
Análisis filogenético comparativo entre secuencias codificadoras (Cyt b y ATPasa 8) y secuencias no codificadoras (D-Loop) del ADN mitocondrial de primates y sus implicancias evolutivas en los homínidos

PHYLOGENETIC ANALYSIS COMPARING CODING (Cyt b and ATPase 8) AND NONCODING (D-Loop) SEQUENCES OF PRIMATE MITOCHONDRIAL DNA. EVOLUTIONARY CONSEQUENCES IN HOMINIDS.

Carlos Scotto E.¹

RESUMEN

Las secuencias del ADN mitocondrial (ADNmt) de animales vertebrados han sido estudiadas desde hace 25 años. Sólo ahora se cuenta con el genoma mitocondrial completo de muchas especies para hacer un análisis más detallado de cómo evolucionan sus secuencias y como esto influye en la construcción de árboles filogenéticos con la aplicación de los diferentes modelos matemáticos y programas bioinformáticos. En definitiva, aún existe un recurrente debate evolutivo acerca de cuáles secuencias mitocondriales son las más adecuadas de utilizar para explicar mejor los procesos que operan dentro de las especies animales. Por lo tanto, el presente trabajo se propone analizar todas las posibles alternativas de solución utilizando tanto secuencias mitocondriales nucleotídicas como aminoácidas.

PALABRAS CLAVE

ADN mitocondrial, D-Loop, Cyt b, ATPasa 8, homínido.

ABSTRACT

Mitochondrial DNA (mtDNA) sequences of vertebrates have been studied for 25 years. Now, we have complete sequences of mitochondrial genomes of many species and this allows a more detailed analysis on the evolution of these sequences and how this influences the construction of phylogenetic trees with the application of different mathematical models and bioinformatics programs. Definitely, an old evolutionary discussion has come back about which mitochondrial sequences are the most appropriate to use in order to explain the processes operating within animal species. Therefore, the aim of this paper is to analyze all these possible alternatives using mitochondrial nucleotide and amino acid sequences.

KEY WORDS

Mitochondrial DNA, D-Loop, Cyt-b, ATPase 8, hominid.

INTRODUCCIÓN

Ventajas del uso del ADNmt de vertebrado

El ADN mitocondrial de vertebrado posee características únicas como marcador molecular (es una molécula circular pequeña entre 16 y 18 Kpb, está presente en cientos o miles de copias por célula, codifica pocos genes (37 en total = 13 genes + 02 ARNm + 22 ARNt) cuya disposición esta muy conservada evolutivamente, posee una región reguladora o D-Loop de 0.9 a 1.1 Kp que hace variar el tamaño del ADNmt, posee herencia materna o uniparental, no hay recombinación génica, tiene un alta tasa mutacional diez veces superior al ADN nuclear (2% cada millón de años), carece de DNA repetitivo (pseudogenes, transposones e intrones) y el tipo de cambio genético es mayormente por sustitución y algunas deleciones o adiciones ocurren en pocos nucleótidos¹.

Los genes mitocondriales

Los genes codificados por el ADNmt de los vertebrados se caracterizan por traslaparse, estar adyacentes o saltarse algunas bases nitrogenadas unos de otros. El ADNmt ha evolucionado hasta contener la menor cantidad posible de secuencias inútiles. Pero esta situación ha provocado que el ADNmt no posea secuencias de ADN regulador, donde las enzimas polimerasas puedan corregir los errores en la secuencia cometidos durante el proceso de replicación o de transcripción. El 93% del ADNmt posee secuencias codificadoras: ARNr, ARNt y ARNm que codifican a las proteínas que constituyen la membrana interna de la mitocondria. Además, posee dos regiones no codificadoras denominadas (7%): D-Loop o Rizo de Desplazamiento y la región Ori donde se inicia la replicación. Estas dos regiones difieren en

¹ M.Sc., Blgo., Laboratorio de Investigación Animal, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas – Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima – Perú.
Email: carlosscotto@yahoo.com

longitud nucleotídica lo cual explica la diferencia de tamaño entre las diferentes moléculas de ADNmt entre y dentro de las especies de animales. Los vertebrados poseen los mismos tipos de genes pero existen diferencias entre las aves y el resto de vertebrados. Así, las proteínas ND6 y la Cyt b en las aves poseen un ordenamiento invertido al resto de vertebrados, estando separados los primeros por un ARNt, mientras que en los otros vertebrados por dos ARNt^{2, 3}.

Región de desplazamiento o D-Loop

Es una región del ADNmt de un promedio de 1,100 nucleótidos de longitud. Esta sección nucleotídica no codifica ninguna información ni en la Cadena H ni en la Cadena L. La región D-Loop funciona como lugar de inicio de la replicación de la cadena H y de la transcripción de las cadenas H y L del ADNmt. Esta región presenta varios bloques de secuencias nucleotídicas homólogas entre las diferentes especies. Estos bloques están separados por secuencias de longitud variable que no presentan ninguna homología entre las diferentes especies (regiones hipervariables). La región entre el extremo 5' y la región del gen de ARNt-Fenilalanina mitocondrial parece ser una de las regiones menos conservadas y que además hace variar el tamaño del ADNmt entre las diferentes especies. Así, por ejemplo, mide 385 nucleótidos en la especie humana y 180 en el vacuno. Esta diferencia de longitud nucleotídica explicaría la divergencia de tamaño entre el ADNmt de humano y el de vacuno, cuyas longitudes miden 16,559 y 16,338 nucleótidos respectivamente¹.

La ATPasa subunidad 8

La proteína ATPasa 8 está codificada por la cadena H del ADNmt, posee una longitud promedio entre 55 y 68 aminoácidos. El gen de ATPasa 8 se transcribe junto con el gen de ATPasa 6 en la molécula ARN mensajero mitocondrial 14, cuyo número de nucleótidos es de 843. Y es parte del complejo V de la cadena de electrones de la membrana interna⁴.

La proteína citocromo oxidorreductasa subunidad b (Cyt b)

La proteína Cyt b está codificada por la cadena H del ADNmt. Está constituida por 380 aminoácidos en promedio. El gen Cyt b se transcribe en la molécula ARN mensajero mitocondrial 11, cuyo número de nucleótidos es de 1140, y es parte del complejo III de la cadena de electrones de la membrana interna. Es la única proteína mitocondrial que no interacciona con ninguna proteína de origen nuclear⁴.

Diferentes tasas mutacionales en las secuencias mitocondriales

Algunas secuencias nucleotídicas del ADNmt evolucionan a distintas tasas mutacionales, algunas en forma lenta (secuencias codificadoras) otras en forma rápida (D-Loop).

Además, la divergencia de las secuencias mitocondriales en el tiempo tiende a reducirse por efectos de “saturación nucleotídica” (transversiones, transiciones), teniendo un efecto de “ruido o error” al momento de construir árboles filogenéticos. Por lo tanto, debe utilizarse secuencias de especies o de poblaciones estrechamente relacionadas separadas sólo por algunos millones de años⁵. En cuanto a las secuencias codificadoras mitocondriales que traducen una proteína, se sabe que las “mutaciones silentes” son el 78% del total de mutaciones. En comparación con el 22% que alteran la estructura proteica final⁶.

Libertad para el error catastrófico

El ADNmt no codifica proteínas involucradas directamente en su propia replicación, transcripción y traducción pues sólo codifica 13 tipos de proteínas mitocondriales. Esta deriva del código genético del ADNmt implica una tolerancia a los errores ocurridos durante el cambio de un código a otro, es decir, durante los procesos de transcripción y de traducción. En resumen, la alta tasa de evolución del ADNmt parece ser una consecuencia de dos fuerzas, una general, probablemente una presión mutacional que afecta la secuencia total de las bases y una específica, relacionada al constreñimiento en los componentes del aparato de traducción que afecta primariamente a los genes no traducibles como son el ARNt, ARNr y al D-Loop¹.

¿Por qué los árboles son diferentes?

Poco se ha discutido sobre este tema, sin embargo se conoce que existen fuerzas como la migración, selección y la mutación, que afectarían a larga la construcción de un solo árbol sino de varios a la vez. Además está el hecho que no todas las secuencias poseen la misma tasa mutacional acrecentando la dificultad de una construcción filogenética⁷.

Los primates

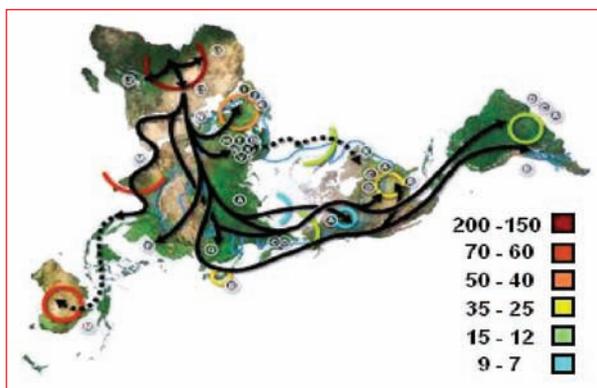
Taxonómicamente el Orden primates (Linnaeus, 1758) está incluido dentro del *Subphylum vertebrata*, Clase *Mammalia* (Linnaeus, 1758), Subclase *Theria* (Parker & Haswell, 1897) y consta de 14 Familias: *Callitrichidae* (Gray, 1821), *Cebidae* (Bonaparte, 1831), *Cercopithecidae* (Gray, 1821), *Cheirogaleidae* (Gray, 1873), *Daubentoniidae* (Gray, 1863), *Galagonidae* (Gray, 1825), *Hominidae* (Gray, 1825), *Hylobatidae* (Gray, 1871), *Indridae* (Burnett, 1828), *Lemuridae* (Gray, 1821), *Loridae* (Gray, 1821), *Megaladapidae* (Major, 1893), *Pitheciidae* (Mivart, 1865) y *Tarsiidae* (Gray, 1825).

La historia evolutiva de los homínidos

Se proclama que descendemos de un único antepasado femenino, una mujer africana prehumana que vivió hace unos doscientos mil años, y cuyos descendientes se habrían extendido desde el continente africano a todo el planeta hace

ciento cincuenta mil a doscientos mil años, sustituyendo a las especies existentes de *Homo sapiens* de entonces⁸. Posteriormente, hace 60 a 70 mil años migró del continente africano primero al Oeste y Sur de Asia y luego al Este asiático. Luego, parte del grupo del Asia Occidental atravesó el Cáucaso rumbo a Europa hace cuarenta a cincuenta mil años. Y el grupo de Asia Oriental ingresó a América del Norte hace treinta y seis mil y llegó a Sudamérica hace siete mil años⁹ (Ver Figura N° 01).

Figura N° 01
Migración humana de acuerdo al análisis del ADN mitocondrial.



El Neanderthal

El *H. neandertalensis* existió desde hace doscientos cincuenta mil años hasta hace treinta mil años atrás. El mayor debate es sobre si el hombre de Neanderthal fue una especie separada, *Homo neandertalensis*, o fue una subespecie de *Homo sapiens* llamada *Homo neandertalensis*. Sin embargo, los últimos estudios indicarían que no hubo flujo génico entre *H. neandertalensis* y *H. sapiens*. Por lo tanto, fueron dos especies separadas¹⁰.

MATERIAL Y MÉTODO

Se obtuvo del Genbank como marcadores moleculares de 29 vertebrados; la secuencia nucleotídica no codificadora del D-Loop (o región controladora) y dos secuencias nucleotídicas codificadoras de proteínas, el Citocromo b (alta tasa mutacional) y la ATPasa 8 (baja tasa mutacional). También del Genbank (Blastp) se recuperó las secuencias aminoácidas del Cyt b y la ATPasa 8; haciendo un total de 137 secuencias analizadas distribuidas entre 05 no primates (géneros *Danio*, *Xenopus*, *Iguana*, *Gallus* y *Bos*), 06 primates no humanos (géneros *Cercopithecus*, *Macaca*, *Hylobates*, *Pongo*, *Gorilla*, *Pan*), 04 primates extintos de distinta ubicación geográfica europea (*Neandertal*), 14 humanos modernos (género *Homo*) distribuido en los cinco continentes (01 de África, 04 de Asia, 04 de Europa, 02 de Oceanía, 03 de América). Tanto al grupo de los no primates (u otros vertebrados),

como al de los primates se les utilizará como grupos externos dependiendo del tipo de análisis. Para las 29 especies se buscó la secuencia de consenso y se editó las secuencias con el programa BioEdit. Se alinearon con el Clustal X. Se construyeron los árboles filogenéticos utilizando los modelos matemáticos de Jukes-Cantor y Kimura 02 con máxima parsimonia (Bootstrap) para las secuencias nucleotídicas. El modelo matemático de MAP con máxima parsimonia (Bootstrap) para las secuencias aminoácidas. Además, se realizó un análisis de secuencias nucleotídicas sólo en primates y humanos utilizándose el programa Network.

RESULTADOS

En la Tabla N° 01 las especies analizadas fueron; no Primates: pez (*Danio rerio*), anfibio (*Xenopus laevis*), reptil (*Iguana iguana*), ave (*Gallus gallus*), mamífero (*Bos taurus*). Primates no humanos: Mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), Mono rhesus (*Macaca mulatta*), Gibón (*Hylobates lar*), Orangután (*Pongo pygmaeus*), Gorila (*Gorilla gorilla*) y Chimpancé (*Pan troglodytes*). Primates humanos extintos: Hombre de Neanderthal de Alemania, Bélgica, Italia y Rusia (*Homo neandertal*). Y primates humanos actuales (*Homo sapiens*) de África, Israel, India, China, Malasia, Italia, España, Alemania, Finlandia, Australia, Melanésia, Indio Cherokee de Estados Unidos de Norteamérica, Brasil, Índio Warao Sudamericano.

Para las secuencias nucleotídicas de peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos se analizaron secuencias alineadas editadas de 1160pb para el D-Loop, 207pb para la ATPasa 8 y 1136pb para el Cyt b (Tabla N° 02). Además, se encontró que el % de G+C fue mayor en reptiles, aves y mamíferos que el resto de vertebrados.

- Longitud de secuencia nucleotídica analizada después del alineamiento con el CLUSTALX (Multiple Sequence Alignment Program, versión 1.83, 2003).

Para las secuencias aminoácidas de peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos se analizaron secuencias alineadas de 50 aminoácidos para la ATPasa 8 y de 378 para la Cyt b (Tabla N° 03).

- Longitud de secuencia aminoácida analizada después del alineamiento con el CLUSTALX (Multiple Sequence Alignment Program, versión 1.83, 2003).

Independientemente para la secuencia nucleotídica del D-Loop de los vertebrados analizados el % de tipos de nucleótidos fue de mayor a menor como sigue: T>A>G>C. Mientras que el % de nucleótidos para el Cyt b fue: C>A>T>G. Y para la ATPasa 8 fue: A>C>>T>G (Tabla N° 04).

Tabla N° 01
Número de acceso al Genbank de los vertebrados analizados.

Vertebrado	Especie animal	N°. Acceso al GenBank	Secuencias Nucleotídicas		Secuencias Aminoacídicas
			D-Loop	Cyt b + ATPasa 8	Cyt b + ATPasa 8
No primate	Pez (Danio rerio)	NC002333	X	x	x
	Anfibio (Xenopus laevis)	NC001573	X	x	x
	Reptil (Iguana iguana)	NC002793	X	x	x
	Ave (Gallus gallus)	NC001323	X	x	x
	Mamífero (Bos taurus)	NC006853	X	x	X
Primate no humano	Mono verde africano (Cercopithecus aethiops)	NC007009	X	x	x
	Mono rhesus (Macaca mulatta)	NC005943	X	x	x
	Gibón (Hylobates lar)	NC002082	X	x	x
	Orangután (Pongo pygmaeus)	NC001646	X	x	x
	Gorila (Gorilla gorilla)	NC001645	X	x	x
	Chimpancé (Pan troglodytes)	NC001643	X	x	x
Primate humano extinto	Neardenthal aleman (Homo sapiens neanderthalensis)	AY149291	X	~	~
	Neardenthal belga (Homo sapiens neanderthalensis)	DQ464008	X	~	~
	Neardenthal italiano (Homo sapiens neanderthalensis)	DQ836132	X	~	~
	Neardenthal ruso (Homo sapiens neanderthalensis)	AF254446	X	~	~
África	Africano (Homo sapiens sapiens)	AF347015	X	x	x
Asia	Israelita (Homo sapiens sapiens)	DQ301797	X	x	x
	Hindú (Homo sapiens sapiens)	AF382013	X	x	x
	Chino (Homo sapiens sapiens)	AY963575	X	x	x
	Malayo (Homo sapiens sapiens)	AY963579	X	x	x
Europa	Italiano (Homo sapiens sapiens)	DQ341088	X	x	x
	Español (Homo sapiens sapiens)	AF382009	X	x	x
	Alemán (Homo sapiens sapiens)	AF346983	X	x	x
	Finlandes (Homo sapiens sapiens)	AY339402	X	x	x
Oceanía	Australiano (Homo sapiens sapiens)	AY289062	X	x	x
	Melanesio (Homo sapiens sapiens)	AY963574	X	x	x
América	Indio norteamericano cherokee (Homo sapiens sapiens)	DQ661681	X	x	x
	Brasileño (Homo sapiens sapiens)	DQ341087	x	x	x
	Índio sudamericano warao (Homo sapiens sapiens)	AF347012	x	x	x

X = Secuencia mitocondrial completa disponible en el Genbank. No primate (Color marrón), primate no humano (color violeta), primate humano extinto (color azul), primate humano actual (color rojo).

Tabla N° 02
Comparación de la longitud promedio de las secuencias nucleotídicas mitocondriales analizadas (D-Loop, ATPasa 8 y Cyt b).

Vertebrado	ADNmt	%GC	Secuencias nucleotídicas		
			D-Loop	ATPasa 8	Cyt b
Peces	16300-16700	39	950	~168	~1140
Anfibia	16400-19000	36	2130	~168	~1140
Reptil	16600-18800	45	~1200	~168	~1140
Aves	16700-18100	45	~1200	~168	~1140
Mamíferos	16500-16700	39-44	~1100	~210	~1140
*Longitud analizada			1160	207	1136

Independientemente para la secuencia aminoacídica de los vertebrados analizados. El Cyt b presentó mayor porcentaje del aminoácido Asparagina (32,5%) seguido de Cisterna (25%). La ATPasa 8 mostró también mayor porcentaje de Asparagina (33,3%) seguido de Cisteína (28,8%) (Tabla N° 05).

Para el análisis filogenético molecular de los vertebrados analizados se utilizó el programa Mega (11).

Se construyeron los árboles filogenéticos para todos los vertebrados analizados (no primates, primates no humanos y humanos extintos y actuales), utilizándose Jukes-Cantor y Kimura 2 con máxima parsimonia (Bootstrap) para las secuencias nucleotídicas de D-Loop, Cyt b y ATPasa 8 (Figuras N° 02, 03, 04, 05, 06 y 07).

Tabla N° 03
Comparación de la longitud promedio de las secuencias aminoacídicas mitocondriales analizadas (ATPasa 8 y Cyt b).

Vertebrado	Longitud de secuencias aminoacídicas	
	ATPasa 8	Cyt b
Peces	~55	~380
Anfibia	~55	~380
Reptil	~55	~380
Aves	~55	~380
Mamíferos	68	~380
*Longitud analizada	50	378

Se construyeron los árboles filogenéticos para todos los vertebrados analizados (no primates, primates no humanos y humanos extintos y actuales) utilizándose el modelo matemático de MAP con máxima parsimonia (Bootstrap) para las secuencias aminoacídicas de Cyt b y ATPasa 8 (Figuras N° 08 y 09).

Se realizó un análisis de las secuencias nucleotídicas del D-Loop, Cyt b y ATPasa 8 sólo en primates y sólo en humanos utilizándose el programa Network (Figuras N° 10, 11, 12, 13 y 14).

Tabla N° 04
Comparación del porcentaje de nucleótidos del D-Loop, Cyt b, ATPasa 8 de los vertebrados analizados.

Secuencia nucleotídica	Porcentaje de nucleótidos (%)			
	T	C	A	G
D-Loop	28.7	20.2	27.1	24.0
Cyt b	25.8	33.3	28.8	12.1
ATPasa 8	22.5	32.9	38.0	6.6

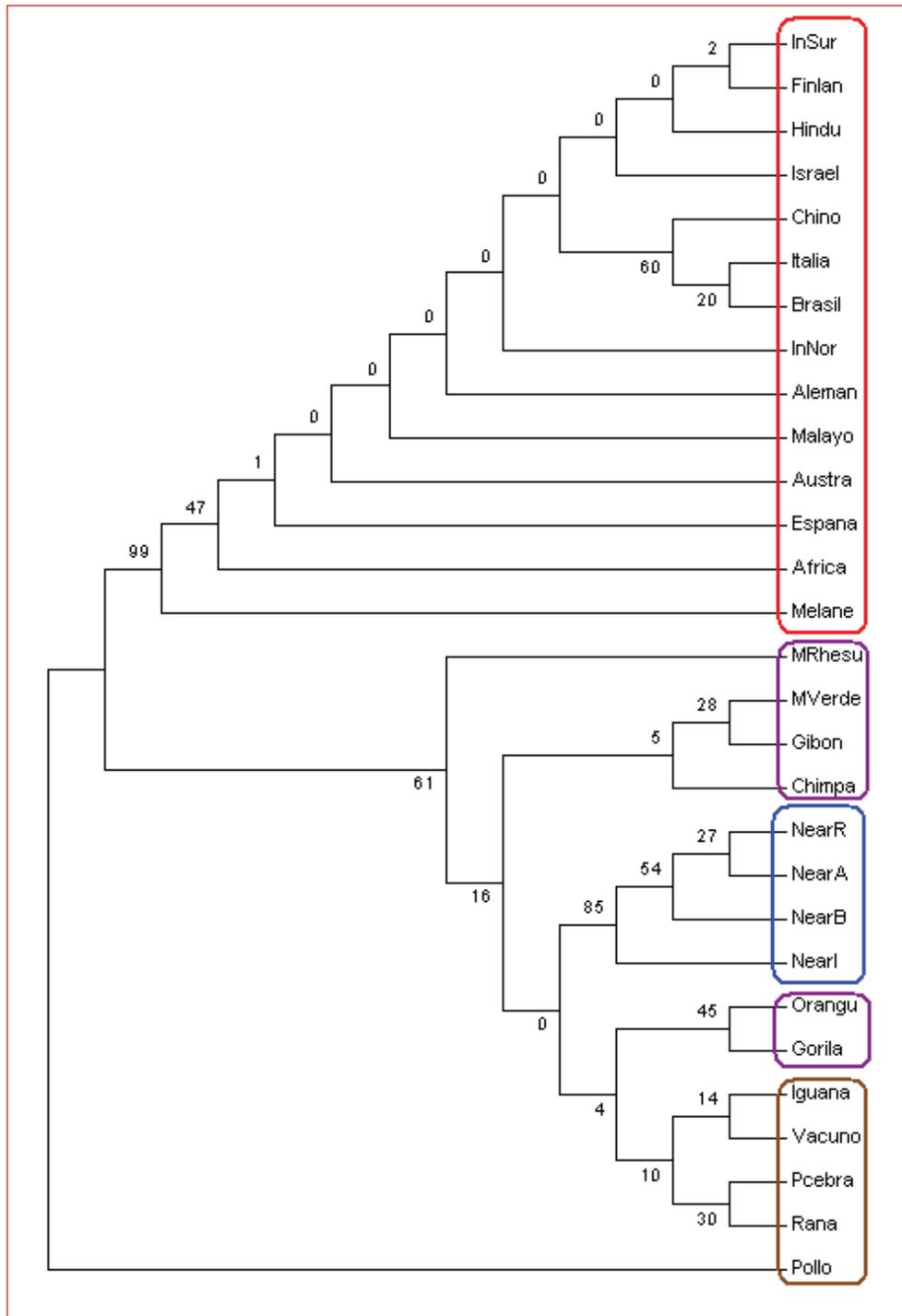
Tabla N° 05
Comparación de las frecuencias aminoacídicas promedio (en porcentaje) del Cyt b y ATPasa 8 de los vertebrados analizados.

Secuencia aminoacídica	Porcentaje de aminoácidos (%)			
	Cys	Asp	His	Thr
Cyt b	25	35.2	16	23.8
ATPasa 8	28.8	33.3	12.0	25.7

DISCUSIÓN

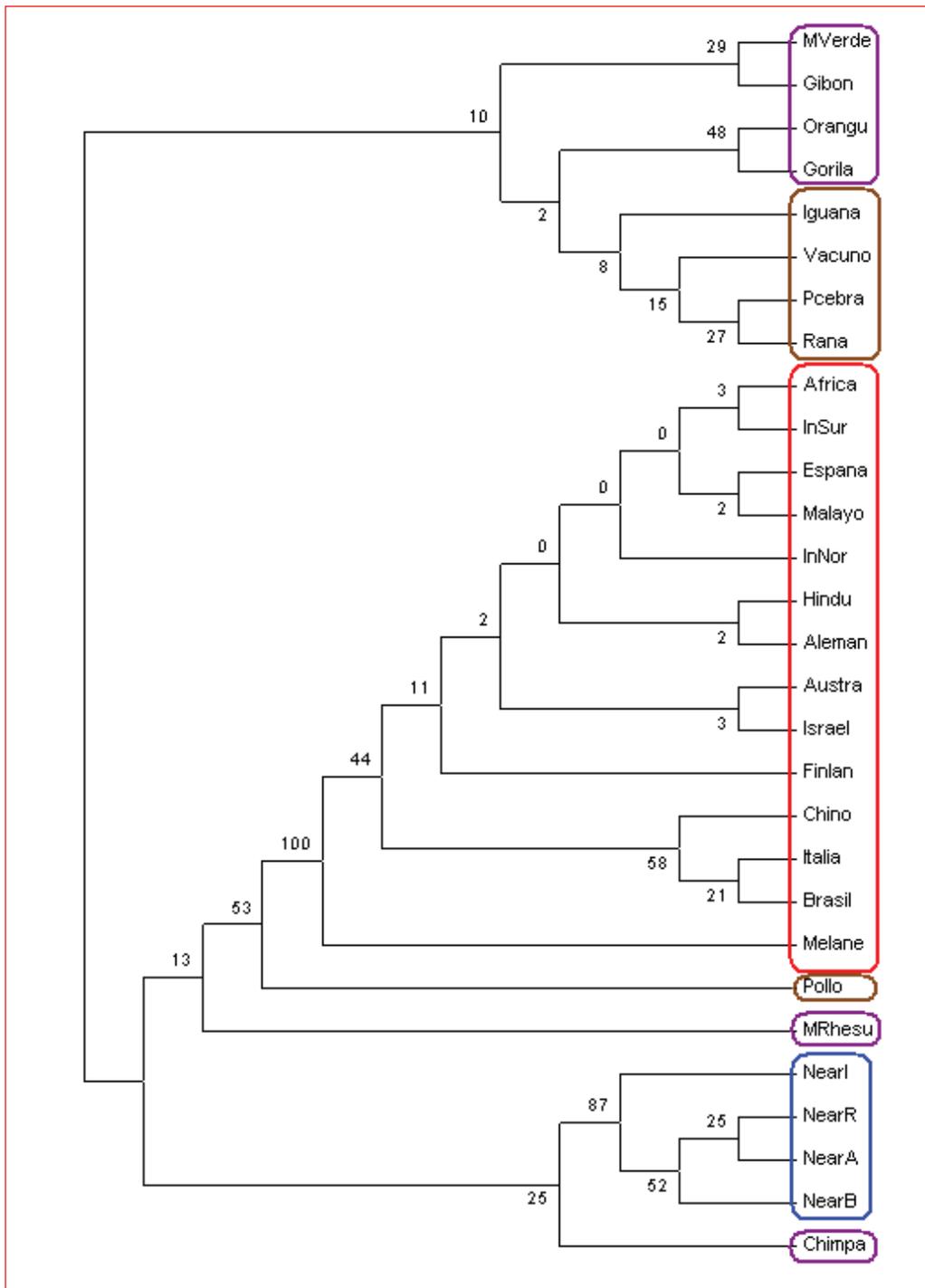
Tanto en las Figuras N° 02 y 03 se observó un ordenamiento distinto de las especies de vertebrados analizados en este artículo. En el modelo de Jukes-Cantor (Figura N° 02) el grupo externo esta separado mostrando al pollo fuera y ubicado entre los humanos y mono Rhesus, el resto de especies no primates (en marrón) se encuentra agrupado junto con el resto de primates y chimpancé (en morado) esta agrupado con los Neandertal que se muestran agrupados todos como un solo grupo (en azul) igual que los humanos (en rojo). En el modelo de Kimura 2 (Figura N° 02), los humanos están todos agrupados (en rojo). El Neanderthal está agrupado (en azul) y flanqueado por dos grupos de primates no humanos (en violeta). El resto de vertebrados no primates se encuentran agrupados y más alejados filogenéticamente que el resto de vertebrados. Para secuencia nucleotídica del D-Loop el Modelo de Kimura 2 es más concordante con la historia natural de estas especies lo cual le da más consistencia al análisis filogenético. Para el caso de humanos se cumple también la misma regla debido a que el modelo de Jukes-Cantor (Figura N° 03), muestra agrupamientos “raros” como africano con Indio Sudamericano o hindú con alemán. Además, coloca a africano como más reciente igual que al australiano. En cambio el modelo de Kimura 2 (Figura N° 02) coloca al africano y

Figura N° 02: Bootstrap de la secuencia nucleotídica del D-Loop mitocondrial de vertebrados (Máxima Parsimonia, Kimura 2).



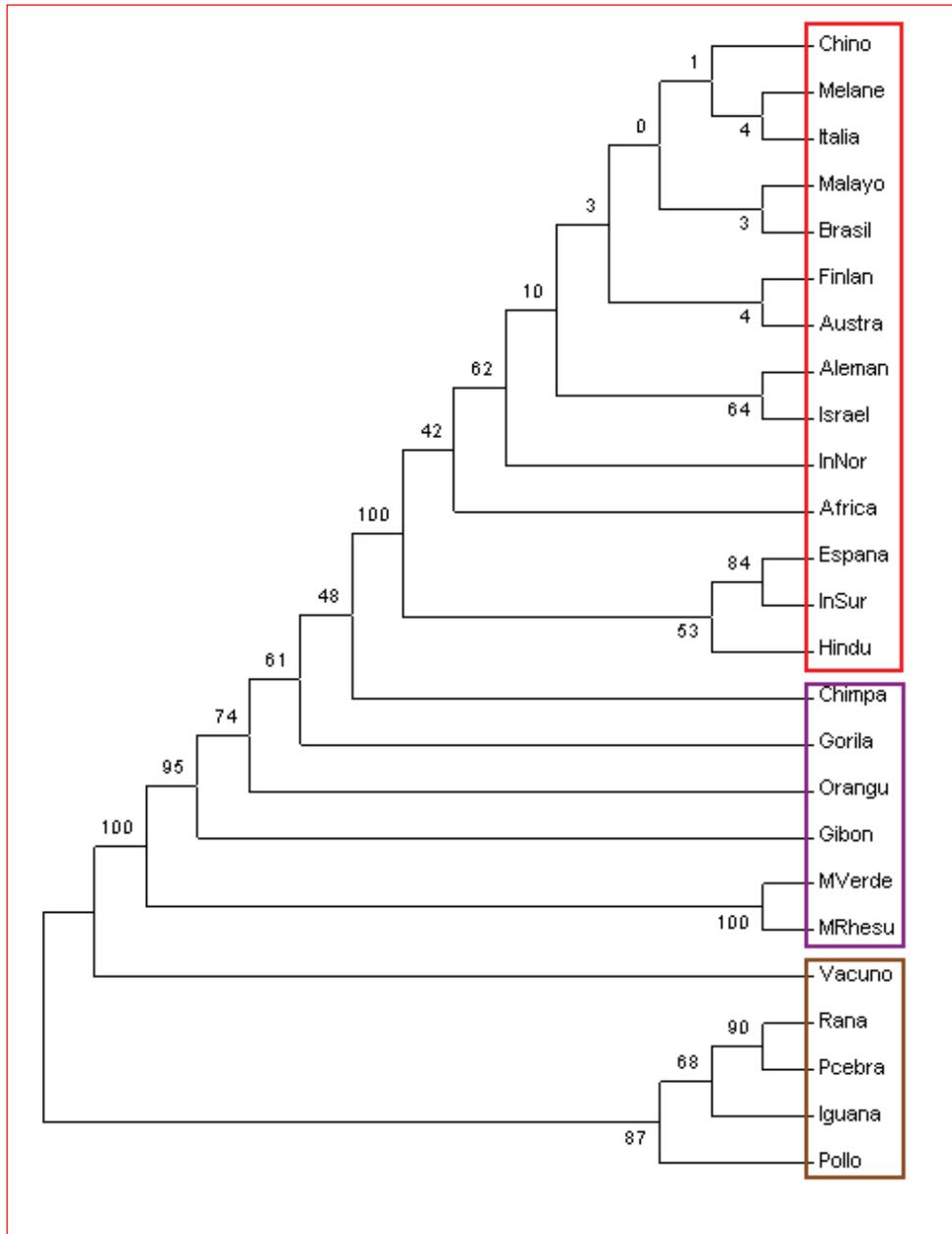
Rojo = Primates humanos, Azul = Neanderthal,
Violeta = Primates no humanos, Marrón = Otro vertebrado

Figura N° 03: Bootstrap de la secuencia nucleotídica del D-Loop mitocondrial de vertebrados (Máxima Parsimonia, Jukes-Cantor).



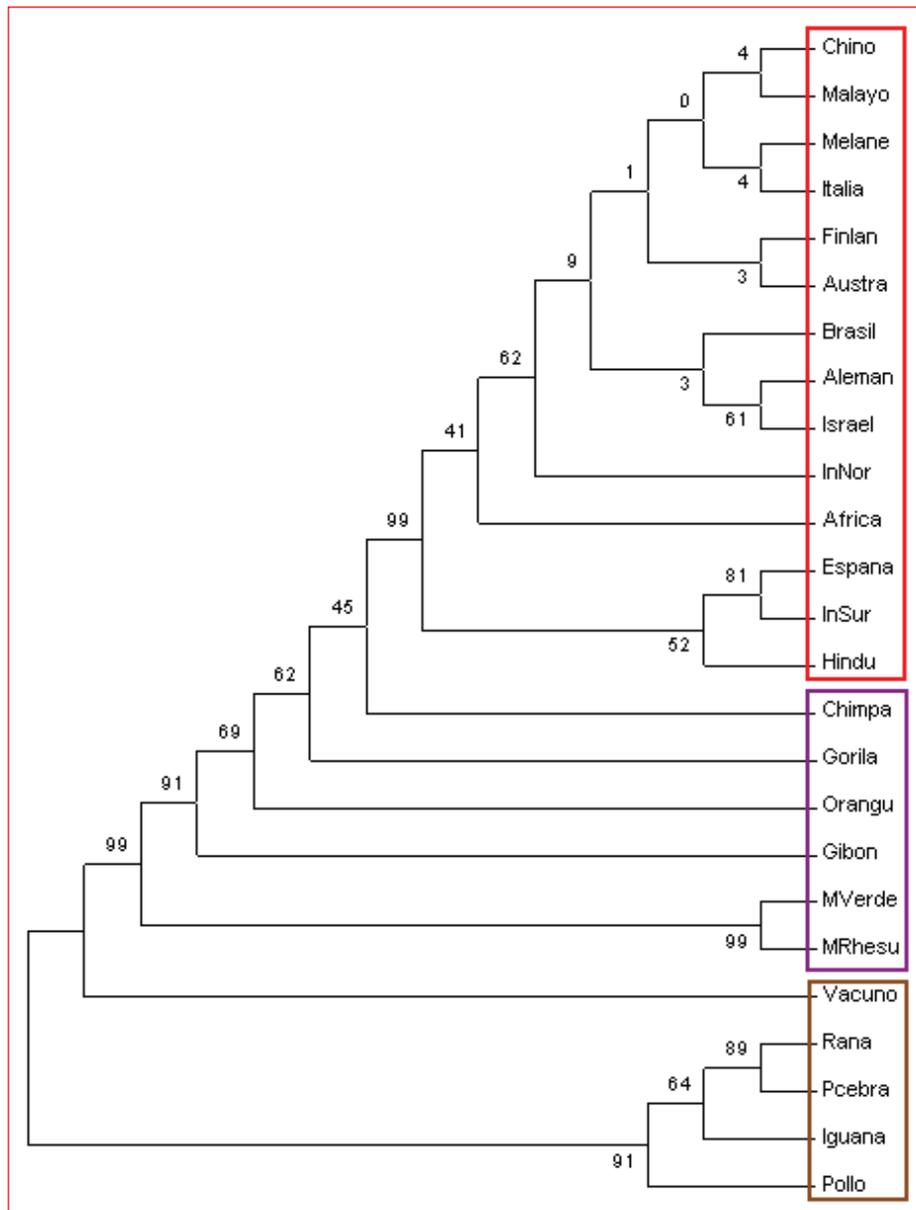
Rojo = Primates humanos, Azul = Neanderthal,
 Violeta = Primates no humanos, Marrón = Otros vertebrados.

Figura N° 04
Bootstrap de la secuencia nucleotídica del Cyt b mitocondrial de vertebrados (Maxima Parsimonia, Kimura 2).



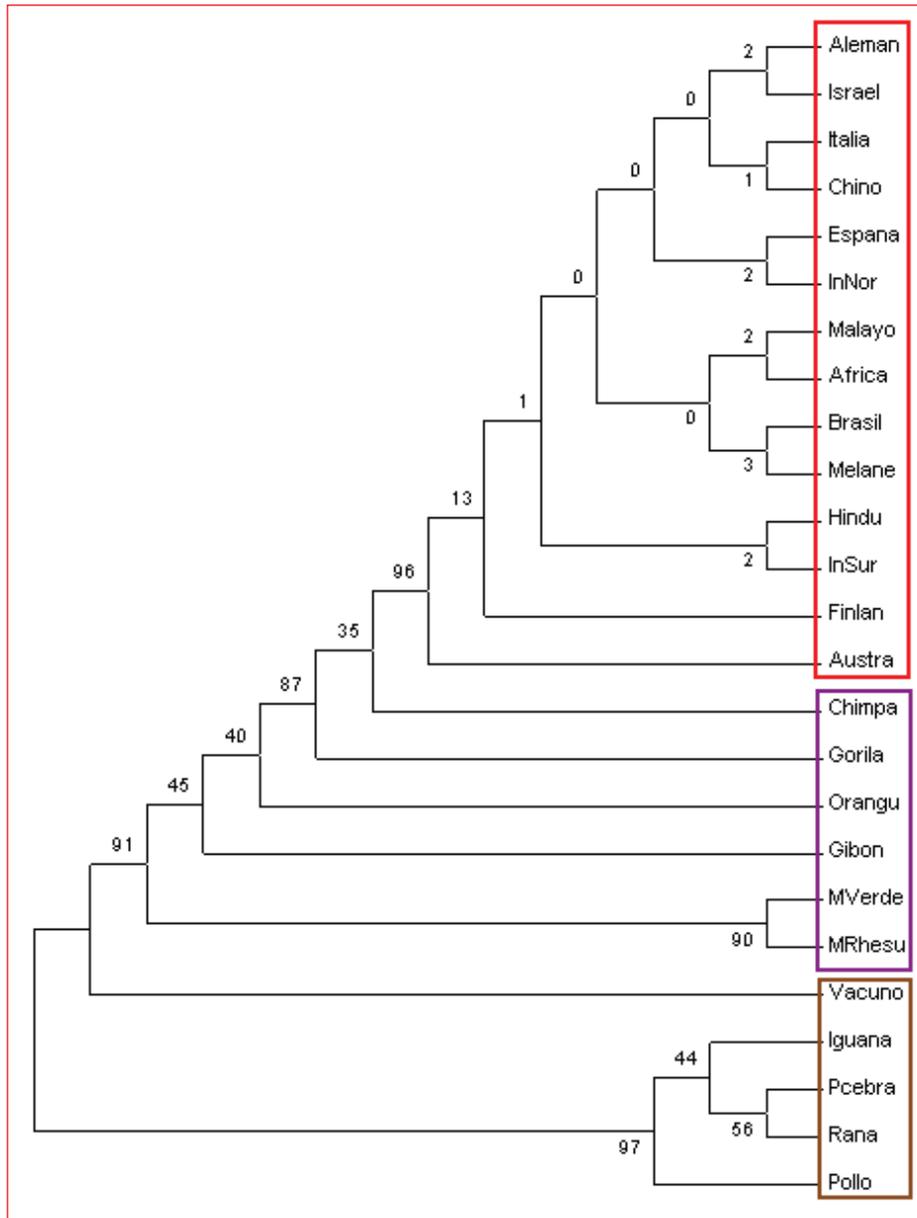
Rojo = Primates humanos
Violeta = Primates no humanos
Marrón = Otros vertebrados.

Figura N° 05
Bootstrap de la secuencia nucleotídica del Cyt b
mitocondrial de vertebrados (Maxima Parsimonia, Jukes-Cantor).



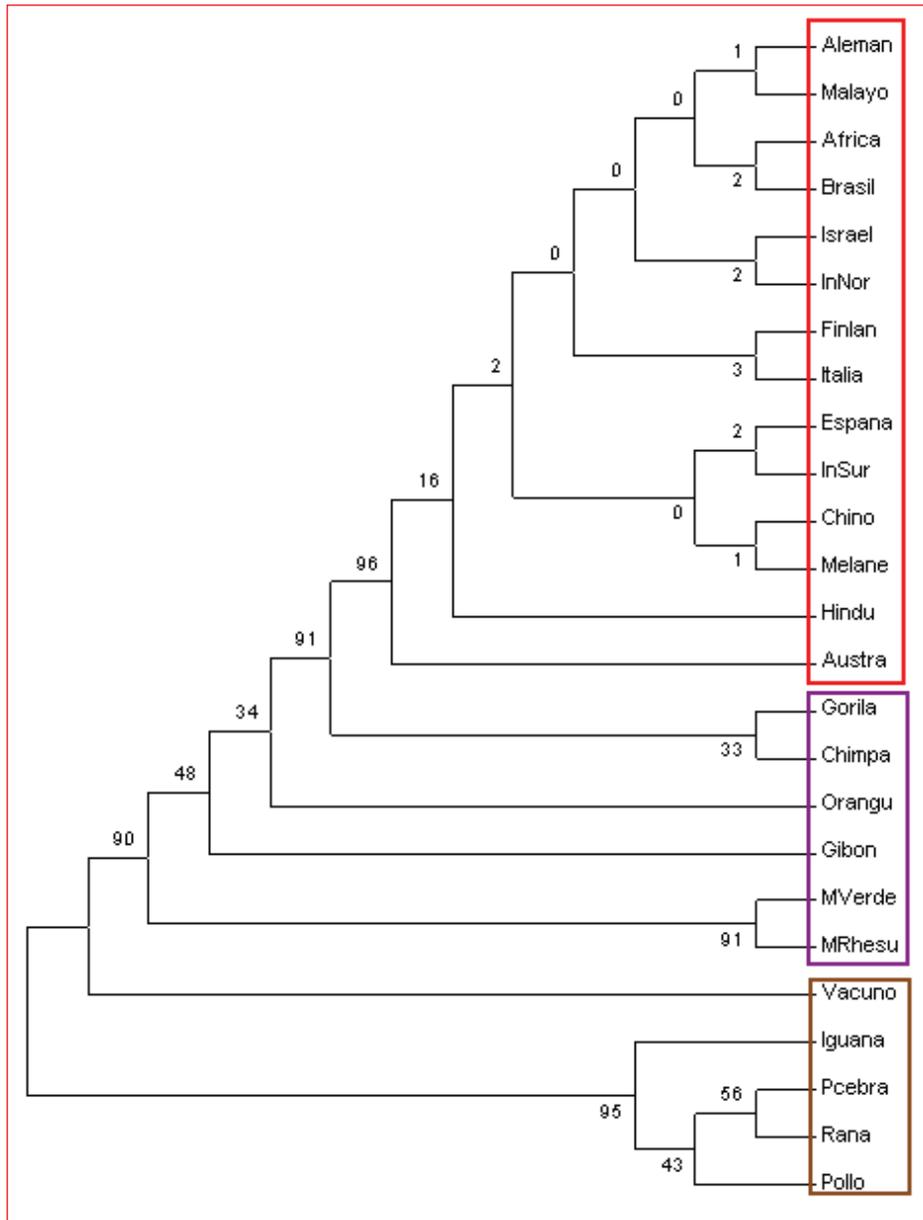
Rojo = Primates humanos,
Violeta = Primates no humanos
Marrón = Otros vertebrados.

Figura N° 06
Bootstrap de la secuencia nucleotídica de la ATPasa 8
mitocondrial de vertebrados (Maxima Parsimonia, Kimura 2).



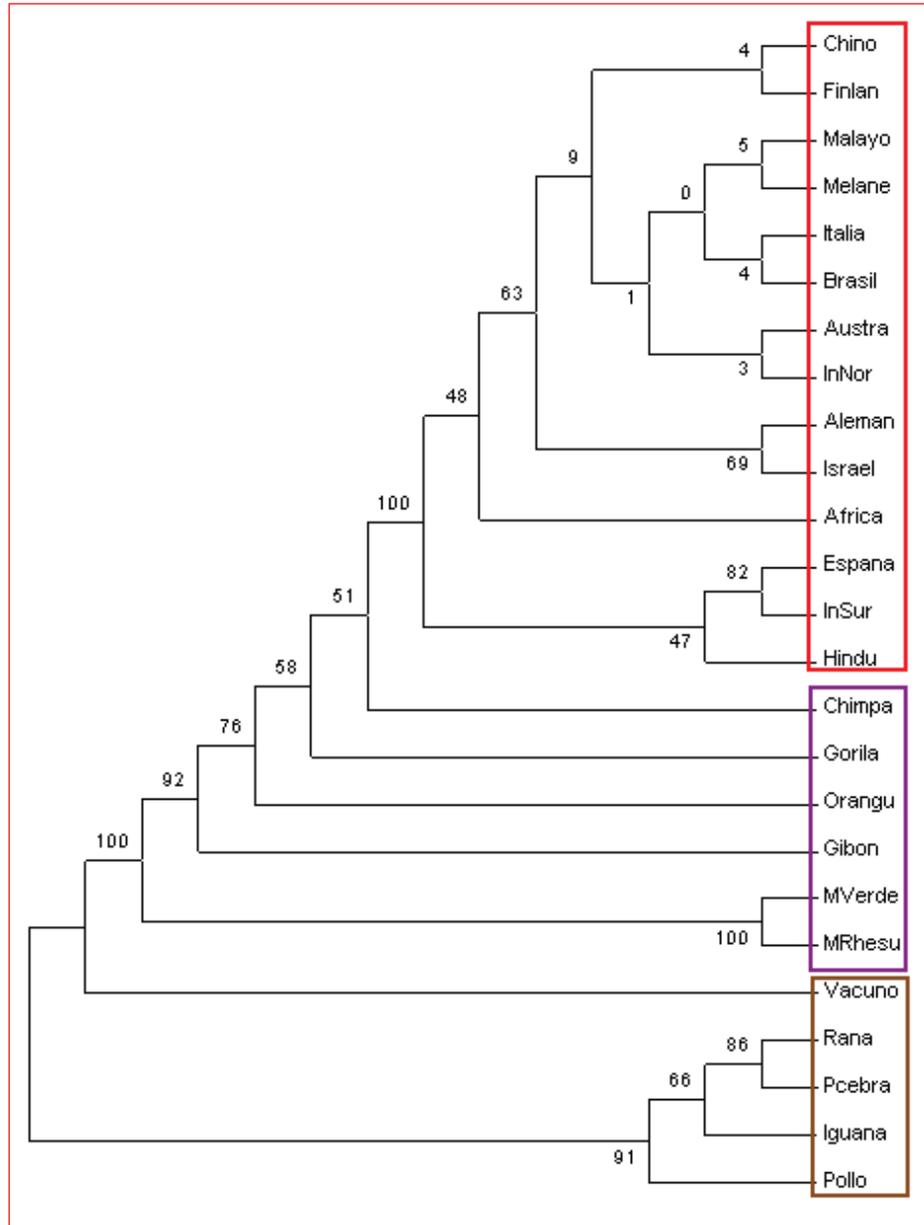
Rojo = Primates humanos,
Violeta = Primates no humanos
Marrón = Otros vertebrados.

Figura N° 07
Bootstrap de la secuencia nucleotídica de la ATPasa 8 de vertebrados (Máxima Parsimonia, Jukes-Cantor).



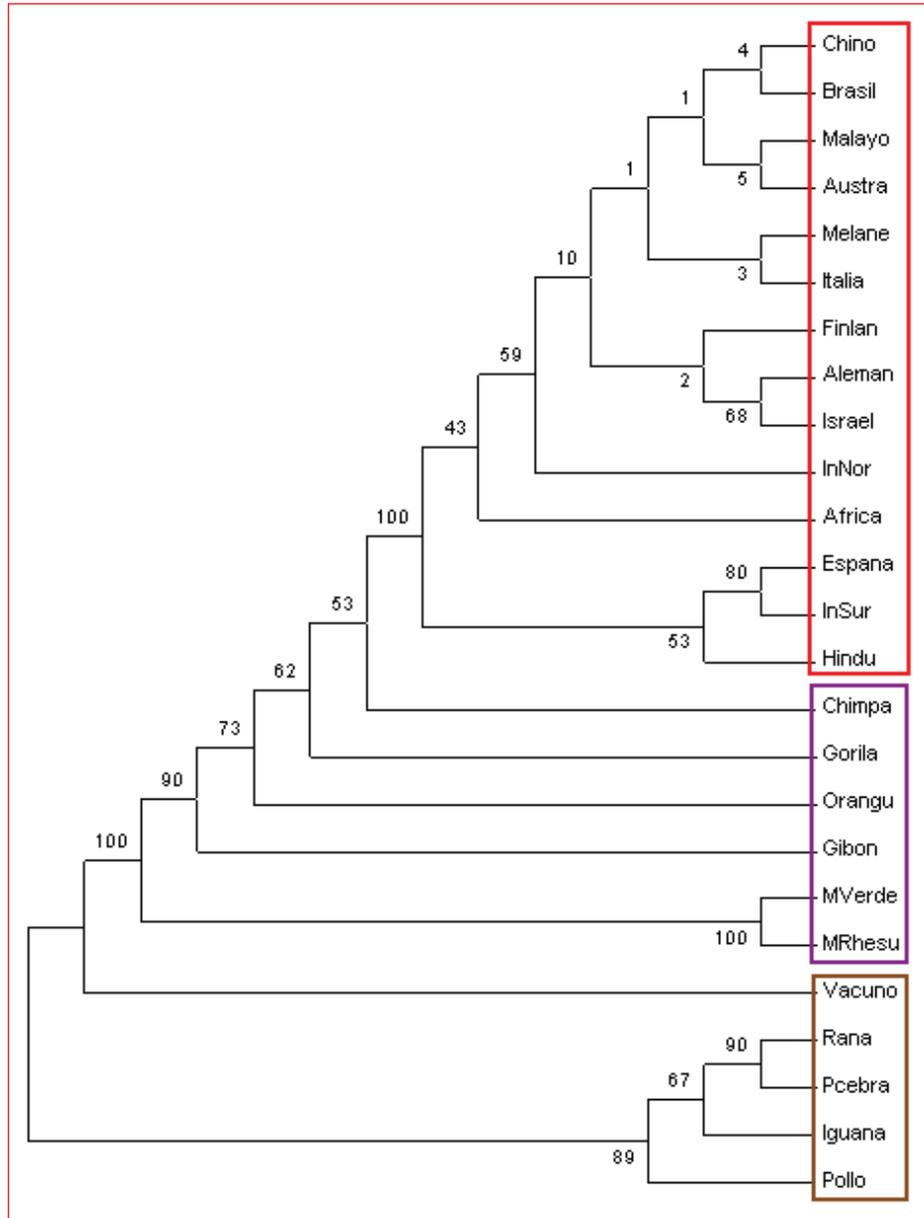
Rojo = Primates humanos
Violeta = Primates no humanos
Marrón = Otros vertebrados.

Figura N° 08
Bootstrap de la secuencia aminoacídica del Cyt b de vertebrados
(Máxima Parsimonia, MAP).



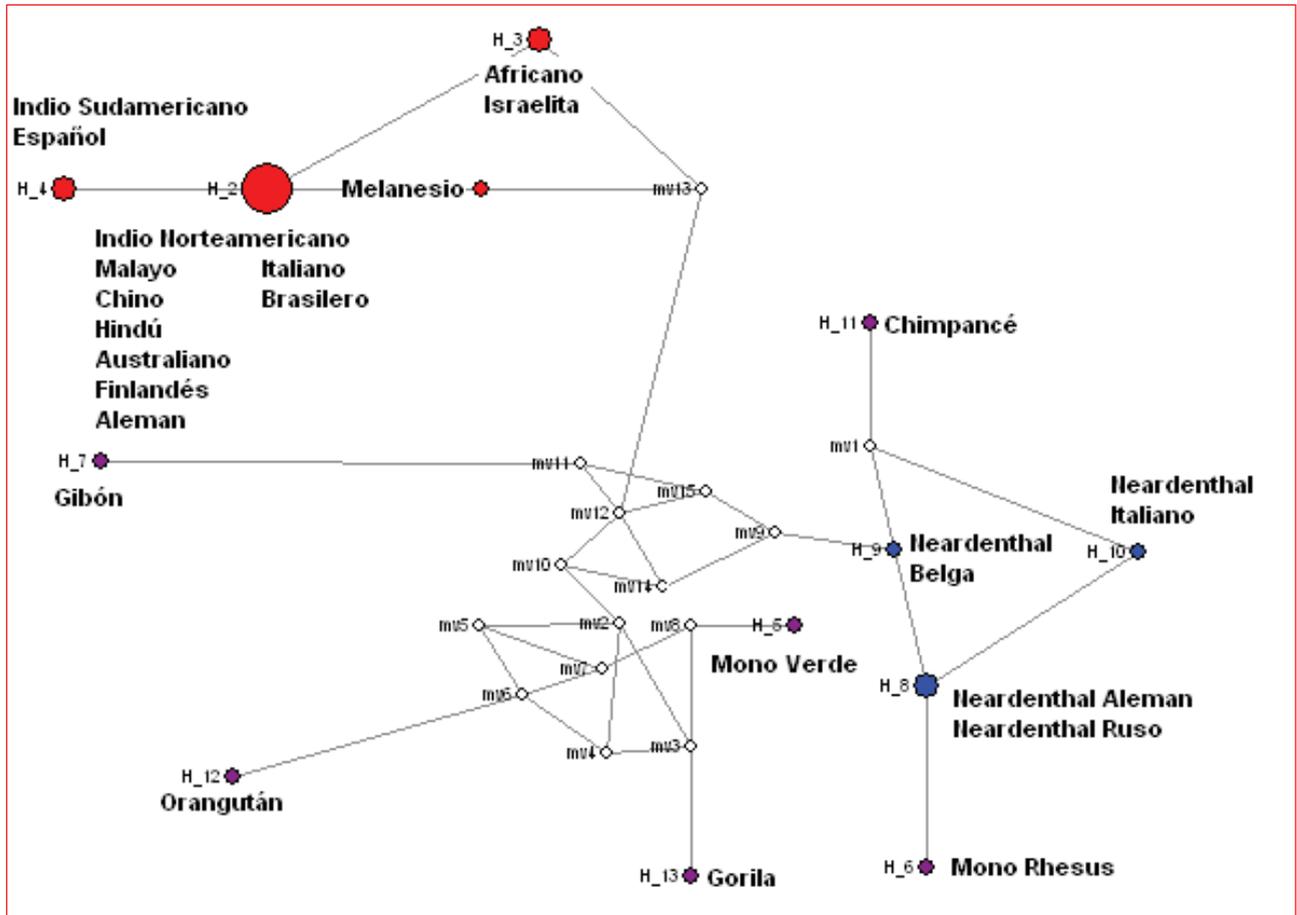
Rojo = Primates humanos
Violeta = Primates no humanos,
Marrón = Otros vertebrados.

Figura N° 09
Bootstrap de la secuencia aminoacídica de la ATPasa 8 de vertebrados
(Máxima Parsimonia, MAP).



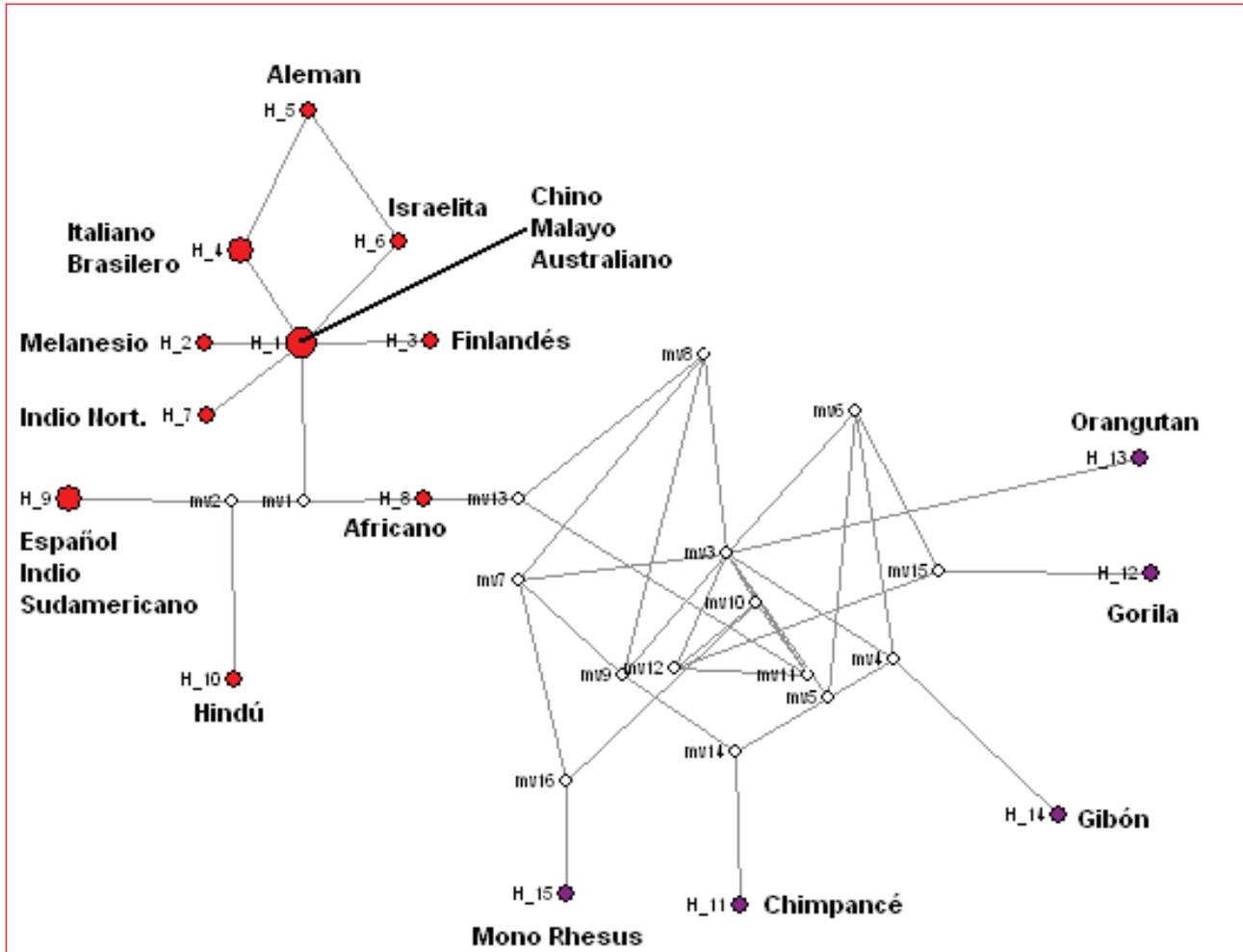
Rojo = Primates humanos
Violeta = Primates no humanos
Marrón = Otros vertebrados.

Figura N° 10
Análisis filogenético con el Network de la variabilidad de la secuencia nucleotídica mitocondrial D-Loop de primates.



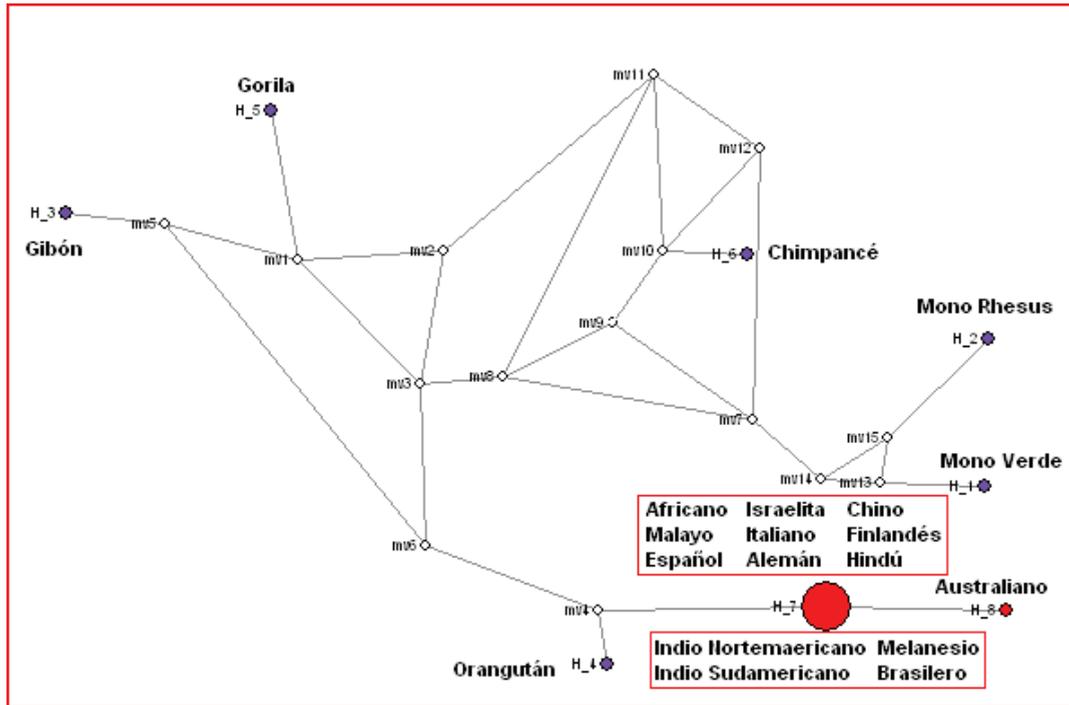
Rojo = Primates humanos
 Azul = Neardenthal
 Violeta = Primates no humanos.

Figura N° 11
Análisis filogenético con el Network de la variabilidad de la secuencia nucleotídica mitocondrial Cyt b de primates.



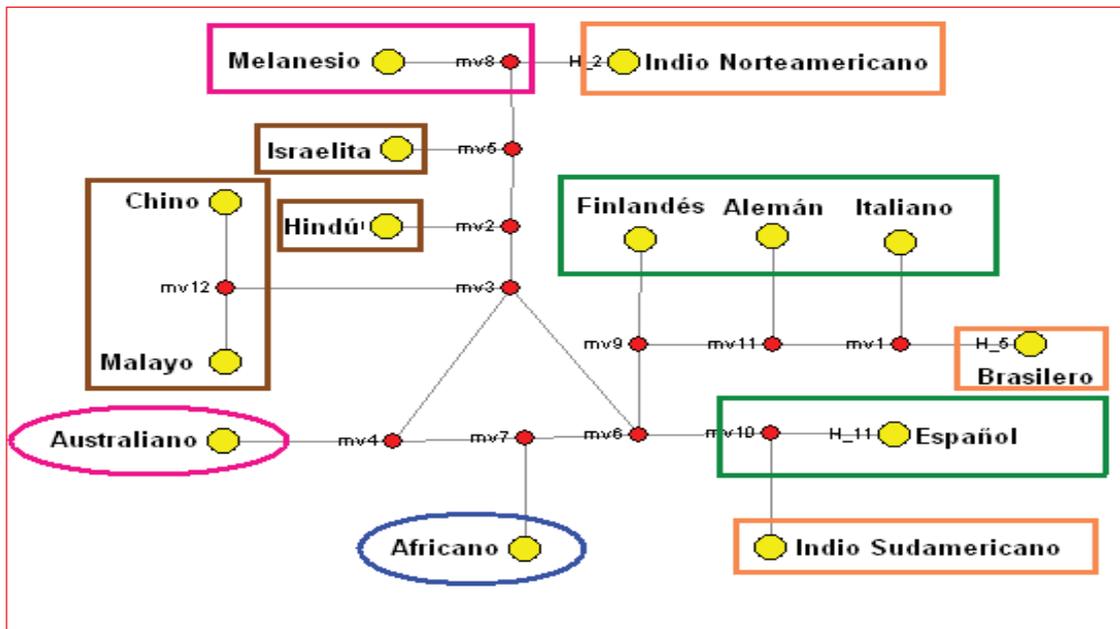
Rojo = Primates humanos
Violeta = Primates no humanos.

Figura N° 12
Análisis filogenético con el Network de la variabilidad de la secuencia nucleotídica mitocondrial de la ATPasa 8 de primates.



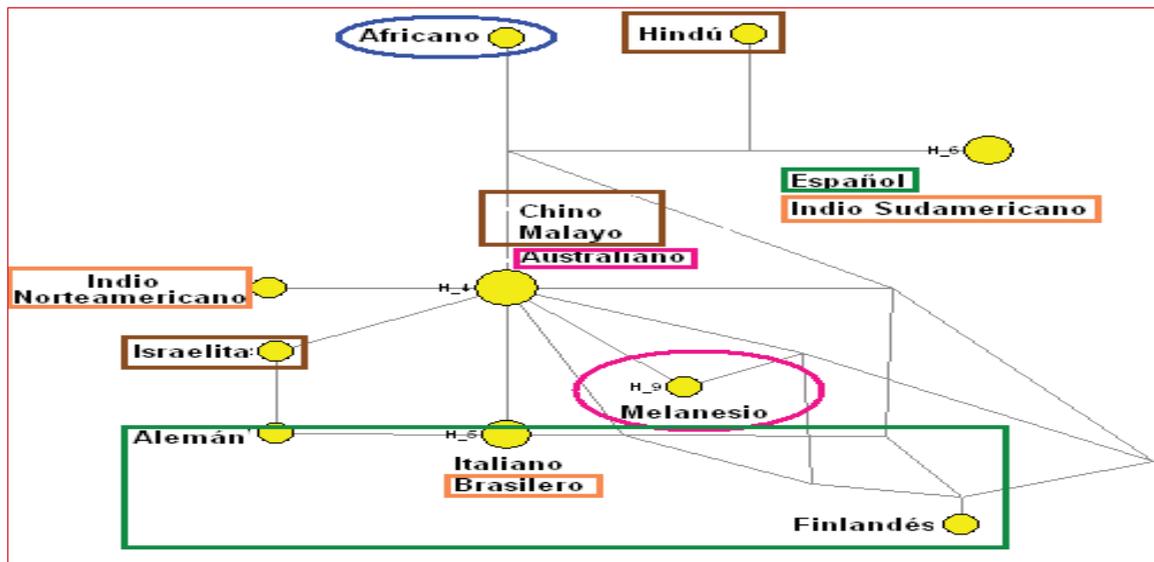
Rojo = Primates humanos, Violeta = Primates no humanos.

Figura N° 13
Análisis filogenético con el Network de la variabilidad de la secuencia nucleotídica mitocondrial del D-Loop de sólo humanos.



Azul = África, Marrón = Asia, Rosado = Oceanía, Verde = Europa, Naranja = América.

Figura N° 14
Análisis filogenético con el Network de la variabilidad de la secuencia nucleotídica mitocondrial del Cyt b de sólo humanos.



Azul = África, Marrón = Asia, Rosado = Oceanía, Verde = Europa, Naranja = América.

al Melanesio como los más antiguos que el resto de humanos lo cual es más concordante con varios de los postulados sobre el origen de las poblaciones humanas. En ambos modelos los valores del Bootstrap fueron bajos para todos los vertebrados con excepción de los Neardental cuyos valores fueron mayores (85 y 87).

En las Figuras N° 04 y 05 se observó el mismo ordenamiento filogenético tanto de las especies de vertebrados no primates (en marrón) como en los primates (en violeta). Pero existen diferencias de agrupación en el caso de los humanos para ambos modelos (en rojo). Además, el Africano no es el más antiguo por lo cual no se ajusta a los resultados obtenidos en otros estudios previos. También se evidencia muy bien la ubicación de vacuno como un grupo externo de los mamíferos para ambos modelos.

En ambos modelos los valores del Bootstrap fueron bajos para la mayoría de humanos pero altos en vertebrados no primates y primates no humanos.

En las Figuras N° 06 y 07 podemos observar algunas diferencias en el ordenamiento filogenético tanto de las especies de vertebrados no primates (en marrón) como en los primates (en violeta). En el modelo de Kimura 2, peces y anfibios están agrupados y más juntos a iguana, mientras que en el modelo de Jukes-Cantor están más cerca al pollo. Aquí también se

evidencia muy bien la ubicación de vacuno como un grupo externo de los mamíferos para ambos modelos (en marrón). En el caso de primates no humanos se muestra muy bien la agrupación de mono verde con mono Rhesus en ambos modelos. Sin embargo, Jukes-Cantor agrupa a gorila con chimpancé mientras que Kimura 2 no lo hace.

Para humanos existen diferencias de agrupación para ambos modelos (en rojo), y ambos ubican al africano como muy reciente; pero, si ubican al Australiano como el más antiguo por lo cual se ajusta a algunos resultados obtenidos en otros estudios previos. En ambos modelos los valores del Bootstrap fueron bajos para la mayoría de humanos con excepción del australiano. Pero altos en vertebrados no primates y primates no humanos.

En las Figuras N° 08 y 09 se hace el análisis de las secuencias aminoacídicas para Cyt b y ATPasa 8 utilizando sólo el modelo MAP. Se puede observar para ambos genes traducibles una agrupación acorde con la historia natural Pez → Anfibio → Reptil → Ave → Mamífero (en marrón). Aquí también se evidencia muy bien la ubicación de vacuno como un grupo externo de los mamíferos. En el caso de primates no humanos también se evidencia el mismo ordenamiento, y se muestra muy bien la agrupación de mono verde con mono Rhesus para ambos genes. Para humanos existen diferencias de agrupación para ambos modelos (en rojo), y ambos ubi-

can al africano como muy reciente y no antiguo. Lo mismo sucede con Australiano y Melanesio. En ambos modelos los valores del Bootstrap fueron medianamente altos para la mayoría de humanos pero el resto fue bajo; pero altos en vertebrados no primates y primates no humanos.

En las secuencias nucleotídicas analizadas (D-Loop, Cyt b y ATPasa 8) poseen tasa mutacionales distintas. El D-Loop posee una alta tasa mutacional debido a que es una secuencia que no se transcribe, el Cyt b posee una media tasa mutacional debido a que es la única proteína mitocondrial independiente que no interactúa con proteínas nucleares dentro de un complejo multienzimático, y la ATPasa 8 posee baja tasa mutacional pero posee una secuencia nucleotídica corta y ante cualquier mutación se detecta un cambio en la secuencia aminoacídica¹². Esta considerable variación en las tasas mutacionales de las secuencias nucleotídicas hace que se produzcan muchas topologías de árbol y ante un análisis de parsimonia el problema no se resuelve sobre todo al decidir la raíz del árbol¹³.

De la Figura N° 10, el análisis del D-Loop muestra a los primates agrupados (en violeta), pero algunos de ellos, como el chimpancé y el mono Rhesus ligados al Neandertal, los cuales se muestran agrupados (en azul). En el caso de humanos existe 4 grupos muy definidos, uno formado por el Africano y el Israelita, otro constituido por el Melanesio y ambos como los más ligados a los Primates y no a los Neandertal (Humano extinto). El resto forma dos grupos definidos por el resto de humanos.

De la Figura 11, el análisis del Cyt b muestra a los primates agrupados (en violeta). En el caso de humanos existen 10 grupos muy definidos (en rojo). Siendo el Africano el más cercano a los primates no humanos, y luego el Australiano y el Melanesio con menor afinidad.

De la Figura N° 12, el análisis de la ATPasa 8 muestra a los primates agrupados (en violeta). Y los humanos sólo muestran dos grupos definidos (en rojo), y donde el Australiano está sólo separado del resto de humanos. Además, está el hecho curioso de existir una conexión más cercana entre los humanos y el orangután con respecto al resto de primates no humanos.

De las Figuras N° 13 y 14, referentes a sólo los grupos humanos tanto en las secuencias nucleotídicas del D-Loop como del Cyt b respectivamente, se pudo observar mejor la separación de los grupos por origen continental. Para ambos el grupo africano siempre estuvo aislado del resto de grupos humanos. Lo mismo sucedió con los grupos de Oceanía donde los melanesios se mostraron aparte concordando con

los estudios antropológicos¹⁴. Pero el grupo australiano se mostró sólo para D-Loop y agrupado junto con chino y malayo para Cyt b. Además el grupo asiático se mostró agrupado para D-Loop, pero más disperso en Cyt b. Para los europeos se mostró agrupado tanto para D-Loop como Cyt b, excepto español que siempre se mostró agrupado con indio sudamericano para ambos. El grupo americano fue el más disperso para ambos genes. Así, brasileño se mostró agrupado con italiano, Indio norteamericano ligado a grupo asiático para Cyt b, pero unido a melanesio para D-Loop.

Para el análisis con ATPasa 8, el Network no permitió realizar el análisis completo (gráfico no mostrado), pero evidenció a australiano alejado del resto de humanos existentes.

CONCLUSIONES

- El ADNmt de aves y anfibios poseen un mayor porcentaje de G+C que el resto de vertebrados.
- En los vertebrados la secuencia ATPasa 8 posee mayor porcentaje de T+A que las secuencias nucleotídicas del D-Loop y la ATPasa 8.
- La asparagina y la cisteína son los aminoácidos mayoritarios de las proteínas Cyt b y ATPasa 8 en vertebrados.
- El modelo de Kimura 2 explica mejor la filogenia molecular que el modelo de Jukes-Cantor en vertebrados con la secuencia nucleotídica del D-Loop.
- Tanto Kimura 2 como Jukes-Cantor explican igual la filogenia molecular en vertebrados con las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas del Cytb y ATPasa 8, pero sólo para vertebrados no primates y primates no humanos, pero no para humanos.
- El Neandertal es un grupo humano extinto muy homogéneo e intermedio entre los humanos actuales y los primates no humanos sobretodo con el Chimpancé y el Gorila.
- Los africanos, australianos y melanesios para todos los análisis siempre fueron los grupos humanos más antiguos.
- El mono verde y el mono Rhesus para todos los análisis siempre fueron los más antiguos primates no humanos.
- El vacuno (*Bos taurus*) fue un excelente outgroup para comparar filogenia de mamíferos.

- Los valores de Bootstrap son altos cuando se analiza primates no humanos y vertebrados no primates, pero son bajos para humanos.
- Para grupos muy cercanos como los humanos se obtiene un mejor análisis con el programa Network que otros análisis para secuencias nucleotídicas del D-Loop y Cyt b, pero no para la ATPasa 8.

M.Sc., Blgo., Carlos Scotto E.
 Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
 Universidad Nacional Federico Villarreal

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Avise J. Molecular markers, natural history and evolution. Ed. Chapman and Hall. 1st. ed. New York. 1994.
2. Rosamond J. The molecular of the mitochondrion. 1982. Biochemical Journal. Vol. 202:1-8.
3. Sager R. 1981. Facetas de la Genética. Los genes extracromosómicos. Ed. H. Blume. 1era. ed. Madrid. pp101-109.
4. Aquadro C, Kaplan N, Risko K. 1984. An analysis of dynamics of mammalian mitochondrial DNA sequence evolution. Molecular Biology Evolution. 1:423-434.
5. Brown W, George M, Wilson A. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:1967-1971.
6. Rodríguez F, Medina J. 1986. Sustitución de nucleótidos en la evolución del ADN. Scientific American. Agosto. (119): 8-15.
7. Richards M, Macaulay V. 2001. The mitochondrial gene tree comes of age. Am. J. Hum. Genet. 68:1315-1320.
8. Knight W. Lord Monboddo and some of his contemporaries, Letter of Lord Monboddo to William Jones dated June 20, 1789, Thoemmes Press, Bristol, England (1990). ISBN 1-85506-207-0.
9. Maca-Meyer N, González A, Larruga J, Flores C, Cabrera V. 2001. Mayor genomic mitochondrial lineales delineate early human expansions. BMC Genetics. Vol. 2: 13.
10. Satoshi Horai, Kenji Hayasaka, Rumi Kondo, Kazuo Tsugane, Naoyuki Takahata. 1995. Recent African origin of modern humans revealed by complete sequences of hominoid mitochondrial DNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol.92, pp. 532-536, January.
11. Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment Briefings in Bioinformatics:150-163.
12. Cann R, Stoneking M, Wilson A. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. Nature. Vol. 325(1): 31-36.
13. Ingman M, Kaessmann H, Paabo S, Gyllensten U. 2000. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. Nature. Dec.7; 408(6813):652-3.
14. Niesturj M. El origen del hombre. Ed. MIR. 1era. ed. Moscú. 1972.