

Diego Tirira S. (ed.):
Biología, sistemática y conservación de los Mamíferos del Ecuador.
Museo de Zoología, Centro de Biodiversidad y Ambiente,
Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
Publicación Especial 1:145–153 Quito (1998).

INTRODUCCIÓN A LOS MÉTODOS MODERNOS EN SISTEMÁTICA DE MAMÍFEROS

Iván Aveiga del P.¹ y Alexandra Narváez T.²

INTRODUCCIÓN

La sistemática basada en las características morfológicas, fisiológicas y fenotípicas se ha utilizado por muchos años, debido a la facilidad con la cual se desarrollan dichos estudios, generando de esta forma la clasificación que rige a los organismos vivos.

Las características morfológicas son el resultado de la expresión génica, a pesar de esto, existen muchos organismos morfológicamente diferentes, pero genéticamente similares. Esta restricción está presente en animales, generando problemas para determinar el grado de especiación y sus relaciones filogenéticas. Con los métodos tradicionales usualmente aplicados, se llega a un punto de no poder descifrar y dilucidar este problema, para lo cual se requiere comparaciones a nivel del fundamento que rige la expresión fenotípica (Champion et al., 1974).

Muchas veces una característica fenotípica utilizada para diferenciar entre especies, subespecies o variedades no tienen una diferencia genética como base, sino son simplemente el resultado de variaciones producidas por efectos

¹ Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Av. 12 de Octubre y Roca, Apdo. 17–01–2184, Quito, Ecuador (iaveiga@puceuo.puce.edu.ec).

² Laboratorio de Biotecnología, Departamento de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Av. 12 de Octubre y Roca, Apdo. 17–01–2184, Quito, Ecuador (anarvaez@puceuo.puce.edu.ec).

ambientales (Hillis y Bull, 1991). Este tipo de plasticidad fenotípica se evidencia especialmente en plantas dando lugar de esta manera a clasificaciones erróneas.

Para solventar los problemas mencionados anteriormente, los investigadores durante muchos años han desarrollado técnicas que nos permiten comparar estructuras a un nivel genético. Entre estas se incluyen características cariológicas, bioquímicas y moleculares (Beverly y Wilson, 1985). Estas técnicas deben ser analizadas con cuidado y por métodos que sean relativamente fuertes a los problemas de no homología (Wiley, 1981).

CARACTERÍSTICAS CARIOLÓGICAS

La especiación, algunas veces esta acompañada de una nueva disposición en los cromosomas. Partiendo del arreglo cromosómico se puede promover o asegurar la independencia del linaje por reproducción entre tipos estériles de cromosomas, reduciendo la fecundidad o haciéndola no viable. Otro tipo de arreglos pueden variar polimórficamente en un solo linaje o pueden ser arreglados en linajes únicos como un producto de la especiación. Los datos cromosómicos proveen diferentes tipos de caracteres para el análisis sistemático y nos pueden dar datos para el análisis sistemático en especies morfológicamente similares, o en taxa en los cuales el estudio trae dificultad (Fig. 1).

La clase de información cromosómica que se analice dependerá del nivel al que se lo haga. Se distinguen varios tipos de análisis cariológicos (White, 1978):

Alfa-cariológicos. Determinación del número de cromosomas y el tamaño de los mismos.

Beta-cariológicos. Determinación de la morfología de los cromosomas basándose en la disposición del centrómero, pudiendo ser metacéntricos, acrocéntricos y telocéntricos, y son usualmente reportados en fotos, ideogramas, etc.

Gamma-cariológicos. Consiste en el teñido de ciertas regiones de los cromosomas, determinando homologías en la comparación de dos o varias especies.

Una información válida para establecer la filogenia que aporta el uso de cromosomas es la observación de inversiones por superposición, ya que estas nos permiten analizar los cambios cromosómicos que provocarán cambios en la expresión fenotípica.

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

Son un estimado general de la diversidad genética de enzimas y proteínas y su relación directa con el DNA y el RNA, estas se subdividen en:

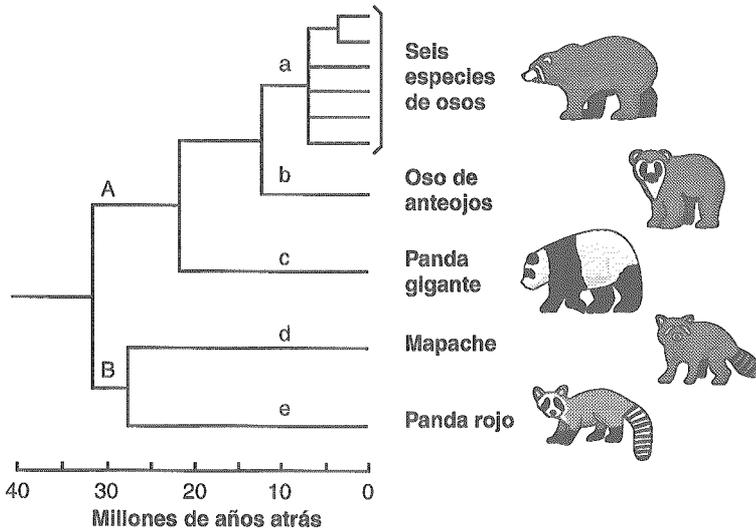


FIGURA 1. Arreglo filogenético observándose la posición genealógica del panda gigante, relacionado a familias de osos (Ursidae, línea A) y mapaches (Procyonidae, línea B), letras minúsculas representan subfamilias propuestas; método: bandeó cromosómico (Tomado de O'Brien, 1987).

INMUNOLÓGICAS

Se fundamentan en las propiedades antigénicas de las proteínas. Cuando se inyecta una proteína de una especie A en el organismo de una especie B, se genera anticuerpos que van a reconocer como extraña a la proteína inyectada, generando anticuerpos específicos para dicha proteína. En pasos posteriores se preparan extractos proteicos de las especies que se quiere analizar (C). Estos extractos se hacen reaccionar con los anticuerpos producidos por la especie B. Las diferencias entre antígenos-anticuerpos que envuelven a antígenos homólogos y heterólogos nos proveen la medida de la relación genética que existe entre los dos (usualmente expresados como las unidades de distancia inmunológica, ID) entre las proteínas de la especie A y C. La suposición principal bajo las pruebas inmunológicas es el nivel de "reconocimiento", el cual nos provee una guía cuantitativa de la similitud genética de las proteínas antigénicas a las cuales se ha sometido la prueba (Wilson, 1984).

Antiguamente se utilizaba la medida del precipitado que forma el complejo antígeno-anticuerpo en solución cruda.

Los datos que resultan de la prueba MCF (medición antígeno-anticuerpo) consisten en cuantificar la ID. Esto dependerá de la afinidad o diferencia entre especies. La estandarización en esta técnica es esencial, la alta

afinidad que posee la reacción antígeno-anticuerpo es capaz de medir un cambio simple de aminoácidos de las partes antigénicas de una proteína. Se mide el número de aminoácidos reemplazados que son responsables de diferencias entre sitios antigénicos de formas de proteínas sintetizados por genes ortólogos. La proteína más utilizada en mamíferos es la albúmina, por ser una proteína monomérica, es sintetizada por un solo gen, es abundante, fácil de purificar y tiene de 25 a 50 sitios antigénicos. Esta metodología sirve para discernir los niveles taxonómicos superiores de una especie (Maxson y Roberts, 1984).

ELECTROFORESIS

Se basa en el concepto de que cualquier carga migra hacia el polo opuesto cuando es sometida a un campo eléctrico. Cada proteína lleva una carga neta que es la sumatoria de las cargas positivas (lisina, arginina e histidina) y negativas (ácidos aspártico y glutámico) a cualquier pH que no sea el de sus puntos isoeléctricos. Muchos medios de soporte son de uso común, siendo los más populares la poliacrilamida, el acetato de celulosa y de almidón. La electroforesis en almidón es la más utilizada, debido a que no se requiere mayor infraestructura y es de bajo costo. Esta se utiliza para la visualización de enzimas solubles procedentes de diferentes fuentes como son hígado, sangre, corazón y músculo. Las enzimas a analizar son las isoenzimas, que son formas similares y funcionales de la misma enzima, incluyendo todos los polímeros de subunidades producidos por diferentes locis o por diferentes alelos en el mismo locus. Otras enzimas para analizar son las aloenzimas (subconjunto de isoenzimas), son variantes de polipéptidos que representan diferentes alternativas alélicas del mismo locus genético. Las muestras se colocan en los geles de almidón, se las somete a un campo eléctrico, haciendo que estas migren. A continuación, estos geles son revelados con tintes histoquímicos específicos para cada enzima. Por ejemplo la solución para teñir la lactato deshidrogenasa (LDH) incluye ácido láctico (substrato), NAD, fenansina-metosulfato (PMS) y NBT (colorante), de tal forma que la posición en el cual el LDH de un organismo ha migrado en el gel se puede observar gracias a que el ácido láctico es oxidado a piruvato y la sal es reducida a un precipitado azul visible como una banda discreta. Con el resultado de esta visualización se elaboran patrones de la enzima llamados zimogramas que posteriormente pueden ser interpretados en términos genéticos mendelianos simples. La mayoría de las enzimas son diméricas (43%), mientras que otras son monoméricas (28%) y tetraméricas (24%) (Shows, 1983).

AMINOÁCIDOS

Nos permite comparar la secuencia de aminoácidos entre especies relacionadas utilizando proteínas específicas. Para utilizar esta técnica hay que

tener claro dos conceptos: genes ortólogos, son genes homólogos resultado de la especiación, de tal forma que cambios en estos genes reflejan la historia evolutiva del grupo examinado, y genes parólogos, son genes no homólogos resultado de una duplicación génica, los mismos que guardan independencia durante la historia de la especiación de dicho grupo. Para la secuenciación, se utilizan proteínas ortólogas, las mismas que son sometidas a hidrólisis proteica (tripsina, quimiotripsina), los resultantes son pequeños péptidos, que son secuenciados utilizando varios métodos con HPLC (hidrólisis con ácidos débiles o anfolitos) (Fitch, 1976).

MARCADORES MOLECULARES

Los datos moleculares proporcionan información previamente inaccesible acerca de la base molecular de los cambios evolutivos. El aspecto más importante de la utilización de marcadores moleculares es que permiten una comparación directa de los niveles de diferenciación genética entre cualquier grupo de organismos.

La utilización de marcadores moleculares por lo general tiene ciertas ventajas sobre los métodos tradicionales, ya que proporcionan una mayor cantidad de datos informativos en menor tiempo y reflejan de mejor manera los polimorfismos existentes entre las unidades taxonómicas objeto del estudio. No obstante, estos métodos exigen personal capacitado en diversas técnicas bioquímicas y moleculares, así como una moderada inversión económica en cuanto a equipos e infraestructura.

Estos métodos se basan en las variaciones en las secuencias de nucleótidos (DNA) presentes en las poblaciones naturales, basados en mutaciones puntuales y nuevos arreglos en el genoma de las unidades taxonómicas. Estos polimorfismos pueden ser objeto de evaluación y análisis, los cuales se pueden realizar en los genomas nucleares y mitocondriales en el caso de los animales (Fig. 2), mientras que las plantas disponen de un genoma adicional, el del cloroplasto.

Actualmente, existe una amplia gama de técnicas mediante las cuales se generan diferentes tipos de marcadores moleculares, los cuales incrementan día a día con el desarrollo de nuevas y mejoradas técnicas moleculares. Un aspecto clave es la elección de un método específico y adecuado, el cual depende en gran medida del problema a ser resuelto o la hipótesis planteada (clasificación, filogenia, grado de especiación, divergencia y variaciones inter e intra específicas, entre otros).

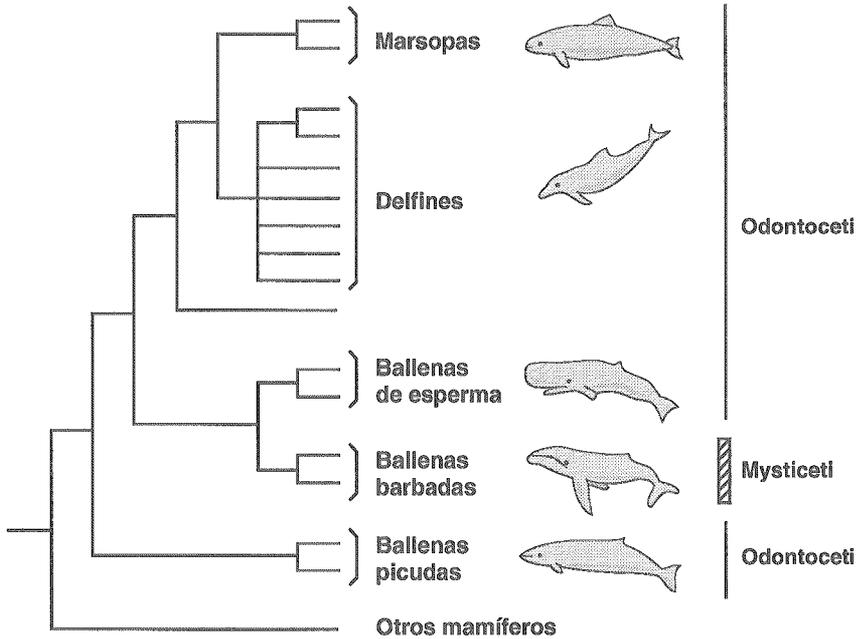


FIGURA 2. Arreglo filogenético de 16 especies de cetáceos, método: secuenciación del gene rRNA de DNA mitocondrial (Tomado de Milinkovitch et al., 1993).

MÉTODOS

Cualquier método comienza con el aislamiento del DNA (o en algunos casos, RNA) de las unidades taxonómicas que se someterán al análisis. Con la finalidad de asegurar la eficiencia de determinados métodos es necesario someter al extracto crudo a uno o varios procesos de purificación. Algunos métodos exigen también la utilización de grandes cantidades de DNA, este problema se ha podido superar a partir del desarrollo de la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), la cual permite la amplificación *in vitro* de segmentos específicos de DNA utilizando primers o secuencias sintéticas y específicas de DNA a partir de una muestra inicial muy pequeña.

Es fundamental distinguir entre los métodos que utilizan radioisótopos (técnicas radioactivas) y las técnicas no-radioactivas. A pesar de que los métodos radioactivos son extremadamente útiles, éstos demandan una infraestructura especial, personal capacitado en su manipulación y regulaciones en cuanto a la disposición de los desechos tóxicos generados por esta metodología. Debido a estos factores, la utilización de estas técnicas actualmente en el Ecuador sería muy limitada. Los métodos más ampliamente utilizados se sintetizan a continuación:

Polimorfismo en la longitud de un fragmento de restricción (RFLP)

- Análisis que se efectúa con DNA (nuclear o citoplasmático).
- Efectiva para evaluar la variabilidad intra e inter específica ya que tiene la capacidad de producir una gran cantidad de marcadores.
- Se fundamenta en la utilización de una batería de enzimas de restricción para digerir al DNA en secuencias determinadas (4 o 6 pares de bases) según la enzima que se utiliza. Esto da como resultado fragmentos de DNA con diferente peso molecular, los cuales se pueden visualizar por medio de electroforesis, en agarosa o poliacrilamida (PAGE). La diferencia entre las unidades taxonómicas en estos “perfiles de digestión” es el resultado de sustituciones de nucleótidos dentro de los sitios de hidrólisis, adiciones o deleciones de la molécula de DNA o nuevos arreglos en la secuencia de los nucleótidos. Cada una de estas fuentes de variación produce cambios en el patrón de bandeamiento.
- La desventaja consiste en que básicamente es una técnica radioactiva, aunque existen variaciones no radioactivas, y se necesita gran cantidad de DNA de alto grado o puro.

DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD)

- Se utiliza DNA nuclear o citoplasmático.
- Aplicación en el análisis de cultivos.
- Evalúa y analiza polimorfismos detectables utilizando primers (segmentos) de 10 pares de bases en longitud para amplificar secuencias aleatorias a partir de una secuencia desconocida de DNA. Los polimorfismos entre las unidades taxonómicas resultan de diferencias en uno o los dos sitios de unión a los primers. Son marcadores dominantes y se registran como ausencia o presencia de bandas a partir de una electroforesis.
- Técnica no radioactiva.
- La desventaja principal es que es un método no fielmente reproducible.
- Amplificación selectiva (digestión con enzimas de restricción)
- Se utiliza principalmente secuencias conocidas de DNA citoplasmático.
- Aplicación a nivel inter específico.
- Amplificación con PCR de una secuencia conocida de DNA utilizando primers específicos. El DNA amplificado se digiere con una batería de enzimas de restricción que dan lugar a polimorfismos entre las unidades taxonómicas resultantes de la presencia o ausencia de los sitios de restricción; estos son visualizados mediante patrones de bandeamiento por medio de electroforesis.
- Método no radioactivo.

Secuenciación de nucleótidos

- DNA nuclear o citoplasmático.
- Amplificación de un segmento de DNA, usualmente de una longitud de 500 pares de bases y su secuenciación utilizando dioxinucleótidos complementarios.
- Polimorfismos basados en cambios de regiones codificadoras en no codificadoras, transiciones (purinas o pirimidinas), transversiones (purina-pirimidina), sustitución de bases, adiciones o deleciones de nucleótidos o rearreglos de nucleótidos.
- La ventaja es que produce gran cantidad de caracteres informativos, sin embargo se sacrifica información al nivel de loci-genes.

ANÁLISIS DE DATOS

El análisis de datos se inicia con la codificación de los caracteres y la elaboración de una matriz de estudio. Esta matriz es sometida al análisis filogenético utilizando un algoritmo seleccionado, usualmente basado en parsimonia, como el PAUP (Análisis Filogenético Utilizando Parsimonia).

El árbol más parsimonioso es aquel que requiere el menor número de cambios evolutivos para explicar las diferencias entre las unidades taxonómicas.

Para ampliar los conocimientos sobre los principios y métodos de análisis en filogenética y sistemática consúltense Wiley (1981), Wiley et al. (1991) y Maddison y Maddison (1992).

LITERATURA CITADA

- Beverly, S. M. y A. C. Wilson. 1985. Ancient origin for Hawaiian *Drosophilinae* inferred from protein comparisons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82:4753–4757.
- Champion, A. B., E. M. Prager, D. Wachter y A. C. Wilson. 1974. Microcomplement fixation. Pp. 397–416 *en*: C. A. Wright (ed.), *Biochemical and immunology taxonomy of animals*. Academic Press. London.
- Fitch, W. M. 1976. Molecular evolutionary clocks. Pp. 160–178 *en*: F. J. Ayala (ed.), *Molecular evolution*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA.
- Hillis, D. M. y J. J. Bull. 1991. Of genes and genomes. *Science* 254:528–558.
- Maddison, W. P. y D. R. Maddison. 1992. *McClade. Analysis of phylogeny and character evolution. Version 3*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA. 398 pp.
- Maxson, L. R. y J. D. Roberts. 1984. Albumin and Australian frogs: molecular data a challenge speciation model. *Science* 225:957–958.

- Milinkovitch, M. C., G. Orti y A. Meyer. 1993. Revised phylogeny of whales suggested by mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Nature* 361:346–348.
- O'Brien, S. J. 1987. The ancestry of the giant panda. *Scientific American* 257(5):102–107.
- Shows, T. B. 1983. Human genome organization of enzyme loci and metabolic diseases. *Isozymes* 323–339.
- Wiley, E. O. 1981. *Phylogenetics. The theory and practice of phylogenetic systematics*. Wiley-Interscience. New York. 439 pp.
- Wiley, E. O., D. Siegel-Causey, D. R. Brooks y V. A. Funk. 1991. *The compleat cladist. A primer of phylogenetic procedures*. The University of Kansas. Natural History Museum. Special Publications 19:1–158.
- Wilson, E. O. 1984. *Biophilia*. Harvard University Press. Cambridge. 157 pp.
- White, M. J. 1978. *Modes of speciation*. W. H. Freeman and Company. San Francisco.

Recibido en marzo de 1997