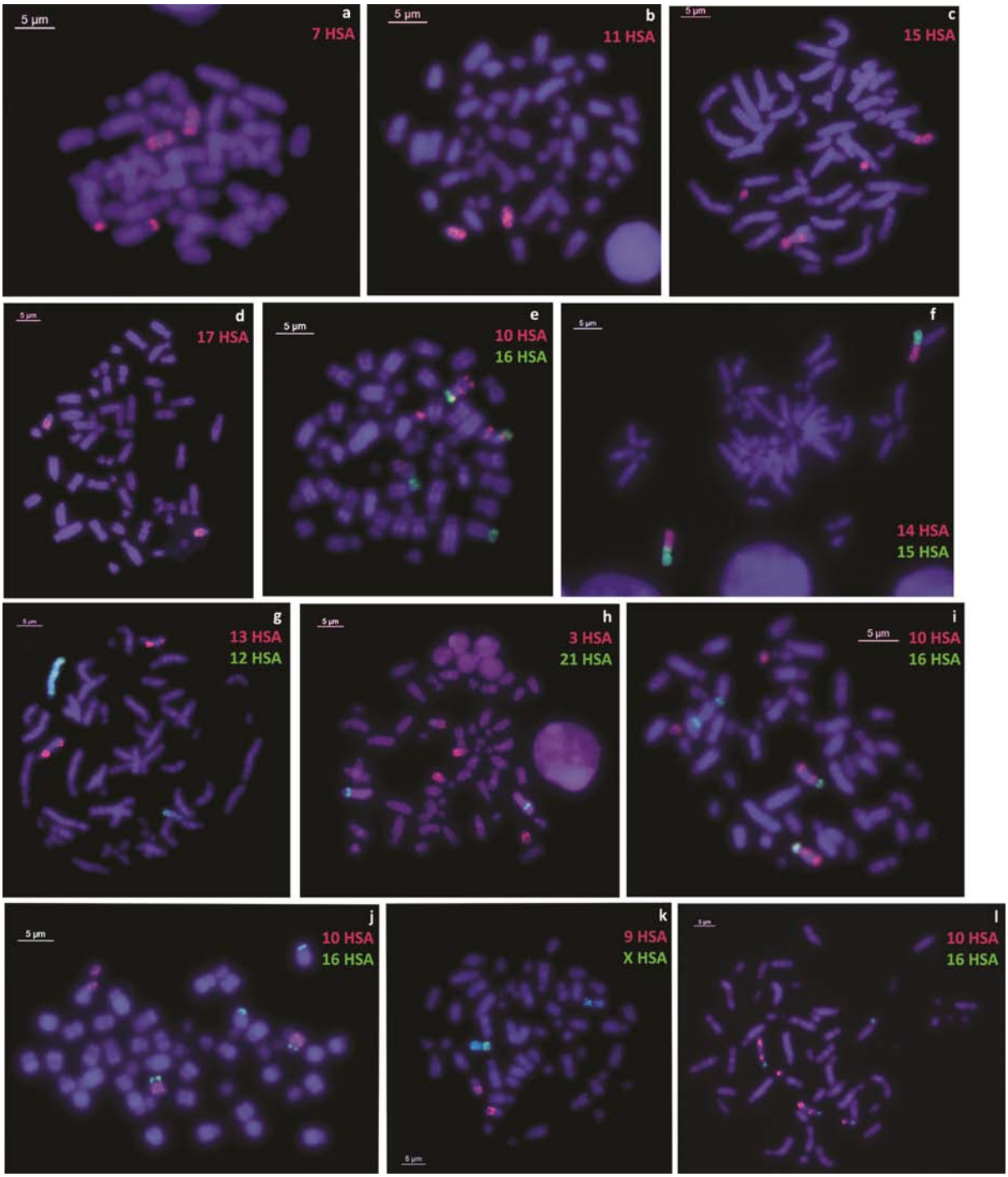

Figura 20. Homologías cromosómicas entre *Cebus* sp. y *Homo sapiens* (HSA). *FISH con sondas humanas de pintado cromosómico en metafases de C. xanthosternos (a-e), C. cay (f-i), C. olivaceus (j) y C. nigritus (k&l). Se muestran las sintenias más representativas. Los números corresponden a los cromosomas humanos y el color indica el fluorocromo de marcado (Rojo: rodamina, Verde: FITC).*

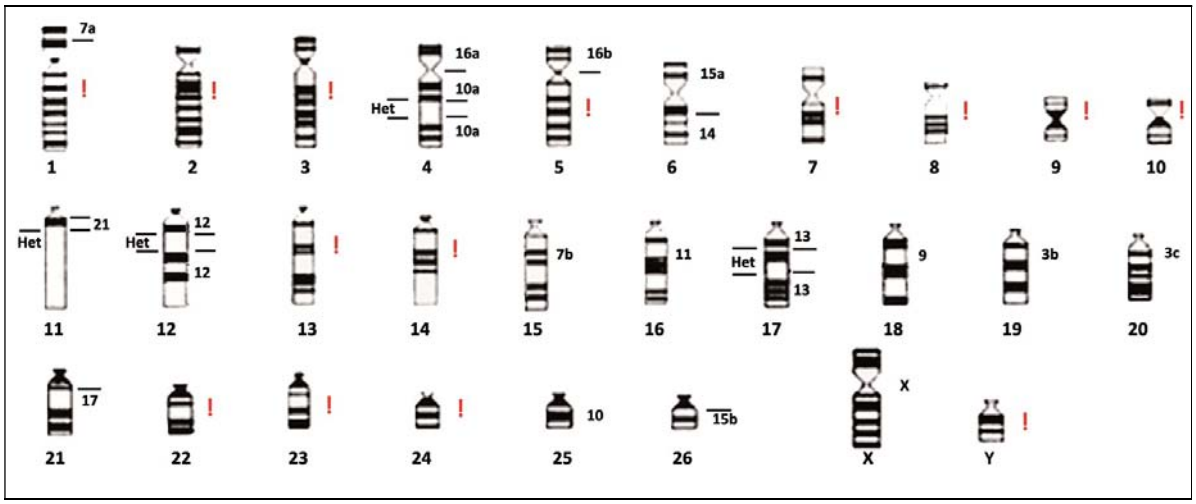

Figura 21. Ideograma de *Cebus cay* mostrando las homologías con los cromosomas humanos. *Los números inferiores identifican los cromosomas de C. cay, los números laterales identifican los cromosomas o segmentos de cromosomas humanos. El signo de exclamación rojo indica ausencia de señal (ver texto). Modificado a partir de Martinez et al.* (2002).

De manera de profundizar el análisis de homeologías cromosómicas, además se realizó FISH con sondas de genes localizados en el cromosoma Y humano, o regiones específicas, más pequeñas, de este cromosoma. La razón de esta decisión se basa en el hecho de que en la mayoría de las especies de primates neotropicales analizadas por FISH no se observa homología entre cromosomas Y, aunque se afirme que genes como el SRY se encuentren en todos los mamíferos.

De todas las sondas génicas y sub-cromosómicas utilizadas las únicas que mostraron una hibridación clara e indudable fueron las sondas sub-teloméricas Xpter-Ypter y Xqter-Yqter, aunque en las especies de primates aquí analizadas, sólo se observó la señal en el cromosoma X de cada una.

La sonda sub-telomérica Xpter-Ypter hibrida a 272Kb del extremo *p* del cromosoma X humano. Esta región es 99.4% idéntica al extremo *p* terminal del cromosoma Y (Yp11.32), a su vez la sonda sub-telomérica Xqter-Yqte hibrida a 154Kb del extremo *q* del cromosoma X. Esta región es 97.8% idéntica al extremo *q* terminal del cromosoma Y (Yq12). Al utilizarlas juntas ambas regiones en cada cromosoma son marcadas por igual, generando 2 señales verdes y 2 rojas por célula en el humano **(Figura 22d)**. Tanto en *Ateles chamek*, *A. paniscus* y *Cebus cay* se observaron las señales en el cromosoma X y no se observaron en el cromosoma Y (**Figura 22a-c**, flechas). Incluso en los núcleos interfásicos se observaron sólo dos señales, una roja y una verde, correspondientes a la señal en el

cromosoma X (por ejemplo **Figura 22c**, flechas). La ausencia de señal dentro de la misma metafase corrobora efectivamente la ausencia de homología entre las regiones analizadas del cromosoma Y.

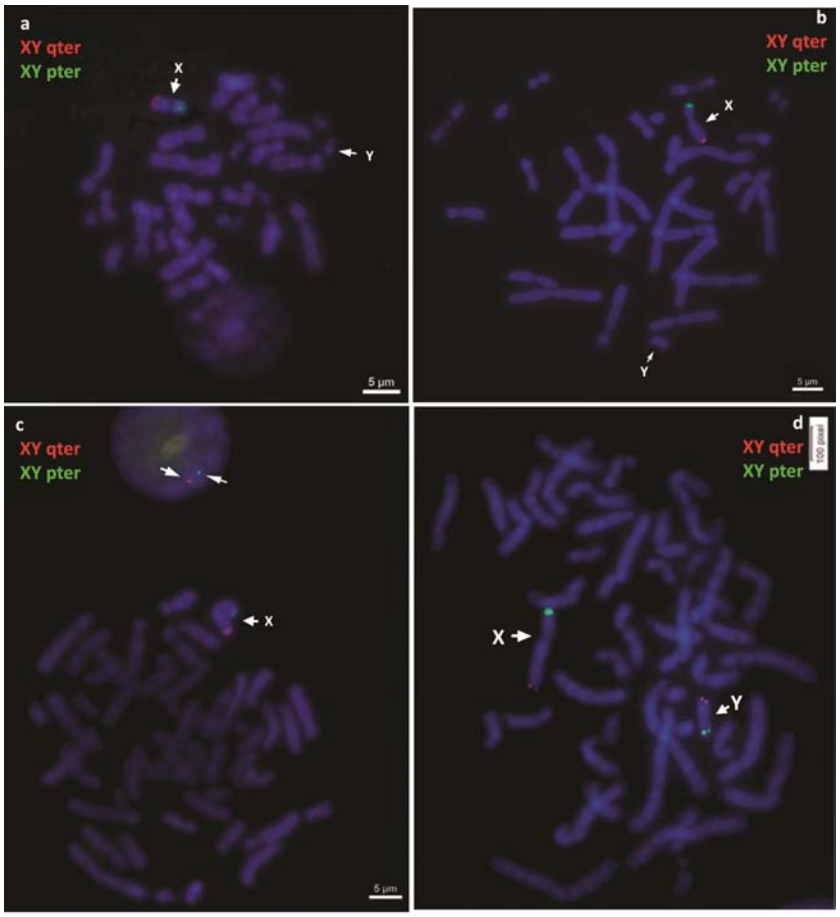

Figura 22. Análisis de homología en el cromosoma Y de *Cebus* y *Ateles* con sondas humanas: Xpter-Ypter (verde) y Xqter-Yqter (roja). *FISH con sondas específicas del cromosoma Y humano: Sonda subtelomérica X e Y sobre cromosomas de A. chamek (a), A. paniscus (b) C. cay (c) y H. sapiens (d).*

Las flechas en (a) y (b) indican la hibridación en el cromosoma X y la ausencia de señal en el cromosoma Y. En (c) se identifica el cromosoma X en la metafase y las señales correspondientes en un núcleo interfásico. No fue posible identificar el cromosoma Y, sin embargo sólo se observa un par de señales por metafase o núcleo. (d) Hibridación sobre cromosomas X e Y humanos, a modo de control positivo.

Además del conjunto de sondas sub-teloméricas en el par sexual, se probaron otras sondas específicas de genes o regiones del cromosoma Y. De todas ellas, sólo la sonda del gen ZFY parece haber dado señal positiva en el cromosoma Y de *Ateles paniscus* **(Figura 23)**, pero no en las otras especies analizadas, ni siquiera en *A. chamek* que presenta un cariotipo altamente homólogo al de *A. paniscus.* Tampoco

se observaron señales con la sonda del gen SRY humano, un gen que también está presente en otras especies de mamíferos, cuya función involucra el desarrollo de los testículos en los machos.

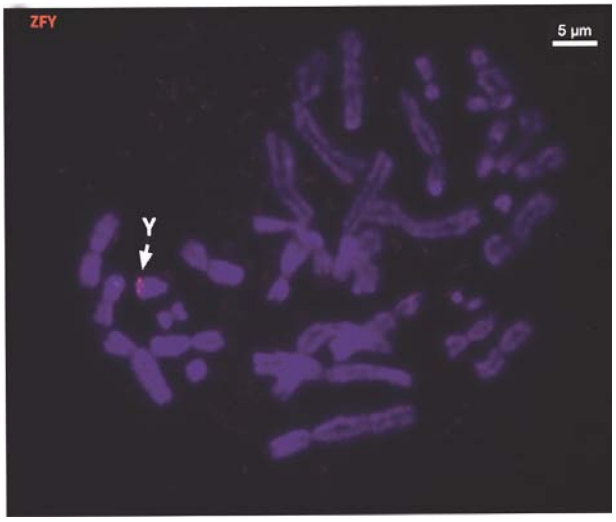

Figura 23. Análisis de homología en el cromosoma Y de *Cebus* y *Ateles* con sondas humanas: gen ZFY (rojo). *Sólo se obtuvo señal de hibridación positiva en metafases de* A. paniscus. *La flecha indica el cromosoma Y y la señal observada.*

IV: 2 HETEROCROMATINA Y VALOR C

IV: 2.1 Proporción de heterocromatina

Teniendo en cuenta las notables diferencias en la cantidad y tamaño de los bloques heterocromáticos en ambos géneros resulta interesante estimar cuantitativamente la porción del cariotipo que corresponde a heterocromatina en cada especie. Más aún si se considera que dentro de cada género no parecieran existir grandes diferencias cualitativas en la composición.

Existen distintas formas de estimar la proporción de heterocromatina en el complemento cromosómico de una especie. En este trabajo se realizó a partir de las imágenes de bandas C, obteniéndose el porcentaje correspondiente a heterocromatina por metafase individual en las especies analizadas de *Ateles* **(Tabla 6)** y *Cebus* **(Tabla 7)**. Los valores medios son sólo un indicador de la cantidad de heterocromatina en el complemento cromosómico de cada especie ligeramente más sensible que el número de bloques heterocromáticos observados, ya que se toma en cuenta además el tamaño de cada uno.

Estos valores son una traducción numérica de lo que observacionalmente ya ha sido establecido como diferencias significativas desde que se ha comenzado el análisis citogenético de estas especies. Como es de esperarse, las especies en cada género, se ordenaron de menor a mayor según observaciones citogenéticas previas de las bandas C (Egozcue et al., 1969; Medeiros et al., 1997; Pieczarka et al., 1989). Por una lado *Ateles chamek*, *A. belzebuth*, *A. geoffroyi* y *A. paniscus* **(Tabla 6)***;* por el otro *Cebus xanthosternos, C. nigritus, C. cay, C. libidinosus, C. apella, C. olivaceus* y *C. albifrons* **(Tabla 7)**.

Entre las especies de *Ateles* la mayor variabilidad se halló en aquellas especies en las que sólo fue posible analizar las metafases de un único ejemplar, *A. belzebuth* y *A. paniscus,* en las cuales la calidad de las metafases no podía ser prioritaria frente a la cantidad. En este sentido, se consideró que la mala calidad de las metafases –entendidas como metafases con cromosomas superpuestos, retorcidos, con poca o mucha elongación, etc. – pudo contribuir a aumentar la variabilidad de las mediciones. En *Cebus*, en cambio, se observa una mayor variabilidad distribuida más homogéneamente entre las especies.

		A. chamek N=7	*A. belzebuth* N=1	*A. geoffroyi* N=8	*A. paniscus* N=1
%HET por especie	$\overline{X}$	**3,00**	**3,83**	**4,96**	**5,31**
	DE	0,51	0,95	0,75	0,94

Tabla 6. Porcentaje de heterocromatina en el complemento cromosómico de las especies de *Ateles* analizadas. *Valores medios por especie:* ***A. chamek*, *A. belzebuth*, *A. geoffroyi*, *A. paniscus***. *Het: heterocromatina N: cantidad de individuos analizados, $\overline{X}$: promedio, DE: desvío estándar.*

		C. xanthosternos N=1	*C. nigritus* N=5	*C. cay* N=7	*C. libidinosus* N=1	*C. apella* N=1	*C. olivaceus* N=1	*C. albifrons* N=2
%HET por especie	$\overline{X}$	**5,27**	**5,6**	**8,47**	**8,57**	**9,31**	**10,47**	**12,5**
	DE	0,66	0,77	0,92	0,48	0,0006	0,61	1,09

Tabla 7. Porcentaje de heterocromatina en el complemento cromosómico de las especies de *Cebus* analizadas. *Valores medios por especie:* ***C. xanthoternos*, *C. nigritus*, *C. cay*, *C. libidinosus*, *C. apella*, *C. olivaceus* y *C. albifrons*.** *Het: heterocromatina N: cantidad de individuos analizados, $\overline{X}$: promedio, DE: desvío estándar.*

IV: 2.2 Valor C

Las determinaciones de valor C se llevaron a cabo teniendo en cuenta la disponibilidad de sangre fresca de cada ejemplar. Es por eso que de algunas de las especies analizadas en esta tesis desde la citogenética no se pudo obtener el dato de tamaño del genoma. Ejemplos de esta situación son los ejemplares de *Ateles paniscus* y *Cebus apella.* Sin embargo, los datos de valor C publicados anteriormente pueden servir de referencia, como se discutirá más adelante. Las muestras sanguíneas de *A. paniscus,* que se usaron por ejemplo para la obtención de ADN genómico (*Materiales & Métodos* III: 2.5), no resultaron útiles para la cuantificación de valor C debido a que se trata de muestras congeladas, las cuales no mantienen la integridad celular como para realizar las estimaciones. En cambio, para los ejemplares de *C. apella* sólo se contó directamente con la fijación cromosómica, material a partir del cual no es posible realizar la estimación del tamaño del genoma.

En consecuencia, se obtuvo el tamaño de genoma o valor C de 13 especies de las 15 muestreadas y/o analizadas. De estas 13 especies, 3 corresponden al género *Ateles*, 6 al género *Cebus*, 2 al género *Alouatta*, 1 al género *Saimiri* y 1 al género *Aotus*. En la **Tabla 8** se presentan los valores de tamaño de genoma por especie obtenidos en esta tesis y los publicados previamente en la bibliografía. Los datos obtenidos muestran diferencias significativas entre las especies dentro del género *Ateles* (ANOVA de dos factores anidados, variación entre especies $p<0,05$). Las especies de *Cebus* muestran en general valores similares y no se encontraron diferencias significativas entre ellos. Ambos géneros muestran valores medios cercanos y similares, en el mismo orden de magnitud que la de otros primates.

Especie	Valor C ± DE (pg)	Valor C previo	Referencia previa
Ateles			Valor C medio= 3,12 ± 0,25 pg
ABE	2,88 ± 0,06**	3.63	Manfredi Romanini, 1972
ACH	3,09 ± 0,23**	no det	--
AGE	3,39 ± 0,35**	3.25	Manfredi Romanini, 1972
APA	No det	3.47	Manfredi Romanini, 1972
Cebus			Valor C medio= 3,22 ± 0,26 pg
CXA	2,87 ± 0,11	no det	--
CNI	3,26 ± 0,12	no det	--
CCY	3,25 ± 0,26	no det	--
CLI	3,09 ± 0,01	no det	--
CAP	No det	3,7	Manfredi Romanini, 1972/ Pelliciari et al 1982
COL	3,27 ± 0,21	3,4	Manfredi Romanini, 1972/ Pellicciari et al. 1982
CAL	3,56 ± 0,17	3,98	Manfredi Romanini, 1972
Alouatta			
AGU	3,20 ± 0,26	no det	--
ACA	3,40 ± 0,29	3,84	Manfredi Romanini, 1972
Saimiri			
SBO	3,03 ± 0,01	no det	--
Aotus			
AAZ	3,56 ± 0,13	no det	--

Tabla 8. Cuantificación del Valor C de las especies muestreadas pertenecientes a los géneros *Ateles*, *Cebus*, *Alouatta*, *Saimiri* y *Aotus*. *Ateles chamek* (ACH), *A. belzebuth* (ABE), *A. geoffroyi* (AGE), *A. paniscus* (APA), *Cebus xanthosternos* (CXA), *C. nigritus* (CNI), *C. cay* (CCY), *C. libidinosus* (CLI), *C. apella (CAP) C. olivaceus* (COL), *C. albifrons* (CAL), *Alouatta guariba* (AGU), *A. caraya* (ACA), *Saimiri boliviensis* (SBO) *y Aotus azarae* (AAZ). *(**) Diferencias significativas entre las especies. ANOVA de dos factores anidados: variación entre especies p<0,05*).

IV: 2.3 Variación del tamaño del genoma y porcentaje de heterocromatina en el cariotipo de las especies de *Cebus* y *Ateles*

Para evaluar la relación entre las variables analizadas se llevaron a cabo análisis de correlación y regresión entre tamaño de genoma y porcentaje de heterocromatina en cada especie para el conjunto completo de las especies de *Cebus* y *Ateles* analizado, así como para las especies de cada género por separado.

En todos los casos de análisis –"*Cebus* & *Ateles*", "*Cebus*" y "*Ateles*"– se observa una correlación positiva de ambas variables que refleja la tendencia esperada según la hipótesis propuesta**.** Esta tendencia sólo se sustenta estadísticamente para las especies del *Cebus* analizadas en este trabajo. **(Tabla 9**, **Figura 24)**. Al incluir a C. *apella,* cuyo tamaño de genoma no fue estimado en esta tesis, esta significancia se pierde.

	r (-APA - CAP)	*valor p*	*r* (+APA + CAP)	*valor p*
Cebus & Ateles	0.627	0.062	0.543	0.078
Cebus	**0.776**	**0.047**	0.659	0.091
Ateles	0.647	0.458	0.795	0.138

Tabla 9. Coeficiente de correlación lineal de Pearson, *r*, para las variables tamaño de genoma y porcentaje de heterocromatina en el cariotipo de las especies de *Cebus* y *Ateles* analizadas. (*-APA-CAP)= no se incluyen datos de A. paniscus ni C. apella. (+APA +CAP)=incluyendo los datos de valor C de A. paniscus y C. apella (www.genomesize.com).*

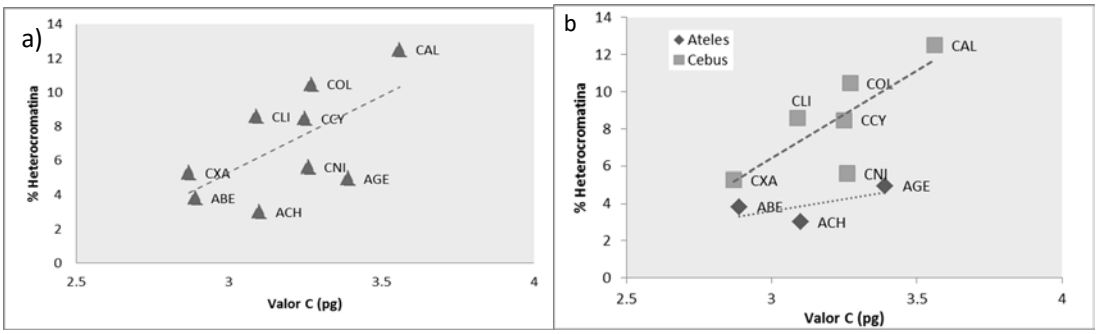

Figura 24. Porcentaje de heterocromatina por especie en función del valor C para las especies analizadas de *Cebus* y *Ateles.* a) *Cebus* & *Ateles* tomados como conjunto b) *Cebus* y *Ateles*, analizados cada uno por separado. *Cada punto corresponde a una especie. Se muestran las líneas de tendencia para cada set de datos. Sólo se usaron los datos de valor C obtenidos en este trabajo. ABE: A. belzebuth; ACH: A. chamek; AGE: A. geoffroyi; CXA: C. xanthosternos; CNI: C. nigritus; CCY: C. cay; CLI: C. libidinosus;COL: C. olivaceus; CAL: C. albifrons.*

IV: 3 COMPARACIONES GENÓMICAS: CGH ENTRE ESPECIES DE *CEBUS* Y *ATELES*

IV: 3.1 Sondas genómicas

En la **tabla 10** se muestran los datos correspondientes a la obtención de las sondas genómicas de *Ateles* sp. y *Cebus* sp. para CGH. Lamentablemente no pudo obtenerse sondas de todas las especies analizadas, en particular aquellas del género *Cebus,* debido a complicaciones técnicas tales como bajo rendimiento de extracción de ADN, imposibilidad de amplificar ADN de mala calidad o baja concentración, o dificultad de obtener sondas marcadas que muestren señal de hibridación en los experimentos de FISH, entre otras. Así, para este género, sólo se obtuvieron sondas de *C. nigritus*, *C. xanthosternos* y *C. olivaceus* reduciendo el espectro de posibles comparaciones en este género.

Para cada muestra de ADN extraída se obtuvo el valor de concentración, el cual se utilizó para ajustar la concentración final en la mezcla de hibridación de manera de obtener iguales cantidades de ambos genomas a comparar. El cociente de absorbancia a 260/280 nm es un indicador del estado de pureza de la muestra de ADN utilizada para elaborar la sonda. Este dato se utilizó como dato auxiliar a la hora de elegir las muestras de ADN a marcar. La variabilidad hallada en la pureza tiene que ver con el rendimiento diferencial de los protocolos de extracción utilizados.

El funcionamiento de cada sonda genómica luego del marcado fue comprobado en experimentos de hibridación *in situ* sobre metafases de la misma especie de origen. La **figura 25** muestra algunos de esos resultados, a modo ilustrativo.

Identificación de la muestra	Sexo del ejemplar	Concentración (ng/µl)	$A_{260/280}$	Fluorocromo
ACH 670B	♂	170,4	1,71	FITC & Rodamina
ACH 669B	♀	133,1	1,82	FITC
APA 6	♂	200,3	1,08	FITC & Rodamina
AGE 692	♂	123,9	1,05	Rodamina
AGE 3	♂	140,6	1,02	FITC
ABE 704	♂	303,1	1,09	Rodamina
ABE 704*	♂	150,0	1,09	Rodamina
CNI 734	♂	281,7	1,60	Rodamina
CNI 712	♂	223,5	1,60	Rodamina
CNI 656	♀	29,3	1,70	FITC
COL 754	♂	101,4	1,98	FITC
CXA 755	♂	53,3	1,82	Rodamina

Tabla 10. Sondas genómicas elaboradas para CGH. *Datos de concentración, pureza ($A_{260/280}$) y fluorocromo de marcado.*

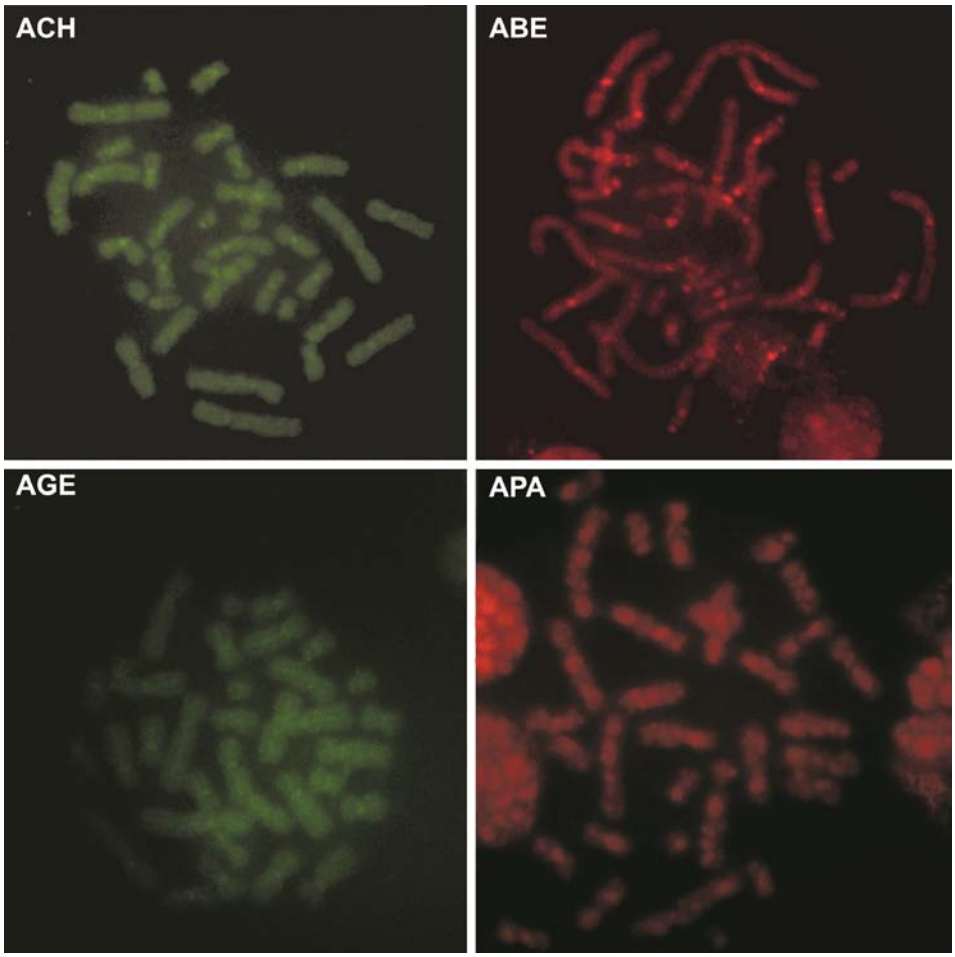

Figura 25. Sondas genómicas de *Ateles* utilizadas en CGH. *Cada sonda se probó sobre metafases de A. chamek.*

IV: 3.2 Determinación de los límites del rango dinámico de hibridación: *Ateles chamek* versus *A. chamek* y *Cebus nigritus* vs. *C. nigritus*

Los experimentos de hibridación para la determinación de los valores límite del rango dinámico —a utilizar en el resto de los experimentos de CGH comparando especies distintas de *Ateles* y de *Cebus*—, se realizaron utilizando sondas genómicas provenientes del mismo individuo (670 ACH para *Ateles*) o de la misma especie (656 CNI y 712 CNI) marcadas en paralelo con el mismo protocolo, excepto por el fluorocromo utilizado (Rodamina o FITC). Las hibridaciones se hicieron sobre metafases de un mismo individuo (673 ACH en *Ateles* y 707 CNI en *Cebus*). Se midieron 5 y 4

metafases completas respectivamente (2n=34, XX y 2n=54, XY). Los datos detallados de cada una se presentan en el Anexo **tabla 11 y 12**.

Los valores límite obtenidos luego del análisis figuran en la **Tabla 13.** Para las especies de *Ateles* los límites superior (L_s) e inferior (L_i) son similares a los ya presentes en la bibliografía y el valor central considerando todas las metafases se aproxima a lo esperado en un experimento ideal de CGH entre muestras de la misma especie. En *Cebus* se observa una disminución generalizada de los valores y un rango dinámico ligeramente más amplio al obtenido para *Ateles.*

Rango dinámico de hibridación	*ATELES*	*CEBUS*
Límite superior (L_s)	1,4	1,1
Valor central	1,1	0,86
Límite inferior (L_i)	0,8	0,6

Tabla 13. Valores estimados para el rango dinámico de hibridación en CGH "control" *Ateles chamek* versus *A. chamek* y *Cebus nigritus* versus *C. nigritus.*

IV: 3.3 Hibridación Genómica Comparada entre especies de *Ateles* con diferencias de valor C

En función de los valores de tamaño de genoma antes presentados (Sección IV: 2.2, **Tabla 8**) se eligieron los pares de especies a comparar por CGH, tomando una especie de menor y de mayor valor C en cada caso. Por cada comparación pareada, se realizaron hibridaciones sobre metafases de una y otra especie involucrada. La **tabla 14** muestra un resumen de las comparaciones realizadas.

Sondas	ACH	ABE	AGE	APA
ACH	CONTROL (Sección IV: 3.2)	--	--	--
ABE	--	--	ABE vs AGE	ABE vs APA
AGE	ACH vs AGE	--	--	--
APA	ACH vs APA	--	--	--

Tabla 14. Experimentos de CGH realizados entre las especies de *Ateles.* *Las especies están ordenadas de izquierda a derecha y de arriba a abajo en orden de menor a mayor valor C.*

En términos generales, al comparar los genomas de las especies de *Ateles* entre sí, se pudo comprobar que las diferencias en tamaño de genoma son evidentemente reconocibles a nivel cromosómico y yacen tanto en regiones eucromáticas como heterocromáticas **(Figura 26 y 27).**

En el cariotipo de *Ateles chamek*, una de las dos especies con tamaño de genoma menor, no se observaron regiones de ganancia de ADN respecto de las especies de mayor tamaño de genoma, *A. geoffroyi* y *A. paniscus.* En *A. belzebuth*, en cambio, se identificaron unas pequeñas regiones teloméricas de ganancia relativa de ADN respecto de *A. geoffroyi*. Contrariamente, ambas especies con mayor valor C mostraron ganancias relativas de ADN en regiones cromosómicas particulares, mayormente heterocromáticas, aunque también en regiones eucromáticas (señales rojas en **figura 26** y señales verdes en **figura 27**).

Asimismo, se hallaron diferencias cuantitativas en el cromosoma Y. En la **figura 26b** (flecha) el cromosoma Y de *Ateles paniscus* se observa fuertemente marcado en rojo, lo que significa una importante diferencia cuantitativa entre el cromosomas Y de *A. paniscus* por sobre *A. chamek.* Al comparar *A. geoffroyi* con *A. belzebuth* también se observó una evidente señal roja en el cromosoma Y compatible con una ganancia relativa de ADN de *A. belzebuth* en ese cromosoma (**Figura 27a-b**, flecha). Asimismo en la comparación entre *A. paniscus* y *A. belzebuth* se observaron diferencias en la cantidad de ADN en el cromosoma Y. En este caso, dos señales se identificaron: una roja cerca del centrómero, donde *A. belzebuth* tiene una ganancia relativa de ADN respecto de *A. paniscus*; y una señal verde de mayor tamaño, compatible con una ganancia relativa de *A. paniscus* respecto de *A. belzebuth* (**Figura 27c**, flecha). Los centrómeros se observan fuertemente marcados tanto con DAPI, como por cada una de las sondas. Debido a su presencia invariable en todos los análisis, dichas marcas no fueron tomadas en cuenta para establecer la localización de las diferencias cuantitativas entre los genomas de las especies en estudio.

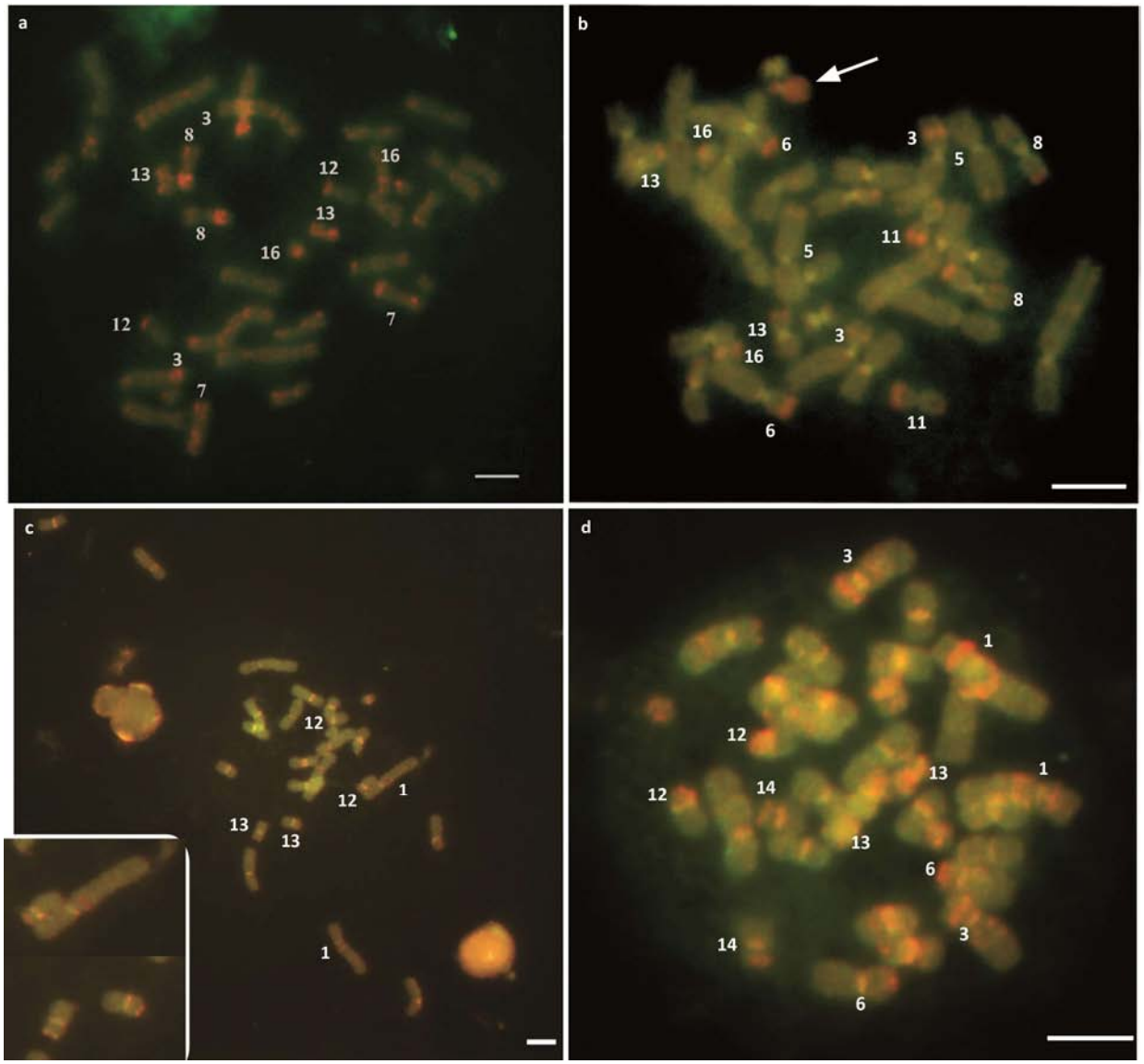

Figura 26. CGH entre especies de *Ateles* con diferencias de valor C: *A. chamek vs. A. paniscus* (a-b) y *A. chamek vs. A. geoffroyi* (c-d) Las señales evidencian regiones de ganancia relativa de ADN en las especies con mayor valor C: *A. paniscus* y *A. geoffroyi* a. *Metafase de A. chamek hibridada con las sondas genómicas A. chamek (FITC, verde) y A. paniscus (Rodamina, rojo).* ***b.*** *Metafase de A. paniscus hibridada con las sondas genómicas A. chamek (FITC, verde) y A. paniscus (Rodamina, rojo). Se señala el cromosoma Y* ***c.*** *Metafase de A. chamek hibridada con las sondas genómicas A. chamek (FITC, verde) y A. geoffroyi (Rodamina, rojo). En los recuadros se muestra el detalle de los cromosomas con señal de hibridación positiva: 12 y 1 (arriba); par 13 (abajo).* ***d.*** *Metafase de A. geoffroyi hibridada con las sondas genómicas A. chamek (FITC, verde) y A. geoffroyi (Rodamina, rojo). Escala: 5 µm.*

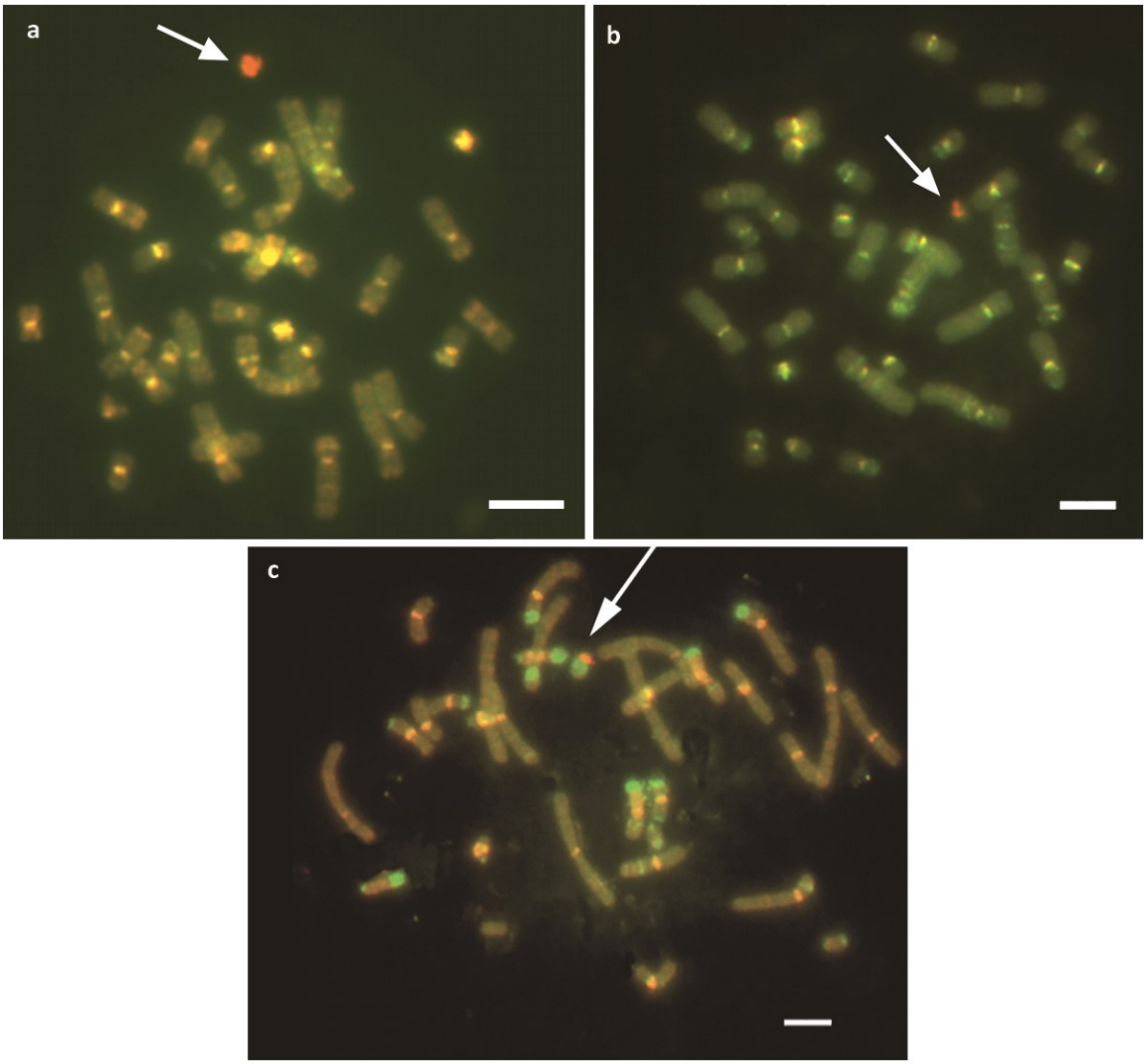

Figura 27. CGH entre especies de *Ateles* con diferencias de valor C: *A. belzebuth* vs. *A. geoffroyi (a-b) y A. belzebuth* vs. *A. paniscus (c).* *a. Metafase de A. belzebuth hibridada con las sondas genómicas A. geoffroyi (FITC, verde) y A.belzebuth (Rodamina, rojo); b. Metafase de A. geoffroyi hibridada con las sondas genómicas A. geoffroyi (FITC, verde) y A.belzebuth (Rodamina, rojo). c. Metafase de A. paniscus hibridada con las sondas genómicas A. belzebuth (Rodamina, rojo) vs. A. paniscus (FITC, verde). Escala: 5 µm.*

A continuación se mencionan los resultados particulares de cada comparación pareada:

Ateles chamek vs *A. paniscus* **(Figura 28 y 29).**

- La mayoría de los cromosomas no mostró diferencias cuantitativas en la cantidad de ADN en toda su longitud (0,8 < razón rojo:verde < 1,4).
- Ningún cromosoma o región cromosómica mostró ganancia de ADN de *Ateles chamek* respecto de *A. paniscus* (razón rojo: verde > 0,8).
- Se identificaron regiones de ganancia de ADN de *Ateles paniscus* respecto de *A. chamek* en 11 cromosomas de ambas especies (razón rojo:verde > 1,4).

  - ✓ En *Ateles chamek* **(Figura 28)**: heterocromatina del cromosoma 3 y 12, regiones teloméricas del cromosoma 7 y 16, y la eucromatina del cromosoma 13 entero.

  - ✓ En *Ateles paniscus* **(Figura 29)**: heterocromatina de los cromosomas 3, 6, 8, 11 y 13; en la región organizadora del nucléolo en el cromosoma 8; en los telómeros de los cromosomas 5 y 16; y en el cromosoma Y. No se hallaron diferencias cuantitativas en el cromosoma rearreglado 4/12 de *A. paniscus.*

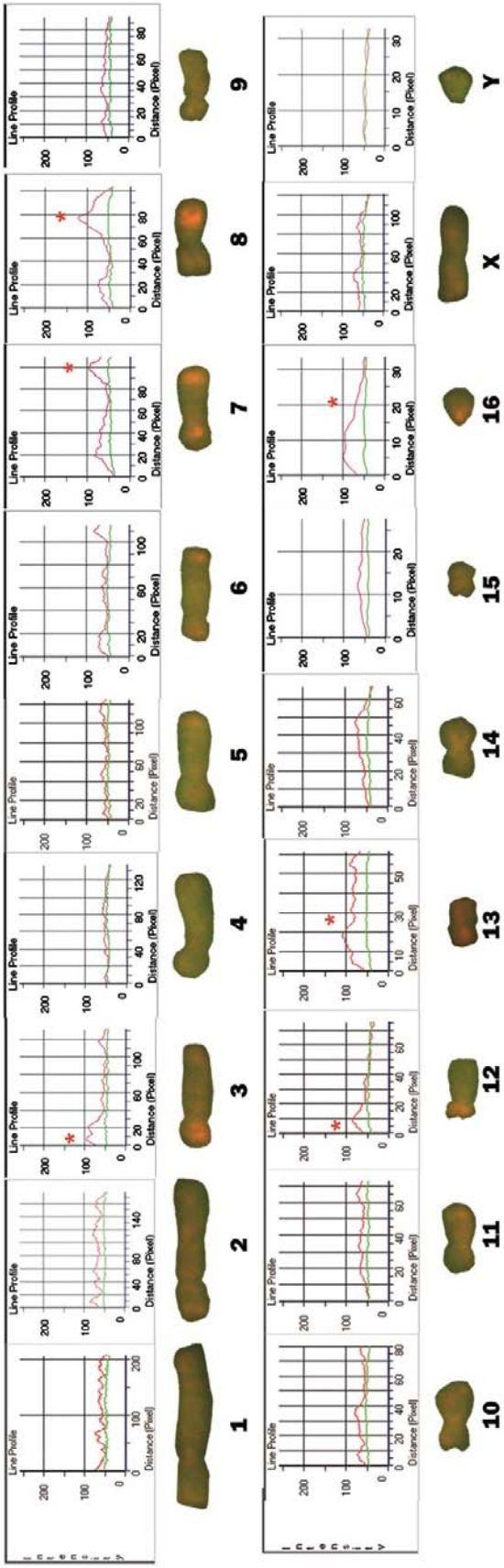

Figura 28. Análisis de CGH *Ateles chamek* vs. *A. paniscus* en los cromosomas de *A. chamek* (2n=34, XY). *Los gráficos muestran los valores de intensidad de fluorescencia roja (genoma de A. paniscus) y verde (genoma de A. chamek) a lo largo de cada cromosoma, donde los asteriscos (*) marcan las regiones donde la razón rojo:verde superó los límites del rango de hibridación.*

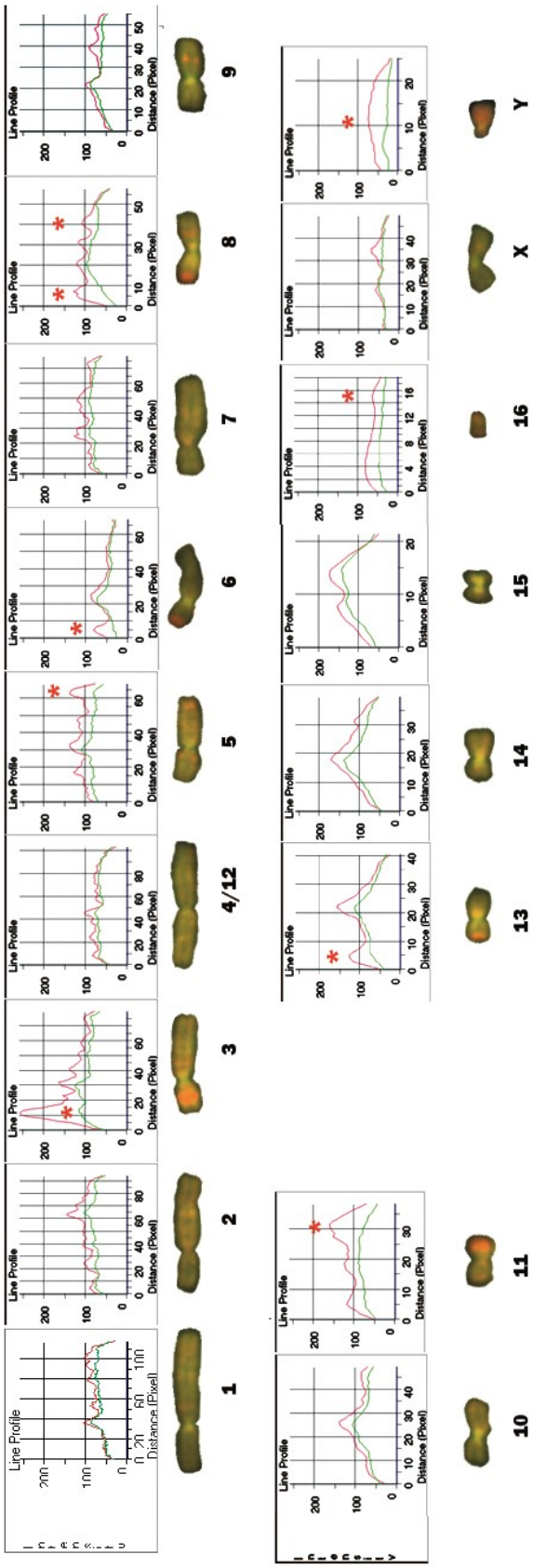

Figura 29. Análisis de CGH *Ateles chamek* vs. *A. paniscus* en los cromosomas de *A. paniscus* (2n=32, XY). *Los gráficos muestran los valores de intensidad de fluorescencia roja (genoma de A. paniscus) y verde (genoma de A. chamek) a lo largo de cada cromosoma, donde los asteriscos (*) marcan una razón rojo:verde por fuera de los límites del rango de hibridación.*

Ateles chamek vs. *A. geoffroyi* **(Figura 30 y 31)**

- La mayoría de los cromosomas no mostró diferencias cuantitativas en la cantidad de ADN en toda su longitud (0,8 < razón rojo:verde < 1,4).
- Ningún cromosoma o región cromosómica mostró ganancia de ADN de *Ateles chamek* respecto de *A. geoffroyi* (razón rojo: verde > 0,8).
- Se identificaron regiones de ganancia de ADN de *Ateles geoffroyi* respecto de *A. chamek* en 7 cromosomas de ambas especies (razón rojo:verde > 1,4).
    - ✓ En *Ateles chamek* **(Figura 30):** pequeñas regiones en los cromosomas 1, 12 y 13.
    - ✓ En *Ateles geoffroyi* **(Figura 31** Regiones heterocromáticas de los cromosomas 1, 3, 6, 12, 13, 14 y en el cromosoma Y.
- Excepto las señales en el cromosoma Y de *Ateles geoffroyi* y el cromosoma 1 de *A. chamek*, todas las señales identificadas detectadas en esta comparación yacen en regiones heterocromáticas.

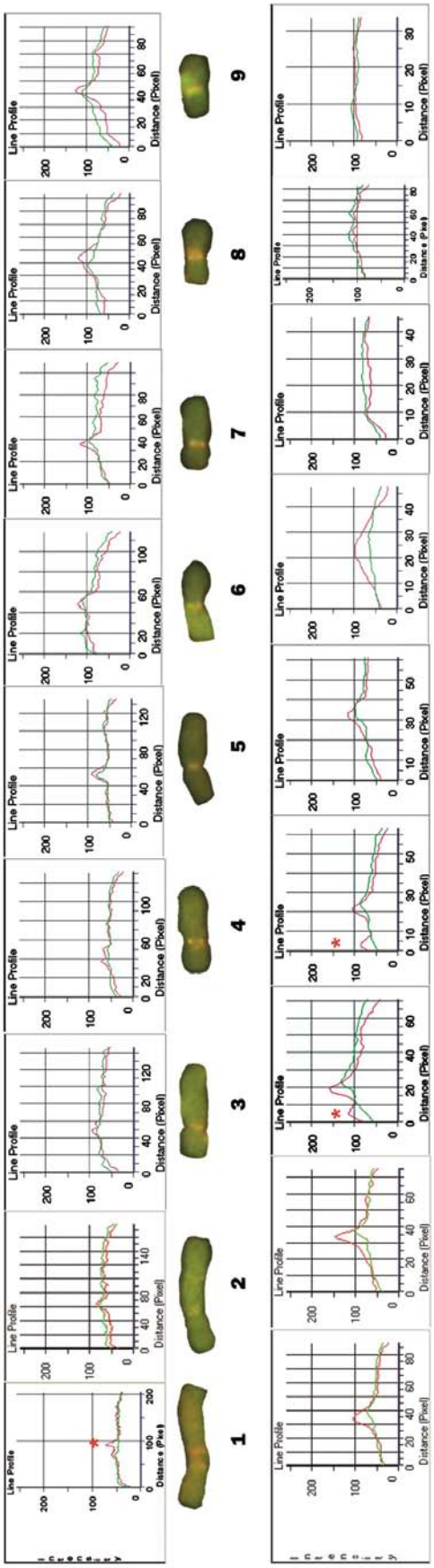

Figura 30. Análisis de CGH *Ateles chamek* vs. *A. geoffroyi* en los cromosomas de *A. chamek* (2n=34, XY). *Los gráficos muestran los valores de intensidad de fluorescencia roja (genoma de A. geoffroyi) y verde (genoma de A. chamek) a lo largo de cada cromosoma, donde los asteriscos (*) marcan una razón rojo:verde por fuera de los límites del rango de hibridación.*

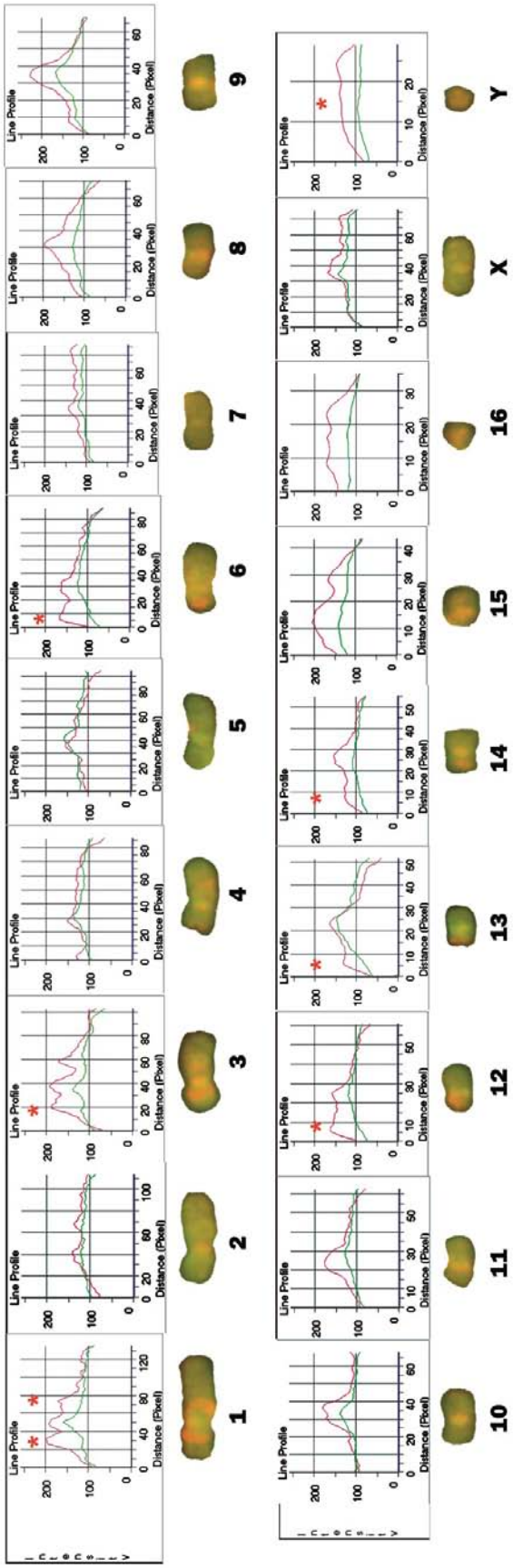

Figura 31. Análisis de CGH *Ateles chamek* vs. *A. geoffroyi* en los cromosomas de *A. geoffroyi* (2n=34, XY). *Los gráficos muestran los valores de intensidad de fluorescencia roja (genoma de A. geoffroyi) y verde (genoma de A. chamek) a lo largo de cada cromosoma, donde los asteriscos (*) marcan una razón rojo:verde por fuera de los límites del rango de hibridación.*

Ateles belzebuth vs *A. geoffroyi* **(Figura 32 y 33).**

- La mayoría de los cromosomas no mostró diferencias cuantitativas en la cantidad de ADN en toda su longitud (0,8 < razón rojo:verde < 1,4).

- Se identificaron regiones de ganancia de ADN de *Ateles geoffroyi* respecto de *A. belzebuth* en 3 cromosomas de ambas especies (razón rojo:verde < 0,8).

    - ✓ En *Ateles belzebuth* en las regiones heterocromáticas de los cromosomas 12 y 15 **(Figura 32).**

    - ✓ En *Ateles geoffroyi* en las regiones heterocromáticas de los cromosomas 6 y 12 **(Figura 33).**

- Se identificaron regiones de ganancia de ADN de *Ateles belzebuth* respecto de *A. geoffroyi* en regiones eucromáticas de los cromosomas 7 y 8 de *A. belzebuth* (razón rojo:verde > 1,4) y en el cromosoma Y de ambas especies **(Figura 32 y 33).**

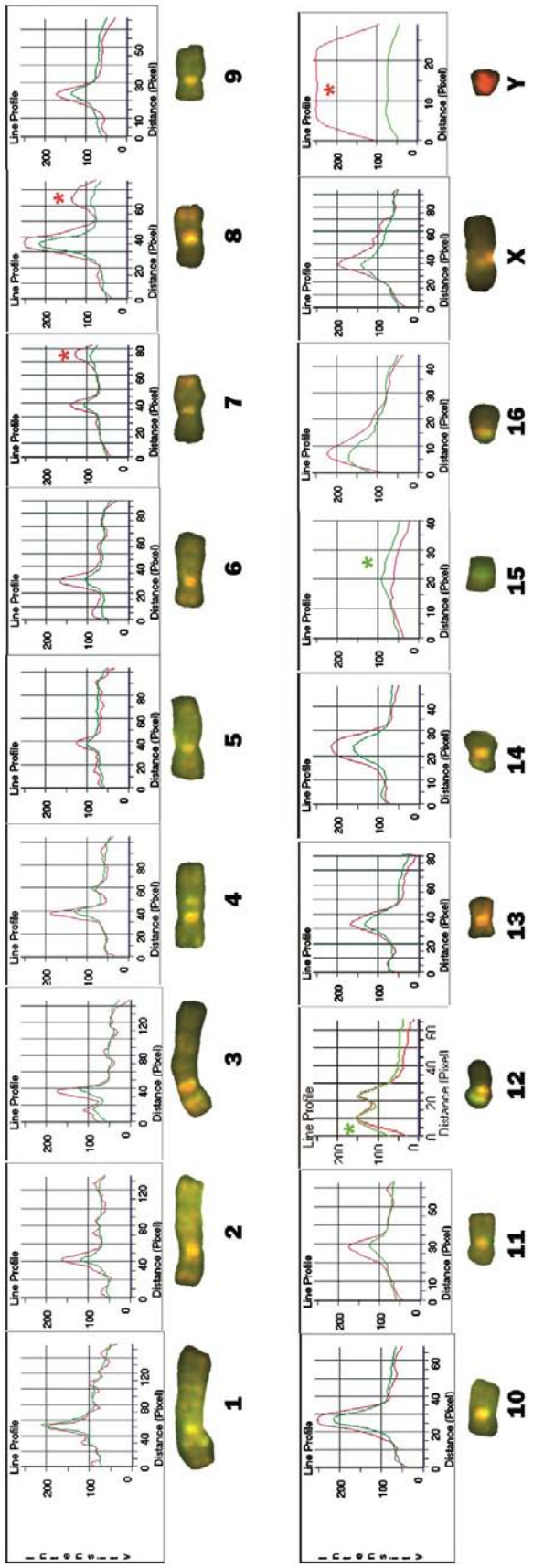

Figura 32. Análisis de CGH *Ateles belzebuth* vs. *A. geoffroyi* en los cromosomas de *A. belzebuth* (2n=34, XY). *Los gráficos muestran los valores de intensidad de fluorescencia roja (genoma de A. belzebuth) y verde (genoma de A. geoffroyi) a lo largo de cada cromosoma, donde los asteriscos (*) marcan una razón rojo:verde por fuera de los límites del rango de hibridación.*

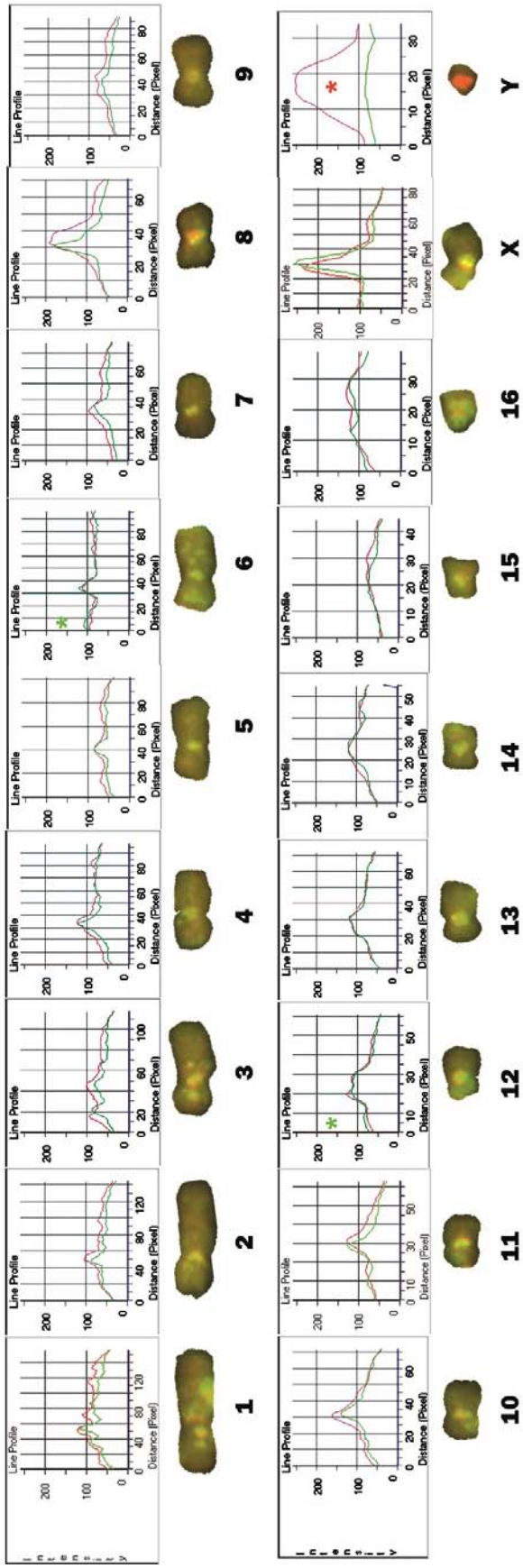

Figura 33. Análisis de CGH *Ateles belzebuth* vs. *A. geoffroyi* en los cromosomas de *A. geoffroyi* (2n=34, XY). *Los gráficos muestran los valores de intensidad de fluorescencia roja (genoma de A. belzebuth) y verde (genoma de A. geoffroyi) a lo largo de cada cromosoma, donde los asteriscos (*) marcan una razón rojo:verde por fuera de los límites del rango de hibridación.*

Ateles belzebuth vs. *A. paniscus* **(Figura 34).**

- La mayoría de los cromosomas no mostró diferencias cuantitativas en la cantidad de ADN en toda su longitud (0,8 < razón rojo:verde < 1,4).

- En los cromosomas de *Ateles paniscus* **(Figura 34)***,* se identificaron regiones de ganancia de ADN en las regiones heterocromáticas de los cromosomas 3, 6, 11, 13 y 14; y en regiones eucromáticas de los cromosomas 8 y 9 (razón rojo:verde < 0,8).

- Se identificaron dos regiones con diferencias en la cantidad de ADN en el cromosoma Y: ganancia relativa de *Ateles belzebuth*, proximal al centrómero (razón rojo:verde > 1,4) y ganancia relativa de *A. paniscus*, posición terminal (razón rojo:verde < 0,8).

- No se hallaron diferencias cuantitativas en el cromosoma reordenado 4/12 de *Ateles paniscus.*

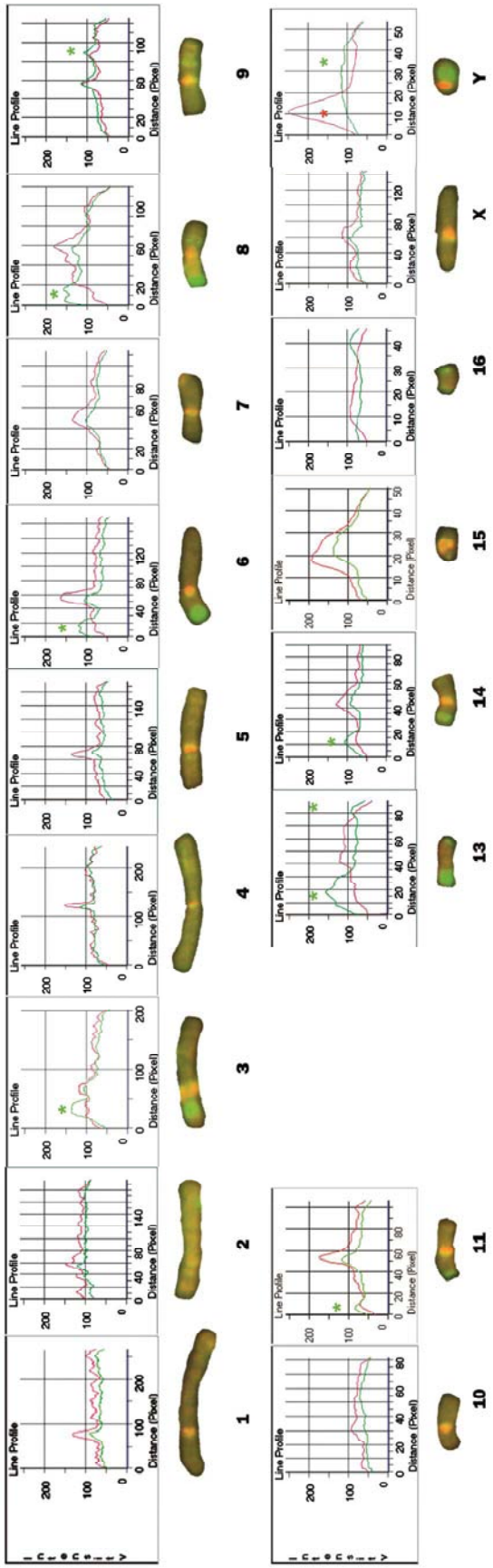

Figura 34. Análisis de CGH *Ateles belzebuth* vs. *A. paniscus* en los cromosomas de *A. paniscus* (2n=32, XY). *Los gráficos muestran los valores de intensidad de fluorescencia roja (genoma de A. belzebuth) y verde (genoma de A. paniscus) a lo largo de cada cromosoma, donde los asteriscos (*) marcan una razón rojo:verde por fuera de los límites del rango de hibridación.*

IV: 3.4 Hibridación Genómica Comparada entre especies de *Cebus*

La elección de los pares de especies a comparar se realizó considerando los tamaños de genoma antes obtenidos, así como también la disponibilidad de sondas y fijación citogenética. Al igual que en las comparaciones entre especies de *Ateles*, por cada comparación pareada se realizaron hibridaciones sobre metafases de una y otra especie involucrada. La **tabla 15** muestra un resumen de las comparaciones realizadas.

Sondas	CNI	COL
CXA	**CNI vs CXA**	--
CNI	CONTROL (Sección IV:3.2)	**CNI vs COL**

Tabla 15. Experimentos de CGH realizados entre las especies de *Cebus.* *Las especies están ordenadas de izquierda a derecha y de arriba a abajo en orden de menor a mayor valor C. Sólo se muestran aquellas especies para las que se obtuvieron sondas genómicas funcionales en buena concentración para la realización de CGH.*

Tanto en la comparación *Cebus nigritus* versus *C. xanthosternos* (**Figura 35**) como *C. nigritus* versus *C. olivaceus* (**Figura 36**) no se detectaron señales diferenciales en el complemento cromosómico autosómico, en las especies analizadas. Es decir, si bien en cada comparación los dos genomas utilizados marcaron conspicuamente las regiones heterocromáticas, la superposición de imágenes y su análisis posterior **(Figuras 37 – 40)** demostraron que no existen diferencias cuantitativas entre estas señales, y que la intensidad de fluorescencia observada se encuentra dentro de los valores del rango de hibridación.

La única señal de hibridación que se destacó como excepción corresponde a la del par sexual, particularmente el cromosoma Y. Así como ocurrió en la comparación de las especies del género *Ateles,* se hallaron diferencias cuantitativas en este cromosoma entre *Cebus nigritus* y *C. olivaceus* (**Figura 36**, flecha). Estas especies muestran diferencias en la cantidad de ADN en el cromosoma Y. En particular, se observa que *C. nigritus* tiene mayor cantidad de ADN en ese cromosoma respecto de *C. olivaceus.* Esta señal de hibridación diferencial sólo es observable en las metafases de *C. nigritus*, mientras que en las metafases de *C. olivaceus* este cromosoma no presenta ninguna señal.

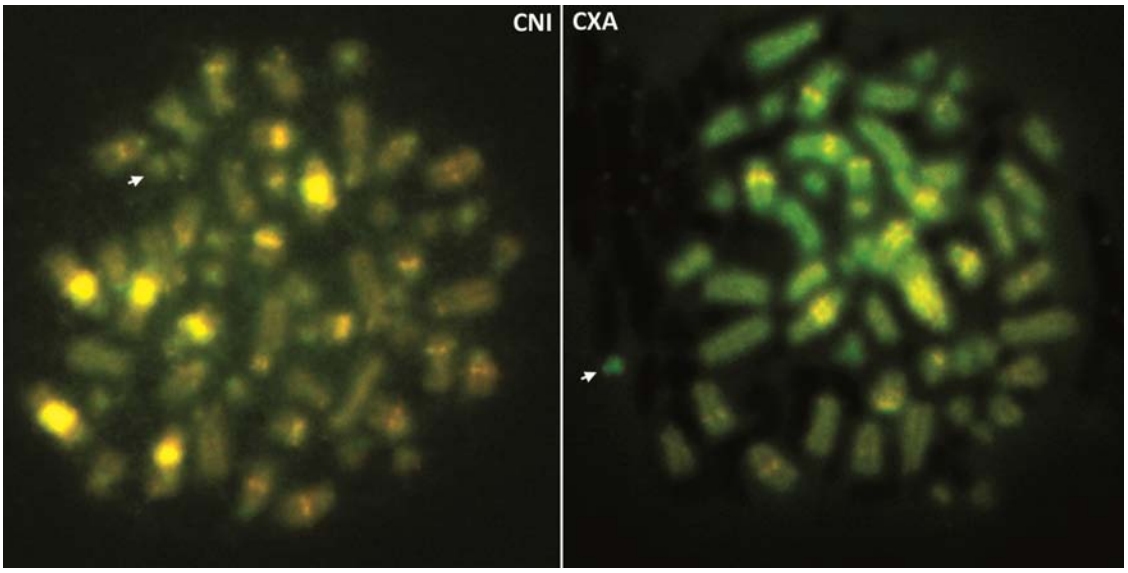

Figura 35. CGH entre *Cebus nigritus* (verde) y *C. xanthosternos* (rojo). *No se observan señales diferenciales de hibridación en las metafases de ambas especies, indicativo de que no son observables diferencias cuantitativas entre los genomas. Las flechas señalan el cromosoma Y de cada metafase.*

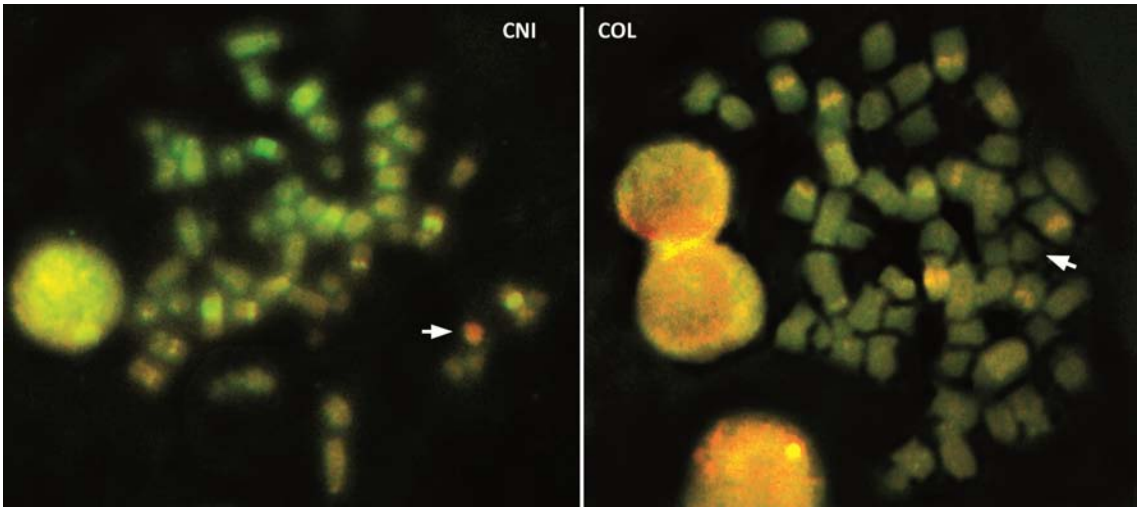

Figura 36. CGH entre *Cebus nigritus* (rojo) y *C. olivaceus* (verde). *No se observan señales diferenciales de hibridación en las metafases de ambas especies, indicativo de que no existen diferencias de cantidad entre los genomas. Las flechas señalan el cromosoma Y de cada metafase. En C. nigritus (derecha) este cromosoma se observa marcado en rojo.*

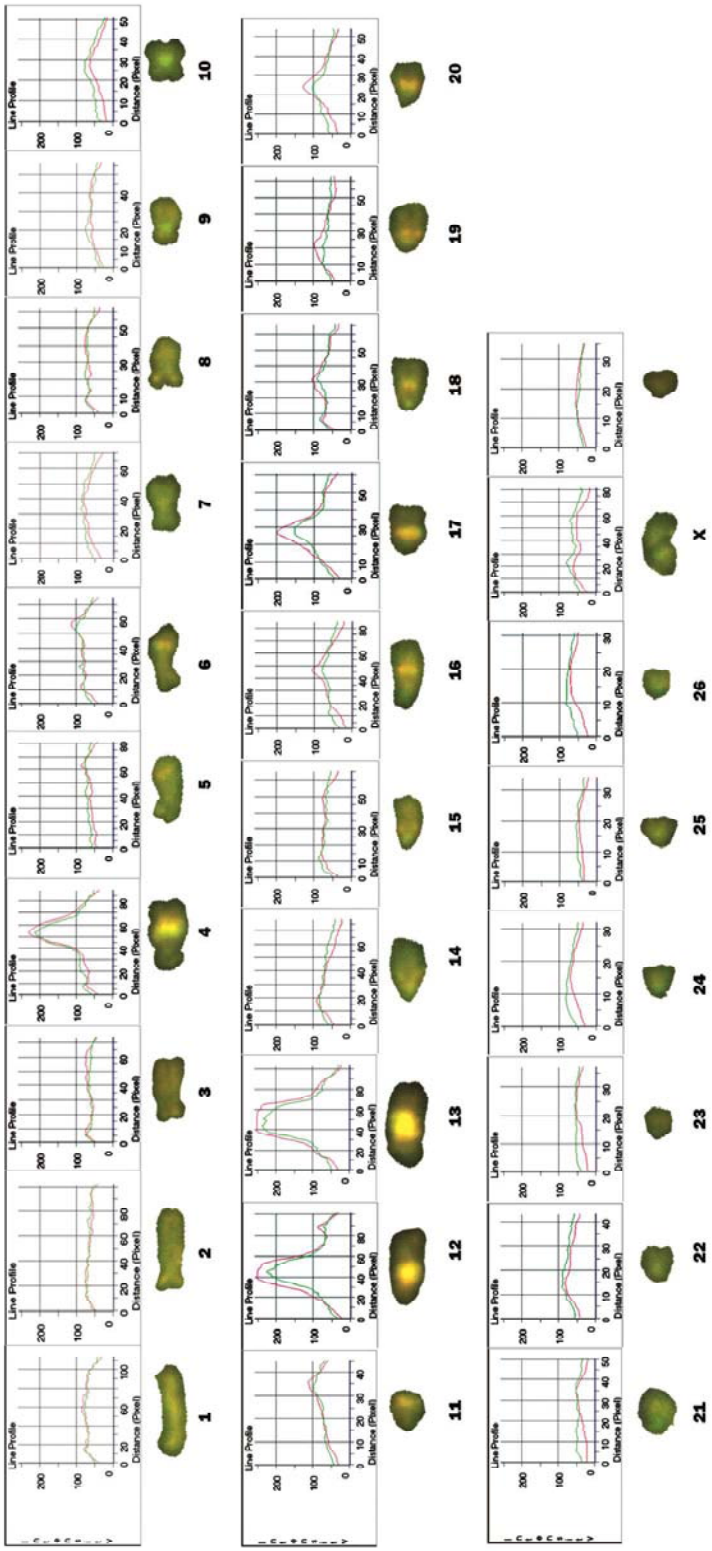

Figura 37. Análisis de CGH entre *Cebus nigritus* y *C. xanthosternos* en los cromosomas de *C. nigritus* (2n=54, XY). *Los gráficos muestran los valores de intensidad de fluorescencia roja (genoma de C. xanthosternos) y verde (genoma de C. nigritus) a lo largo de cada cromosoma. No se observan señales con intensidad de fluorescencia por fuera de los límites del rango de hibridación en ningún cromosoma.*

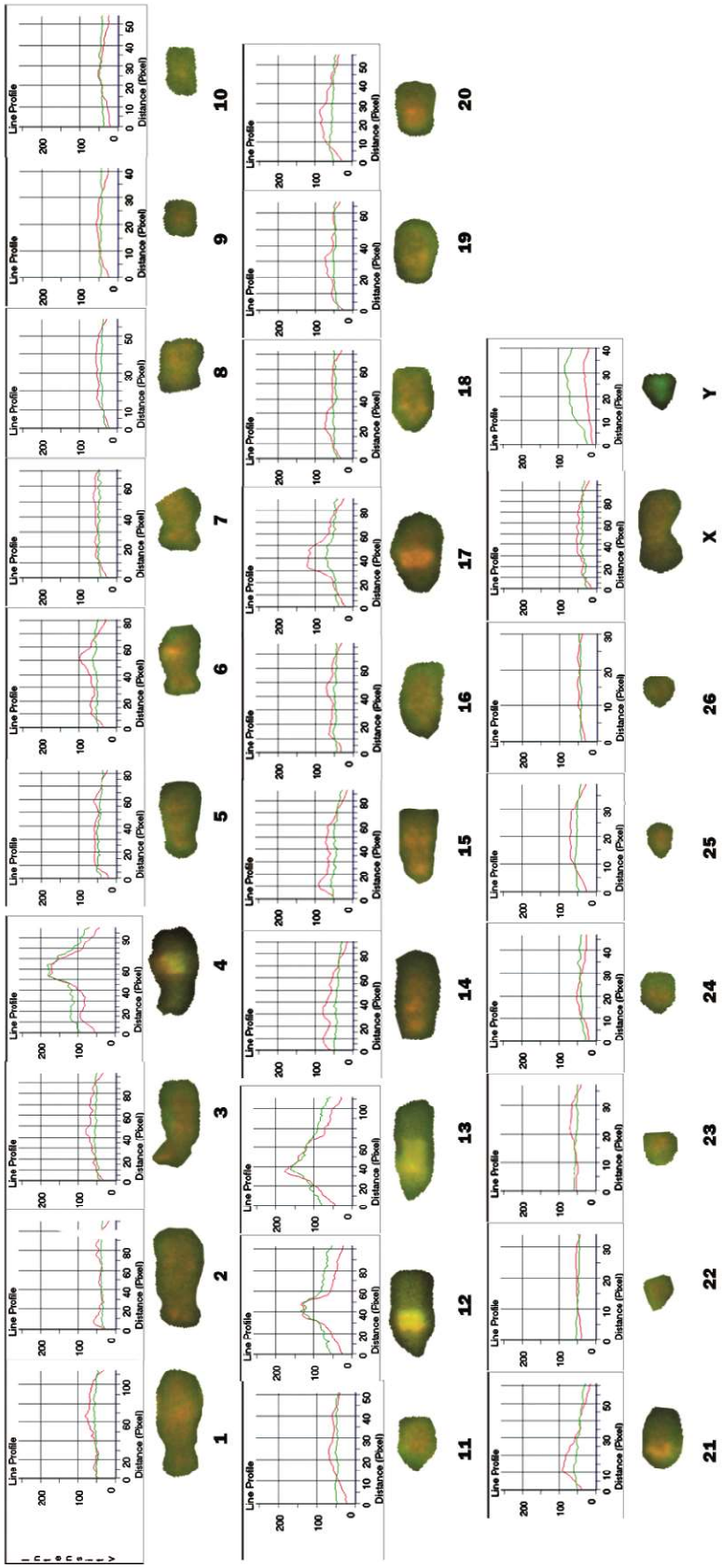

Figura 38. Análisis de CGH entre *Cebus nigritus* y *C. xanthosternos* en los cromosomas de *C. xanthosternos*. *Los gráficos muestran los valores de intensidad de fluorescencia roja (genoma de C. xanthosternos) y verde (genoma de C. nigritus) a lo largo de cada cromosoma. No se observan señales con intensidad de fluorescencia por fuera de los límites del rango de hibridación en ningún cromosoma.*

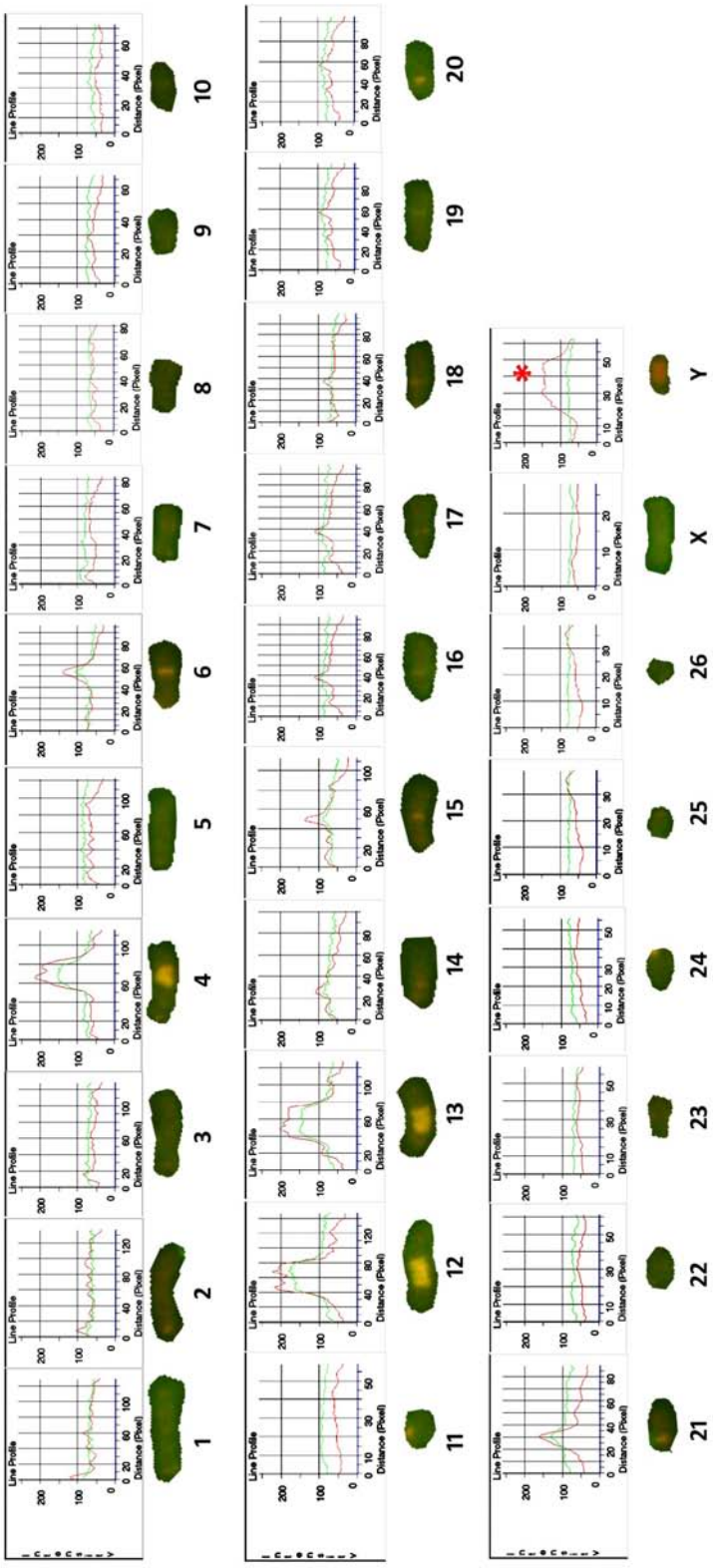

Figura 39. Análisis de CGH entre *Cebus nigritus* y *C. olivaceus* en los cromosomas de *C. nigritus* *Los gráficos muestran los valores de intensidad de fluorescencia roja (genoma de C. nigritus) y verde (genoma de C. olivaceus) a lo largo de cada cromosoma. No se observan señales con intensidad de fluorescencia por fuera de los límites del rango de hibridación en ningún cromosoma, excepto en el cromosoma Y.*

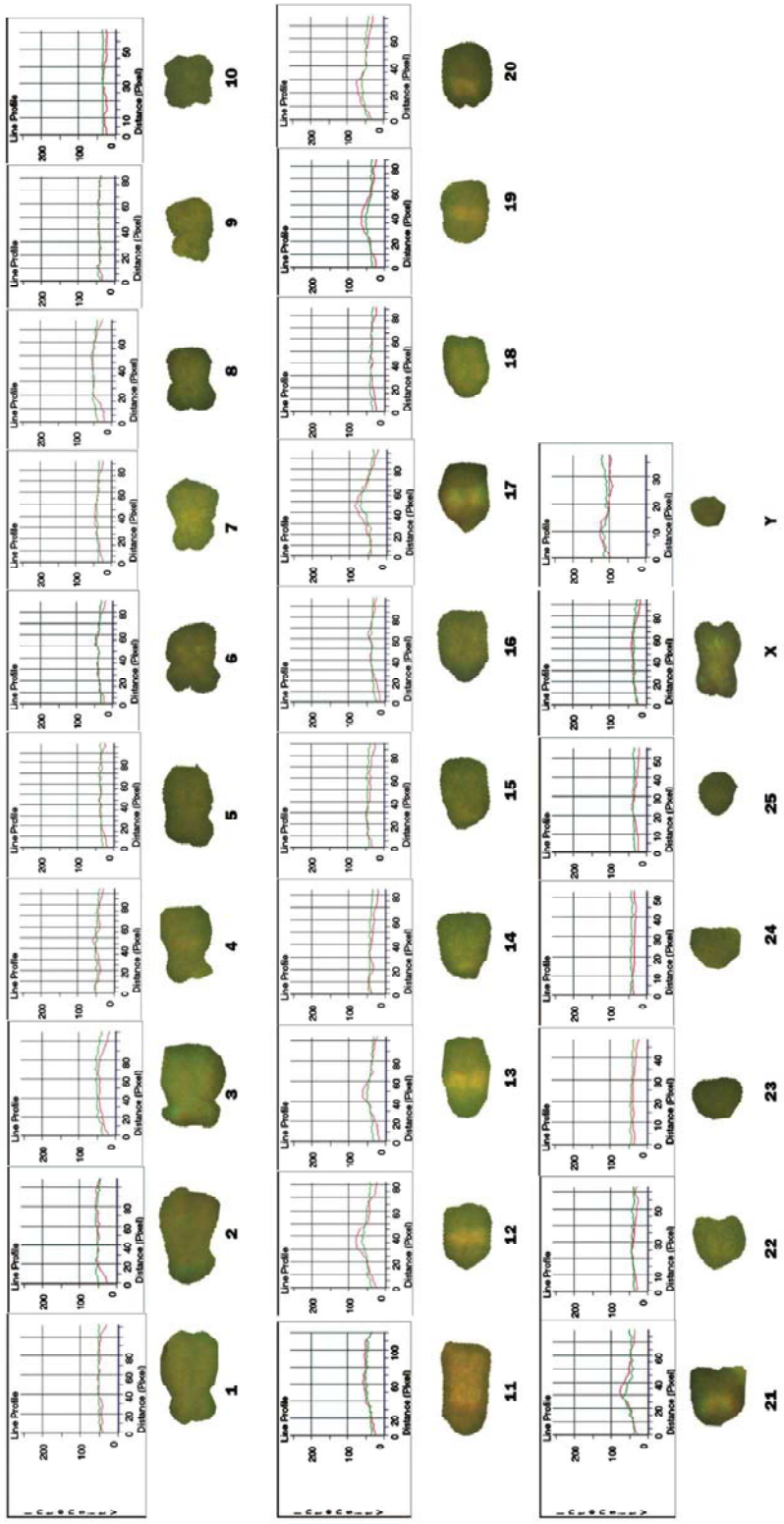

Figura 40. Análisis de CGH entre *Cebus nigritus* y *C. olivaceus* en los cromosomas de *C. olivaceus*. *Los gráficos muestran los valores de intensidad de fluorescencia roja (genoma de C. nigritus) y verde (genoma de C. olivaceus) a lo largo de cada cromosoma. No se observan señales con intensidad de fluorescencia por fuera de los límites del rango de hibridación en ningún cromosoma.*

Discusión

V: 1 CARIOLOGÍA

Si se tiene en consideración que los cromosomas son los portadores de la información genética de un organismo, la citogenética, entonces, proporciona una herramienta útil para el estudio y esclarecimiento de ciertos interrogantes en el campo de la taxonomía, así como en procesos de especiación y evolución. Dentro de los Primates, la amplia variabilidad cariotípica y fenotípica de las especies de *Cebus* y *Ateles* ha sido extensamente referida en la literatura especializada y en la Introducción de este trabajo de tesis.

Como parte del desarrollo de este trabajo de tesis, se han caracterizado citogenéticamente 76 ejemplares de *Cebus* y *Ateles* de diferentes orígenes geográficos e instituciones de Argentina, Colombia, Brasil y México (**Tabla 1**, *II: Materiales y Métodos*). El análisis de estos animales, alojados en Jardines zoológicos, bioterios o estaciones de rehabilitación y cría, permitió en primer lugar, ampliar el número de especies y ejemplares estudiados en el marco del Proyecto Primates, que constituye la línea de investigación a partir de la cual se desprenden todos los proyectos del GIBE, incluida la presente tesis doctoral. Por otro lado, teniendo en cuenta que frecuentemente no existe certeza sobre el origen geográfico de los especímenes de cautiverio, y por ende, sobre su estatus taxonómico, con este trabajo se contribuyó al esclarecimiento de su sistemática, encontrando diferentes situaciones de asignación taxonómica confusa que pudieron ser esclarecidas y/o confirmadas.

Los resultados obtenidos en esta tesis confirman por un lado la variabilidad fenotípica no asociada directamente con el cariotipo, y por otro lado, destacan la utilidad de la caracterización citogenética como aporte informativo en los planes de manejo en cautiverio, reafirmando la necesidad de darle un carácter transdisciplinario a los mismos.

Entre los ejemplares de *Ateles* analizados se encontraron las variantes cromosómicas ya descritas para los cromosomas 5, 6 y 7 –característicos de la variabilidad descrita para el género (Nieves et al., 2005; Oliveira et al., 2005; Medeiros et al., 1997)– y las distintas morfologías y tamaños para el cromosoma Y **(IV: 1.2, Figura 11)**; sólo en los ejemplares de *A. paniscus* se observó el cromosoma resultante de la fusión entre el cromosoma 4 y el 12, confirmando las caracterizaciones previas para esta especie. Asimismo, en este trabajo se presentó por primera vez el

mapa de pintado cromosómico de la especie *A. chamek*, con notables similitudes con las especies previamente analizadas (Oliveira et al., 2005; Morescalchi et al., 1997).

Por su parte, entre las especies de *Cebus,* la variación en el número cromosómico es más compleja de explicar que en el género *Ateles,* pero también implica reordenamientos a partir de un mismo cariotipo ancestral (Stanyon et al., 2008; García Haro, 2001). En las especies aquí en estudio se obtuvieron datos de número cromosómico concordantes con el estatus taxonómico asignado desde el fenotipo (52 cromosomas en *C. olivaceus* y *C. albifrons*, 54 cromosomas en el resto, **IV: 1.1 Tabla 5**). Asimismo, se observaron polimorfismos cromosómicos, evidenciables notoriamente con la técnica de bandas C **(IV: 1.2, Figura 14 & 15).** Este tipo de polimorfismos han sido ampliamente descritos en numerosos estudios previos, y forman parte de la diversidad cariotípica que caracteriza al género (Penedo et al., 2014; Ruiz-Herrera et al., 2004; Ponsà et al., 1995; Mudry, 1990; Mudry de Pargament and Labal de Vinuesa, 1988; Mudry de Pargament et al., 1985). Como ya se mencionó en los resultados, el ejemplar de *C. xanthosternos* estudiado representa un ejemplo particular en cuanto a los polimorfismos de heterocromatina observados en los ejemplares de esta tesis **(IV: 1.2 Figura 10c & 12).**

Es importante resaltar, en cuanto a este trabajo de tesis, que en todo momento se tuvo en cuenta que el material de estudio, objeto de los análisis e interpretaciones realizadas, surge a partir de muestras extraídas de animales de cautiverio, por lo que las conclusiones que de este análisis se desprenden pueden resultar una representación limitada, sobre todo a niveles poblacionales. Sin embargo, consideramos que en este contexto, la evaluación genética de las colonias de cautiverio proporcionada por trabajos de este tipo es útil a la vez que esencial, no sólo para establecer un diseño de mantenimiento y manejo acorde a los proyectos de cada institución, sino también por la posibilidad de disponer de manera directa y relativamente fácil de un gran número de ejemplares con su información genética.

V: 1.1 Homologías cromosómicas entre especies

Las comparaciones entre cariotipos pueden realizarse de numerosas maneras. Contar con información provista desde distintos enfoques metodológicos permite destacar y describir más completamente las características propias de cada especie a analizar. Una de las posibilidades es a través del análisis de homologías cromosómicas mediante FISH, que permite visualizar y localizar las

similitudes en la composición de diferentes cariotipos. Además de describir mejor los cariotipos de interés, el conocimiento de las similitudes a nivel cualitativo es importante antes de realizar comparaciones de tipo cuantitativo entre los genomas.

Como se mencionó anteriormente, en este trabajo se analizó comparativamente el cariotipo de algunas especies a través de FISH utilizando sondas cromosómicas y génicas humanas. Como resultado de estas comparaciones se obtuvo el primer mapa cromosómico de homologías entre el cariotipo humano y la especie *Ateleschamek* **(IV: 1.3, Figura 18 y 19)***,* así como también se confirmaron algunas homologías entre las especies de *Cebus* **(IV: 1.3, Figura 20 y 21)**.

En las especies analizadas por FISH se pudieron observar algunas de las principales sintenias descritas para el cariotipo ancestral de Platyrrhini, entre ellas: en *Ateles chamek*, 5/7a, 2b/16b, 14/15a, 10a/16a y en *Cebus* 14/15a, 10a/16a (Stanyon et al., 2008; García Haro, 2001).

Al comparar los resultados aquí obtenidos con los de las otras especies de *Ateles*, *A. chamek* muestra un cariotipo muy conservado. Tal es así que en el mapa cromosómico de homologías aquí obtenido para *A. chamek* **(IV: 1.3, Figura 19)** puede observarse el mantenimiento de algunas sintenias que sustentan el cariotipo ancestral de Atelidae, y que además apoyan la monofilia de los Atelinae, tales como 14/15a_1, 7a/5a, 5b, 1a_1 y 1a_2 (Oliveira et al., 2005, 2002). Asimismo, en esta especie se mantienen sintenias ancestrales que en las otras especies se presentan en formas derivadas, como por ejemplo la inversión pericéntrica observada en *A. paniscus, A. geoffroyi* y *A. hybridus* que da origen a la forma cromosómica 1a/6/1c/6/1c (Oliveira et al., 2005) que en *A. chamek* se presenta en la forma 1/6/1.

Las sondas cromosómicas utilizadas para FISH fueron marcadas y testeadas en metafases humanas previo a su utilización en metafases de los primates aquí en análisis. En todos los casos se obtuvieron resultados favorables en los experimentos con metafases humanas –si bien con diferencias en la calidad de la hibridación- , no así en metafases de mono para las sondas de los cromosomas 4 y 8. Teniendo en cuenta que ya existen registros de homología entre estos cromosomas y los de *Ateles*, es probable que exista algún artefacto experimental que impida su correcto funcionamiento en las metafases de interés. Es posible que el modo de obtención del ADN con el que se manufacturó la sonda, o bien su clonado, haya introducido alguno de los artefactos experimentales que expliquen la diferencia en los resultados de la hibridación. Estos artefactos tendrían efectos tan sutiles de manera que sólo son evidentes cuando la hibridación se realiza en

especies diferentes, y no cuando se utilizan los propios cromosomas humanos. La hibridación con el mismo conjunto de sondas en las especies de *Cebus* develó más conspicuamente estos inconvenientes, ya que una mayor proporción de sondas presentó los mencionados problemas de hibridación. Por limitaciones de tiempo y financiamiento no fue posible obtener un nuevo set de sondas que permita realizar más hibridaciones. Una situación completamente diferente explica la ausencia de hibridación con la sonda del cromosoma Y humano (V: 1.1.1).

Tanto en las especies de *Cebus* como en *Ateles chamek*, a excepción de las sondas cromosómicas ya mencionadas con las que no se obtuvo señal de hibridación exitosa, el resto de las sondas utilizadas mostró una o varias señales de hibridación. La mayoría de las señales fueron detectadas en posiciones cromosómicas homólogas en el cariotipo de las especies de cada género, siendo la única excepción la hibridación del cromosoma 18 humano en posición intersticial en el cromosoma 1 de *A. chamek* **(IV: 1.3, Figura 18 f)** en lugar de una posición pericentromérica como en las otras especies de *Ateles* (Oliveira et al., 2005)**.** Al no hallarse nuevos reordenamientos o sintenias estos datos no agregan información para la construcción de filogenias que incluyan datos citogenéticos. Sin embargo, en cada caso, estas señales representan características compartidas que pueden ser utilizadas junto con otras en la caracterización y definición de una especie.

V: 1.1.1 Cromosoma Y

Todos los mamíferos placentarios comparten un sistema cromosómico de determinación sexual que consiste en dos cromosomas X en la hembra y XY en el macho; o bien alguna variante de este sistema. El mapeo génico y el pintado cromosómico con sondas interespecíficas han develado que el cromosoma X se encuentra altamente conservado entre las especies de mamíferos euterios, siendo prácticamente idéntico incluso entre las especies más distantes. Sin embargo, el cromosoma Y muestra diferencias notables entre las especies tanto morfológica como genéticamente (Waters et al., 2007).

La ausencia de homología entre sondas del cromosoma Y humano y el cromosoma Y de especies de primates neotropicales ha sido mencionada previamente en la bibliografía (Stanyon et al., 2003; Mudry et al., 2001; Consigliere et al., 1998, 1996), por lo que la ausencia de señal en las hibridaciones realizadas en las metafases de *Cebus* y *Ateles* presentada en este trabajo no resulta extraordinaria. Situaciones similares se han observado incluso entre los cromosomas Y de algunas

especies de primates neotropicales. Por ejemplo, estudios citogenéticos previos en la familia Atelidae han demostrado que el cromosoma Y de *Brachyteles arachnoides,* uno de los géneros más cercanos filogenéticamente a *Ateles* (ver I: 3, **Figura 2**), presenta homología con aquel de *Lagothrix lagothricha* y *Ateles marginatus*, pero no con el de *Alouatta*, otra género de la misma familia (Gifalli-Iughetti and Koiffmann, 2009).

Si bien no se ha encontrado homología completa, es decir cromosoma a cromosoma, para los cromosomas Y del humano y los primates neotropicales, resultó interesante explorar la posibilidad de homología con porciones más pequeñas de este cromosoma. Para ello, en este trabajo se refinó el análisis de homología en el cromosoma Y utilizando sondas subteloméricas y génicas. Los resultados muestran que en las especies analizadas no se observan porciones más pequeñas de homología en las regiones subteloméricas. Al utilizarse como sonda la porción subtelomérica de los cromosomas sexuales humanos Xp-Yp/Xq-Yq se observa únicamente la hibridación de esos segmentos en la región pseudo autosómica del cromosoma X, no así en el cromosoma Y **(IV: 1.3, Figura 22).** Como se trata de la misma sonda que hibrida en ambos cromosomas humanos, –un segmento de 135 Kb que es 99.4% idéntico para ambos cromosomas en el extremo p o un segmento de 154Kb con 97,8% de identidad en X e Y en el extremo q– los resultados obtenidos incluyen un control de hibridación intra metafase, que descarta cualquier artefacto técnico como posible causa de la ausencia de señal en el cromosoma Y de las especies analizadas, dejando en evidencia la falta de homología entre dichos segmentos de ADN. Otros análisis de este tipo, que no incluyen sondas génicas sino de segmentos de cromosoma Y, han arrojado resultados similares en primates neotropicales. Por ejemplo sondas derivadas del cromosoma Y humano, constituidas por duplicaciones segmentarias distribuidas a lo largo de este cromosoma, fueron testeadas en *Callithrix jacchus*, *C. geoffroyi*, *C. Moloch* y *Ateles geoffroyi*, y en ningún caso se obtuvo señal de hibridación (Kirsch et al., 2008).

Los mismos resultados se obtuvieron para la mayoría de los genes humanos del cromosoma Y testeados por FISH en este trabajo. Curiosamente, se obtuvieron resultados de hibridación positiva en el cromosoma Y de *Ateles paniscus* con la sonda del gen humano ZFY. El hecho de que se haya observado señal de hibridación sólo en esta especie puede tener que ver con el mayor tamaño de su cromosoma Y, o bien a cuestiones experimentales que favorecieron la hibridación en estas metafases. El gen ZFY se ubica en el genoma humano en Yp11.3, y codifica una proteína que contiene un motivo de tipo “dedo de Zinc” que funcionaría como un factor de

transcripción, expresado mayormente en los testículos de los mamíferos (GenBank NG_008113). Se han descrito genes ortólogos a ZFY en el chimpancé y otros primates catarrhinos (Lau and Chan, 1989), aunque no existen registros de secuencias homólogas en primates neotropicales. Los resultados de FISH obtenidos en este trabajo constituirían el primer registro de una posible homología de este gen humano en un primate neotropical cuya confirmación queda pendiente para posibles abordajes genético moleculares futuros.

V: 1.2 Heterocromatina

Como parte de los objetivos de este trabajo se refieren a las diferencias del tamaño del genoma, una caracterización citogenética más completa de la heterocromatina proporcionaría herramientas útiles para la discusión de aquellos resultados. Los análisis citogenéticos aquí presentados representan una caracterización somera de la heterocromatina presente en *Cebus* y *Ateles*, sin embargo se suman a otro tipo de caracterizaciones antes realizadas.

Si bien las propiedades de la heterocromatina no dependen únicamente de la presencia de una secuencia específica de ADN, diferentes autores han estudiado su composición en el genoma de los primates neotropicales a nivel citogenético. Fanning et al. (1993) describieron dos tipos de ADN satélite presentes en *Cebus apella*: *CAP A*, un fragmento mayor de 1500pb, que mediante análisis por *Southern blot* se observó en los bloques extracentroméricos de *Cebus* y en otros géneros de primates neotropicales, entre ellos *Ateles* (en la especie *A. fusciceps*, no muestreada en el presente trabajo); y *CAP B*, un α-satélite que se encontró en los centrómeros de *Cebus* y aparentemente estaría conservado tanto en los cariotipos de los primates del nuevo mundo como en los del viejo mundo. Posteriormente, García et al. (2003) hallaron diferentes tipos de heterocromatina a partir del análisis del patrón de digestión por enzimas de restricción en 16 especies de primates. Para *C. apella* identificaron 5 tipos de heterocromatina centromérica y un tipo intersticial/terminal. En concordancia con descripciones previas de la heterocromatina de *Cebus* y *Saguinus* (un género de callitricidos), propusieron un origen no centromérico de la heterocromatina intersticial (Pieczarka et al., 2001; Ferrucci et al., 1995).

En este trabajo, el análisis de heterocromatina se realizó a nivel citogenético –es decir, cromosómico-, y abordó algunas cuestiones cualitativas como la descripción de los bloques a través de las técnicas de bandas C y bandas DAPI-CMA3 en cada una de las especies muestreadas.

Asimismo, se analizó cuantitativamente su distribución en las distintas especies, estableciéndose un estimador numérico de comparación entre especies: el porcentaje de heterocromatina.

En las especies del género *Ateles* los bloques heterocromáticos se encuentran principalmente, y según la especie, en regiones terminales o intersticiales de los cromosomas 1, 3, 6, 11, 12, 13 y 14, y en la región pericentromérica del cromosoma 15 **(IV: 1.2, Figura 13)**. Si bien se observaron diferencias entre las especies en cuanto al número y ubicación de los bloques heterocromáticos, en ninguna de ellas se observaron polimorfismos de tamaño o posición de los bloques entre los diferentes homólogos. Las distintas especies pudieron ser diferenciadas tanto por la distribución de los bloques heterocromáticos en los diferentes cromosomas, así como por la cantidad de heterocromatina contenida en el genoma, reflejada en el porcentaje de heterocromatina en el cariotipo **(IV: 2.1, Tabla 6)**. Por otro lado, el patrón de bandas observado mediante la superposición de las bandas DAPI-CMA3 **(IV: 1.2, Figura 16)** develó que todas las regiones heterocromáticas de las distintas especies de *Ateles* se marcan fuertemente con DAPI, correspondiente a un ADN enriquecido en pares AT, mientras que algunos cromosomas, como por ejemplo el portador de la región del organizador nucleolar (NOR), muestran porciones conspicuamente marcadas con CMA3.

En las especies del género *Cebus* los bloques heterocromáticos se encuentran principalmente, según la especie, en regiones intersticiales y en menor medida terminales de los cromosomas 1, 4, 6, 11, 12, 13, 17, 19 y 21. En 4 de las especies analizadas se observaron polimorfismos heterocromáticos, siendo los más frecuentes los correspondientes a los cromosomas 6, 17 y 19 **(IV: 1.2, Figura 14 y 15)**. Como aspecto a destacar, se observó que en las especies "sin copete" la cantidad de bloques heterocromáticos es mayor, algo que ya había sido notado por Nieves (2011) al analizar los patrones de hibridación con la sonda de heterocromatina de *Cebus*. En este caso, el conjunto de especies aquí tratado no siempre pudo ser identificado únicamente a partir del patrón de distribución heterocromático, debido a los polimorfismos heterocromáticos, por un lado, y a las similitudes entre especies en la ubicación y tamaño de los bloques de heterocromatina. Asimismo, la cantidad de heterocromatina contenida en el genoma, reflejada en el porcentaje de heterocromatina en el cariotipo **(IV: 2.1, Tabla 7)**, mostró valores muy cercanos entre pares de especies como *C. xanthosternos* y *C. nigritus*, y *C. libidinosus* y *C. cay.* Las especies sin copete, *C. olivaceus* y *C. albifrons* no sólo son las que poseen mayor cantidad de bloques heterocromáticos, entre las especies de *Cebus* aquí analizadas, sino también son quienes poseen los de mayor

extensión en el cariotipo, con porcentajes de heterocromatina cercanos al 10%. El patrón de bandas DAPI-CMA3, por su parte, arrojó resultados similares para las diferentes especies del género, donde los bloques heterocromáticos muestran conspicuas bandas en CMA3, correspondiente a una composición rica en regiones GC en el ADN **(IV: 1.2, Figura 17)**.

El contenido de GC en los mamíferos se encuentra correlacionado con diversas características genómicas potencialmente relevantes tanto en relación a la variación del tamaño del genoma –como por ejemplo la distribución de elementos transponibles–, como desde un punto de vista funcional, por ejemplo en cuanto a densidad génica, tasa de recombinación y niveles de expresión (Kudla et al., 2006; Eyre-Walker and Hurst, 2001). Se ha propuesto que un mayor porcentaje de GC en la porción heterocromática del genoma podría conferir mayor estabilidad a los genomas de mayor tamaño; o bien proveer una cierta protección frente a daños químicos, ya que muchos de los mutágenos químicos conocidos presentan una mayor afinidad hacia los pares GC que a los AT (Vinogradov, 1998). De hecho, estudios de genotoxicidad de derivados de nitroimidazol en *C. libidinosus*[4] han mostrado que el daño químico no se produce aleatoriamente en el cariotipo, sino que aquél tiene una mayor incidencia en los cromosomas portadores de heterocromatina, ricos en pares GC (Mudry et al., 2011). Por su parte, el ADN rico en pares AT, característico del ADN repetitivo en algunas especies como por ejemplo las de *Ateles* aquí analizadas, es relativamente más lábil y, se supone, más fácilmente propagable ya que por mutación espontánea los pares GC suelen convertirse en pares AT más usualmente que en el sentido inverso (Vinogradov, 1998).

En cuanto a la caracterización de la heterocromatina aquí realizada, en cada uno de los géneros se observó un patrón uniforme al seno de cada uno –es decir entre las especies del mismo género-, pero distinto entre ambos géneros. A partir de trabajos anteriores se había establecido a la heterocromatina de *Cebus* como género-específica, sin embargo cabía la posibilidad de que la heterocromatina de *Cebus* y *Ateles* compartieran algunos atributos moleculares. Teniendo en cuenta el paralelismo inicial que fundamenta esta tesis, es importante destacar que, a pesar de tratarse de dos grupos de especies que muestran como característica común la presencia de abundante

[4] Según la nomenclatura aquí usada, correspondería *C. cay*

heterocromatina en el cariotipo, *Cebus* y *Ateles* presentan composiciones heterocromáticas notablemente diferentes.

V: 1.3 Cariología y Sistemática de los monos capuchinos: *Cebus* vs. *Cebus* y *Sapajus*

Considerando los importantes cambios taxonómicos que el género C*ebus* ha sufrido en los últimos 3 años cabe destacar que según los resultados citogenéticos que desde este trabajo de tesis y otros artículos, ya publicados, se presentan, no existen argumentos que sostengan o apoyen la decisión de la subdivisión en *Cebus* y *Sapajus*.

Una revisión exhaustiva de los trabajos publicados en citogenética de *Cebus* entre 1970 y 2014 (Nieves et al. en preparación), que abarca el análisis de diferentes ejemplares de vida silvestre y de cautiverio de distintos sitios (en los que en conjunto se han analizado 127 ejemplares de vida silvestre y 272 de cautiverio u origen desconocido), arroja evidencias que muestran una homogeneidad cariotípica del conjunto completo, aunque no sin destacar una notable variabilidad (Steinberg et al., 2014; Nieves et al., 2011; Amaral et al., 2008; Ruiz-Herrera et al., 2005; Martinez et al., 2004; García et al., 2003, 2002; Martinez et al., 2002; García et al., 2000, 1999; Mudry, 1990; Mudry de Pargament y Labal de Vinuesa, 1988; Matayoshi et al., 1987; Clemente et al., 1987; Seuánez et al., 1986; Garcia et al., 1983; Freitas y Seuánez, 1982; Couturier y Dutrillaux, 1981; Dutrillaux B et al., 1978; García et al., 1978, 1976; Cambefort y Moro, 1978; Torres de Caballero et al., 1976; Koiffmann y Saldanha, 1974). Estas evidencias se relacionan a características también aquí analizadas y señaladas:

En primer lugar, el número cromosómico (2n=52 y 2n=54) y la fórmula cromosómica **(Tabla 5)**. Si bien los distintos números cromosómicos que en *Cebus* se observan muestran un patrón de aparición acorde al de la división propuesta –todas las especies con 52 cromosomas pertenecen al grupo grácil sin copete–, esta característica no resuelve totalmente ambos grupos. Y, si así lo hiciera, aún resultaría insuficiente pues existen otros grupos de primates con diferencias en el número cromosómico que constituyen un mismo género –sin ir más lejos, el género *Ateles,* aquí también analizado-.

En segundo lugar, el patrón de bandas con tinciones diferenciales (G, C, DAPI-CMA3, etc.) **(Figuras 10, 14 y 17)** muestra importantes similitudes entre todas las especies

analizadas. Asimismo la conservación de sintenias cromosómicas entre todas las especies, es representativa de la amplia homología entre los genomas de las especies **(Figura 20 y 21)**.

Por último, la composición de heterocromatina evidenciada a través de las bandas DAPI-CMA3 **(Figura 17),** y más exactamente, por medio de FISH con sonda de la heterocromatina del cromosoma 11 de *Cebus cay*, manifiesta igual composición de las secuencias repetidas en todas las especies, considerándose como género específica (Nieves et al., 2011).

Todos estos argumentos citogenéticos no descalifican la decisión ya tomada por muchos primatólogos de dividir al género en *Cebus* y *Sapajus* (Lynch Alfaro et al., 2012a; Lynch Alfaro et al., 2012b), ni tampoco van necesariamente en contra de la misma. Sin embargo se suman al conjunto que considera que decisiones de este tipo requieren una notable suma de evidencias en favor, así como clama por una taxonomía que no sobreestime el número de especies (Jameson Kiesling et al., 2015; Nascimento et al., 2015; Rosenberger, 2012; Isaac et al., 2004).

V: 2 TAMAÑO DEL GENOMA

El contenido de ADN y su variación han sido ampliamente ignorados como factores de análisis en la evolución y divergencia de las especies, sobre todo con el advenimiento de los enfoques basados en el análisis de secuencias. Si bien ciertos patrones de variación del tamaño del genoma han sido detectados en determinados grupos animales –por ejemplo, en relación al metabolismo en mamíferos y aves, o al desarrollo en anfibios– todavía queda mucho por hacer en relación al estudio del tamaño del genoma. Incluso el aspecto más básico de la cuestión, la determinación del tamaño genoma en un amplio rango de especies aún muestra importantes huecos en diversos grupos (Gregory, 2004).

La base de datos de tamaño de genoma animal (Animal Genome Size database: www.genomesize.com) lista 114 tamaños de genoma para el orden Primates, que representan a 70 especies clasificadas en 36 géneros distintos, 12 de los cuales incluyen más de una especie en la base de datos –entre ellos *Cebus* y *Ateles*. Los valores C allí registrados para todo el Orden oscilan entre un mínimo de 2,3 pg para *Callicebus cupreus* (Platyrrhini) y un máximo de 5,26pg para *Tarsius syrichta*

(Haplorrhini), con una media de 3,61pg y una desviación estandar de 0,55.

En el presente trabajo este listado ha sido ampliado a partir de la cuantificación del tamaño del genoma de 13 de las 15 especies muestreadas, pertenecientes a los géneros *Ateles y Cebus*, principalmente, aunque también se incluyen datos de especies pertenecientes a los géneros *Alouatta, Aotus y Saimiri* (Platyrrhini) **(IV: 2.2, Tabla 8)**. De estas 13 estimaciones nuevas, 8 corresponden a especies que nunca habían sido analizadas para tamaño de genoma (*C. cay, C. nigritus, C. xanthosternos, C. libidinosus, A. chamek, Alouatta guariba, S. boliviensis y Aotus azarae*) y para las cuales no existían datos previos en la bibliografía, siendo esta tesis el primer registro. Para las restantes 5 especies (*A. belzebuth, A. geoffroyi, A. paniscus, C. olivaceus, C. albrifrons y Alouatta caraya*), los valores obtenidos difieren de los publicados previamente en la bibliografía (Pellicciari et al., 1982; Manfredi Romanini, 1973, 1972). En la mayoría de los casos se obtuvieron valores menores a los previamente registrados, siendo el caso más llamativo el de *A. belzebuth* **(IV: 2.2, Tabla 8)**.

Una de las posibles razones que pueden explicar las diferencias entre los datos aquí presentados y los anteriores publicados se relaciona con la identificación y asignación taxonómica de los ejemplares. A diferencia de muchos de los trabajos anteriores de estimación del tamaño del genoma, donde no existe registro de las características citogenéticas de los ejemplares utilizados para la estimación del valor C, todos los datos de tamaño de genoma aquí obtenidos y presentados son acompañados con una caracterización citogenética detallada y con conocimiento del fenotipo de cada uno de los individuos, lo que garantiza una adecuada asignación taxonómica de los ejemplares y las variables que los caracterizan. La importancia de destacar este aspecto reside en que existen registros en la base de datos cuya asignación puede ser dudosa. En el caso particular de las especies analizadas en esta tesis existen dos ejemplos a destacar. En primer lugar, el dato correspondiente a *A. paniscus*, que figura con un número de 34 cromosomas. Considerando que el artículo original donde los datos fueron presentados fue publicado antes de la descripción del cariotipo de esta especie (Pieczarka et al., 1989), es dable pensar que es el número cromosómico, más que la asignación taxonómica del ejemplar o la estimación del valor C, el dato erróneo. Por ello, el valor presentado por Manfredi Romanini (1972) y citado en la **tabla 8** (IV: 2.2) fue considerado apropiado a los efectos de las comparaciones genómicas que se discutirán más adelante. En segundo lugar, el dato de *C. apella*, obtenido en una época en la que ese nombre abarcaba más de 11 subespecies, ahora reconocidas como especies plenas diferentes. En ambos casos el error asociado al dato de valor C es indistinguible e inseparable de la incerteza sobre el origen y designación taxonómica de los ejemplares utilizados para

obtener dichos valores, y su propagación resulta inevitable a menos que se realizasen estimaciones que incluyan mayor cantidad de ejemplares por especie, correctamente identificados y caracterizados. Uno de los propósitos iniciales del presente trabajo de tesis se construyó en este sentido, luego formalizado en el primer objetivo propuesto.

Otra de las posibles razones que explicaría las diferencias entre las distintas estimaciones de valor C podría tener que ver con que las técnicas utilizadas para realizar las mediciones fueron diferentes. En este trabajo, como ya se mencionó en *Materiales y Métodos* (III: 2.3) se realizó la estimación del valor C a través de análisis de imagen por densitometría de Feulguen. Esta técnica ha sido criticada pues depende de las condiciones de fijado, hidrólisis y tinción de la muestra, generando variaciones entre distintas estimaciones, –algo que tampoco es ajeno a la técnica de citometría de flujo, la cual se presenta como de mayor precisión pero que depende del estado de condensación de la cromatina y la especificidad AT/GC del fluorocromo usado en la medición-. A pesar de ello, la principal ventaja del análisis de imágenes por densitometría de Feulguen radica en la posibilidad de utilizarlo para muestras de escaso volumen y/o difíciles de conseguir –como las utilizadas en este trabajo de tesis—, puesto que con sólo unas pocas gotas de sangre es posible realizar numerosos frotis. Además, una vez realizado el frotis sanguíneo este puede ser conservado en condiciones ambientales no rigurosas por un tiempo considerable, facilitando el traslado y la manipulación del material biológico a cuantificar.

V: 2.1 Tamaño de genoma y Heterocromatina

V: 2.1.1 Variación del tamaño del genoma y porcentaje de heterocromatina en el cariotipo de las especies de interés

Según los datos actualmente incluidos en la base de datos de valor C (www.genomesize.com), la variación del tamaño del genoma del Orden Primates se distribuye, principalmente, en familias dentro del orden y en géneros dentro de familias (Morand and Ricklefs, 2005). En la presente tesis, el análisis de la variabilidad del tamaño del genoma se enfocó en las especies de *Cebus* y *Ateles,* ambos géneros pertenecientes a diferentes familias dentro de Platyrrhini, por lo que según lo mencionado anteriormente, sería esperable encontrar algunas diferencias entre ambos. Sin embargo, en ambos casos, los valores obtenidos para cada género muestran una media similar y ligeramente menor a la del Orden Primates (3,5pg) y los tamaños de genoma por especie muestran valores cercanos entre sí.

Asimismo, los valores obtenidos para las otras especies de Platyrrhini muestreadas para cuantificación de tamaño de genoma (*Alouatta, Saimiri y Aotus*) –y que pertenecen a las mismas familias que los géneros de interés, Cebidae y Atelidae–, muestran características similares.

Si se consideran los datos obtenidos para el conjunto de especies de interés de la presente tesis, los resultados muestran que entre las especies de *Ateles* existen diferencias significativas en el tamaño del genoma, comprobando la hipótesis propuesta de variabilidad entre las especies. Incluso, según análisis filogenéticos recientes, las especies que muestran menores tamaño de genoma del género –y que además muestran un valor similar–, *A. chamek* y *A. belzebuth*, están más cercanamente emparentadas entre sí que al resto de las especies del género y constituirían uno de los primeros linajes en divergir dentro del género (Morales-Jimenez et al., 2015). Teniendo en cuenta los datos de valor C obtenidos para todas las especies y la hipótesis filogenética del grupo propuesta por Morales-Jimenez et al. 2015 **(Figura 5f)**, la optimización del carácter tamaño de genoma denota una reducción en el nodo que une a *A. chamek* y *A. belzebuth* **(Figura 41)**.Si bien no es una tendencia general para todo el género, es posible advertir que los cambios en el tamaño del genoma entre las especies de *Ateles* analizadas mustran una relación con la divergencia de las especies, al menos en una de las ramas (ver en V: 3).

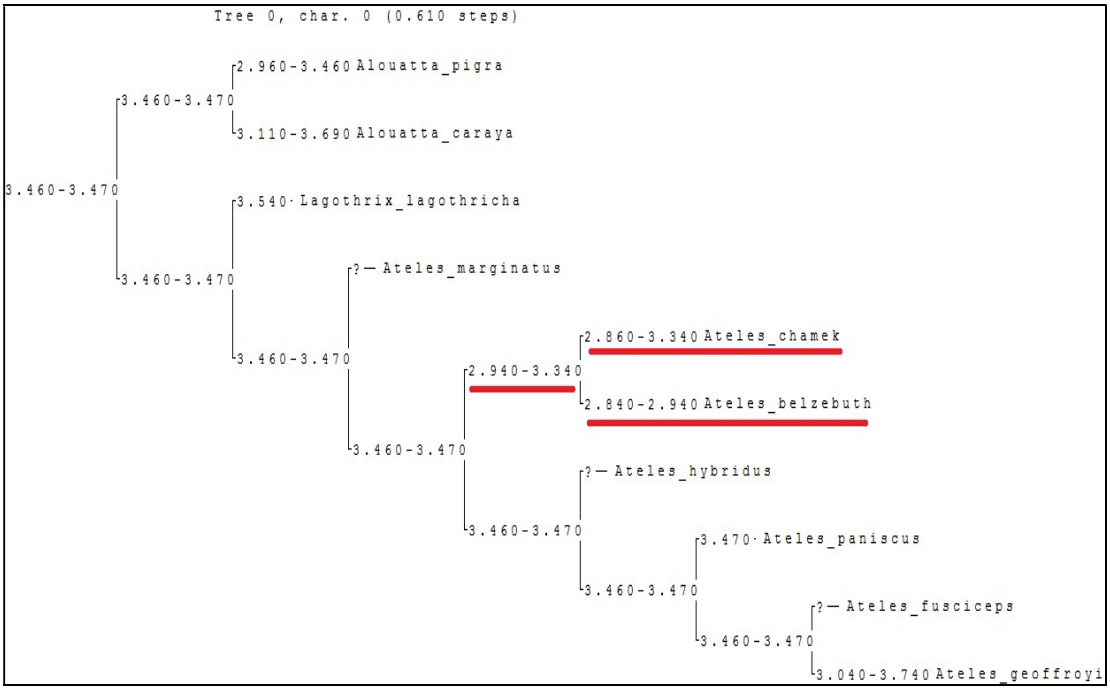

Figura 41. Optimización del carácter cuantitativo "Tamaño de genoma (pg)" para la hipótesis filogenética de Morales-Jimenez et al. (2015) del género *Ateles.*

Figura 41 (continuación página anterior): *El clado señalado en rojo (A. chamek + A. belzebuth) muestra una reducción del tamaño del genoma. Los datos de los terminales corresponden a los obtenidos en este trabajo de tesis, excepto para las especies A. paniscus y Lagothrix lagothricha los cuales fueron obtenidos de www.genomesize.com. Optimización realizada utilizando TNT para caracteres continuos* (Goloboff et al., 2006).

Asimismo, en este género se observa que las especies con menor tamaño de genoma muestran además menor proporción de heterocromatina en su cariotipo, respecto de aquellas especies con mayor tamaño de genoma, como *A. geoffroyi* y *A. paniscus* **(IV: 3.3, Figura 24)**. Sin embargo el análisis estadístico entre tamaño de genoma y porcentaje de heterocromatina resultó no significativo. Aunque es posible notar que para el género *Ateles* se evidencia una tendencia directa entre tamaño del genoma y proporción de heterocromatina, y los datos hallados para el género *Ateles* son consistentes con la segunda hipótesis propuesta, sería necesario agregar más y más precisos datos para que el análisis cuente con la robustez estadística suficiente.

Para las especies del género *Cebus*, en cambio, no se encontraron diferencias significativas en el tamaño del genoma entre las especies, de manera que los datos obtenidos no reflejan la divergencia entre las distintas especies y por lo tanto para este género se rechazó la primera hipótesis. Cabe mencionar que el muestreo desbalanceado de especies –en donde algunas se encuentran subrepresentadas y cuentan tan sólo con 1 ejemplar analizado, y otras están extensamente muestreadas– es un factor más que importante para tener en cuenta a la hora de realizar interpretaciones estadísticas, y que podría oscurecer la variabilidad esperada en el tamaño del genoma entre las distintas especies del género.

Es posible que la ausencia de diferencias significativas del valor C entre especies de *Cebus* se deba a que algunas presentan prácticamente el mismo valor: *C. nigritus*, *C. cay* y *C. olivaceus* (≈3,2 pg). Al respecto, es importante destacar la amplia variabilidad de tamaños de genoma obtenida, contando los diferentes individuos, para la especie *C. cay,* una de las más extensamente muestreadas en el presente trabajo. Durante el desarrollo de este proyecto se obtuvieron muestras de ejemplares de esta especie de distintos sitios **(III: 1, Tabla 1)**, y si bien el origen exacto de muchos ejemplares es desconocido, en función de la institución colaboradora y su ubicación es posible asumir la procedencia más probable de los ejemplares. Así, los ejemplares provenientes del Parque Ecológico "El Puma", en Posadas (Misiones, Argentina), se asumen más probablemente provenientes de la región sureste de Paraguay, los cuales llegan a Argentina por medio del tráfico de fauna; mientras que los ejemplares provenientes de la "Estación de fauna autóctona de Salta" (Salta, Argentina) y los

de la "Reserva Horco Molle" (Tucumán, Argentina) provienen más probablemente de la yunga argentino-boliviana[5]. En un primer análisis del tamaño del genoma de esta especie, el valor obtenido a partir de ejemplares procedentes de "El Puma" fue de 3,40 pg (Fantini et al., 2011). En ese mismo análisis, el tamaño de genoma de *C. nigritus*, también a partir de ejemplares procedentes de "El Puma", fue de 3,04 pg, siendo estos valores significativamente diferentes entre ambas especies. Asimismo, se realizaron comparaciones genómicas entre estas dos especies por medio de CGH y estas diferencias de Valor C fueron localizadas en el cariotipo como regiones cromosómicas de ganancia/pérdida tanto en la heterocromatina como en algunas regiones eucromáticas (Nieves et al., 2010). Con el transcurso del tiempo y el desarrollo de este trabajo de tesis, el muestreo se extendió a otras instituciones, obteniéndose una amplia cantidad de estimaciones individuales de ejemplares procedentes, más probablemente, del noroeste de Argentina. Como consecuencia, el valor C medio de *C. cay* disminuyó considerablemente, acercándose al de otras especies, al mismo tiempo que su variabilidad aumentó notablemente. Y si bien no existe una distinción clara entre ambos grupos a nivel de valor C, los ejemplares procedentes de Paraguay muestran valores homogéneamente más altos (3,40 ± 0,05 pg) que los procedentes de las yungas (3,25 ± 0,26 pg). A su vez, los resultados de valor C presentados en esta tesis para este par de especies pueden considerarse contradictorios[6] con los resultados de CGH presentados por Nieves et al. (2010), por lo que es posible que dentro de esta especie se encuentre una importante variabilidad a nivel genómico que dificulte la estimación del valor C. Esta importante variabilidad en poblaciones de la distribución más austral de *C. cay* también se ha observado a otros niveles al estudiar distintos ejemplares tanto de cautiverios como de colecciones de museo naturales, en abordajes genético-moleculares o de morfometría geométrica (Arístide et al., 2013; Casado et al., 2010; Hassel et al. en preparación), y forma parte de las características que complejizan la distinción e identificación de las especies de *Cebus.*

---

[5] Para algunos ejemplares provenientes de EFA de Salta, la procedencia natural es conocida y coincide con la distribución de la especie en el NOA argentino.

[6] La contradicción podría existir o no, según se considere que los genomas incluyen los mismos elementos en cada especies, o si ambas o alguna de ellas posee elementos especie-específicos, respectivamente. Podría suceder que a pesar de no tener diferencias en el tamaño del genoma posean diferencias en el grado de ganancia/pérdida de secuencias comunes, de manera que estos desbalances se compensen recíprocamente y no se detecten en el tamaño total.

Si se considera ahora el porcentaje del cariotipo correspondiente a heterocromatina en este género en relación a los tamaños de genoma, también es posible advertir una tendencia hacia una relación directa entre las variables analizadas, la cual sólo resulta significativa si no se considera el dato dudoso de *Cebus apella* **(V: 2** y **IV: 2.3, Figura 24).** En conjunto, los datos obtenidos para el género *Cebus* muestran un rango de variación más amplio que *Ateles* tanto en tamaño de genoma como en porcentaje de heterocromatina en el cariotipo. Es posible notar que *C. xanthosternos* presenta no sólo la menor estimación de tamaño de genoma sino que también la menor cantidad de heterocromatina, así como *C. albifrons* muestra las características opuestas **(IV: 2.3, Figura 24)**. A pesar de ello, los datos obtenidos para el género *Cebus* son consistentes con la hipótesis propuesta.

A partir de los datos aquí presentados, entonces, fue posible hallar una variabilidad significativa en el tamaño del genoma de las especies del género *Ateles.* Si bien esta variabilidad muestra un patrón de variación consistente con la proporción de heterocromatina en el cariotipo de cada especie –aquí estimada a partir del porcentaje del área ocupada por heterocromatina en BC–, estas variables no se relacionan entre sí con robustez estadística necesaria como para aceptar la hipótesis propuesta, mas tampoco la contradicen. Para las especies del género *Cebus,* la tendencia observada entre tamaño de genoma y proporción de heterocromatina es ligeramente más acentuada que para las especies de *Ateles,* y significativa. Algo que vale la pena destacar es que tal vez la relación entre tamaño de genoma y proporción de heterocromatina se vea oscurecida por la forma en que estas variables son estimadas. En particular, la proporción de heterocromatina, estimada desde el porcentaje de área correspondiente a bandas C – las cuales son obtenidas a partir de tinción con Giemsa posterior al tratamiento con ácidos y bases-, podrían representar por igual tanto al ADN que conforma la heterocromatina como a una estructura residual proteica que forma parte del *scaffold.* Es posible que aproximaciones más precisas pudieran realizarse con otras metodologías, como por ejemplo citometría de flujo.

Como ya se mencionó en la introducción de este trabajo, la relación entre tamaño de genoma y ADN repetitivo o heterocromatina ya ha sido analizada en primates y en otras especies animales. Un abordaje similar al realizado aquí fue empleado por Pellicciari et al. (1990), en donde se evaluó la relación del tamaño del genoma del humano, el gorila y el chimpancé respecto de la cantidad de heterocromatina, estimada como el área correspondiente a bandas C –como en este trabajo de tesis-, y a la cantidad de ADN C-heterocromático. En dicho trabajo, los autores tampoco encontraron relaciones significativas entre las variables, pero hallaron correlaciones aparentes entre el tamaño del genoma y la cantidad de ADN C-heterocromático, el cual, destacan, no se encontraría

únicamente en las regiones correspondientes a bandas C (Pellicciari et al., 1990). Es posible que una situación similar ocurra en las especies aquí analizadas, en particular de *Cebus*. Al respecto, Nieves (2007), en su análisis de la heterocromatina de *Cebus* mediante FISH con una sonda del bloque heterocromático 11q de *C. cay*, había detectado regiones de homología en los cariotipos de las especies de *Cebus* no correspondiente a bandas C que hibridaban con dicha sonda. Estas regiones podrían corresponderse con lo que Pellicciari y colaboradores identificaron como ADN C-heterocromático.

Resulta casi evidente pensar que el efecto del ADN no codificante en el tamaño del genoma, cualquiera sea este, se manifiesta a través del estado de condensación de la cromatina, cuyo caso extremo es la heterocromatina. Sin embargo, estimar la cantidad, su porción relativa al cariotipo y el grado de condensación de la cromatina es complejo. Una aproximación de este tipo fue realizada por Vinogradov (2005) al analizar los genomas de distintas especies de vertebrados, y bajo un paradigma adaptativo de la variación del tamaño del genoma, propuso que el grado de condensación de la cromatina serviría en el ajuste fino de la función nucleoesqueletal y / o búfer del ADN.

Conclusiones como la antes mencionada son sólo asequibles en estudios que proponen el análisis de gran diversidad de especies, no sólo dos géneros del mismo Orden como en este trabajo. Sin embargo el análisis de las variables aquí analizadas en *Cebus* y *Ateles* es de los primeros enfocados en especies de primates neotropicales con una importante proporción de heterocromatina en el cariotipo, y tal vez sirvan como continuación de un tema que fuera abordado en otras especies.

V: 2.1.2 Variación del tamaño del genoma y composición heterocromática

Así como es posible analizar la variación del tamaño del genoma en relación a la variación cuantitativa de la heterocromatina, también se encuentran relaciones interesantes de abordar a nivel cualitativo. Por ejemplo, existe una correlación positiva altamente significativa entre el tamaño del genoma y el porcentaje de pares GC en los genomas de los vertebrados y mamíferos en particular (Romiguier et al., 2010; Vinogradov, 1998). Se han propuesto diversas explicaciones para esta relación, siendo la más frecuente aquella relacionada con la necesidad de estabilidad física del ADN en los genomas más grandes, compensada a expensas de una mayor proporción de pares GC. Otra explicación para la relación entre tamaño de genoma y contenido GC se relaciona con una de las hipótesis propuestas para explicar la existencia de regiones con gran contenido GC (isocoros) en el genoma de los mamíferos: la conversión génica sesgada a GC (del inglés *GC-biased gene conversión*),

según la cual un sesgo en la maquinaria de reparación resultaría en un favorecimiento de los alelos GC frente a los AT en las regiones con gran incidencia de recombinaciones (Duret and Galtier, 2009).

A la luz de estos antecedentes, aunque no forme parte de las hipótesis aquí evaluadas, resulta interesante iniciar una breve discusión en relación al tamaño del genoma y el contenido GC en las especies de interés de esta tesis. Teniendo en cuenta que las especies de *Cebus* poseen, en proporción al cariotipo, mayor cantidad de heterocromatina que las especies de *Ateles;* y que esta heterocromatina de *Cebus,* a diferencia de *Ateles,* se caracteriza, como se ha discutido ya (V: 1.2), por una composición rica en pares GC, la relación antes planteada entre contenido GC y tamaño del genoma pareciera también insinuarse en este pequeño subconjunto de primates neotropicales. Si bien en el presente trabajo se profundizó la caracterización cualitativa y sólo se presentó una descripción cuantitativa sobre la heterocromatina de *Cebus* y *Ateles*, resulta al menos interesante evaluar la posibilidad de estimar cuantitativamente el contenido GC en el genoma total y en la porción heterocromática para analizar su efecto, o mejor dicho, relación con el tamaño del genoma. Cabe preguntarse cómo se modificaría este escenario incluyendo aún más especies de primates platyrrhinos, incluso aquellos en donde la variabilidad heterocromática no parece ser un factor de incidencia en la divergencia de las especies.

V: 2.2 Localización cromosómica de las diferencias en el tamaño del genoma entre las especies de *Cebus* y *Ateles*

El análisis de las diferencias en el genoma de especies cercanamente emparentadas puede abordarse, al menos, desde dos niveles de análisis —uno cualitativo y otro cuantitativo— ya sea abarcando pequeñas regiones génicas o bien involucrando reorganizaciones y reconstrucciones a gran escala. A partir de análisis inter-específicos utilizando CGH, como el realizado en este trabajo de tesis, las diferencias tanto cualitativas como cuantitativas pueden ser detectadas y diferenciadas entre sí. En su protocolo tradicional, la CGH permite visualizar amplias regiones cromosómicas tanto de tipo especie-específico como de adición/pérdida. Al tratarse de una metodología citogenética posee una resolución comparable al de una banda cromosómica en microscopía óptica. Se ha estimado que en experimentos de CGH tradicional, para que una región cromosómica pueda ser detectada como ganancia respecto a otro genoma debe tener un tamaño de 2 Mb, así como las deleciones más pequeñas que pueden ser detectadas rondan los 3-5 Mb (Siu and Kwong, 1999). A partir de modificaciones posteriores que dieron origen al *array*-CGH la técnica se volvió más precisa y

resolutiva, pudiéndose detectar diferencias en el rango de las 100 kb, aumentando notablemente la resolución de la técnica (Snijders et al., 2001 entre otros).

Las diferencias en el tamaño del genoma entre las especies de *Cebus* y *Ateles* analizadas aquí por CGH se encuentran en el rango previamente mencionado **(Tabla 16)**, por lo que era esperable observar señales de hibridación. La única excepción la constituye el par *C. nigritus-C. olivaceus*, el cual presenta una diferencia de tan sólo 10 Mb, pero en donde cada especie presenta una cantidad de heterocromatina en el cariotipo que se encuentra en extremos opuestos para el género. Es por ello que dicha comparación fue realizada a pesar de no representar el caso que se propuso analizar con la tercera hipótesis.

	ABE	ACH	AGE	APA
ABE	0			
ACH	x	0		
AGE	489.1	285.1	0	
APA	567.2	363.2	x	0

	CNI	CXA	COL
CNI	0		
CXA	376	0	
COL	10	x	0

Tabla 16. Diferencias de valor C expresadas en megabases (Mb) entre las especies de *Ateles* (arriba) y *Cebus* (abajo) analizadas mediante CGH. *Datos obtenidos a partir de los valores C en picogramos presentados en la sección de Resultados de este trabajo (Tabla R8) y la fórmula (I) presentada en la Introducción. Para cada tabla los genomas de mayor valor C se destacan con subrayado. ABE= A. belzebuth; ACH= A. chamek; AGE= A. geoffroyi; APA= A. paniscus; CNI= C. nigritus; CXA= C. xanthosternos; COL= C. olivaceus. X=comparación no realizada.*

Entre las especies de *Ateles* comparadas por CGH el análisis llevado a cabo mostró que las diferencias de tamaño de genoma no sólo son detectables a nivel cromosómico, sino que yacen en distintas regiones del genoma, no sólo regiones heterocromáticas **(IV: 3.3 Figura 26 y 27)**. Entre las especies con menor tamaño de genoma, *Ateles chamek* no mostró poseer regiones de ganancia de ADN al compararlas con las especies de mayor tamaño de genoma, *A. geoffroyi* y *A. paniscus,* mientras que si se detectaron regiones de ganancia en teloméros de *A. belzebuth* al compararlas con *A. geoffroyi.* Debido a que la mala calidad de las metafases de *A. belzebuth*, no fue posible realizar la

comparación con *A. paniscus*, como para determinar si estas regiones serían específicas de *A. belzebuth* o también se encuentran en *A. paniscus.* El análisis de homologías mediante FISH del cariotipo de *A. chamek* no mostró diferencias cualitativas con los cariotipos de *A. belzebuth, A. geoffroyi* o *A. paniscus* (Morescalchi et al., 1997; Oliveira et al., 2005), develando que la diferenciación entre los genomas de estas especies es mayormente cuantitativa. A partir de las comparaciones genómicas realizadas se evidencia que los genomas de menor valor C, como el de *A. chamek,* estarían completamente incluidos y representados en aquéllos de mayor tamaño. Es decir, según los resultados de CGH obtenidos, pareciera que todo elemento perteneciente al genoma de *A. chamek* pertenece, a su vez, al genoma de *A. geoffroyi* y/o *A. paniscus,* aunque con distinto grado de amplificación y distribución en el cariotipo. Mientras que, en los genomas de ambas especies con mayor valor C, se observaron ganancias relativas de ADN en regiones cromosómicas particulares, mayormente heterocromáticas aunque también en regiones eucromáticas, y ninguna pérdida relativa a las especies de menor tamaño de genoma. En relación a las diferencias cariotípicas más conspicuas que distinguen a cada una de las especies, como por ejemplo la fusión 4/12 en *A. paniscus*, sólo se observaron señales en el cromosoma 12 de *A. chamek* **(IV: 3.3 Figura 28)**, las cuales se corresponden a una banda heterocromatina no observable en el cromosoma reordenado en *A. paniscus.* Asimismo, se hallaron diferencias cuantitativas entre las 4 especies de *Ateles* en el cromosoma Y. Este resultado es compatible con la importante diversidad morfológica descrita para este cromosoma en dicho conjunto de especies **(IV: 1.2 Figura 11)** (García et al., 2002; Morescalchi et al., 1997; Herzog et al., 1992; Koiffmann and Saldanha, 1982).

Algo interesante de mencionar es que estos resultados de CGH entre las especies de *Ateles* son perfectamente compatibles con los datos de tamaño de genoma aquí presentados **(IV: 2.2 Tabla 8),** en donde las especies que muestran ganancias relativas de ADN localizadas en distintas partes del cariotipo son también las que poseen mayor tamaño de genoma.

Entre las especies de *Cebus* analizadas por CGH el valor de las diferencias de tamaño de genoma difiere notablemente **(Tabla 16)**. Por un lado, el par *C. nigritus-C. xanthosternos* muestra una diferencia comparable a la observada entre las especies del género *Ateles*, que por su tamaño (≈300 Mb) sería esperable detectar por CGH tradicional. Por otro lado, el par *C. nigritus-C. olivaceus,* con una diferencia de valor C mínima y cercana a los límites de resolución detectable por CGH (≈10 Mb), pero, como ya se mencionó, con notables diferencias en la proporción de heterocromatina. No obstante, el patrón de hibridación observado fue el mismo en ambos pares de comparaciones: no se detectaron señales diferenciales en el complemento cromosómico autosómico, en ninguna de las

especies analizadas (*C. nigritus* versus *C. xanthoternos,* **IV: 3.4 Figura 35 y 37** y *C. nigritus* versus *C. olivaceus,* **IV: 3.4 Figura 36 y 38**). Lo que significa que para el par *C. nigritus- C. xanthosternos* las diferencias de tamaño de genoma –si bien no significativas– no se detectan citogenéticamente, como ocurre entre las especies de *Ateles* y entre otras especies de *Cebus* (Fantini et al., 2011; Nieves et al., 2010), por lo que no es posible con este abordaje testear la hipótesis propuesta. Al respecto, es importante mencionar que las especies aquí tratadas, *C. nigritus* y *C. xanthosternos*, presentan cariotipos con un alto grado de homología y con características citogenéticas muy similares **(IV: 1.2 Figura 10 y 14)**. Es posible que las diferencias de valor C entre estas especies se encuentren disperdigadas en el genoma de manera tal que al analizar el cariotipo luego de CGH, por la resolución de la técnica empleada, no sea posible detectarlas a nivel cromosómico. En ese caso, para refinar el análisis sería necesario llevar a cabo experimentos que permitan mayor resolución, como un *array-CGH* por ejemplo. Sin embargo, además de su alto costo, para realizar esta técnica es preciso contar con la secuencia genómica de las especies, algo que aún no se encuentra disponible. Por lo pronto, con el abordaje citogenético-molecular aquí empleado, no es posible aceptar o rechazar la tercera hipótesis propuesta.

En las comparaciones entre genomas de las especies de *Cebus,* la única señal de hibridación que se destacó, como excepción a lo expuesto anteriormente, corresponde a la del cromosoma Y. Así como ocurrió en la comparación de las especies del género *Ateles,* se hallaron diferencias cuantitativas en este cromosoma entre *C. nigritus* y *C. olivaceus*. En particular, se observa que *C. nigritus* tiene mayor cantidad de ADN en ese cromosoma respecto de *C. olivaceus.* Estos resultados concuerdan con la amplia divergencia entre estas especies (Nascimento et al., 2015; Lynch Alfaro et al., 2012), pero a nivel general citogenético, es decir, en el resto del cariotipo, no se observa una diferenciación tal como la vista en las especies de *Ateles.*

En conjunto, los resultados de CGH aquí presentados no sólo apoyan ideas previas acerca de la relación entre tamaño de genoma y heterocromatina, sino que también se suman a la caracterización cuantitativa de cada una de las especies, al menos comparativamente. Tradicionalmente, los cambios cromosómicos han sido considerados en una de dos categorías: aquellos que afectan la morfología de los cromosomas o estructurales (inversiones, traslocaciones, fusiones, deleciones y duplicaciones, amplificación y reducción de segmentos heterocromáticos); y los numéricos, aquellos que afectan la cantidad de cromosomas. Esta caracterización deja afuera los cambios cuantitativos del genoma, como los presentados para algunas especies en este trabajo, que no modifican ni el número ni la morfología de los cromosomas pero que, al fin, constituyen cambios de potencial importancia evolutiva. De esta

forma cobra importancia el enfoque "cruzado" genómico-citogenético, el cual permite refinar las comparaciones entre especies en la discusión del proceso de su divergencia.

Algunas de las regiones identificadas mediante CGH evidencian, además, que ambos tipos de diferencias, cuantitativas y cualitativas, podrían coincidir físicamente. Por ejemplo, entre las especies de *Ateles*, el par 6, que presenta diferentes variantes cromosómicas y proporción de heterocromatina en cada especie, o el par 12, involucrado en una fusión cromosómica en el cariotipo de *A. paniscus*, ambos presentan una cantidad de ADN diferencial en la mayoría de las comparaciones realizadas. Al realizar comparaciones genómicas entre especies de Aves se ha sugerido que las duplicaciones segmentales facilitarían los reordenamientos cromosómicos, y se ha visto que estas duplicaciones correlacionan con la variación del número de copias de una determinada secuencia y/o región cromosómica (Griffin et al., 2008). Una posible explicación para estas diferencias, si bien hipotética, podría relacionarse con la actividad de los elementos transponibles. Al estar involucrados en la estructura de los cromosomas, la expansión de estos elementos en un linaje específico podría dar cuenta de los reordenamientos genómicos que caracterizan a cada especie (Böhne et al., 2008; Kidwell and Lisch, 2002). La expansión diferencial de estas regiones, compuestas mayoritariamente de secuencias repetitivas, es congruente con la hipótesis *de biblioteca (library hipothesis),* según la cual las secuencias repetitivas presentes en un determinado grupo de especies con cierto grado de parentesco ya estarían presentes en un ancestro en común (Gosálvez et al., 2010; Fry and Salser, 1977). Las secuencias constituyentes de la heterocromatina, que habrían aumentado sus copias en las especies de mayor tamaño de genoma, aparecerían primero conformando un *pool* de bajo número de copias que luego se iría diversificando, en paralelo con la divergencia de especies en el género **(Figura 42)**.

La asociación entre la posible expansión en un linaje de las secuencias que conforman la heterocromatina y la variación del tamaño de genoma en estas especies es, en principio, compatible con cualquiera de las teorías que intentan explicar la variación del tamaño del genoma mencionadas en la Introducción (I: 1.5). Aunque cabe destacar que aquéllas teorías han sido propuestas para un rango de especies mayor, más que para un conjunto reducido como el aquí tratado. Además, en ellas se consideran factores aquí no tenidos en cuenta, como el volumen celular y nuclear, el tamaño efectivo de las poblaciones o la incidencia y tipo de selección natural operante (si la hubiera). Así y todo, la no detección de pérdidas de ADN (deleciones) y la localización de ganancias (inserciones) en distintas regiones del cariotipo de las especies de *Ateles* con mayor tamaño de genoma es compatible con la propuesta de Petrov (2002) (En este trabajo en I: 1.5.3), según la cual se produciría un equilibrio de mutación entre las pequeñas deleciones y la ocurrencia de inserciones. Un análisis más detallado, a nivel

molecular, sobre las regiones del genoma identificadas por CGH en las especies de *Ateles* respondería, tal vez, estas y otras cuestiones. Con estos resultados, en este trabajo se ha mostrado que algunas especies en particular resultan interesantes para analizar regiones eucromáticas y heterocromáticas en relación a la evolución del genoma, en particular su tamaño.

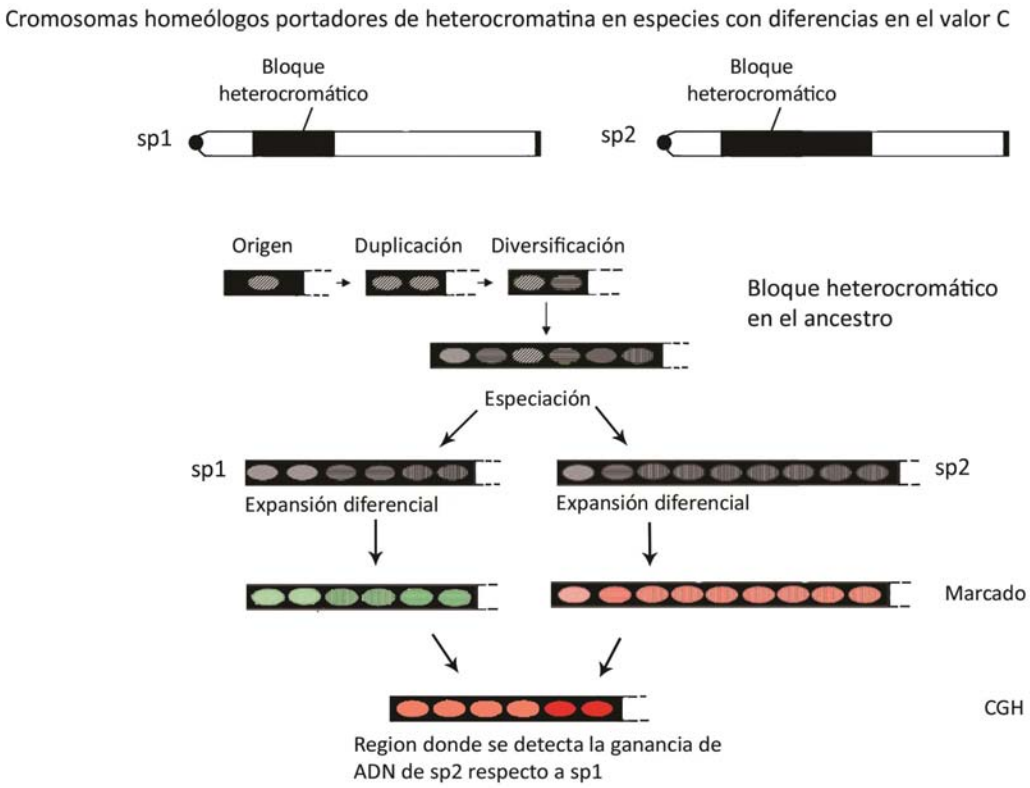

Figura 42. Explicación compatible con la observación de regiones heterocromáticas con diferencias de ADN. *Posible origen y diversificación en cada linaje de una secuencia repetitiva componente de la heterocromatina. Cada óvalo representaría una unidad de copia, que se amplifica específicamente en un linaje pero con ligeras variaciones respecto del ancestro común (Modificado de Gosálvez et al., 2010).*

V: 2.2.1 Diferencias cuantitativas en regiones eucromáticas autosómicas

En los experimentos de CGH realizados en este trabajo de tesis, determinadas señales de hibridación destacan regiones eucromáticas involucradas en los cambios del tamaño del genoma, lo que indica que la diferencia de valor C entre especies cercanamente emparentadas no se trata únicamente de la ganancia o pérdida de heterocromatina. Se hallaron diferencias cuantitativas en regiones eucromáticas particulares: en los cromosomas Y de *Cebus* y *Ateles*; en la región del organizador nucleolar de *Ateles;* en los cromosomas 5, 8, 9 y 16 de *A. paniscus,* en los telómero de los cromosomas 7 y 8 de *A. belzebuth,* y en los cromosomas 1 y 13 de *A. chamek.* Específicamente, *A. paniscus* se destaca por tratarse de una especie con una acumulación de autapomorfías cromosómicas que tienen su correlato en la variación del tamaño del genoma. A su vez, teniendo en cuenta que los cariotipos de *Ateles* presentan un mayor cambio frente al cariotipo ancestral de Platyrrhini, pareciera que esta gran variabilidad a nivel cariotípico se ve reflejada en el tamaño del genoma y en el grado de amplificación de determinadas regiones genómicas.

Las regiones identificadas en el cariotipo de *Ateles chamek* corresponden, ambas, a ganancias relativas de ADN de las especies con mayor tamaño de genoma. En particular, *A. paniscus* muestra un exceso de ADN localizable en todo el cromosoma 13 de *A. chamek.* Este cromosoma presenta homología con los cromosomas humanos 10 y 2, constituyendo una sintenia muy conservada entre las especies de *Ateles* **(IV: 1.3 Figura 19)**. En el cariotipo humano dicha región comprende más de 3500 genes, un número al menos complejo de abordar en la discusión de este trabajo. Sin embargo, la técnica de CGH ha permitido destacar esta región, que podría señalar una tendencia cromosómica individual de importancia evolutiva.

Por su parte, *Ateles geoffroyi* posee un exceso relativo de ADN en una pequeña banda intersticial en el cromosoma 1 de *A. chamek,* en una posición con posible homología con el cromosoma 18 humano **(IV: 1.3 Figura 19)** o con la banda heterocromática de *A. geoffroyi* en el cromosoma 1 **(IV: 1.2 Figura 14).** A partir de esto último, es posible que dicha región identificada por CGH constituya una posible región heterocromática incipiente –o aún no detectable por bandas C– en *A. chamek*, que es revelada sólo al hibridar con un conjunto de sondas en donde se halla enriquecida la porción heterocromática. Se trataría, entonces, de una situación similar a la detectada previamente por Nieves (2011) para la heterocromatina de *Cebus,* o por Pellicciari et al. (1990) para el ADN C-heterocromático de simios y humanos.

Algunas de las regiones eucromáticas involucradas en la variación del tamaño del genoma –como por ejemplo los pares 8 y 9 de *Ateles paniscus*– también parecen ser genéticamente inestables. En

un estudio preliminar utilizando la técnica de intercambio de cromátidas hermanas (más conocida por su sigla, ICH) *A. paniscus* mostró intercambios en dichas regiones (M. Nieves comunicación personal). La coincidencia de las mismas regiones asociadas tanto a inestabilidad cromosómica como a diferencias cuantitativas no pareciera ser casual. Con el fin de profundizar esta caracterización podría plantearse a futuro análisis que aborden las diferencias particularmente, sobre todo las que corresponden a porciones eucromáticas del cariotipo. Una primera aproximación podría considerarse a partir de RDA (del inglés: *Representational Difference Analysis*), en donde a partir de comparar dos muestras genómicas se amplifican por PCR las regiones diferenciales en ellas (Lisitsyn, 1995).

Registros similares al aquí presentado, donde se identifican diferencias cuantitativas en regiones eucromáticas, han sido obtenidos en análisis genómico comparativos entre otras especies, aunque son escasos. Uno de los ejemplos más relevantes a los efectos de la presente tesis es la comparación entre los genomas de *Cebus nigritus* y *C. cay* (Nieves et al., 2010). Según los resultados de ese trabajo las diferencias de ADN involucran regiones genómicas diferentes, siendo preferencialmente de tipo repetitivo en *C. cay* y codificante o repetitivo disperso en *C. nigritus.*

Otro ejemplo de comparación genómica en donde fueron halladas diferencias cuantitativas en regiones eucromáticas lo constituye la comparación entre el genoma del perro (*Canis lupus)* y el perezoso de dos dedos de Linnaeus (*Chloepus didactylus*) sobre los cromosomas del pangolín taiwanés (*Manis pentadactyla pentadactyla*) (Yu et al., 2012). Sin embargo, como el estudio abarca especies tan distantes al pangolín, pertenecientes incluso a distintos órdenes de mamíferos (Carnívora y Xenarthra), es preciso reforzarlo y/o ratificarlo con especies más cercanas de Pholidota y Xenartrha.

La unicidad genética de una especie es un factor de gran importancia en la comprensión y determinación de la misma, y tanto diferencias en unos pocos genes como reordenamientos genómicos mayores podrían ser responsables del establecimiento de barreras reproductivas entre especies cercanamente emparentadas. Los resultados aquí expuestos demuestran que las diferencias genómicas entre las especies existen, al menos, en una dimensión cuantitativa, asociadas a regiones particulares del cariotipo.

V: 2.2.2 Diferencias cuantitativas en el cromosoma Y

El cromosoma Y es tal vez uno de los más peculiares en el cariotipo de los mamíferos, ya que constituye una gran porción de ADN sin recombinación homóloga, los pocos genes que contiene permanecen en estado de hemicigosis y es transmitido únicamente a través de los machos

(Charlesworth, 2003). A partir de los resultados de CGH en las comparaciones entre especies de *Cebus* y *Ateles* fue posible identificar diferencias cuantitativas en este cromosoma.

Para el caso de las especies de *Ateles* este hallazgo no resulta sorprendente pues las diferencias de morfología y tamaño del cromosoma sexual Y ya habían sido registradas desde las primeras caracterizaciones realizadas por citogenética clásica (García et al., 2002; Morescalchi et al., 1997; Herzog et al., 1992; Koiffmann and Saldanha, 1982). A pesar de ello, cabía la posibilidad de que los cromosomas Y de cada una de las especies tuviera secuencias de tipo especie-específica, cuya existencia no podría ser develada con aquellas técnicas. A su vez, la posibilidad de indagar la homología entre cromosomas Y por medio de FISH se encontraba restringida a la capacidad de generar una sonda específica, cuestión no siempre sencilla y/o asequible. Sin embargo, por medio de CGH, si bien tampoco una técnica sencilla, es posible detectar tendencias y/o cambios específicos en un cromosoma o región en particular, por lo que la comparación entre genomas de machos de distintas especies de cada género se presentaba como la posibilidad de resolver ambas cuestiones –diferencias de tamaño de genoma y diferencias morfológicas en el cromosoma Y– en un solo experimento.

Así, fue posible detectar que las especies con tamaño de genoma mayor Ateles *paniscus* y A. *geoffroyi,* no sólo presentan ganancias de ADN en regiones autosómicas sino que además, al compararlas con el genoma de *A. chamek,* se observan regiones de ganancia específica en cada uno en los respectivos cromosomas Y **(IV: 3.3 Figura 26)**. Como las señales de hibridación en dichas comparaciones se presentan únicamente en los cromosomas Y de *A. paniscus* y *A. geoffroyi* es posible concebir, al menos, que esas regiones no están presentes en *A. chamek* –caso contrario en las metafases de *A. chamek* también se observarían señales rojas en el cromosoma Y **(IV: 3.3 Figura 26)–.** Pero las señales de hibridación obtenidas no confirman que estas regiones sean iguales entre *A. paniscus* y *A. geoffroyi* , o que sean específicas de cada una de las especies. En este aspecto, es importante recordar que las diferencias identificadas por CGH son relativas al par de especies comparado, y nada puede decirse respecto a una tercera especie sin realizar previamente la comparación pareada.

Por el contrario, al realizar la comparación de *Ateles paniscus* y *A. geoffroyi* con el genoma de *A. belzebuth* se obtuvo un patrón prácticamente inverso, en donde es *A. belzebuth* –la especie con menor tamaño de genoma– quien muestra importantes señales de ganancia de ADN en el cromosoma Y respecto a ambas especies de mayor valor C **(IV: 3.3 Figura 27, flechas).** A partir de estos resultados, entonces, es posible deducir que existen regiones comunes de homología entre los

cromosomas Y de *A. belzebuth*, *A. geoffroyi y A. paniscus.* A su vez, existirían regiones especie-específicas en el cromosoma Y de *A. paniscus*, reveladas a partir de las señales de hibridación obtenidas en la comparación con *A. chamek* ya mencionada **(IV: 3.3 Figura 26, flecha)** y las señales de hibridación verdes obtenidas en la comparación con *A. belzebuth* **(IV: 3.3 Figura 27c, flecha).** En cuanto al cromosoma Y de *A. chamek,* lo más probable es que la ausencia de señales de hibridación se deba a la inexistencia de diferencias cuantitativas en dicho cromosoma.

En las comparaciones entre las especies de *Cebus,* también se obtuvieron señales que destacan diferencias cuantitativas en el cromosoma Y. De hecho, estas señales fueron las únicas que se detectaron entre las especies comparadas, en particular *C. nigritus* y *C. olivaceus.* Cabe destacar que cada una de estas especies correspondería a uno de los dos subgrupos que se reconocen dentro del grupo completo de monos capuchinos: los gráciles ("sin copete") y los robustos ("con copete"), cuya divergencia ha sido estimada en 5,2 Ma (Jameson Kiesling et al., 2015) o en 6,7 Ma (Lynch Alfaro et al., 2012). Más allá de la diferencia en las estimaciones, es claro que existe un grado de divergencia notable entre estas especies. A nivel citogenético esa divergencia pareciera evidenciarse solamente en la composición del cromosoma Y, donde C. *nigritus* muestra regiones de ganancia relativa de ADN que no se hallan en el cromosoma Y de *C. olivaceus* **(IV: 3.4 Figura 38).** Estas regiones de ganancia no se revelarían como diferencia cuantitativa al realizar la comparación con *C. xanthosternos* **(IV: 3.4 Figura 35 y 37)** o con *C. cay* (Fantini et al., 2011; Nieves et al., 2010), todas especies correspondientes al grupo robusto de los monos capuchinos.

Dada la, prácticamente, ausencia de recombinación homóloga en el cromosoma Y, la tasa de evolución de las secuencias ubicadas en este cromosoma es generalmente mayor que la de los autosomas (Charlesworth, 2003). La ausencia de recombinación facilitaría, entonces, este proceso de expansión o contracción diferencial de ADN según el linaje. Así como previamente se explicaron las diferencias ubicadas en las regiones heterocromáticas, es posible explicar esta diferenciación en el cromosoma Y, ahora teniendo en cuenta que este proceso sucede a una tasa evolutiva mayor. Un caso similar a este ya había sido registrado para la comparación genómica del caballo y el burro, cuya descendencia, además, suele ser estéril (Gosálvez et al., 2010). En este sentido, los casos de híbridos interespecíficos en primates son escasos (Fantini et al., 2011; Moore et al., 1999; Coimbra-Filho and Pissinatti, 1993; Moore et al., 1990; Pellicciari et al., 1988; y otros citados allí). Los híbridos registrados entre especies de *Cebus* han sido sólo de hembras no estériles, y entre especies del género *Alouatta* (Platyrrhini: Atelidae), los híbridos detectados son siempre hembras (Cortés-Ortiz et al., 2007). Cabe preguntarse, entonces, cómo influyen estas secuencias de extensión diferencial en el

cromosoma Y en la reproducción de los individuos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que las especies de *Ateles* y las de *Cebus* aún comparten ciertas secuencias de ADN en el cromosoma Y, mientras que el grado de extensión de algunas de estas secuencias varía según cada especie y conforman otro aspecto que las distingue cuantitativa y genómicamente.

V: 3 DIVERGENCIA DE ESPECIES EN *CEBUS* Y *ATELES*

V: 3.1 Respecto de citogenética molecular, heterocromatina y tamaño del genoma

Como se mencionó en la Introducción, algunas características citogenéticas de los primates neotropicales nos han permitido asociar géneros que muestran patrones comunes. Entre ellos se encuentran *Cebus* y *Ateles,* dos de los géneros con mayor proporción de heterocromatina y en los que las inversiones paracéntricas y pericéntricas constituyen los cambios distintivos.

Si se consideran el cariotipo ancestral de los primates neotropicales y el de las especies existentes (Müller, 2006; Sineo y Stanyon, 2006) , el número de reordenamientos cromosómicos entre ellos varía ampliamente desde ninguno en *Cebus capucinus* (Richard et al., 1996) hasta más de 20 en *Callicebus lugens* (Stanyon et al., 2003). Sin embargo la dirección de cambio citogenético no parece seguir una tendencia continua y clara en ninguno de los linajes de primates neotropicales (Oliveira et al., 2012).

A lo largo de este trabajo se ha abordado el análisis de tamaño de genoma y citogenético comparativo entre especies y, en paralelo, se han ido contemplando los mismos enfoques en uno y otro género. *Cebus* (Platyrrhini, Cebidae)*,* es considerado el género con el cariotipo más ancestral entre los Platyrrhini, mientras que *Ateles* (Platyrrhini, Atelidae)*,* presenta un cariotipo altamente derivado (García et al., 2002). Los resultados de esta tesis muestran que existen diferencias cuantitativas entre las especies de *Ateles* y éstas se localizan en regiones heterocromáticas y eucromáticas, mientras que entre las especies de *Cebus* aquí analizadas la variabilidad en tamaño del genoma no es significativa y no se detecta citogenéticamente más que en el cromosoma Y. Sin embargo, en las especies de *Cebus* la variabilidad de tamaño de genoma se relaciona con la proporción de heterocromatina en el cariotipo, por lo que es posible que la diferenciación cuantitativa se encuentre dentro de ese nivel. En este sentido, la cuantificación precisa de la porción heterocromática de estos genomas podría dar una respuesta. Es posible que en *Cebus,* al poseer cariotipos conservados y homólogos entre sí –que además parecieran no tener diferencias

cuantitativas en valor C–, las mismas porciones del genoma se modularían complementariamente entre heterocromatina y eucromatina, dando como consecuencia la ausencia de diferencias en el tamaño total del genoma entre especies. Entre los genomas de *Ateles*, en cambio, fue posible identificar regiones de ganancia de ADN entre especies, en la porción heterocromática y eucromática de los cariotipos, pero la modulación entre ambos tipos de porciones parecería no estar compensada, y consecuentemente resultaría en diferencias de valor C notables citogenéticamente. Otras características aquí abordadas, como por ejemplo la descripción de la composición de las regiones heterocromáticas a través de bandas DAPI-CMA3, también parecen evidenciar las diferencias en la dinámica y organización de los genomas entre ambos géneros, los cuales parecen tener, sin embargo, respuestas genómicas que redundan en un mismo resultado: la presencia notable de regiones heterocromáticas en el cariotipo.

V: 3.2 Respecto de la biogeografía histórica

En la comprensión del proceso de divergencia de un grupo de especies, la historia biogeográfica tiene una importancia crucial. Se ha propuesto que la especiación y consecuente distribución geográfica de las especies neotropicales, entre ellas los primates, son el resultado de diversos mecanismos que parecen haber sido especialmente activos durante el Pleistoceno (Haffer, 2008, 1979; Bush and Oliveira, 2006; y otros allí citados). En la Introducción de este trabajo (I: 3.4) se mencionaron algunas de las hipótesis propuestas para cada uno de los géneros aquí en estudio. Sin embargo, las hipótesis más recientes propuestas para *Cebus* y *Ateles*, indican que las divisiones a nivel de especies dentro de cada género tuvieron lugar a finales del Plioceno, lo que sugiere que la diversidad moderna en monos araña y capuchinos no puede explicarse principal y únicamente por aislamiento y divergencia de las poblaciones en refugios forestales durante el Pleistoceno (Morales-Jimenez et al., 2015; Nascimento et al., 2015; Lynch Alfaro et al., 2012). Entre los aspectos novedosos de estas hipótesis se destaca, además, el planteo de un relato biogeográfico, que explica no sólo el patrón actual de distribución sino también las relaciones entre especies. En este contexto, resulta interesante discutir dichas explicaciones con los resultados aquí obtenidos:

Según una de las hipótesis compatibles con los análisis filogenéticos de Morales-Jimenez y colaboradores (2015), el género *Ateles* se habría originado en la cuenca amazónica del sur hace aproximadamente 6,7 Ma **(Figura 43)**. Luego, las poblaciones iniciales se habrían expandido hacia el

este desde el sur amazónico a la parte oriental de la Amazonia, donde actualmente se encuentra *A. marginatus*, y hacia el oeste de Brasil dando lugar (≈4,5 Ma) al ancestro común de *A. chamek* y *A. belzebuth.* Otras poblaciones se habrían ampliado hacia el norte y oeste a través de las tierras bajas de la Amazonía occidental en la actual Venezuela y el norte de Colombia antes de la elevación final de los Andes (≈4,0 Ma), dando lugar al ancestro común de *A. hybridus*, las formas trans- andinas (*A. fusciceps* y *A. geoffroyi*) y *A. paniscus*. A partir de ahí, los monos araña se habrían expandido hacia el este hasta las Guayanas y el noreste de Brasil, al norte de la desembocadura del río Amazonas, dando lugar a *A. paniscus* (≈3,5 Ma). En cuanto al tamaño del genoma y el cambio en los cariotipos, si bien en el presente trabajo no se han caracterizado todas las especies, los resultados obtenidos se muestran en concordancia con la mencionada hipótesis, en donde se observa un patrón de divergencia de especies acorde a los tamaños de genoma presentados. Las especies de menor tamaño de genoma, *A. belzebuth* y *A. chamek*, son, luego de la divergencia de *A. marginatus*, las más basales y forman un linaje hermano, que además presentan, cada una, notables diferencias de valor C localizadas citogenéticamente respecto de las especies con mayor valor C, *A. geoffroyi* y *A. paniscus.* Estas últimas, más derivadas, muestran ganancias relativas de ADN localizadas en regiones particulares y comunes con las especies basales de menor valor C. Teniendo en cuenta que en el presente trabajo también se cuantificó el tamaño de genoma de otras especies de Platyrrhini cercanas a *Ateles*, como por ejemplo las del género *Alouatta* **(IV: 2.2 Tabla 8)**, es posible postular al menos un evento de reducción del tamaño del genoma en el nodo ancestral que une a *Ateles chamek* y *A. belzebuth* **(Figura 41)**. Según este escenario esta reducción del tamaño de genoma en *Ateles,* habría ocurrido hace aproximadamente 4,5 Ma, luego de la divergencia del ancestro común de *A. belzebuth* y *A. chamek*. Respecto de la proporción de heterocromatina se esperaría un patrón similar al ya obtenido, con mayor preponderancia en las especies más derivadas. Nuevos datos de valor C del resto de las especies de *Ateles* aún sin cuantificar, así como un análisis citogenético completo (aún pendiente), colaborarían en el esclarecimiento de este escenario.

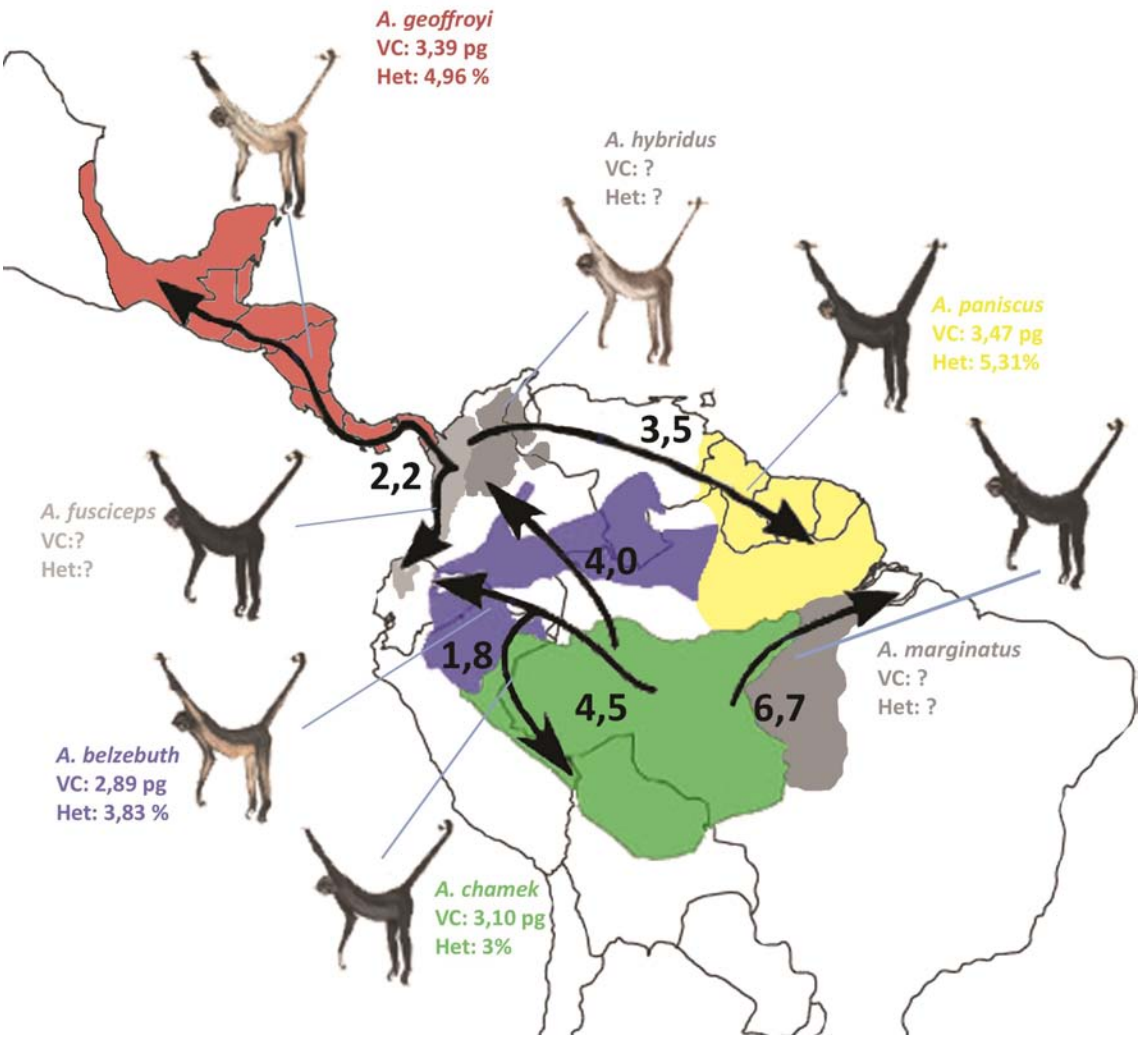

Figura 43. Hipótesis biogeográfica propuesta por Morales-Jimenez y colaboradores (2015) **para las especies de *Ateles.*** *Para cada especie se muestra su distribución geográfica actual, junto con los datos de valor C y proporción de heterocromatina (en colores sólo se muestran las muestreadas en el presente trabajo). Las flechas representan el movimiento de las poblaciones ancestrales, y los números indican el tiempo en millones de años.*

En *Cebus,* bajo el modelo propuesto por Lynch Alfaro y colaboradores (2012), luego de una divergencia basal entre los monos gráciles amazónicos y los robustos de la selva atlántica hace 6 Ma en la región amazónica occidental, se habría restablecido una distribución en simpatría de las especies de ambos grupos al producirse la expansión de los monos robustos hacia la región amazónica a través del Cerrado **(Figura 44)**. Una explicación alternativa a partir de un re-análisis de

los mismos datos e incluyendo nuevas especies, en cambio, propone un origen para el género entero en el sur de la selva atlántica (Nascimento et al., 2015). Según estos autores, *xanthosternos* representaría en la actualidad un remanente del taxón basal más ampliamente distribuido. Considerando ambas hipótesis, es posible que el aumento del tamaño de genoma haya ocurrido principalmente en el linaje grácil, con *C. albifrons* como el principal exponente entre las especies aquí analizadas; mientras que las especies robustas de la selva atlántica habrían mantenido un tamaño del genoma relativamente estable. La aparición de la heterocromatina en el cariotipo sería anterior a la divergencia de estos dos grandes linajes, teniendo en cuenta las similitudes ampliamente destacadas en el presente trabajo, y habría tenido una ampliación diferencial en las distintas especies, siendo más preponderante también en las especies gráciles.

En conjunto, es posible reconocer en las hipótesis antes mencionadas, tanto para el género *Cebus* como para *Ateles,* un cambio en el origen, pero sobre todo en la dirección de dispersión de las especies propuesta –de sur a norte, en vez de norte a sur- (Morales-Jimenez et al., 2015; Nascimento et al., 2015; Lynch Alfaro et al., 2012), la cual en muchos trabajos anteriores se asumía mas no se testeaba directamente (Nieves, 2007; Collins and Dubach, 2000b; Medeiros et al., 1997; entre otros). Si bien en la última década se ha producido una explosión en la cantidad de trabajos de investigación con enfoques genéticos aplicados a estudios evolutivos, es aceptado que desde una única disciplina sólo será posible ofrecer explicaciones parciales sobre procesos complejos como el de la diversificación evolutiva. En particular en primates platirrinos, si bien la información brindada tanto por la citogenética como por la genética molecular ha permitido interpretaciones más ajustadas y la contrastación de hipótesis más complejas en estudios evolutivos (por ejemplo respecto a la conservación genómica, el esclarecimiento taxonómico o estudios filogenéticos y biogeográficos), aún quedan cuestiones que atender.

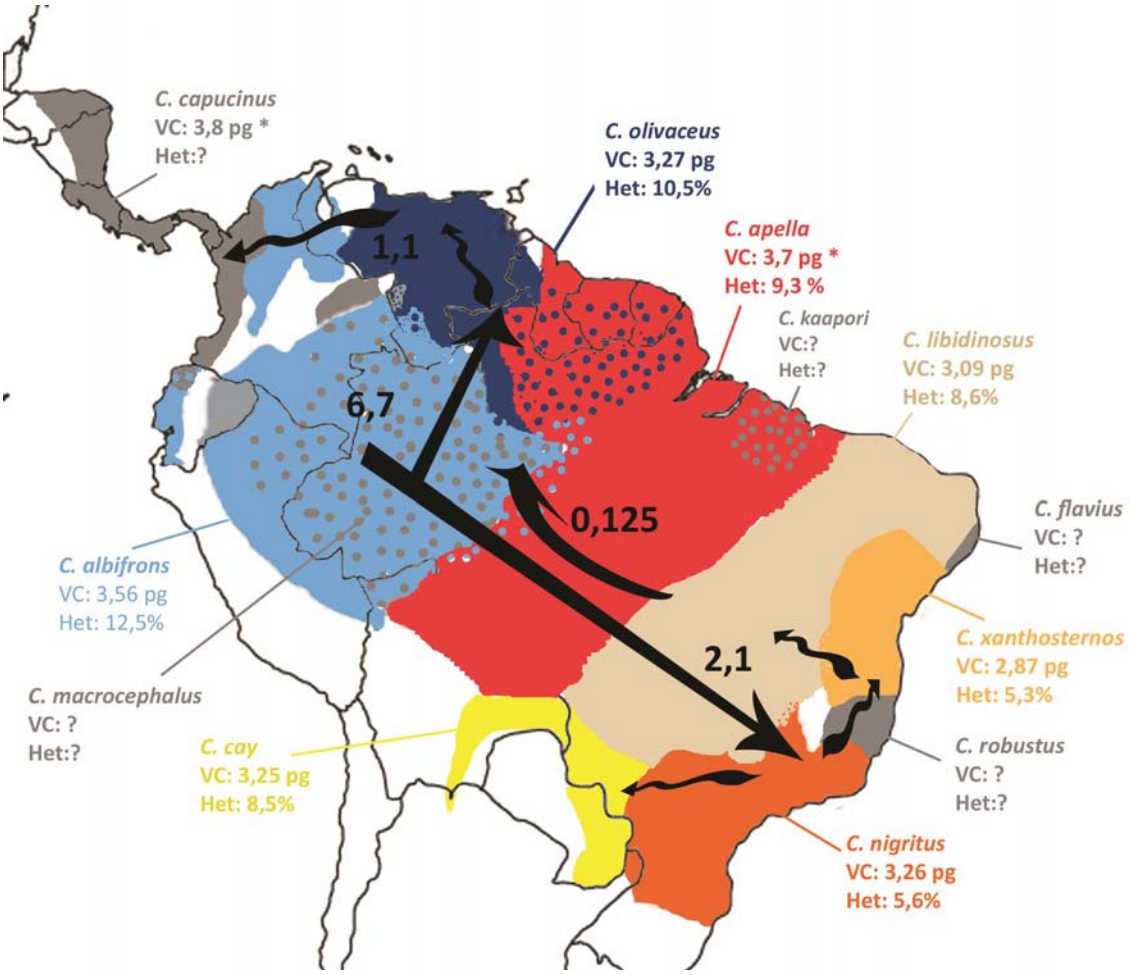

Figura 44. Hipótesis biogeográfica propuesta por Lynch-Alfaro y colaboradores (2012) **para las especies de *Cebus*.** *Para cada especie se muestra su distribución actual, junto con los datos de valor C y proporción de heterocromatina (en colores sólo se muestran las muestreadas en el presente trabajo. Las zonas punteadas corresponden a áreas de simpatría). Las flechas representan el movimiento de las poblaciones ancestrales, y los números indican el tiempo en millones de años. (*): www.genomesize.com.*

V: 4 CONCLUSIONES FINALES

- Existen diferencias entre los tamaños del genoma de las especies analizadas. Entre las especies de *Ateles* estas diferencias son significativas.

- La variabilidad del tamaño del genoma correlaciona con la proporción de heterocromatina en el cariotipo en las especies de *Cebus.*

- Las diferencias en el tamaño del genoma entre las especies de *Ateles* son detectables citogenéticamente y se ubican en regiones heterocromáticas, principalmente, aunque también en regiones eucromáticas.

- Los genomas de menor valor C de *Ateles* estarían completamente incluidos en los genomas de mayor valor C. Las regiones de ganancia de ADN detectadas en las especies de mayor valor C corresponderían a amplificaciones o repeticiones del mismo tipo de secuencias, y no a secuencias especie-específicas.

- Los cariotipos de *Ateles* son completamente homólogos entre sí, con una composición heterocromática similar, rica en pares AT. Además de número y morfología cromosómica, los cariotipos de las especies de *Ateles* son distinguibles también por diferencias cuantitativas reveladas por CGH.

- Los cariotipos de las especies de *Cebus* también presentan un alto grado de homología entre sí, así como una composición heterocromática similar rica en pares GC, independientemente del subgrupo al que la especie corresponda.

- Las diferencias cuantitativas entre las especies de *Cebus* analizadas se hallaron en el cromosoma Y.

- Los hallazgos citogenéticos y los datos genómicos presentados podrían estar indicando que el proceso especiogénico se modula complementariamente entre regiones de eucromatina y heterocromatina, pero compensado de distinta manera según el género considerado.

Bibliografía

Amaral, P., Finotelo, L., De Oliveira, E., Pissinatti, A., Nagamachi, C., Pieczarka, J., 2008. Phylogenetic studies of the genus *Cebus* (Cebidae-Primates) using chromosome painting and G-banding. BMC Evol. Biol. 8, 169.

Arístide, L., Rosenberger, A.L., Tejedor, M.F., Perez, S.I., 2015. Modeling lineage and phenotypic diversification in the New World monkey (Platyrrhini, Primates) radiation. Mol. Phylogenet. Evol. 82 Pt B, 375–385.

Arístide, L., Soto, I.M., Mudry, M.D., Nieves, M., 2013. Intra and Interspecific Variation in Cranial Morphology on the Southernmost Distributed *Cebus* (Platyrrhini, Primates) Species. J. Mamm. Evol. 1–7.

Avramova, Z.V., 2002. Heterochromatin in Animals and Plants. Similarities and Differences. Plant Physiol. 129, 40–49.

Barbará, T., Palma-Silva, C., Paggi, G.M., Bered, F., Fay, M.F., Lexer, C., 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. Mol. Ecol. 16, 3759–3767.

Bennett, M.D., 1972. Nuclear DNA Content and Minimum Generation Time in Herbaceous Plants. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 181, 109–135.

Böhne, A., Brunet, F., Galiana-Arnoux, D., Schultheis, C., Volff, J.-N., 2008. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. Chromosome Res. 16, 203–215.

Bonvicino, C.R., Penna-Firme, V., do Nascimento, F.F., Lemos, B., Stanyon, R., Seuánez, H.N., 2003. The lowest diploid number (2n = 16) yet found in any primate: Callicebus lugens (Humboldt, 1811). Folia Primatol. Int. J. Primatol. 74, 141–149.

Brown, S.W., 1966. Heterochromatin. Science 151, 417–425.

Bush, M.B., Oliveira, P.E. de, 2006. The rise and fall of the Refugial Hypothesis of Amazonian speciation: a paleoecological perspective. Biota Neotropica 6.

Cabrera, A., 1957. Catálogo de los mamíferos de América del Sur. Rev. Mus. Argent. Cienc. Nat., Ciencias Zoológicas IV, 308.

Cáceres, N., Meloro, C., Carotenuto, F., Passaro, F., Sponchiado, J., Melo, G.L., Raia, P., 2014. Ecogeographical variation in skull shape of capuchin monkeys. J. Biogeogr. 41, 501–512.

Cambefort, Y., Moro, F., 1978. Cytogenetics and taxonomy of some South Bolivian monkeys. Folia Primatol. Int. J. Primatol. 29, 307–314.

Casado, F., Bonvicino, C.R., Nagle, C., Comas, B., Manzur, T.D., Lahoz, M.M., Seuánez, H.N., 2010. Mitochondrial divergence between 2 populations of the hooded capuchin, *Cebus (Sapajus) cay* (Platyrrhini, Primates). J. Hered. 101, 261–269.

Cavalier-Smith, T., 1978. Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. J. Cell Sci. 34, 247–278.

Cavalier-Smith, T., 1982. Skeletal DNA and the evolution of genome size. Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 11, 273–302.

Cavalier-Smith, T., 2005. Economy, speed and size matter: evolutionary forces driving nuclear genome miniaturization and expansion. Ann. Bot. 95, 147–175.

Charlesworth, B., 2003. The organization and evolution of the human Y chromosome. Genome Biol. 4, 226.

Clemente, I.C., Garcia, M., Ponsà, M., Egozcue, J., 1987. High-resolution chromosome banding studies in *Cebus apella*, *Cebus albifrons*, and *Lagothrix lagothricha*: Comparison with the human karyotype. Am. J. Primatol. 13, 23–36.

Coimbra-Filho, A.F., Pissinatti, A., 1993. Experimental multiple hybridism and natural hybrids among *Callithrix* species from eastern Brazil. In: Rylands, A.B., Rylands, A. (Eds.), Marmosets and Tamarins: Systematics, Ecology and Behaviour. Oxford University Press, Oxford, pp. 95–120.

Collins, A.C., Dubach, J.M., 2000a. Phylogenetic Relationships of Spider Monkeys (*Ateles*) Based on Mitochondrial DNA Variation. Int. J. Primatol. 21, 381–420.

Collins, A.C., Dubach, J.M., 2000b. Biogeographic and Ecological Forces Responsible for Speciation in *Ateles*. Int. J. Primatol. 21, 421–444.

Collins, A.C., Dubach, J.M., 2001. Nuclear DNA Variation in Spider Monkeys (*Ateles*). Mol. Phylogenet. Evol. 19, 67–75.

Consigliere, S., Stanyon, R., Koehler, U., Agoramoorthy, G., Wienberg, J., 1996. Chromosome painting defines genomic rearrangements between red howler monkey subspecies. Chromosome Res. 4, 264–270.

Consigliere, S., Stanyon, R., Koehler, U., Arnold, N., Wienberg, J., 1998. In situ hybridization (FISH) maps chromosomal homologies between *Alouatta belzebul* (Platyrrhini, Cebidae) and other primates and reveals extensive interchromosomal rearrangements between howler monkey genomes. Am. J. Primatol. 46, 119–133.

Cortés-Ortiz, L., Jr, T.F.D., Canales-Espinosa, D., García-Orduña, F., Rodríguez-Luna, E., Bermingham, E., 2007. Hybridization in Large-Bodied New World Primates. Genetics 176, 2421–2425.

Couturier, J., Dutrillaux, B., 1981. Conservation of replication chronology of homologous chromosome bands between four species of the genus *Cebus* and man. Cytogenet. Cell Genet. 29, 233–240.

Dávila-Rodríguez, M.I., Cortés-Gutiérrez, E.I., López-Fernández, C., Pita, M., Mezzanotte, R., Gosálvez, J., 2009. Whole-comparative genomic hybridization in domestic sheep *(Ovis aries)* breeds. Cytogenet. Genome Res. 124, 19–26.

Defler, T.R., 2004. Primates of Colombia. Conservation International, Bogotá. Colombia.

de Oliveira, E.H.C., Neusser, M., Figueiredo, W.B., Nagamachi, C., Pieczarka, J.C., Sbalqueiro, I.J., Wienberg, J., Müller, S., 2002. The phylogeny of howler monkeys (*Alouatta*, Platyrrhini): Reconstruction by multicolor cross-species chromosome painting. Chromosome Res. 10, 669–683.

Dimitri, P., Caizzi, R., Giordano, E., Accardo, M.C., Lattanzi, G., Biamonti, G., 2009. Constitutive heterochromatin: a surprising variety of expressed sequences. Chromosoma 118, 419–435.

Doolittle, W.F., Sapienza, C., 1980. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. Nature 284, 601–603.

Dufresne, F., Jeffery, N., 2011. A guided tour of large genome size in animals: what we know and where we are heading. Chromosome Res. 19, 925–938.

Dumas, F., Stanyon, R., Sineo, L., Stone, G., Bigoni, F., 2007. Phylogenomics of species from four genera of New World monkeys by flow sorting and reciprocal chromosome painting. BMC Evol. Biol. 7, S11.

Dunham, M.J., Badrane, H., Ferea, T., Adams, J., Brown, P.O., Rosenzweig, F., Botstein, D., 2002. Characteristic genome rearrangements in experimental evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 16144–16149.

Duret, L., Galtier, N., 2009. Biased gene conversion and the evolution of mammalian genomic landscapes. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 10, 285–311.

Dutrillaux B, Couturier J, Viegas-Péquignot E, Chauvier G, Trebbau P, 1978. Presence of abundant heterochromatin in the karyotype of *Cebus*: *C. cappucinus* and *C. nigrivittatus*. Ann. Genet. 21, 142–148.

Egozcue, J., Perkins, E.M., Hagemenas, F., Ford, D.M., 1969. The chromosomes of some Platyrrhini (*Callicebus, Ateles*, and *Saimiri*). Folia Primatol. (Basel) 11, 17–27.

Eissenberg, J.C., Elgin, S.C., 2000. The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. Curr. Opin. Genet. Dev. 10, 204–210.

Elliot, D.G., 1913. A review of the primates. American Museum of Natural History, New York, U.S.A. :

Evans, J.D., Gundersen-Rindal, D., 2003. Beenomes to *Bombyx*: future directions in applied insect genomics. Genome Biol. 4, 107.

Eyre-Walker, A., Hurst, L.D., 2001. The evolution of isochores. Nat. Rev. Genet. 2, 549–555.

Fanning, T.G., Seuánez, H.N., Forman, L., 1993. Satellite DNA sequences in the New World primate *Cebus apella* (Platyrrhini, Primates). Chromosoma 102, 306–311.

Fantini, L., Mudry, M.D., Nieves, M., 2011. Genome Size of Two *Cebus* Species (Primates: Platyrrhini) with a Fertile Hybrid and Their Quantitative Genomic Differences. Cytogenet. Genome Res. 135, 33–41.

Ferrucci, L., Romano, E., Derme, V., Nicolai, F., Gorostiaga, M., Zunino, G.E., Mudry, M.D., 1995. Restrictin enzymes induced band in *Cebus apella*: a method for detect intraspecific variability of satellite DNA sequences.

Finotelo, L.F., Amaral, P.J., Pieczarka, J.C., de Oliveira, E.H., Pissinati, A., Neusser, M., Müller, S., Nagamachi, C.Y., 2010. Chromosome phylogeny of the subfamily Pitheciinae (Platyrrhini, Primates) by classic cytogenetics and chromosome painting. BMC Evol. Biol. 10, 189.

Formenti, D., 1975. Nuclear DNA content in some species of the genus *Cercopithecus* (Primates:Cercopithecidae). Genetica 45, 307–313.

Freitas, L., Seuánez, H., 1982. Chromosome heteromorphisms in *Cebus apella*. J. Hum. Evol. 11, 173–180.

Froehlich, J.W., Supriatna, J., Froehlich, P.H., 1991. Morphometric analyses of <I>Ateles:</I> systematic and biogeographic implications. Am. J. Primatol. 25, 1–22.

Fry, K., Salser, W., 1977. Nucleotide sequences of HS-alpha satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. Cell 12, 1069–1084.

Gallardo, M.H., Bickham, J.W., Honeycutt, R.L., Ojeda, R.A., Köhler, N., 1999. Discovery of tetraploidy in a mammal. Nature 401, 341–341.

Gamperl, R., Ehmann, C., Bachmann, K., 1982. Genome size and heterochromatin variation in rodents. Genetica 58, 199–212.

Garber, P.A., Gomes, D.F., Bicca-Marques, J.C., 2012. Experimental field study of problem-solving using tools in free-ranging capuchins (*Sapajus nigritus*, formerly *Cebus nigritus*). Am. J. Primatol. 74, 344–358.

García, F., Garcia, M., Mora, L., Alarcón, L., Egozcue, J., Ponsà, M., 2003. Qualitative analysis of constitutive heterochromatin and primate evolution. Biol. J. Linn. Soc. 80, 107–124.

García, F., Nogués, C., Garcia, M., Egozcue, J., Ponsà, M., 1999. Characterization of constitutive heterochromatin in *Cebus apella* (Cebidae, Primates) and *Pan troglodytes* (Hominidae, Primates): Comparison to human chromosomes. Am. J. Primatol. 49, 205–221.

García, F., Nogués, C., Ponsà, M., Ruiz-Herrera, A., Egozcue, J., Garcia Caldés, M., 2000. Chromosomal homologies between humans and *Cebus apella* (Primates) revealed by ZOO-FISH. Mamm. Genome 11, 399–401.

García, F., Ruiz-Herrera, A., Egozcue, J., Ponsà, M., Garcia, M., 2002. Chromosomal homologies between *Cebus* and *Ateles* (Primates) based on ZOO-FISH and G-banding comparisons. Am. J. Primatol. 57, 177–188.

García Haro, F., 2001. Evolución cromosómica en Simiiformes. Homologías, Reorganizaciones y Heterocromatina. (Doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, España.

García, M., Freitas, L., Miró, R., Egozcue, J., 1976. Banding Patterns of the Chromosomes of *Cebus albifrons*. Folia Primatol 25, 313–319.

Garcia, M., Miró, R., Estop, A., Ponsà, M., Egozcue, J., 1983. Constitutive heterochromatin polymorphism in *Lagothrix lagothricha cana*, *Cebus apella*, and *Cebus capucinus*. Am. J. Primatol. 4, 117–126.

García, M., Miró, R., Freitas, L., Egozcue, J., 1978. Banding patterns of the chromosomes of *Cebus apella*: unstable chromosomes and pericentric inversion. Folia Primatol. (Basel) 29, 196–205.

Garner, T.W., 2002. Genome size and microsatellites: the effect of nuclear size on amplification potential. Genome 45, 212–215.

Gifalli-Iughetti, C., Koiffmann, C.P., 2009. The Y chromosome of the Atelidae family (Platyrrhini): study by chromosome microdissection. Cytogenet. Genome Res. 125, 46–53.

Goloboff, P.A., Mattoni, C.I., Quinteros, A.S., 2006. Continuous characters analyzed as such. Cladistics 22, 589–601.

Gosálvez, J., Crespo, F., Vega-Pla, J.L., López-Fernández, C., Cortés-Gutiérrez, E.I., Devila-Rodriguez, M.I., Mezzanotte, R., 2010. Shared Y chromosome repetitive DNA sequences in stallion and donkey as visualized using whole-genomic comparative hybridization. Eur. J. Histochem. EJH 54.

Gregory, T.R., 2000. Nucleotypic effects without nuclei: genome size and erythrocyte size in mammals. Genome Natl. Res. Counc. Can. Génome Cons. Natl. Rech. Can. 43, 895–901.

Gregory, T.R., 2001. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 76, 65–101.

Gregory, T.R., 2002a. The C-value enigma (Ph.D.). University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.

Gregory, T.R., 2002b. A bird's-eye view of the C-value enigma: genome size, cell size, and metabolic rate in the class aves. Evol. Int. J. Org. Evol. 56, 121–130.

Gregory, T.R., 2002c. Genome size and developmental complexity. Genetica 115, 131–146.

Gregory, T.R., 2002d. Genome size and developmental parameters in the homeothermic vertebrates. Genome Natl. Res. Counc. Can. Génome Cons. Natl. Rech. Can. 45, 833–838.

Gregory, T.R., 2004. The evolution of the genome. Academic Press.

Gregory, T.R., n.d. Animal Genome Size Database [WWW Document]. URL http://www.genomesize.com

Gregory, T.R., Hebert, P.D., Kolasa, J., 2000. Evolutionary implications of the relationship between genome size and body size in flatworms and copepods. Heredity 84 (Pt 2), 201–208.

Gregory, T.R., Nicol, J.A., Tamm, H., Kullman, B., Kullman, K., Leitch, I.J., Murray, B.G., Kapraun, D.F., Greilhuber, J., Bennett, M.D., 2007. Eukaryotic genome size databases. Nucleic Acids Res. 35, D332–D338.

Greilhuber, J., DoleŽel, J., Lysák, M.A., Bennett, M.D., 2005. The Origin, Evolution and Proposed Stabilization of the Terms "Genome Size" and "C-Value" to Describe Nuclear DNA Contents. Ann. Bot. 95, 255–260.

Griffin, D., Robertson, L., Tempest, H., Vignal, A., Fillon, V., Crooijmans, R., Groenen, M., Deryusheva, S., Gaginskaya, E., Carre, W., Waddington, D., Talbot, R., Volker, M., Masabanda, J., Burt, D., 2008. Whole genome comparative studies between chicken and turkey and their implications for avian genome evolution. BMC Genomics 9, 168.

Groves, C.P., 2001. Primate Taxonomy. Smithsonian Institution Press, Washington D.C., USA.

Groves, C.P., 2005. Order Primates. In: Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.), Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference. pp. 111–185.

Haffer, J., 1979. Quaternary biogeography of tropical lowland: South America. The Museum of Natural History, The University of Kansas.

Haffer, J., 2008. Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. Braz. J. Biol. Rev. Brasleira Biol. 68, 917–947.

Heitz E., 1928. Das Heterochromatin der Moose. Jahrbuecher Wiss Bot 69, 762–818.

Hershkovitz, P., 1949. Mammals of northern Colombia. Preliminary report No. 4 : monkeys (Primates), with taxonomic revisions of some forms. Proc U Nat Mus 98, 323–427.

Herzog, S., Herzog, A., Höhn, H., Matern, B., Hecht, W., 1992. Chromosome polymorphism in *Ateles geoffroyi* (Cebidae; Primates; Mammalia). Theor. Appl. Genet. 84, 986–989.

Hill, W., 1960. Primates: Comparative Anatomy and Taxonomy. Edinburgh University Press, Edinburh.

Hines, J.J.H., 2005. Ecology and Taxonomy of *Ateles geoffroyi* in Parque Nacional Pico Bonito, Atlántida, Honduras. The Australian National University.

Izar, P., Verderane, M.P., Peternelli-dos-Santos, L., Mendonça-Furtado, O., Presotto, A., Tokuda, M., Visalberghi, E., Fragaszy, D., 2012. Flexible and conservative features of social systems in tufted capuchin monkeys: comparing the socioecology of *Sapajus libidinosus* and *Sapajus nigritus*. Am. J. Primatol. 74, 315–331.

Jameson Kiesling, N.M., Yi, S.V., Xu, K., Gianluca Sperone, F., Wildman, D.E., 2015. The tempo and mode of New World monkey evolution and biogeography in the context of phylogenomic analysis. Mol. Phylogenet. Evol. 82 Pt B, 386–399.

Jenner, R.A., Wills, M.A., 2007. The choice of model organisms in evo-devo. Nat. Rev. Genet. 8, 311–319.

Kallioniemi, A., Kallioniemi, O., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J., Waldman, F., Pinkel, D., 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science 258, 818–821.

Kallioniemi, O.-P., Kallioniemi, A., Piper, J., Isola, J., Waldman, F.M., Gray, J.W., Pinkel, D., 1994. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. Genes. Chromosomes Cancer 10, 231–243.

Karhu, R., Kähkönen, M., Kuukasjärvi, T., Pennanen, S., Tirkkonen, M., Kallioniemi, O., 1998. Quality control of CGH: Impact of metaphase chromosomes and the dynamic range of hybridization. Cytometry 28, 198–205.

Kato, H., Harada, M., Tsuchiya, K., Moriwaki, K., 1980. Absence of Correlation Between Dna Repair in Ultraviolet Irradiated Mammalian Cells and Life Span of the Donor Species. Jpn. J. Genet. 55, 99–108.

Kay, R.F., 2015. Biogeography in deep time – What do phylogenetics, geology, and paleoclimate tell us about early platyrrhine evolution? Mol. Phylogenet. Evol.

Kellogg, R., Goldman, E.A., 1944. Review of the spider monkeys. Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 1–45.

Kidwell, M.G., Lisch, D.R., 2002. Transposable elements as sources of genomic variation. In: Craig, N.L., Craigie, R., Gellert, M., Lambowitz, A.M. (Eds.), Mobile DNA II. American Society for Microbiology, Washington D.C., pp. 59–90.

King, M., 1993. Species evolution: the role of chromosome change. Cambridge University Press.

Kirsch, S., Münch, C., Jiang, Z., Cheng, Z., Chen, L., Batz, C., Eichler, E.E., Schempp, W., 2008. Evolutionary dynamics of segmental duplications from human Y-chromosomal euchromatin/heterochromatin transition regions. Genome Res. 18, 1030–1042.

Koiffmann, C.P., Saldanha, P.H., 1974. Cytogenetics of Brazilian monkeys. J. Hum. Evol. 3, 275–282.

Koiffmann, C.P., Saldanha, P.H., 1982. Karyotypic studies in Atelinae monkeys. Braz. J. Genet. V, 773–792.

Kudla, G., Lipinski, L., Caffin, F., Helwak, A., Zylicz, M., 2006. High Guanine and Cytosine Content Increases mRNA Levels in Mammalian Cells. PLoS Biol. 4.

Lau, Y.F., Chan, K.M., 1989. The putative testis-determining factor and related genes are expressed as discrete-sized transcripts in adult gonadal and somatic tissues. Am. J. Hum. Genet. 45, 942–952.

Lederberg, J., McCray, A.T., 2001. 'Ome Sweet 'Omics-- A Genealogical Treasury of Words. The Scientist 15, 8.

Lisitsyn, N.A., 1995. Representational difference analysis: finding the differences between genomes. Trends Genet. 11, 303–307.

Lynch Alfaro, J.W., Boubli, J.P., Olson, L.E., Di Fiore, A., Wilson, B., Gutiérrez-Espeleta, G.A., Chiou, K.L., Schulte, M., Neitzel, S., Ross, V., Schwochow, D., Nguyen, M.T.T., Farias, I., Janson, C.H., Alfaro, M.E., 2012. Explosive Pleistocene range expansion leads to widespread Amazonian sympatry between robust and gracile capuchin monkeys. J. Biogeogr. 39, 272–288.

Lynch Alfaro, J.W., Izar, P., Ferreira, R.G., 2014. Capuchin monkey research priorities and urgent issues. Am. J. Primatol. 76, 705–720.

Lynch Alfaro, J.W., Matthews, L., Boyette, A.H., Macfarlan, S.J., Phillips, K.A., Falótico, T., Ottoni, E., Verderane, M., Izar, P., Schulte, M., Melin, A., Fedigan, L., Janson, C., Alfaro, M.E., 2011. Anointing variation across wild capuchin populations: a review of material preferences, bout frequency and anointing sociality in Cebus and Sapajus. Am. J. Primatol. 74, 299–314.

Lynch Alfaro, J.W., Silva, J.D.E.S.E., Jr, Rylands, A.B., 2012. How different are robust and gracile capuchin monkeys? An argument for the use of sapajus and cebus. Am. J. Primatol. 74, 273–286.

Lynch, M., 2007. The Origins of Genome Architecture. Sinauer Associates.

Lynch, M., 2011. Statistical Inference on the Mechanisms of Genome Evolution. PLoS Genet 7, e1001389.

Lynch, M., Conery, J.S., 2003. The Origins of Genome Complexity. Science 302, 1401 – 1404.

Manfredi Romanini, M.G., 1972. Nuclear DNA content and area of primate lymphocytes as a cytotaxonomical tool. J. Hum. Evol. 1, 23–40.

Manfredi Romanini, M.G., 1973. The DNA nuclear content and the evolution of Vertebrates. In: Chiarelli, A.B., Capanna, E. (Eds.), Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution. Academic Press, pp. 39–81.

Manfredi Romanini, M.G., Formenti, D., Stanyon, R., 1991. C Heterochromatic- Dna and the Problem of Genome Size Variability in Hominoidea. In: Symposium on the Evolution of Terrestrial Vertebrates. Mucchi, Modena, pp. 387–397.

Ma, N.S.F., 1981. Chromosome evolution in the owl monkey, Aotus. Am. J. Phys. Anthropol. 54, 293–303.

Ma, N.S.F., Elliott, M.W., Morgan, L., Miller, A., Jones, T.C., 1976. Translocation of Y chromosome to an autosome in the Bolivian owl monkey, Aotus. Am. J. Phys. Anthropol. 45, 191–201.

Ma, N.S.F., Jones, T.C., 1975. Added Heterochromatin Segments in Chromosomes of Squirrel Monkeys (Saimiri sciureus). Folia Primatol. (Basel) 24, 282–292.

Mantecón, M., Mudry, M., Brown, A.D., 1984. Cebus apella de Argentina, distribución geográfica, fenotipo y cariotipo. Rev. Mus. Argent. Cienc. Nat., Zoología XIII, 399–408.

Martinez, R.A., Giudice, A.M., Szapkievich, V., Ascunce, M.S., Nieves, M., Zunino, G.E., Mudry, M.D., 2002. Parameters modeling speciogenic processes in *Cebus apella* (Primates: Platyrrhini) from Argentina. Maztozoología Neotropical 9, 171–186.

Martinez, R.A., Torres, E., Nieves, M., Szapkievich, V., Rodríguez, S., Schinini, A., Ascurra, M., Mudry, M.D., 2004. Genetic variability in two captive colonies of *Cebus apella paraguayanus* (Primates: Platyrrhini) from eastern Paraguay. Caryologia 57, 332–336.

Matayoshi, T., Seuánez, H.N., Nasazzi, N., 1987. Heterochromatic variation in *Cebus apella* (Cebidae, Platyrrhini) of different geographic regions. Cytogenet Cell Genet 44, 158–162.

Matthews, L.J., 2011. Variations in sexual behavior among capuchin monkeys function for conspecific mate recognition: a phylogenetic analysis and a new hypothesis for female proceptivity in tufted capuchins. Am. J. Primatol. 74, 287–298.

Medeiros, M.A., Barros, R.M., Pieczarka, J.C., Nagamachi, C.Y., Ponsa, M., Garcia, M., Garcia, F., Egozcue, J., 1997. Radiation and speciation of spider monkeys, genus *Ateles*, from the cytogenetic viewpoint. Am. J. Primatol. 42, 167–178.

Mirsky, A.E., Ris, H., 1951. The desoxyribonucleic acid content of animal cells and its evolutionary significance. J. Gen. Physiol. 34, 451–462.

Moore, C.M., Harris, C.P., Abee, C.R., 1990. Distribution of chromosomal polymorphisms in three subspecies of squirrel monkeys (genus *Saimiri*). Cytogenet. Cell Genet. 53, 118–122.

Moore, C.M., Janish, C., Eddy, C.A., Hubbard, G.B., Leland, M.M., Rogers, J., 1999. Cytogenetic and fertility studies of a rheboon, rhesus macaque (*Macaca mulatta*) x baboon (*Papio hamadryas*) cross: further support for a single karyotype nomenclature. Am. J. Phys. Anthropol. 110, 119–127.

Morales-Jimenez, A.L., Disotell, T., Di Fiore, A., 2015. Revisiting the phylogenetic relationships, biogeography, and taxonomy of spider monkeys (genus *Ateles*) in light of new molecular data. Mol. Phylogenet. Evol. 82 Pt B, 467–483.

Morand, S., Ricklefs, R.E., 2005. Genome size is not related to life-history traits in primates. Genome Natl. Res. Counc. Can. Génome Cons. Natl. Rech. Can. 48, 273–278.

Morescalchi, M., Schempp, W., Consigliere, S., Bigoni, F., Wienberg, J., Stanyon, R., 1997. Mapping chromosomal homology between humans and the black-handed spider monkey by fluorescence in situ hybridization. Chromosome Res. 5, 527–536.

Moura-Pensin, C., Pieczarka, J., Nagamachi, C., Pereira Carneiro Muniz, J.A., Do Carmo de Oliveira Brigido, M., Pissinatti, A., Marinho, A., De Souza Barros, R.M., 2001. Cytogenetic relations among the genera of the subfamily Pitheciinae (Cebidae, Primates). Caryologia 54, 385–391.

Mudry de Pargament, M.D., Labal de Vinuesa, M.L., 1988. Variabilidad en bandas C de dos poblaciones de *Cebus apella*. Mendeliana 8, 79–86.

Mudry de Pargament, M.D., Labal de Vinuesa, M.L., Brieux de Salum, S., 1985. Quantitative estimation of heteromorphism in C-bands of *Cebus apella*. J. Hum. Evol. 14, 693–698.

Mudry, M., Brown, A.D., Zunino, G.E., 1987. Algunas consideraciones citotaxonomicas sobre Cebus apella de Argentina. Bol. Primatológico Argent. 5, 1–2.

Mudry, M.D., 1990. Cytogenetic variability within and across populations of *Cebus apella* in Argentina. Folia Primatol. (Basel) 54, 206–16.

Mudry, M.D., Martinez, R.A., Nieves, M., Carballo, M.A., 2011. Biomarkers of genotoxicity and genomic instability in a non-human primate, *Cebus libidinosus* (Cebidae, Platyrrhini), exposed to nitroimidazole derivatives. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. 721, 108–113.

Mudry, M.D., Rahn, M.I., Solari, A.J., 2001. Meiosis and chromosome painting of sex chromosome systems in Ceboidea. Am. J. Primatol. 54, 65–78.

Müller, S., 2006. Primate Chromosome Evolution. In: Genomic Disorders. Humana Press, New Jersey, USA, pp. 133–152.

Nagamachi, C.Y., Pieczarka, J.C., Schwarz, M., Barros, R.M.S., Mattevi, M.S., 1997. Comparative chromosomal study of five taxa of genus Callithrix, group Jacchus (Platyrrhini, primates). Am. J. Primatol. 41, 53–60.

Nascimento, F.F., Lazar, A., Seuánez, H.N., Bonvicino, C.R., 2015. Reanalysis of the biogeographical hypothesis of range expansion between robust and gracile capuchin monkeys. J. Biogeogr. n/a–n/a.

Neusser, M., Münch, M., Anzenberger, G., Müller, S., 2005. Investigation of marmoset hybrids (*Cebuella pygmaea* x *Callithrix jacchus*) and related Callitrichinae (Platyrrhini) by cross-species chromosome painting and comparative genomic hybridization. Cytogenet. Genome Res. 108, 191–196.

Neusser, M., Stanyon, R., Bigoni, F., Wienberg, J., Müller, S., 2001. Molecular cytotaxonomy of New World monkeys (Platyrrhini) - comparative analysis of five species by multi-color chromosome painting gives evidence for a classification of Callimico goeldii within the family of Callitrichidae. Cytogenet. Cell Genet. 94, 206–215.

Nick J. B. Isaac, James Mallet, Georgina M. Mace, 2004. Taxonomic inflation: its influence on macroecology and conservation. Trends Ecol. Evol. 19, 464–469.

Nieves, M., 2007. Heterocromatina y Evolución Cromosómica en Primates Neotropicales (Tesis de Doctorado). Universidad de Buenos Aires.

Nieves, M., Ascunce, M.S., Rahn, M.I., Mudry, M.D., 2005. Phylogenetic relationships among some *Ateles* species: the use of chromosomic and molecular characters. Primates 46, 155–164.

Nieves, M., De Oliveira, E.H.C., Amaral, P.J.S., Nagamachi, C.Y., Pieczarka, J.C., Mühlmann, M.C., Mudry, M.D., 2011. Analysis of the heterochromatin of *Cebus* (Primates, Platyrrhini) by micro-FISH and banding pattern comparisons. J. Genet. 90, 111–117.

Nieves, M., Mühlmann, M., Mudry, M.D., 2010. *Cebus paraguayanus* and *Cebus nigritus* (Primates, Platyrrhini): A Comparative Genomic Hybridization Analysis. Cytogenet. Genome Res. 128, 214–220.

Ohno, S., 1970. Evolution by gene duplication. Springer-Verlag.

Ohno, S., 1972. So much "junk" DNA in our genome. Brookhaven Symp. Biol. 23, 366–370.

Oliveira, E.H.C., Neusser, M., Müller, S., 2012. Chromosome Evolution in New World Monkeys (Platyrrhini). Cytogenet. Genome Res. 137, 259–272.

Oliveira, E.H.C., Neusser, M., Pieczarka, J.C., Nagamachi, C., Sbalqueiro, I.J., Müller, S., 2005. Phylogenetic inferences of Atelinae (Platyrrhini) based on multi-directional chromosome painting in *Brachyteles arachnoides*, *Ateles paniscus paniscus* and *Ateles b. marginatus*. Cytogenet. Genome Res. 108, 183–90.

Oliver, M.J., Petrov, D., Ackerly, D., Falkowski, P., Schofield, O.M., 2007. The mode and tempo of genome size evolution in eukaryotes. Genome Res. 17, 594–601.

Painter, T.S., 1922. The Sex Chromosomes of the Monkey. Science 56, 286–287.

Park, Y., Kuroda, M.I., 2001. Epigenetic aspects of X-chromosome dosage compensation. Science 293, 1083–1085.

Pellicciari, C., Formenti, D., Redi, C.A., Manfredi, M.G., Romanini, 1982. DNA content variability in primates. J. Hum. Evol. 11, 131–141.

Pellicciari, C., Formenti, D., Zuccotti, M., Stanyon, R., Manfredi Romanini, M.G., 1988. Genome size and constitutive heterochromatin in *Hylobates muelleri* and *Symphalangus syndactylus* and in their viable hybrid. Cytogenet. Cell Genet. 47, 1–4.

Pellicciari, C., Ronchetti, E., Formenti, D., Stanyon, R., Manfredi Romanini, M., 1990. Genome size and «C-heterochromatic-DNA» in man and the african apes. Hum. Evol. 5, 261–267.

Penedo, D.M., de Armada, J.L.A., da Silva, J.F.S., Neves, D.M., Pissinatti, A., Nogueira, D.M., 2014. C-banding patterns and phenotypic characteristics in individuals of *Sapajus* (Primates: Platyrrhini) and its application to management in captivity. Caryologia 67, 314–320.

Perelman, P., Johnson, W.E., Roos, C., Seuánez, H.N., Horvath, J.E., Moreira, M.A.M., Kessing, B., Pontius, J., Roelke, M., Rumpler, Y., Schneider, M.P.C., Silva, A., O'Brien, S.J., Pecon-Slattery, J., 2011. A Molecular Phylogeny of Living Primates. PLoS Genet 7, e1001342.

Perez, S.I., Klaczko, J., dos Reis, S.F., 2012. Species tree estimation for a deep phylogenetic divergence in the New World monkeys (Primates: Platyrrhini). Mol. Phylogenet. Evol. 65, 621–630.

Petrov, D.A., 2001. Evolution of genome size: new approaches to an old problem. Trends Genet. 17, 23–28.

Petrov, D.A., 2002. Mutational Equilibrium Model of Genome Size Evolution. Theor. Popul. Biol. 61, 531–544.

Pieczarka, J.C., Nagamachi, C., Barros, R.M., 1989. The karyotype of *Ateles paniscus paniscus* (Cebidae, Primates): 2n=32. Rev. Bras. Genética 12, 543–551.

Pieczarka, J.C., Nagamachi, C.Y., Barros, R.M.S., Mattevi, M.S., 1996. Analysis of constitutive heterochromatin by fluorochromes and in situ digestion with restriction enzymes in species of the group *Callithrix argentata* (Callitrichidae, Primates). Cytogenet. Cell Genet. 75, 325–330.

Pieczarka, J.C., Nagamachi, C.Y., Muniz, J.A., Barros, R.M., Mattevi, M.S., 2001. Restriction enzyme and fluorochrome banding analysis of the constitutive heterochromatin of *Saguinus species* (Callitrichidae, Primates). Cytobios 105, 13–26.

Plath, K., Mlynarczyk-Evans, S., Nusinow, D.A., Panning, B., 2002. Xist RNA and the mechanism of X chromosome inactivation. Annu. Rev. Genet. 36, 233–278.

Ponsà, M., García, M., Borell, A., Garcia, F., Egozcue, J., Gorostiaga, M.A., Delprat, A., Mudry, M., 1995. Heterochromatin and cytogenetic polymorphisms in *Cebus apella* (Cebidae, Platyrrhini). Am. J. Primatol. 37, 325–331.

Projan, S.J., 2007. (Genome) Size Matters. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 1133–1134.

Redi, C.A., Capanna, E., 2012. Genome Size Evolution: Sizing Mammalian Genomes. Cytogenet. Genome Res. 137, 97–112.

Redi, C., Garagna, S., Zacharias, H., Zuccotti, M., Capanna, E., 2001. The other chromatin. Chromosoma 110, 136–147.

Richard, F., Lombard, M., Dutrillaux, B., 1996. ZOO-FISH Suggests a Complete Homology between Human and Capuchin Monkey (Platyrrhini) Euchromatin. Genomics 36, 417–423.

Rieger, R., Michaelis, A., Green, M., 1991. Glossary of genetics, 5th edition. ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Rodrigues LR, Pieczarka JC, Pissinati A, Barros RM, 2001. Cytogenetic study of Callicebus hoffmannsii (Cebidae, Primates) and comparison with C. m. moloch. Cytobios. 105, 137–45.

Romiguier, J., Ranwez, V., Douzery, E.J.P., Galtier, N., 2010. Contrasting GC-content dynamics across 33 mammalian genomes: relationship with life-history traits and chromosome sizes. Genome Res. 20, 1001–1009.

Ronchetti, E., Crovella, S., Rumpler, Y., Pellicciari, C., Manfredi Romanini, M.G., 1993. Genome size and qualitative and quantitative characteristics of C-heterochromatic DNA in *Eulemur* species and in a viable hybrid. Cytogenet. Cell Genet. 63, 1–5.

Rosenberger, A.L., 2012. New World Monkey Nightmares: Science, Art, Use, and Abuse (?) in Platyrrhine Taxonomic Nomenclature. Am. J. Primatol. n/a–n/a.

Roth, G., Blanke, J., Wake, D.B., 1994. Cell size predicts morphological complexity in the brains of frogs and salamanders. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 4796–4800.

Ruiz-García, M., Castillo, M.I., Lichilín-Ortiz, N., Pinedo-Castro, M., 2012. Molecular Relationships and Classification of Several Tufted Capuchin Lineages (*Cebus apella*, *Cebus xanthosternos* and *Cebus nigritus,* Cebidae), by Means of Mitochondrial Cytochrome Oxidase II Gene Sequences. Folia Primatol. (Basel) 83, 100–125.

Ruiz-Herrera, A., García, F., Aguilera, M., Garcia, M., Ponsà, M., 2004. New polymorphisms in a *Cebus* (Platyrrhini, Primates) species. The case of *Cebus nigrivittatus*. Caryologia 57, 206–209.

Ruiz-Herrera, A., García, F., Mora, L., Egozcue, J., Ponsà, M., Garcia, M., 2005. Evolutionary conserved chromosomal segments in the human karyotype are bounded by unstable chromosome bands. Cytogenet. Genome Res. 108, 161–74.

Sahara, K., Marec, F., Eickhoff, U., Traut, W., 2003. Moth sex chromatin probed by comparative genomic hybridization (CGH). Genome Natl. Res. Counc. Can. Génome Cons. Natl. Rech. Can. 46, 339–342.

Schneider, H., Sampaio, I., 2015. The systematics and evolution of New World primates – A review. Mol. Phylogenet. Evol., Phylogeny and Biogeography of Neotropical Primates 82, Part B, 348–357.

Seuánez, H.N., Armada, J.L., Freitas, L., Silva, R.R.E., Pissinatti, A., Coimbra-Filho, A., 1986. Intraspecific chromosome variation in *Cebus apella* (Cebidae, Platyrrhini): The chromosomes of the yellow breasted capuchin Cebus apella xanthosternos wied, 1820. Am. J. Primatol. 10, 237–247.

Seuánez, H.N., Bonvicino, C.R., Moreira, M.A.M., 2005. The primates of the Neotropics: genomes and chromosomes. Cytogenet. Genome Res. 108, 38–46.

Silva Jr., J. de S., 2001. Especiação nos macacos-prego e caiararas, gênero *Cebus* Erxleben, 1777 (Primates, Cebidae) (Doctoral). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Sineo, L., Roscoe Stanyon, 2006. Primate Cytogenetics and Comparative Genomics: Florence, August, 29-30th, 2004. Firenze University Press.

Siu, L.L.P., Kwong, Y.-L., 1999. Comparative Genomic Hybridization: a companion to conventional cytogenetics. JHKMTA 7–12.

Snijders, A.M., Nowak, N., Segraves, R., Blackwood, S., Brown, N., Conroy, J., Hamilton, G., Hindle, A.K., Huey, B., Kimura, K., Law, S., Myambo, K., Palmer, J., Ylstra, B., Yue, J.P., Gray, J.W., Jain, A.N., Pinkel, D., Albertson, D.G., 2001. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. Nat. Genet. 29, 263–264.

Stanyon, R., Archidiacono, N., Rocchi, M., 2012. Comparative Primate Molecular Cytogenetics: Revealing Ancestral Genomes, Marker Order, and Evolutionary New Centromeres. In: Hirai, H., Imai, H., Go, Y., Matsuzawa, T., Yamagiwa, J. (Eds.), Post-Genome Biology of Primates, Primatology Monographs. Springer Tokyo, pp. 193–216.

Stanyon, R., Bigoni, F., Slaby, T., Muller, S., Stone, G., Bonvicino, C.R., Neusser, M., Seuánez, H.N., 2004. Multi-directional chromosome painting maps homologies between species belonging to three genera of New World monkeys and humans. Chromosoma 113, 305–315.

Stanyon, R., Bonvicino, C.R., Svartman, M., Seuánez, H.N., 2003. Chromosome painting in *Callicebus lugens*, the species with the lowest diploid number (2n=16) known in primates. Chromosoma 112, 201–6.

Stanyon, R., Rocchi, M., Capozzi, O., Roberto, R., Misceo, D., Ventura, M., Cardone, M.F., Bigoni, F., Archidiacono, N., 2008. Primate chromosome evolution: ancestral karyotypes, marker order and neocentromeres. Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol. 16, 17–39.

Steinberg, E., Nieves, M., Mudry, M.D., 2014. Multiple sex chromosome systems in howler monkeys (Platyrrhini, Alouatta). Comp. Cytogenet. 8, 43–69.

Steinberg, E.R., Nieves, M., Ascunce, M.S., Palermo, A.M., Mudry, M.D., 2009. Morphological and Genetic Characterization of Saimiri boliviensis. Int. J. Primatol. 30, 29–31.

Steinberg, E.R., Nieves, M., Fantini, L., Mudry, M.D., 2014. Primates karyological diagnosis and management programs applications. J. Med. Primatol. 43, 455–467.

Sumner, A.T., 2008. Chromosomes: Organization and Function. John Wiley & Sons.
Szathmáry, E., Smith, J.M., 1995. The major evolutionary transitions. Nature 374, 227–232.
Thomas, C.A., 1971. The genetic organization of chromosomes. Annu. Rev. Genet. 5, 237–256.
Toder, R., Xia, Y., Bausch, E., 1998. Interspecies Comparative Genome Hybridization and Interspecies Representational Difference Analysis Reveal Gross DNA Differences Between Humans and Great Apes. Chromosome Res. 6, 487–494.
Torres de Assumpcao, C., 1988. Resultados preliminares de reavaliacao das racas do macaco - prego *Cebus apella* (Primates : Cebidae). Rev. Nord. Biol. 6, 15–28.
Torres de Caballero, O.M., Ramirez, C., Yunis, E., 1976. Genus *Cebus* Q- and G-Band Karyotypes and Natural Hybrids. Folia Primatol. (Basel) 26, 310–321.
Torres, O.M., Enciso, S., Ruiz, F., Silva, E., Yunis, I., 1998. Chromosome diversity of the genus *Aotus* from Colombia. Am. J. Primatol. 44, 255–275.
Traut, W., Sahara, K., Otto, T.D., Marec, F., 1999. Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. Chromosoma 108, 173–180.
Vendrely, R., Vendrely, C., 1949. La teneur du noyau cellulaire en acide désoxyribonucléique à travers les organes, les individus et les espèces animales. Experientia 5, 327–329.
Vinogradov, A.E., 1995. Nucleotypic Effect in Homeotherms: Body-Mass-Corrected Basal Metabolic Rate of Mammals is Related to Genome Size. Evolution 49, 1249–1259.
Vinogradov, A.E., 1998. Genome size and GC-percent in vertebrates as determined by flow cytometry: The triangular relationship. Cytometry 31, 100–109.
Vinogradov, A.E., 2005. Genome size and chromatin condensation in vertebrates. Chromosoma 113, 362–369.
Walker, L.I., Spotorno, A.E., Sans, J., 1991. Genome size variation and its phenotypic consequences in *Phyllotis* rodents. Hereditas 115, 99–107.
Waters, P.D., Wallis, M.C., Marshall Graves, J.A., 2007. Mammalian sex--Origin and evolution of the Y chromosome and SRY. Semin. Cell Dev. Biol. 18, 389–400.
Whitney, K.D., Boussau, B., Baack, E.J., Garland, T., 2011. Drift and Genome Complexity Revisited. PLoS Genet 7, e1002092.
Whitney, K.D., Garland, T., 2010. Did Genetic Drift Drive Increases in Genome Complexity? PLoS Genet. 6.
Wienberg, J., Stanyon, R., 1998. Comparative Chromosome Painting of Primate Genomes. ILAR J. Natl. Res. Counc. Inst. Lab. Anim. Resour. 39, 77–91.
Wildman, D.E., Goodman, M., 2004. Humankind's Place in a Phylogenetic Classification of Living Primates. In: Wasser, S.P. (Ed.), Evolutionary Theory and Processes: Modern Horizons. Springer Netherlands, pp. 293–311.
Wilson, D.E., Reeder, D.M., 2005. Mammal Species of the World. JHU Press.
Wright, K.A., Wright, B.W., Ford, S.M., Fragaszy, D., Izar, P., Norconk, M., Masterson, T., Hobbs, D.G., Alfaro, M.E., Lynch Alfaro, J.W., 2015. The effects of ecology and evolutionary history on robust capuchin morphological diversity. Mol. Phylogenet. Evol. 82 Pt B, 455–466.
Yu, H.-T., Ma, G.-C., Lee, D.-J., Chin, S.-C., Chen, T.-L., Tsao, H.-S., Lin, W.-H., Wu, S.-H., Lin, C.-C., Chen, M., 2012. Use of a cytogenetic whole-genome comparison to resolve phylogenetic relationships among three species: implications for mammalian systematics and conservation biology. Theriogenology 77, 1615–1623.

Anexo

M\C	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12	13	13	14	14	15	15	16	16	X	X
A	1,31	1,64	1,37	1,11	1,19	1,25	1,81	1,37	1,09	1,10	1,04	1,69	1,07	1,01	0,86	1,19	1,36	0,91	1,11	1,25	1,24	1,08	1,19	1,07	0,80	0,92	1,09	0,88	1,06	1,01	1,21	0,93	1,07	1,57
	1,17	1,30	1,26	1,04	1,04	1,15	1,16	1,17	0,91	1,00	0,91	1,27	0,89	0,83	0,54	0,67	0,94	0,78	1,05	0,89	1,24	0,99	0,76	0,73	0,60	0,71	0,89	0,80	0,91	0,96	1,16	0,80	0,92	1,26
	0,77	0,88	0,63	0,76	0,75	0,84	0,76	0,81	0,62	0,69	0,65	0,81	0,65	0,63	0,53	0,66	0,77	0,65	0,76	0,72	0,74	0,68	0,66	0,56	0,56	0,59	0,67	0,56	0,84	0,64	0,83	0,61	0,65	0,88
B	1,86	nd	1,62	1,49	1,23	1,36	1,96	nd	1,38	1,38	1,62	1,22	1,49	1,63	1,34	1,43	1,31	1,46	1,14	1,34	1,83	1,43	1,50	1,28	1,27	1,83	1,63	1,19	1,54	1,23	1,23	1,19	1,49	1,42
	1,43	nd	1,17	1,38	1,04	1,15	1,57	nd	1,28	1,22	1,28	1,08	1,17	1,21	1,05	1,22	1,18	1,22	1,00	1,07	1,46	1,37	1,33	1,15	1,14	1,54	1,43	1,00	1,36	1,00	1,09	1,10	1,18	1,11
	1,12	nd	0,95	1,08	0,86	0,95	1,24	nd	1,04	0,97	1,17	0,96	0,95	0,95	0,90	1,09	0,94	1,06	0,80	0,92	1,24	1,18	1,16	1,04	0,86	1,31	1,13	0,92	1,04	0,90	0,94	0,96	1,12	1,01
C	1,16	1,49	1,29	1,21	1,13	1,20	1,08	1,19	1,42	1,25	1,38	1,45	1,08	1,10	1,02	0,89	1,17	1,27	1,19	1,27	1,11	1,45	1,04	1,19	1,09	nd	1,18	1,18	1,13	1,04	1,19	1,02	1,22	1,10
	1,05	1,24	1,00	1,06	1,03	0,81	0,98	1,04	1,12	1,08	1,00	1,12	0,91	0,74	0,73	0,81	0,92	0,94	0,97	0,65	1,03	1,21	0,89	1,03	0,88	nd	0,91	1,00	1,04	0,79	0,66	0,94	0,92	0,93
	0,66	0,80	0,61	0,54	0,59	0,54	0,63	0,77	0,68	0,83	0,79	0,67	0,59	0,67	0,48	0,59	0,51	0,81	0,70	0,56	0,67	0,65	0,65	0,50	0,63	nd	0,69	0,43	0,57	0,50	0,54	0,75	0,53	0,74
E	1,09	1,71	1,52	1,25	1,46	1,22	1,51	1,31	1,37	1,72	1,21	1,46	1,75	1,40	1,12	1,44	1,39	1,32	1,15	1,30	1,29	1,82	1,14	1,27	1,18	1,24	1,36	1,01	1,24	1,09	0,90	1,42	1,30	1,16
	0,81	1,00	1,00	0,86	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,16	1,00	1,00	1,20	1,00	0,83	1,00	1,00	0,97	0,86	1,00	1,00	0,92	0,95	0,91	0,99	1,00	1,03	0,80	0,88	1,06	0,87	0,80	0,92	0,82
	0,61	0,85	0,65	0,55	0,68	0,60	0,67	0,59	0,56	0,69	0,46	0,55	0,93	0,65	0,58	0,64	0,66	0,57	0,63	0,74	0,64	0,75	0,59	0,59	0,72	0,80	0,57	0,44	0,63	0,64	0,51	0,59	0,58	0,61
F	1,61	1,62	1,83	1,77	1,342	1,50	1,60	1,40	1,61	1,54	1,51	1,44	1,35	1,50	2,00	1,65	1,66	1,88	2,22	2,18	2,09	2,07	1,35	1,86	2,28	1,45	1,84	2,46	1,26	1,48	1,59	1,70	1,38	1,91
	1,20	1,35	1,60	1,34	1,07	1,09	1,22	1,05	1,21	1,50	1,23	1,18	1,00	1,10	1,48	1,27	1,42	1,26	1,55	1,58	1,45	1,47	0,97	1,58	1,46	1,04	1,43	1,70	1,09	1,40	1,26	1,13	1,04	1,42
	1,01	0,95	1,26	1,09	0,811	0,97	0,90	0,85	0,90	0,96	0,88	0,94	0,84	0,93	1,02	0,97	1,02	0,92	1,08	1,15	1,21	1,23	0,92	1,13	1,21	0,78	1,02	1,16	0,86	1,08	1,03	1,06	0,86	0,98

Tabla 11. Valores máximos (rojo), modales (celeste) y mínimos (verde) de intensidad de fluorescencia R:V a lo largo de cada cromosoma en 5 metafases de *A. chamek* hibridadas con sondas genómicas de *A. chamek* sin diferencias cuantitativas. *M: metafase; C: Número de cromosoma; A-F: identificación de las metafases analizadas; nd: no determinado*

M\C	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12	13	13	14	14
	0.76	0.75	0.83	0.63	0.70	0.86	0.86	0.73	0.71	0.73	0.66	0.62	0.76	0.75	0.59	0.59	0.72	0.65	0.62		0.67	0.59	0.91	0.69	0.77	0.72	0.71	0.74
	0.61	0.63	0.75	0.56	0.56	0.63	0.72	0.69	0.55	0.63	0.55	0.60	0.67	0.67	0.54	0.52	0.54	0.65	0.50		0.63	0.43	0.63	0.64	0.73	0.61	0.41	0.47
a	0.46	0.50	0.60	0.43	0.44	0.57	0.63	0.48	0.42	0.48	0.45	0.41	0.48	0.52	0.42	0.43	0.43	0.41	0.43		0.51	0.41	0.56	0.47	0.55	0.45	0.36	0.47
	0.83	0.86	0.82	0.78	0.69	0.75	0.86	0.85	0.84	0.69	0.78	0.89	0.62		0.65	0.74	0.74	0.78	0.71	0.69	0.69	0.71	0.99	0.86	0.74	0.91	0.92	0.71
	0.63	0.67	0.62	0.68	0.64	0.61	0.71	0.71	0.67	0.63	0.60	0.62	0.50		0.63	0.67	0.62	0.69	0.47	0.59	0.47	0.69	0.83	0.80	0.60	0.75	0.76	0.64
b	0.53	0.57	0.46	0.51	0.49	0.47	0.52	0.53	0.53	0.41	0.46	0.40	0.43		0.47	0.53	0.45	0.39	0.43	0.46	0.42	0.50	0.49	0.49	0.45	0.46	0.48	0.46
	1.94	1.72	1.82	1.86	1.76	1.90	1.98	2.23	1.79	1.83	1.79	1.88	1.91	1.83	1.70	1.75	1.59	1.56	1.34	1.39	1.63	1.58	2.04	2.02	2.15	2.06	2.06	1.80
	1.67	1.41	1.50	1.48	1.40	1.40	1.25	1.52	1.60	1.58	1.50	1.59	1.67	1.51	1.50	1.55	0.97	1.21	1.13	1.21	1.22	1.00	1.75	1.78	2.00	2.00	1.67	1.57
c	1.38	1.18	0.89	1.06	1.07	1.08	0.89	0.94	1.10	0.94	0.92	0.91	0.95	0.84	0.74	0.78	0.73	0.78	0.73	0.79	0.76	0.71	1.00	0.92	1.05	1.03	0.79	0.69
	1.04	0.78	1.11	1.02	0.90	1.04	1.06	1.06	1.00	1.02	0.88	1.00	0.92	0.85	0.86	0.83	0.88	0.76	0.72	0.54	0.73	0.86	1.19	1.16	1.05	1.28	0.54	0.81
	0.86	0.76	0.89	0.80	0.69	0.92	0.81	0.90	0.83	0.80		0.77	0.63	0.68	0.85		0.82	0.66	0.32	0.44	0.73	0.81	1.00	0.50	0.92	1.05		0.63
d	0.51	0.50	0.59	0.54	0.41	0.49	0.56	0.47	0.46	0.42	0.36	0.42	0.46	0.38	0.39	0.36	0.41	0.41	0.31	0.31	0.28	0.34	0.35	0.38	0.34	0.47	0.36	0.51

M\C (cont.)	15	15	16	16	17	17	18	18	19	19	20	20	21	21	22	22	23	23	24	24	25	25	26	26	X	
	0.71	0.65	0.72	1.03	0.71	0.81	0.74	0.71	0.71	0.72	0.91	0.73	0.63	0.78	0.60	0.72	0.65	0.72	0.83	0.66	0.67	0.64	0.69	0.53	0.54	
	0.56	0.46	0.65	0.74	0.55	0.72	0.56	0.51	0.60	0.51	0.67	0.52	0.52	0.63	0.50	0.64	0.50	0.56	0.74	0.53	0.55	0.50		0.45	0.45	
a	0.39	0.45	0.47	0.53	0.41	0.50	0.46	0.41	0.51	0.48	0.52	0.46	0.46	0.49	0.41	0.51	0.48	0.50	0.60	0.46	0.47	0.49	0.49	0.43	0.37	
	0.85	0.73	0.73	0.75	0.98	0.80	0.89	1.02	0.86	1.12	0.85	0.68	0.72	0.62	0.59	0.66	0.59	0.69	0.87	0.71	0.67	0.68	0.63	0.63	0.67	
	0.60	0.50	0.67	0.64	0.60	0.65	0.38	0.52	0.59	0.89	0.66	0.54	0.57	0.57	0.40	0.55	0.55	0.60	0.62	0.69	0.46	0.52	0.56	0.58	0.60	
b	0.43	0.48	0.45	0.44	0.55	0.44	0.37	0.42	0.49	0.53	0.47	0.41	0.42	0.47	0.39	0.44	0.41	0.54	0.56	0.45	0.46	0.50	0.48	0.44	0.49	
	1.77	1.95	1.96	1.97	2.02	2.03	1.89	1.98	2.00	2.03	1.65	1.62	1.85	2.11	1.68	1.64	1.74	1.92	1.62	1.45	1.55	1.53	1.58	1.34	1.53	
	1.60	1.71	1.63	1.72	1.77	1.65	1.60	1.67	1.76	2.00	1.36	1.34	1.55	1.44	0.81	1.50	1.71		1.41	0.91	0.90	1.27	1.17		1.33	
c	0.77	0.68	1.09	0.89	0.84	0.82	0.81	0.78	1.03	0.91	0.88	0.84	0.69	0.83	0.81	0.75	0.94	0.86	0.80	0.85	0.90	0.71	0.82	0.79	0.97	
	1.15	1.09	1.19	1.26	0.92	1.15	0.90	1.16	0.90	0.89	0.88	1.08	1.02	1.00	0.81	0.99	0.79	0.89	0.66	0.70	0.65	0.85	0.75	0.77	0.82	
	1.00	0.90	0.94	0.99	0.90			0.94	0.76	0.71		1.00	0.73	0.44	0.77	0.40	0.53	0.50	0.32	0.43	0.58	0.81		0.50	0.64	
d	0.61	0.40	0.44	0.43	0.32	0.46	0.35	0.51	0.31	0.34	0.37	0.50	0.36	0.35	0.36	0.29	0.34	0.27	0.28	0.39	0.34	0.44	0.45	0.43	0.37	

Tabla 12. Valor máximo (rojo), modal (celeste) y mínimo (verde) de intensidad de fluorescencia R:V a lo largo de cada cromosoma en 4 metafases de *C. nigritus* hibridadas con sondas genómicas de *C. nigritus* sin diferencias cuantitativas. *M: metafase; C: Número de cromosoma;* ***a****-d: identificación de las metafases analizadas.*