

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**Trabajo de Graduación:**

**“APLICACIÓN DE MICROSATÉLITES PARA IDENTIFICACIÓN DEL  
GENOTIPO DE *Ateles geoffroyi* “MONO ARAÑA” EN CONDICIONES DE  
CAUTIVERIO”**

**Presentado por:**

**SILVIO JAVIER Crespín Guzmán**

**PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, ABRIL 2009**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**Trabajo de Graduación:**

**“APLICACIÓN DE MICROSATÉLITES PARA IDENTIFICACIÓN DEL  
GENOTIPO DE *Ateles geoffroyi* “MONO ARAÑA” EN CONDICIONES DE  
CAUTIVERIO”**

**Presentado por:**

**SILVIO JAVIER Crespín Guzmán**

**PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**ASESOR INTERNO: \_\_\_\_\_**

**Dr. RIGOBERTO AYALA**

**ASESOR INTERNO: \_\_\_\_\_**

**Lic. ROBERTO GUILLÉN PAREDES**

**ASESOR EXTERNO: \_\_\_\_\_**

**Dr. JORGE ERNESTO QUEZADA DÍAZ**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, ABRIL 2009**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**Trabajo de Graduación:**

**“APLICACIÓN DE MICROSATÉLITES PARA IDENTIFICACIÓN DEL  
GENOTIPO DE *Ateles geoffroyi* “MONO ARAÑA” EN CONDICIONES DE  
CAUTIVERIO”**

**Presentado por:**

**SILVIO JAVIER Crespín Guzmán**

**PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**JURADO:** \_\_\_\_\_

**Dra. BEATRIZ DREYER**

**JURADO:** \_\_\_\_\_

**M.Sc. YANIRA ELIZABETH LÓPEZ VENTURA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, ABRIL 2009**

# **AUTORIDADES UNIVERSITARIAS**

**RECTOR:**

**M.Sc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SÁNCHEZ**

**SECRETARIO GENERAL:**

**Lic. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHÁVEZ**

**FISCAL GENERAL:**

**Dr. RENÉ MADECADEL PERLA JIMÉNEZ**

**DECANO:**

**Dr. RAFAEL ANTONIO GÓMEZ ESCOTO**

**DIRECTORA DE LA ESCUELA DE BIOLOGIA:**

**M.Sc. NOEMY ELIZABETH VENTURA CENTENO**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, ABRIL 2009**

**In Memory of Mikhail.**

**“Thus are we likened unto Zarathustra, we who are born content, who lust for a veritable feast of truths and satiate only with supremacy over the zeitgeist, such is the way great minds think alike” S.C.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría comenzar esta tesis expresando mi gratitud a todas aquellas personas y entidades que de algún modo, han contribuido durante estos años a la culminación de mis estudios de biología y la realización este trabajo:

A mi madre, Edmidlia Guzmán de Crespín, quien me enseñó los frutos de la perseverancia; mi padre, Augusto Crespín, quien inculcó en mí el fervor por mi pasión; mis hermanos, Tito Peña y Fidel Peña, por su apoyo y ejemplo; y a Mozart, por quererme incondicionalmente.

A mis asesores, Dr. Rigoberto Ayala, Lic. Roberto Guillén Paredes y especialmente al Dr. Jorge Ernesto Quezada Díaz por brindarme su colaboración en todas las actividades realizadas durante este estudio.

A la Dra. Beatriz Dreyer y M.Sc. Yanira Elizabeth López Ventura, los jurados, por su valiosa ayuda y aporte al trabajo de graduación.

Un merecido y especial agradecimiento al Dr. Gustavo Gutiérrez-Espeleta y su equipo, Lic. Mayori Grimaldo-Salazar y Don Fede, del Laboratorio de Genética de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, quienes compartieron sus conocimientos y mejores momentos con generosidad, lo que permitió el desarrollo de este trabajo y por enseñarme realmente el gusto por la investigación.

A M.Sc. Floria Berstch, por su amistad y colaboración durante las actividades realizadas en Costa Rica.

A Karenina Morales Hernández y Ana María Mistretta por su apoyo y orientación.

A mis amigos, quienes me apoyaron y creyeron en mí desde el inicio y a los monos araña por su ayuda involuntaria.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	IX
ÍNDICE DE CUADROS .....	X
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XII
RESUMEN .....	XIII
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
2.1 CONSERVACIÓN DE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA .....	4
2.2 MONO ARAÑA ( <i>ATELES GEOFFROYI</i> ) .....	5
2.2.1 <i>Taxonomía de Ateles geoffroyi</i> .....	6
2.2.2 <i>Descripción de Ateles geoffroyi</i> .....	7
2.2.3 <i>Situación actual de Ateles geoffroyi en El Salvador</i> .....	8
2.3 MARCADORES MOLECULARES.....	10
2.3.1 <i>Marcadores de ADN</i> .....	12
2.3.2 <i>ADN Satélite</i> .....	13
2.3.3 <i>MICROSATÉLITES</i> .....	15
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO .....	18
3.2. PROTOCOLO GENERAL DE TRABAJO .....	20
3.2.1 <i>Toma de muestras</i> .....	20
3.2.2 <i>Extracción de ADN vía muestra sanguínea</i> .....	21
3.2.3. <i>Extracción de ADN a partir de raíz de pelos</i> .....	22
3.2.4 <i>Electroforesis de las muestras de ADN genómico</i> .....	22
3.2.4.1 <i>Preparación de gel</i> .....	23
3.2.4.2. <i>Preparación de las muestras de ADN</i> .....	23
3.2.5 <i>Amplificación de ADN</i> .....	24
3.2.5.1 <i>Preparación de la solución para PCR</i> .....	25
3.2.5.2 <i>Iniciadores utilizados</i> .....	25
3.2.5.3 <i>Programa para PCR</i> :.....	29
3.2.5.4 <i>Electroforesis de los productos de PCR</i> .....	29
3.2.6 <i>Análisis de Muestras (Electroforesis Capilar)</i> .....	30
3.2.6.1 <i>Preparación de los productos amplificados</i> .....	31
3.2.7 <i>Análisis de Datos Crudos</i> .....	32
3.2.8 <i>Interpretación de Datos Analizados</i> .....	32
3.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	34

3.3.1	Conteo alélico .....	34
3.3.2	Frecuencia alélica .....	35
3.3.3	Estimación de variación genética .....	35
3.3.3.1	Heterocigosidad.....	36
3.3.3.2	Índice de fijación .....	37
3.3.3.3	Número de alelos efectivos.....	38
3.3.4	Principio de Hardy-Weinberg.....	38
3.3.4.1	Proporciones Hardy-Weinberg (EHW) .....	39
3.3.4.2	Prueba del EHW .....	40
3.3.4.3	Prueba exacta del EHW.....	42
3.3.5	Alelos nulos.....	44
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
4.1	VISUALIZACIÓN DE LOS PERFILES ELECTROFORÉTICOS .....	46
4.2	GENOTIPOS OBSERVADOS .....	49
4.3	CONTEO ALÉLICO .....	53
4.4	FRECUENCIA ALÉLICA .....	54
4.5	VARIACIÓN GENÉTICA .....	58
4.6	PROPORCIONES HARDY-WEINBERG.....	59
4.6.1	Prueba de EHW para Locus 1118 .....	60
4.6.2	Prueba de EHW para Locus 311 .....	66
4.6.3	Prueba de EHW para Locus 5 .....	70
4.6.4	Resultados de prueba del EHW .....	76
4.6.5	Resultados de prueba exacta del EHW.....	76
4.7	ALELOS NULOS .....	77
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>79</b>
5.1	PERFILES ELECTROFORÉTICOS .....	79
5.2	RESULTADOS ANALÍTICOS .....	79
5.3	RESULTADOS ESTADÍSTICOS .....	80
5.3.1	Variación genética.....	80
5.3.2	Equilibrio Hardy-Weinberg.....	82
5.3.3	Alelos nulos.....	83
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>84</b>
<b>7.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>85</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>.....</b>	<b>95</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Linaje y clasificación del género <i>Ateles</i> .....	7
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de secuencias repetidas en tándem, sus características y longitud del motivo repetido .....	14
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de microsatélites según Chambers y MacAvoy (2000) .....	17
<b>Tabla 4.</b> Datos esenciales de los individuos muestreados .....	19
<b>Tabla 5.</b> Resumen de los distintos datos de iniciadores de loci microsatelitales, identificados en <i>Lagothrix lagotricha</i> , utilizando los loci 1118, 311 y 5 .....	27
<b>Tabla 6.</b> Datos de secuencia en pares de base para el locus 1118 en <i>Lagothrix lagotricha</i> .....	28
<b>Tabla 7.</b> Datos de secuencia en pares de base para el locus 311 en <i>Lagothrix lagotricha</i> .....	28
<b>Tabla 8.</b> Programa de PCR para los loci 157, 311 y 5 .....	29

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Genotipos obtenidos con los tres loci microsatélites .....	50
<b>Cuadro 2.</b> Frecuencias genotípicas observadas .....	52
<b>Cuadro 3.</b> Conteo alélico y número total de alelos observado .....	53
<b>Cuadro 4.</b> Frecuencia alélica y el tamaño de la muestra .....	54
<b>Cuadro 5.</b> Parámetros comparables entre los loci 1118, 311 y 5 .....	58
<b>Cuadro 6.</b> Frecuencia genotípica esperada para el locus 1118 .....	61
<b>Cuadro 7.</b> Número de genotipos observados en el locus 1118 .....	61
<b>Cuadro 8.</b> Número de genotipos esperados en el locus 1118 .....	62
<b>Cuadro 9.</b> Diferencia entre los conteos de los genotipos observados y esperados en el locus 1118 .....	62
<b>Cuadro 10.</b> Potenciación cuadrada de la diferencia entre los conteos de los genotipos observados y esperados en el locus 1118 .....	63
<b>Cuadro 11.</b> Potenciación cuadrada de la diferencia entre los conteos de los genotipos observados y esperados en el locus 1118 dividida entre el conteo esperado .....	63
<b>Cuadro 12.</b> Comparación entre el número de genotipos observados con el número de genotipos esperados para el locus 1118 .....	64
<b>Cuadro 13.</b> Frecuencia genotípica esperada para el locus 311 .....	66
<b>Cuadro 14.</b> Número de genotipos observados en el locus 311 .....	66
<b>Cuadro 15.</b> Número de genotipos esperados en el locus 311 .....	67
<b>Cuadro 16.</b> Diferencia entre los conteos de los genotipos observados y esperados en el locus 311 .....	67
<b>Cuadro 17.</b> Potenciación cuadrada de la diferencia entre los conteos de los genotipos observados y esperados en el locus 311 .....	67
<b>Cuadro 18.</b> Potenciación cuadrada de la diferencia entre los conteos de los genotipos observados y esperados en el locus 311 dividida entre el conteo esperado.....	68
<b>Cuadro 19.</b> Comparación entre el número de genotipos observados con el número de genotipos esperados para el locus 311 .....	68
<b>Cuadro 20.</b> Frecuencia genotípica esperada para el locus 5 .....	70
<b>Cuadro 21.</b> Número de genotipos observados en el locus 5 .....	71
<b>Cuadro 22.</b> Número de genotipos esperados en el locus 5 .....	71

<b>Cuadro 23.</b> Diferencia entre los conteos de los genotipos observados y esperados en el locus 5 .....	72
<b>Cuadro 24.</b> Potenciación cuadrada de la diferencia entre los conteos de los genotipos observados y esperados en el locus 5 .....	72
<b>Cuadro 25.</b> Potenciación cuadrada de la diferencia entre los conteos de los genotipos observados y esperados en el locus 5 dividida entre el conteo esperado.....	73
<b>Cuadro 26.</b> Comparación entre el número de genotipos observados con el número de genotipos esperados para el locus 5 .....	74
<b>Cuadro 27.</b> Comparación entre el número de homocigotos y heterocigotos observado con lo esperado .....	75
<b>Cuadro 28.</b> Valores-P para cada locus estudiado utilizando la prueba exacta.....	76
<b>Cuadro 29.</b> Valores-P para cada locus estudiado utilizando la prueba exacta.....	76
<b>Cuadro 30.</b> Frecuencias esperadas de alelos nulos en los loci estudiados.....	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1</b> Ventana para visualización de electroferogramas e identificación de picos verdaderos en el software Peak Scanner™ .....	33
<b>Fig. 2</b> Electroferograma de la muestra AG6 para locus 1118, típico de un individuo heterocigótico .....	48
<b>Fig. 3</b> Electroferograma de la muestra AG8 para locus 1118, típico de un individuo homocigótico .....	48
<b>Fig. 4</b> Composición alélica de la muestra (N) para el locus 1118 .....	55
<b>Fig. 5</b> Composición alélica del la muestra (N) para el locus 311 .....	55
<b>Fig. 6</b> Composición alélica del la muestra (N) para el locus 5 .....	56
<b>Fig. 7</b> Frecuencias alélicas de los tres loci en estudio .....	57
<b>Fig. 8</b> Comparación entre el conteo de genotipos observados y esperados en el locus 1118 .....	65
<b>Fig. 9</b> Comparación entre el conteo de genotipos observados y esperados en el locus 311 .....	69
<b>Fig. 10</b> Comparación entre el conteo de genotipos observados y esperados en el locus 5 .....	75

## RESUMEN

Mediante la aplicación de marcadores microsatelitales se realizó una identificación genotípica de *Ateles geoffroyi* Kuhl (1820) en condiciones de cautiverio, utilizando tres loci de microsatélites (Loci 1118, 311 y 5), constituyendo el primer estudio de este tipo en El Salvador y obteniéndose el primer registro de frecuencias alélicas. Además, se midió la variación genética y se evaluó la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg.

Para la amplificación de los microsatélites y la posterior identificación de los genotipos se utilizó ADN nuclear extraído de muestras sanguíneas y de folículo piloso. Se logró identificar genotípicamente el 89% de los individuos, a pesar de una pérdida de información del 16% en el locus 1118 y del 22% en locus 311 al no producir productos de PCR. Se calculó una alta heterocigosidad esperada promedio ( $H_e$ ) de 0.717, aunque existe una deficiencia de heterocigotos ( $F = 0.492$ ). Las pruebas exactas calculadas confirman que la colección de individuos no se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) para ninguno de los tres loci estudiados.

# 1. INTRODUCCIÓN

El mono araña (*Ateles geoffroyi* Kuhl, 1820), es el único primate no humano, que existe en El Salvador. Son pocas y pequeñas las poblaciones presentes de esta especie, por lo que la probabilidad de extinción local es muy alta, exigiendo la inmediata toma de medidas de conservación. Es en su mayoría una especie frugívora, no presenta amenaza al ser humano y según la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) es una especie en peligro de extinción (CITES, 2007). Esto concuerda con la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) que lo califica a nivel global como una especie en peligro de extinción (Cuarón *et al.*, 2008a). Las poblaciones de mono araña se han visto amenazadas por varios factores (pérdida de hábitat – reducción y deterioro, fragmentación; cacería furtiva para diversos fines – venta como mascotas (crías con muerte de las madres, para alimento durante la guerra, etc.). Conjuntamente con la disminución poblacional y la fragmentación, vienen problemas como la pérdida de diversidad genética lo cual podría resultar en enfermedades homocigóticas recesivas y una fragilidad en el estado inmunológico de esta especie (Frankham *et al.*, 2002).

Sufriendo una drástica reducción tanto en distribución como en abundancia, se ha reportado la presencia de esta especie en seis localidades de El Salvador, pero con poblaciones muy bajas; por ejemplo en 2003 se estimó una población de 28 individuos para el Área Natural Protegida de Chaguantique, departamento de Usulután (Morales-Hernández, 2003).

Una de las posibles salidas a esta problemática podría ser la reproducción en cautiverio monitoreando la composición genética, con posteriores liberaciones a fin de aumentar los tamaños poblacionales y su variabilidad genética. Para esto se necesitan estudios poblacionales, tanto de poblaciones naturales como de poblaciones o individuos mantenidos en condiciones de cautividad.

Considerando la situación de extremo peligro en la que se encuentra la especie, es necesario hacer énfasis en los problemas *in situ*, ya que la conservación debe enfocarse en el manejo de poblaciones genéticamente distintas, dado que algunas subespecies y poblaciones se encuentran en un estado crítico de supervivencia en la actualidad, como es el caso en El Salvador. Para evitar la desaparición de la población salvadoreña de monos araña, es necesario llevar a cabo medidas de conservación, entre las cuales podría considerarse un muestreo de todos los individuos posibles para identificarlos genotípicamente y determinar su nivel de diversidad genética, pudiéndose luego desarrollar un manejo de la población con énfasis en conservación; no obstante, en la actualidad la investigación de campo se dificulta debido a las amenazas previamente mencionadas, una falta de conocimiento sobre su distribución poblacional y geográfica exacta como también una falta de apoyo por parte de las instituciones oficiales o estatales. Un proyecto de ese calibre requeriría de fondos sustanciales, recursos humanos, tiempo y espacios adecuados a nivel gubernamental u otro tipo de entidades interesadas en la conservación de esta especie.

Una investigación similar a lo dicho anteriormente, utilizando individuos en cautiverio, con el fin de propiciar interés en proyectos de esta naturaleza, se realizó utilizando especímenes en régimen de cautividad, ya sea en tenencia o consignación, y que fueron provistos por el Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales (MARN). Las poblaciones cautivas se exponen a los mismos problemas genéticos que las poblaciones silvestres, sin embargo, presentan mayor facilidad de manejo.

El actual desarrollo de las técnicas de la genética molecular ha permitido sustituir los marcadores morfológicos o fenotípicos por marcadores moleculares, los cuales se han convertido en la herramienta de mayor importancia para la conservación biológica. Entre los marcadores moleculares más utilizados en los últimos años se encuentran los microsatélites (Frankham *et al.*, 2002; Ellegren, 2004; Hedrick, 2005; Allendorf y Luikart, 2007), secuencias de ADN nuclear constituidas

por repeticiones en tándem de entre uno y seis nucleótidos, cuyo polimorfismo se determina según el número de repeticiones observadas en un locus (Frankham *et al.*, 2002; Dieringer y Schlötterer, 2003; Ellegren, 2004; Allendorf y Luikart, 2007).

El uso de microsatélites se basa en la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), siendo necesario el conocimiento previo del genoma para utilizar fragmentos específicos, delimitados por oligonucleótidos complementarios a las secuencias flanqueantes de los fragmentos objetivos, denominados “primers” o “iniciadores”. Los loci por consecuencia se determinan por el “iniciador” utilizado, y los alelos por el número de repeticiones (Tautz, 1989; Dieringer y Schlötterer, 2003; Ellegren, 2004; Allendorf y Luikart, 2007).

Como objetivo general del presente estudio se estableció aplicar marcadores microsatelitales para la identificación genotípica de tres loci de *Ateles geoffroyi* “mono araña” en condiciones de cautiverio, por lo que se enfocó en determinar el número de alelos para cada locus en la totalidad de sujetos de estudio y generar una base de datos que sirva de referencia para futuras investigaciones con los genotipos identificados. Pero, además, se logró calcular varias medidas de variación genética como el número de alelos efectivos, heterocigosidad observada, heterocigosidad esperada, y el índice de fijación; también como herramienta para futuros proyectos, se computó la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg con el fin de establecer la estabilidad genética en los tres loci que tendría una población formada por la colección de individuos muestreados.

Se espera que la información obtenida en este estudio sea el inicio de una base de datos que apoye el manejo de la conservación de esta especie en El Salvador por medio del mantenimiento de la variabilidad genética, entre otros usos, para un posible futuro desarrollo de programas de apareamiento. Los microsatélites utilizados, son una fuente de referencia para el nivel de polimorfismo y la cantidad de diversidad genética presente en la población.



## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Conservación de la diversidad biológica

La conservación de la diversidad biológica en el mundo actual es una necesidad que la sociedad humana debe enfrentar. Considerado influyente principal del desarrollo de la ética ambiental, el ecologista Aldo Leopold empezó a inculcar en una generación de biólogos el reconocimiento de que las acciones del ser humano son grabadas en una red ecológica que no se debe ignorar (Meine, 1998). Sin embargo, desde entonces las entidades sociopolíticas que se han encargado de la conservación, sólo han velado por el presente, llegando a lo mucho, a planificar para unos cuantos años en el futuro.

La escala de tiempo que se debe implementar para la conservación, según el genético en plantas Otto Frankel (1974), debe ser infinitamente amplia. También, este mismo autor explica que “Primero... se debe conocer la estructura y dinámica de las poblaciones y comunidades naturales... Segundo, incluso en este momento el genético puede participar aportando consideraciones genéticas en el planteamiento de reservas de cualquier tipo... y, finalmente, apoyando la conservación de la naturaleza con una perspectiva evolutiva puede ayudar a dar a la conservación una permanencia que un razonamiento utilitario, e incluso un razonamiento ecológico, no logran proveer en la mente de los hombres.” En este tercer punto, Frankel habla sobre la incapacidad del ser humano para anticipar el futuro a largo plazo, por lo que es responsabilidad de la presente generación mantener abiertas las opciones evolutivas para las futuras generaciones.

La tendencia moderna sobre la conservación se encuentra enfocada en los recursos genéticos que se han desarrollado, como ha sido la secuenciación de genomas enteros de varias especies, e incluso en el simple hecho de un nivel de conocimiento mayor, en el que se tratan fenómenos como el flujo genético

(migración) y la ingeniería genética (ADN recombinante). Este advenimiento de nuevos conocimientos y técnicas debe ser empleado en donde según la conservación corresponda; por la actual situación del género *Ateles* en El Salvador, es necesario aplicar los principios de la genética para el bien común.

Myers y Knoll (2001) estiman que en la actualidad nos encontramos en el tiempo de mayor número de extinciones jamás visto, y actualmente se estima que aproximadamente el 23 % de mamíferos, 12 % de aves, 32 % de anfibios, 34 % de peces y hasta un posible 34 % de los taxones del reino Plantae se encontrarán amenazados de extinción durante las próximas décadas (UICN, 2004). Anualmente se extinguen entre 3,000 y 30,000 especies (Woodruff, 2001).

Discusiones recientes proyectan que el enfoque sobre la extinción en general, no debe radicar en la extinción de la especie, sino en la extinción de poblaciones genéticamente distintas (Hughes *et al.* 1997; Hobbs y Mooney, 1998).

Por todo ello, además de los esfuerzos para proteger los bosques, es importante conocer la variabilidad genética dentro y entre poblaciones de estos primates para establecer políticas de manejo y conservación y así garantizar la supervivencia de esta especie.

## **2.2 Mono Araña (*Ateles geoffroyi*)**

A continuación se presenta una revisión de la taxonomía y una breve descripción de la especie de mono araña presente en El Salvador, en donde se incluye distribución, hábitat, hábitos alimenticios y su situación actual en El Salvador.

### 2.2.1 Taxonomía de *Ateles geoffroyi*

La taxonomía original de *Ateles* presentada por Kellog y Goldman (1944), aún utilizada extensivamente, consiste en las siguientes cuatro especies basada en variaciones del color del pelaje: *Ateles geoffroyi*, con nueve subespecies en Centroamérica; *Ateles fusciceps* con dos subespecies, distribuidas en la región Choco a lo largo de la costa pacífica del noroeste de Suramérica; *Ateles belzebuth*, con tres subespecies, y, por último, *Ateles paniscus*, con dos subespecies (Kellog y Goldman, 1944; Konstant *et al.*, 1985; Rylands, 2000).

Sin embargo, no se considera del todo certero utilizar criterios taxonómicos basados en el pelaje de subespecies de *Ateles*, debido a que, además de presentar una gran variedad de color, algunas subespecies comparten varios espectros en su color de pelaje (Hershkovitz, 1969, 1970; Hernández-Camacho and Cooper, 1976; Konstant *et al.*, 1985; Groves, 1989; Froehlich *et al.*, 1991; Silva-Lopez *et al.*, 1996). Los datos taxonómicos – morfológicos/morfométricos – de *Ateles* no son concluyentes, ya que los resultados de diversas investigaciones morfológicas y genéticas no concuerdan en sus respuestas. Sin embargo, Collins y Dubach (2000, 2001) realizaron estudios sobre *Ateles* utilizando dos regiones del genoma mitocondrial como también una región de ADN nuclear, en donde concluyeron que la variación promueve a cuatro especies de *Ateles*: *A. paniscus*, *A. belzebuth*, *A. hybridus* y *A. geoffroyi*; lo cual, a excepción de la inclusión de *A. hybridus* concuerda con Froehlich *et al.* (1991), en un análisis morfométrico de variación cráneo-dental en los cuales se obtuvieron resultados similares a los de Collins y Dubach (2001). Lo anterior indica que las investigaciones recientes sobre filogenia de los monos araña han establecido ciertos criterios genéticos que no se pueden ignorar, debido a su naturaleza más exacta.

Según la UICN la especie reportada para el país es *Ateles geoffroyi*, la cual se califica como EN (Endangered o bajo Peligro de Extinción) por la misma organización (Cuarón *et al.*, 2008a), mientras que CITES, tomando en cuenta que

esta convención se relaciona con restricciones al comercio internacional, es decir, especies que están en condiciones de amenaza por comercio internacional, también la considera una especie en peligro de extinción, ubicándola en el Apéndice I designada a especies en peligro (CITES, 2007). La tabla 1 presenta la clasificación actual según el Sistema de Información Taxonómica Integrada (ITIS por sus siglas en inglés, Integrated Taxonomic Information System).

<b>Tabla 1.</b> Linaje y clasificación del género <i>Ateles</i> .	
Reino:	Animalia - Animal, animals, animaux
Phylum:	Chordata - chordates, cordado, cordés
Subphylum:	Vertebrata - vertebrado, vertebrates, vertébrés
Clase:	Mammalia (Linnaeus, 1758) - mamífero, mammals, mammifères
SubClase:	Theria (Parker and Haswell, 1897)
Infraclase:	Eutheria (Gill, 1872)
Orden:	Primates (Linnaeus, 1758) - homem, primata, primates, sagüi
Familia:	Cebidae (Bonaparte, 1831) - new world monkeys
Subfamilia:	Atelinae (Gray, 1825)
Género:	<i>Ateles</i> (É. Geoffroy Saint-Hilaire, 1806)
Especie:	<i>Ateles geoffroyi</i> (Kuhl, 1820)
Tomado del Sistema de Información Taxonómica Integrada (ITIS, 2007).	

### 2.2.2 Descripción de *Ateles geoffroyi*

Los primates pertenecientes a este taxón poseen extremidades distintivamente largas y delgadas, una cola prensil con un área desprovista de pelo en la parte inferior y un pelaje café-dorado o rojo hasta café oscuro con manos y patas negras (Rowe, 1996). Pesan entre 8 y 10 kg, y tienen una longitud de cabeza y cuerpo en el rango de 38.2-63.5 cm, mientras que la longitud de la cola se aproxima a 50.8-89.0 cm, lo cual indica que en general, la cola mantiene una mayor longitud que el cuerpo (Nowak, 1999; Defler, 2003).

Los monos araña se encuentran distribuidos extensamente a través del neotrópico, desde Tamaulipas (Nor-este de México 23°N), atraviesa Centroamérica y Suramérica hasta el sur de Brasil y Bolivia (19°S), alcanzando una altura de 2500 msnm. (Nowak, 1999; Hernández-Camacho y Cooper, 1976). Esta especie se encuentra en bosques húmedos más que en secos, específicamente bosques tropicales lluviosos siempre verdes (Hershkovitz, 1977), prefiriendo los estratos altos del dosel (Fleagle, 1988; Rowe, 1996). Sin embargo, siendo una especie arbórea, ha encontrado conveniente para su supervivencia, los bosques húmedos primarios y secundarios, bosques semi-caducifolios, e incluso zonas de manglar (Rowe, 1996), proporcionándole a esta especie una alta adaptabilidad a los distintos bosques tropicales centroamericanos, con fuentes de alimento y espacio, así como, sus limitantes.

El mono araña es una especie frugívora, por lo que tiende a preferir las frutas maduras, sin embargo también opta por una dieta de hojas, flores, e incluso puede llegar a comer otras partes de las plantas, y muy esporádicamente insectos, arácnidos y huevos (Rowe, 1996). Como la mayoría de los primates, es un animal diurno y bastante social, por lo que tienden a formar grupos de cuatro a treinta y cinco (promedio de quince) individuos con una proporción macho-hembra de 1:1.8 (Rowe, 1996).

### **2.2.3 Situación actual de *Ateles geoffroyi* en El Salvador**

El mono araña (*Ateles geoffroyi*) se considera la única especie de primate existente en El Salvador aparte del ser humano (Rylands *et al.*, 2006), encontrándose en la actualidad seis localidades con sus respectivas poblaciones, una en el Parque Nacional Montecristo, departamento de Santa Ana; otra en Área Natural Protegida Conchagua, departamento de La Unión; y cuatro en la Bahía de Jiquilisco, en las áreas protegidas de Normandía, Nancuchiname, Chaguantique y El Tercio, departamento de Usulután (Gallo, 2005).

Las principales amenazas en contra de las poblaciones de monos araña en El Salvador, se podrían extrapolar de las que, según Horwich y Lyon (1998), reducen la población de monos aulladores de Belice, las cuales han sido: desaparición del hábitat (deforestación), tala (eliminación del hábitat natural) y la caza, ya sea para el comercio o para consumo cotidiano. Se mantiene que la subespecie reportada para El Salvador, *A. geoffroyi vellerosus* Gray, 1866, es clasificada como CR (Critically Endangered o Peligro Crítico) según la UICN debido a una disminución poblacional pasada y proyectada hacia el futuro (Cuarón *et al.*, 2008b).

Muy pocos estudios han examinado la variación genética de la única especie primate no humana de El Salvador. Morales-Hernández (2003) en su estudio preliminar de la población de *Ateles geoffroyi* en Usulután estima una densidad poblacional de 0.8 individuos/Ha y 1.35 individuos/Ha para Chaguantique y El Tercio, respectivamente. De lo anterior se puede suponer una población de aproximadamente 28 y 47.25 individuos para Chaguantique y El Tercio respectivamente. Debido a su naturaleza frugívora, el mono araña requiere de una extensión de bosque relativamente amplia, sin embargo publicaciones estatales mencionan que la cobertura vegetal original (cobertura boscosa natural primaria) de El Salvador solamente es de un 7.06% (MARN, 1997). Esto presenta un problema para las poblaciones de *Ateles* en El Salvador, ya que no simplemente son desplazados de sus hábitats, sino que también son forzados a vivir en sitios de poca extensión, y tomando en cuenta la presión por la captura para mascotas y de la caza ilegal (Gorog, 2002), este animal se encuentra con opciones limitadas de supervivencia. Poblaciones de número reducido, junto con la fragmentación del hábitat, aumentan el riesgo de perder su diversidad genética, e incluso la aparición de enfermedades degenerativas (homocigótico-recesivas).

Localmente se consideran extintas la mayoría de las poblaciones de estos monos, quedando sólo aquellas poblaciones con poca accesibilidad humana. Debido a que la población actual de monos araña en El Salvador no se conoce a profundidad, y que sólo se registran pequeñas poblaciones en seis localidades y

tienden a formar tropas de un promedio de solo quince individuos (Rowe, 1996), se puede considerar que constituye una población en condiciones críticas, que se encuentra en peligro de perder su potencial evolutivo. Este potencial para adaptarse a su medio sólo es posible manteniendo una cantidad mínima de variedad genética en la población. Entre menos individuos existan, las opciones evolutivas disminuyen hasta un punto en que ya no hay escapatoria de la extinción, debido a las complicaciones que sufren poblaciones de tamaño reducido, como lo son fluctuaciones ambientales, fluctuaciones demográficas y problemas genéticos

La propia naturaleza ayuda a mantener la diversidad por medio de mutaciones, éstas son, sin embargo, en su mayoría insignificantes o deletéreas y solo ocurren en intervalos no determinados. La especie como tal desde el punto de vista genético puede que no esté en peligro de extinción, pero la población de *Ateles* en El Salvador necesita un estudio genético, para verificar su estado.

### **2.3 Marcadores Moleculares**

El genoma de los seres vivos eucarióticos se organiza en cromosomas, los cuales contienen el ADN y sus proteínas asociadas (histónicas y no histónicas). El ADN se presenta como doble cadena y contiene los genes o unidades de herencia, formados a su vez por secuencias de ADN (ácido desoxirribonucleico), molécula que contiene y transmite la información genética (Watson y Crick, 1953). El ADN está compuesto por dos cadenas enrolladas alrededor de sí mismas para formar una "doble hélice". Cada cadena está formada por una secuencia de bases nitrogenadas. El ADN solamente contiene cuatro bases diferentes designadas por las letras A (Adenina), T (Timina), G (Guanina) y C (Citosina), cuyo orden secuencial puede componer un gen, el cual codifica para secuencias específicas de aminoácidos que se doblarán sobre sí mismas para formar la estructura tridimensional (estructura terciaria) de una proteína, componente principal de la estructura y funcionamiento de cualquier organismo.

En un principio los marcadores genéticos, llamados así por ser fenotipos de fácil identificación visual, controlados por genes y asociados a caracteres morfológicos, eran la única manera de realizar estudios genéticos. Sin embargo, desde los finales de los años 70, una serie de técnicas moleculares modernas han permitido conocer la información genética que los organismos portan, primero de forma indirecta utilizando el producto (proteínas) y luego en estudios directos del ADN, determinando las secuencias de pares de bases que componen varios genes y las características que estos aportan al individuo (Claros, 1998), por lo que los marcadores genéticos ahora se clasifican en morfológicos y moleculares.

Los marcadores moleculares se definen como cualquier “fenotipo molecular” que tiene origen en la expresión de un gen, o segmentos específicos de ADN, que puede ser detectado y su herencia monitoreada (Azofeifa, 2006). Funcionan como señaladores de diferentes regiones del genoma, por ser “biomoléculas” que se relacionan con algún rasgo genético. Los marcadores moleculares no están sujetos a las limitantes de los marcadores morfológicos, ya que pueden ser fenotípicamente neutros y presentan mayor polimorfismo; por lo que un marcador ideal debe ser: altamente polimórfico o variable dentro y entre especies (Picca *et al.*, 2004).

Claros (1998) explica que a los marcadores moleculares se les atribuye un carácter monomórfico cuando no varían en ningún organismo; y polimórfico a aquellos que presentan diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura o sitios de restricción, aunque, por lo general, el criterio sostiene que el alelo más común debe tener una frecuencia de 0.99 o menos (Allendorf y Luikart, 2007); mientras que cuando un marcador presenta un alto nivel de polimorfismo se dice que es hipervariable.

Existen dos tipos de marcadores moleculares: proteínas (antígenos, aloenzimas e isoenzimas) y marcadores de ADN (genes identificados o fragmentos de secuencias) (Picca *et al.*, 2004). Según Allendorf y Luikart (2007) y Frankham *et al.* (2002) los marcadores más idóneos para la conservación biológica por medio del



estudio de la genética de poblaciones son los de ADN, debido a: (i) la facilidad con la que se identifican genotípicamente individuos y poblaciones, (ii) la realización de muestreos no-intrusivos; (iii) la detección de selección, migración, flujo genético y cuellos de botellas; (iv) la determinación de la estructura de poblaciones o evaluación de poblaciones para la reintroducción, etc.

Algunos ejemplos de marcadores basados en el ADN son: Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism), Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA), Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism), Microsatélites o Secuencias simples repetidas (SSR: Simple Sequence Repeat), Amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites (RAMP: Randomly Amplified Microsatellite Polymorphism), etc. (Rallo *et al.*, 2002).

### **2.3.1 Marcadores de ADN**

Un marcador de ADN es simplemente un punto de referencia en un cromosoma (o en la molécula de ADN), que puede o no corresponder a un gen (Picca *et al.*, 2004). Para detectar la variabilidad en la secuencia de ADN, se encuentra disponible una variedad de técnicas de la biología molecular, cada una con sus marcadores respectivos que se diferencian en su grado de polimorfismo, dominancia y técnicas de detección.

Según Karp *et al.* (1997) dentro de este grupo se incluyen tres categorías básicas.

- Categoría 1: métodos que no se basan en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Por ejemplo, RFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción) y VNTRs (número variable de repeticiones en tándem).

- Categoría 2: técnicas que utilizan iniciadores arbitrarios o semiarbitrarios (cuando la identidad del producto de amplificación se desconoce). Por ejemplo, las técnicas basadas en MAAP (Perfiles múltiples de amplificación arbitraria; Multiple Arbitrary Amplicon Profiling), tales como RAPD (Amplificación aleatoria del ADN polimórfico) y AFLP (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos Amplificados).
- Categoría 3: PCR con sitio “objetivo específico”. Por ejemplo, SSR (Microsatélites o secuencias simples repetidas), también llamadas STMS (sitios de microsatélite de secuencia etiquetada).

### **2.3.2 ADN Satélite**

Existe una gran variabilidad en el tamaño del genoma entre eucariontes, el cual tiene poca relación con la complejidad, ploidía o el número de secuencias codificantes. Realmente una parte significativa del genoma de muchos eucariontes está compuesto de ADN repetitivo, en el cual secuencias cortas se encuentran repetidas en series de tamaño variable (Slamovits y Rossi, 2002).

Los ADN satélite son secuencias cortas repetidas en tándem, organizadas en series largas, usualmente en el rango de megabases, y se encuentran principalmente en las regiones pericentroméricas y teloméricas de la heterocromatina (Charlesworth, 1994, citado por Ugarkovic y Plohl, 2002). Su nombre se deriva del hecho de que las repeticiones cortas de ADN tienden a producir frecuencias distintas de nucleótidos (adenina, citosina, guanina y timina) por lo que presentan una densidad diferente al ADN codificante, de tal manera que forman una segunda banda, o una banda ‘satélite’ cuando el ADN genómico se separa por una gradiente de densidad. Es de esta manera que se diferencia claramente del resto del ADN genómico (Slamovits y Rossi, 2002).

En general, los ADNs satélite demuestran una variabilidad excepcional entre individuos, particularmente en lo que se refiere al número de repeticiones en un locus determinado (Colorado State University, 1999).

Secuencias de ADN no codificante con número variable de repeticiones en 'tándem', denominados VNTRs, incluyen regiones hipervariables (HVRs, sitio dentro del ADN nuclear compuesto por repeticiones altamente polimórficas de pares de bases), minisatélites y microsátélites (Harding *et al.*, 1992). En la tabla 2 se muestra una clasificación del ADN repetido en tándem (ADN satélite), de acuerdo al tamaño de la secuencia, también llamada motivo de repetición. (Goldstein y Schlötterer, 1999; Chambers and MacAvoy, 2000).

**Tabla 2.** Clasificación de secuencias repetidas en tándem, sus características y longitud del motivo repetido.

<b>Secuencias repetidas en tándem</b>	<b>Características</b>	<b>Longitud del motivo de repetición en Pares de Bases (bp)</b>
Satélites	Altamente repetitivo. Agrupados en las regiones heterocromáticas de los cromosomas, cerca de centrómeros y telómeros. Tamaño extenso, secuencias de grandes longitudes (más de 1 millón de bp).	>100
Minisatélites	Moderadamente repetitivo. Localizados en las regiones eucromáticas del genoma y altamente variable. Tamaño moderado (500- 30,000 bp).	11-100
Microsatélites	Moderadamente repetitivo. Característicamente variable dentro una población. De poco tamaño (10-100 bp).	1-6
No clasificados	Mecanismo de mutación desconocido	7-10

Secuencias repetidas en tándem son comúnmente conocidas como ADN satélite. Tomado de Chambers y MacAvoy, 2000.

### 2.3.3 Microsatélites

Los microsatélites, conocidos como SSRs (Repeticiones de Secuencia Simple), son secuencias cortas de ADN nuclear, mitocondrial o del cloroplasto, repetidas en tándem cierto número de veces, entre uno a seis nucleótidos, con una longitud menor a 200 bp (Tautz, 1989; Morera *et al.*, 1999; Goldstein y Schlötterer, 1999; Dieringer y Schlötterer, 2003; Ellegren, 2004; Azofeifa, 2006; Allendorf y Luikart, 2007).

La especificidad de un locus se determina utilizando las regiones flanqueantes de estas secuencias, las cuales son únicas (Litt y Luty, 1989; Goldstein y Schlötterer, 1999; Frankham *et al.*, 2002; Ellegren, 2004; Azofeifa, 2006; Allendorf y Luikart, 2007). Los SSRs son un tipo de VNTRs, sin embargo se consideran marcadores de ADN categoría 3, debido al uso de la técnica de PCR para su análisis y la especificidad de las regiones flanqueantes (Goldstein y Schlötterer, 1999; Allendorf y Luikart, 2007). La exclusividad de estas regiones flanqueantes se utiliza para diseñar un par de oligonucleótidos complementarios que delimitan a los fragmentos objetivos, y sirven como iniciadores de PCR, llamados iniciadores o cebadores, los cuales se utilizan para analizar cada locus individualmente (Goldstein y Schlötterer, 1999; Frankham *et al.* 2002; Dieringer y Schlötterer, 2003). Los pares de iniciadores desarrollados para cierta especie se pueden utilizar con frecuencia para especies emparentadas, debido a que los sitios de hibridación para estos iniciadores generalmente se encuentran bien conservados (Frankham *et al.* 2002; Allendorf y Luikart, 2007).

Los microsatélites son altamente polimórficos, evidenciado por la variabilidad de la longitud del fragmento (producto de PCR) amplificado, determinado por el número de veces que se repite el motivo originado por el microsatélite (Frankham *et al.* 2002; Ellegren, 2004; Allendorf y Luikart, 2007). El número de repeticiones en un locus polimórfico varía aproximadamente desde cinco a 100, por consecuencia los productos de PCR se encuentran en un rango de 75-300 pares de base (Allendorf y Luikart, 2007). El origen del polimorfismo se dice que radica en la alta tasa de

mutación que tienen los microsatélites, típicamente de una mutación en cada 1,000 o 10,000 meiosis, por locus por gameto por generación (entre 0 y  $7 \times 10^{-3}$  o  $7 \times 10^{-4}$ ) (Brinkmann *et al.*, 1998; Ellegren, 2004; Allendorf y Luikart, 2007).

El mecanismo de mutación más probable es el del 'resbalo' o 'slippage', el cual consiste en un deslizamiento ya sea de la cadena nueva sobre la cadena original o viceversa, en donde un motivo se cubre por la otra, dando como resultado un mal apareamiento de las cadenas durante el proceso de la replicación o la reparación del ADN (Levinson y Gutman, 1987; Goldstein y Schlötterer, 1999; Ellegren, 2004). Es esta característica, su inestabilidad inherente, de loci microsatelitales, la que los hace sumamente útil para estudios genéticos y evolutivos (Goldstein y Schlötterer, 1999; Ellegren, 2004).

Los microsatélites se consideran codominantes y multialélicos, ya que ambos alelos de un individuo se visualizan y cada fragmento amplificado de longitud diferente representa un alelo distinto del mismo locus (Goldstein y Schlötterer, 1999; Posso y Ghneim, 2006; Allendorf y Luikart, 2007). La clasificación de los microsatélites que propusieron Chambers y MacAvoy (2000) se basa en el número de motivos presentes y sus interrupciones. La tabla 3 muestra los siguientes términos con sus respectivos ejemplos, en donde: 'puro' se refiere a un solo motivo de repetición, 'compuesto' a dos y 'complejo' a tres o más; el término interrumpido lo utilizan para designar cualquier número de pares de bases no repetitivo en medio del microsatélite.

Debido a su naturaleza polimórfica, en estudios de genética de población, los microsatélites son capaces de identificar cada alelo de cada locus en toda la población, obteniendo así datos poblacionales como frecuencias alélicas para poder estimar distancias genéticas entre poblaciones o individuos (Bowcock *et al.*, 1994; Ponsuksili *et al.*, 1999). Esto se puede ver en los trece loci microsatelitales que utiliza el FBI de Estados Unidos en su base de datos CODIS (Combined DNA Index

System), el cual se considera suficiente para poder identificar positivamente a un individuo (Federal Bureau of Investigation, 2000).

**Tabla 3.** Clasificación de microsatélites según Chambers y MacAvoy (2000).

<b>Tipos de microsatélites</b>	<b>Ejemplos</b>
SSR Puro	(ACC) <sub>9</sub>
SSR Interrumpido puro	(ACC) <sub>6</sub> TG(ACC) <sub>7</sub>
SSR Compuesto	(ACC) <sub>5</sub> (TTG) <sub>9</sub>
SSR Interrumpido compuesto	(ACC) <sub>8</sub> TG(ACC) <sub>5</sub> GA(TTA) <sub>6</sub>
SSR Complejo	(ACC) <sub>8</sub> TG(GA) <sub>12</sub> (TTA) <sub>5</sub> GC(TTA) <sub>7</sub>

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Material Biológico

La investigación se desarrolló con individuos pertenecientes a la especie *Ateles geoffroyi* (mono araña) en condiciones de cautiverio en tres distintas localidades en El Salvador (véase tabla 4), y un número total de 18 animales fueron muestreados. Las muestras de ADN se obtuvieron a partir de bulbo de pelos y de sangre.

En total se obtuvieron 18 muestras de pelo y 17 muestras sanguíneas, a causa de una complicación (dosis insuficiente de agente anestésico) durante el muestreo de un individuo donde solo fue posible obtener muestra de pelos. Las muestras de pelos obtenidas consistían en pequeñas cantidades de pelos arrancados con raíz, ya que estos contienen folículo piloso en donde se encuentran las células que dan origen al tallo del pelo (células madre) y de las cuales es posible extraer ADN nuclear. La sangre es una fuente conveniente de ADN y es frecuentemente utilizada como tal, en donde el ADN nuclear se obtiene a partir de leucocitos debido a que los eritrocitos en los mamíferos carecen de núcleo (Hoelzel, 1992).

Es importante hacer notar la naturaleza de las muestras, la cual consiste en una colección de individuos separados, y sin relación filial o reproductiva, por lo que la muestra, como un todo, no es representativa de ninguna población natural directamente. A pesar de esto, es posible considerar a los individuos cautivos como una población cautiva o muestra de la población cautiva de El Salvador, no siendo una población en términos tradicionales, sin embargo aplicando siempre las mismas leyes y parámetros convencionales (incluyendo el equilibrio Hardy-Weinberg, heterocigosidad y homocigosidad) extrapolándolas a las condiciones impuestas por cautiverio.

Las muestras se pueden identificar según el orden de su obtención (número de identificación), junto con el nombre propio del individuo, género, edad y lugar de muestreo (Tabla 4).

**Tabla 4.** Datos esenciales de individuos muestreados.

ID	Nombre	Género	Edad	Lugar
AG1	Loco	♂	6-7	Parque Recreativo Montegrande, San Miguel
AG2	Marcial	♂	5	Parque Recreativo Montegrande, San Miguel
AG3	Panchita	♀	3	Parque Recreativo Montegrande, San Miguel
AG4	Tania	♀	6	Parque Recreativo Montegrande, San Miguel
AG5	Florentin	♂	6	Parque Recreativo Montegrande, San Miguel
AG6	Rosita	♀	7	Parque Recreativo Montegrande, San Miguel
AG7	Chepa	♀	8	Parque Recreativo Montegrande, San Miguel
AG8	Chepe	♂	8	Parque Recreativo Montegrande, San Miguel
AG9	Gorda	♀	>30	LaGeo – Central geotérmica de Berlin, Usulután
AG10	Seco	♂	>30	LaGeo – Central geotérmica de Berlin, Usulután
AG11	Chele	♀	>7	LaGeo – Central geotérmica de Berlin, Usulután
AG12	Seca	♀	>30	LaGeo – Central geotérmica de Berlin, Usulután
AG13	Viejo	♂	*	Finca San Ernesto, La Libertad
AG14	Pancha	♀	*	Finca San Ernesto, La Libertad
AG15	Chayanne	♂	*	Finca San Ernesto, La Libertad
AG16	Zarca	♀	*	Finca San Ernesto, La Libertad
AG17	Chabelito	♂	*	Finca San Ernesto, La Libertad
AG18	Gringa	♀	*	Finca San Ernesto, La Libertad

Género del animal se indica por el símbolo contiguo a su nombre, edades se denotan por años. Símbolo \* indica dato no obtenido.



## 3.2. Protocolo general de trabajo

Todos los protocolos utilizados provienen del Laboratorio de Genética a cargo del Dr. Gustavo Gutiérrez Espeleta, Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica.

### 3.2.1 Toma de muestras

El muestreo se llevó a cabo durante tres fechas:

15/1/2008	8 individuos
31/1/2008	4 individuos
06/2/2008	6 individuos
Total:	18 individuos

N = 18 muestras

El muestreo se realizó bajo la coordinación y el apoyo de técnicos del Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales (MARN), por lo cual las muestras sanguíneas fueron tomadas con su metodología propia, aprovechando un programa de control epidemiológico en vida silvestre cautiva. Se utilizó una dosis de 0.1 cm<sup>3</sup> de salicina como agente anti-inflamatorio y 0.5 cm<sup>3</sup> de clorhidrato de ketamina como agente anestésico, por medio de cerbatana administrada por agentes de dicho Ministerio.

Las muestras sanguíneas constaban de una cantidad promedio extraída de 3 cm<sup>3</sup>, mientras que las muestras de pelo se arrancaron de la zona dorsal del animal, en un promedio de 20 pelos cada muestra, inmediatamente guardándose en bolsas plásticas Ziplock®, una bolsa por individuo muestreado.

Para preservar las muestras sanguíneas se utilizaron tubos de vidrio Vacutainer™ conteniendo K<sub>3</sub> EDTA en el interior del tubo como agente anticoagulante, con tapa de seguridad HEMOGARD™ y tapón siliconado hemorrepeleante, propiamente etiquetadas. Luego se almacenaron temporalmente en una hielera Coleman™ 'personal 8' y se conservaron en hielo a una temperatura

promedio de entre 4° C y 6 °C para el transporte desde los lugares de muestreo al laboratorio en la Escuela de Biología de la Universidad de El Salvador.

Las muestras sanguíneas se almacenaron en un congelador a una temperatura estimada de entre -18 °C y -20 °C hasta el momento de su transporte al Laboratorio de Genética, Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica. Las muestras de pelo se mantuvieron en sus bolsas plásticas respectivas hasta el momento de su transporte a Costa Rica para el cual se transfirieron a tubos de PVC transparente. Las muestras se transportaron en la hielera bajo las condiciones previamente descritas al Laboratorio de Genética de la Universidad de Costa Rica, Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica.

### **3.2.2 Extracción de ADN vía muestra sanguínea**

Protocolo modificado de Wizard® Genomic DNA Purification Kit: Para facilitar la eliminación de la hemoglobina, a la muestra de sangre de 300 µl se le añade 900 µl de H<sub>2</sub>O de PCR (Destilada), posteriormente se le centrifuga por 3 minutos y se elimina el sobrenadante. Luego se resuspende en solución de rehidratación de ADN y se prosigue con el siguiente protocolo (todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente):

1. Se añaden 300 µl de muestra de sangre y 900 µl de solución de lisis celular a un tubo de microcentrífuga y se incuban de 20 - 25 min.
2. Se centrifuga por 3 – 4 min. a velocidad máxima y se descarta el sobrenadante.
3. Se agregan 300 µl de solución de lisis nuclear y se agitan fuertemente con un Vortex.
4. Se adicionan 100 µl de solución para precipitación de proteínas y se mezcla con ayuda del Vortex por 30 seg.
5. Se centrifuga a 14,000 r.p.m. por 5 min.
6. Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo y se agregan 300 µl de isopropanol y luego se mezcla hasta visualizar el ADN (listones blancos).
7. Se repite lo descrito en el Paso 2.

8. Se adicionan 300 µl de etanol 70%.
9. Se repite el Paso 2 y se deja secando, boca abajo, con un ángulo de 45° durante 2 horas.
10. Al secarse, se añaden 100 µl de solución de rehidratación de ADN y se almacena a 4° C entre 4 – 24 horas.

### **3.2.3. Extracción de ADN a partir de raíz de pelos**

Para la extracción de ADN a partir de la raíz de pelos se utilizó la resina Chelex-100, una resina cargada negativamente que después de la lisis celular se une a los cationes de metal, incluyendo iones de magnesio, un co-factor esencial de enzimas que hidrolizan el ADN. El ADN y ARN nuclear permanecen en una solución de agua sobre el Chelex-100 como sobrenadante. Se prepara una solución de Chelex-100 al 5% y se siguen los siguientes pasos:

1. Tres pelos con bulbo se colocan en tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, los bulbos deben hacer contacto con el fondo del tubo, la parte de los pelos que sobresalen del tubo, se cortan al nivel del haz del tubo.
2. Se adicionan 200 µl de la solución de Chelex-100 5% (4° C).
3. Se añade 1 µl de proteinasa K al 2% (rompe los enlaces proteínicos).
4. Se incuba a 56° C (mínimo 7 horas).
5. Posteriormente se hierve a 100° C durante 8 min. para inactivar la proteinasa K.
6. Se centrifuga a 14,000 r.p.m. por 3 min. El sobrenadante se utiliza para la PCR.

### **3.2.4 Electroforesis de las muestras de ADN genómico**

La concentración e integridad del ADN extraído, así como el tamaño de distintos fragmentos de ADN puede ser verificada mediante electroforesis en geles de agarosa, sin embargo, el uso de esta técnica en el presente protocolo se limita a determinar la presencia de ADN en la muestra. La electroforesis consiste en la separación de moléculas a través de una matriz tamponada (agarosa y acrilamida). La matriz funciona como un filtro, separando las moléculas en un campo eléctrico, de

acuerdo al tamaño y la carga neta que poseen, que en el caso del ADN es negativa. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato es el responsable por la fuerte carga negativa, haciendo que los fragmentos migren hacia el polo positivo (ánodo) durante la electroforesis (Posso y Ghneim, 2006). Los ácidos nucleicos separados en geles de agarosa pueden visualizarse mediante la tinción con bromuro de etidio.

#### **3.2.4.1 Preparación de gel**

Para visualizar y comprobar la presencia del ADN genómico extraído se prepararon geles de agarosa al 1%, según el siguiente protocolo:

1. Se pesan 0.5 gr. de agarosa, y se agregan 50 ml de tampón de TAE (tris-acetate–EDTA) a 1x pH 7.7 y se mezclan.
2. Se coloca la solución resultante durante 1 min. al horno microonda.
3. Se enfría al contacto con agua para disminuir vapores emitidos al mezclar con bromuro de etidio en el siguiente paso.
4. A la solución se agregan 2.5 µl bromuro de etidio.
5. Se vacía en cámara electroforesis (no dejar burbujas en peines).
6. Luego se esperan 30 min. mientras la agarosa se polimeriza.

#### **3.2.4.2. Preparación de las muestras de ADN**

Se prepararon las muestras para electroforesis, con el fin de comprobar la presencia de ADN en las muestras preparadas, por lo que se siguieron los siguientes pasos:

1. Para cada muestra, se mezcla 1 µl azul de bromofenol 6x y 5 µl de ADN extraído, éste funciona como tampón de carga, el cual le da color y densidad a la muestra para facilitar el proceso al cargar el gel. El tampón de carga contiene glicerol para que el ADN no flote (ADN menos denso que buffer TAE).

2. Se colocan 3  $\mu$ l de la escalera de ADN marca FastRuler™ en el primer pozo disponible del gel preparado de agarosa al 1 %. Este es un marcador de peso de carga, con el que se obtiene una idea del tamaño de banda. También contiene azul de bromofenol y glicerol.
3. Se coloca cada muestra en distintos pozos.
4. Se corre a 70 V por 30 min.

### 3.2.5 Amplificación de ADN

La amplificación de los fragmentos de ADN se realiza con el objetivo de facilitar la lectura de las hebras de ADN en el analizador genético. Se logra por medio de la técnica molecular conocida como Reacción en Cadena de la Polimerasa, la cual permite amplificar más de un millón de veces un fragmento de ADN obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de sus secuencia nucleotídica (Allendorf y Luikart, 2007).

La técnica de PCR consiste en la utilización de los oligonucleotidos, comúnmente llamados iniciadores o cebadores (“primers” en inglés), que son complementarios a las zonas flanqueantes de la región que se desea amplificar. Estos oligonucleótidos actúan como cebadores para la síntesis *in vitro* de ADN, habitualmente catalizada por la enzima *Taq* Polimerasa (aislada del la bacteria termófila *Thermus aquaticus*). Debido a la temperatura óptima de la *Taq* Polimerasa, ésta permite el uso de temperaturas elevadas para la unión de iniciadores y su extensión, para aumentar el nivel de exigencia de la reacción y reduciendo así el nivel de extensión de los iniciadores unidos inespecíficamente al ADN (Goldstein y Schlötterer, 1999; Azofeifa, 2006; Allendorf y Luikart, 2007).

La técnica implica la ejecución de una serie repetitiva de ciclos, compuestos por tres pasos básicos: (i) desnaturalización del ADN (separación de la doble hebra en hebras); (ii) la unión (hibridación) del iniciador a la cadena desnaturalizada al principio o final del la secuencia objetivo; y (iii) la síntesis (extensión), a partir del

iniciador, de una nueva hebra complementaria a la hebra original mediante la acción de la polimerasa. Como consecuencia de lo anterior, después de cada ciclo térmico, resulta una acumulación exponencial de un fragmento específico de ADN (Goldstein y Schlötterer, 1999; Azofeifa, 2006; Allendorf y Luikart, 2007).

### **3.2.5.1 Preparación de la solución para PCR**

La solución utilizada es modificada a partir de la solución de Di Fiore y Fleischer (2004) la cual está diseñada para monos platirinos de las familias Atelidae, Pitheciidae y Cebidae.

Cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl en tubos de PCR de 200 µl, con los siguientes componentes:

- 2.5 µl Buffer (10x Promega™ PCR buffer) (inicia reacción)
- 1.5 µl MgCl<sub>2</sub> (2.0 mM) (inicia reacción)
- 2.0 µl dNTPs (10 mM, 2.5 mM cada dNTP) (deoxinucleosidos trifosfatados)
- 2.4 µl Iniciadores (1.2 µl de cada uno a 10 mM)
- 0.625 Unidades de Promega™ ADN Polimerasa *Taq* (produce síntesis de ADN en la región entre los dos iniciadores)
- 50 ng ADN (extraído previamente).
- Se añade H<sub>2</sub>O hasta alcanzar 25 µl.

### **3.2.5.2 Iniciadores utilizados**

Los loci microsatelitales que se utilizaron en el presente estudio, son los siguientes: 1118, 311 y 5, correspondientes a sus respectivos iniciadores del mismo código de asignación.

Identificados por Di Fiore y Fleischer (2004) en monos lanudos (*Lagothrix lagotricha*), los loci 1118 y 311 (números de consentimiento de GenBank son AY450290 y AY450292 respectivamente) se consideran aptos para el estudio de otros monos platirrinos, en especial aquellos pertenecientes a la familia Atelidae, como lo son monos del género *Ateles*, entre otros, debido a su proximidad evolutiva. El Locus 5, identificado en el titi león dorado (*Leontopithecus rosalia*), al momento de la elaboración del presente documento, aun no ha sido publicado, por lo que no se tiene su secuencia ni su motivo de repetición; sin embargo, se utilizó para el estudio poblacional de monos platirrinos (Gutiérrez-Espeleta, 2008, com. per.<sup>1</sup>).

El locus 1118 contiene motivos de repetición dinucleótidos al igual que locus 5 (Gutiérrez-Espeleta, 2008, com. per.<sup>2</sup>), mientras que locus 311 contiene motivos de repetición trinucleótidos y ambos se consideran SSR compuestos.

Los iniciadores fueron provistos por el Laboratorio de Genética de la Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, a cargo del Dr. Gustavo Gutiérrez-Espeleta.

Los motivos de repetición del respectivo locus, las secuencias de los iniciadores (ascendentes y reversos), y sus temperaturas de hibridación se encuentran en la tabla 5.

---

<sup>1</sup> Gutiérrez-Espeleta, G. 2008. Di Fiore, A. *Sin Publicar* (correo electrónico). Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

<sup>2</sup> Gutierrez-Espeleta, G. 2008. Di Fiore, A. *Sin Publicar* (correo electrónico). Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

**Tabla 5.** Resumen de los distintos datos de iniciadores de loci microsatelitales, identificados en *Lagothrix lagotricha*, utilizando los loci 1118, 311 y 5 (Di Fiore y Fleisher, 2004).

Locus ID	Secuencias de Primers (5'-3')	Motivos de repetición	Temp. De hibridación
1118	A* TTTCTCCCTCTCAGATTACCAG R CCTTGAGGTTTTTGGGTTCC	[CA] <sub>2</sub> [TA] <sub>1</sub> [CA] <sub>17</sub>	50° C
311	A CTTCCGAAAGCCATTTCTCC R* TTAATGCCAGATGATTTTGG	[GAA] <sub>3</sub> [GAG] <sub>9</sub> [CAG] <sub>6</sub>	52° C
5	A* TCTGTTTGAATCCCCAGTCC R GCAGTCCCTCAAGGTTTTCT	—	—

A y R indican iniciadores ascendentes y reversos, respectivamente. El miembro de la pareja iniciador marcado fluorescentemente se denota con un asterisco.

La secuencia de origen de los loci 1118 y 311 se puede apreciar en las tablas 6 y 7, respectivamente, junto con la región de repetición, y las secuencias de oligonucleótidos flanqueantes a la secuencia objetivo a los cuales se híbridizan los iniciadores.



**Tabla 6.** Datos de secuencia en pares de base para el locus 1118 en *Lagothrix lagotricha*.

Locus ID:	1118
Región de Repetición:	53..92
Iniciador Ascendente:	1..22
Iniciador Reverso:	120..139

ORIGEN

```

1      TTTCTCCCTC TCAGATTACC AGccccccac ccccacggca ccaaaaagaa aacacataca
61     cacacacaca cacacacaca cacacacaca cagtttcatt ttgtctcttc tggttacctG
121    GAACCCAAAA ACCTCAAGGa ttatagtgtc aggctgggtg tgggtgtttca tadcataatc
181    ccaacacttt aggagg

```

Letras en mayúscula y subrayadas indican secuencias complementarias a los iniciadores (NCBI, 2008a).

**Tabla 7.** Datos de secuencia en pares de base para el locus 311 en *Lagothrix lagotricha*.

Locus ID:	311
Región de Repetición:	382..435
Iniciador Ascendente:	349..368
Iniciador Reverso:	525..545

ORIGEN

```

1      cataaacgtg gcaatgtcct ttccattccg tataggattt gctgtcata tgtgaacca
61     aataaaaata aaagtgccac ctgcactaaa ttctcatttc gtctctaaca ggagagcaat
121    ttgaagcaag actctctctc tctctctcac tctcactctc tttcactccc tctctctctc
181    cagcatttat ttcgacccta attggtttcc ctcttcttcg acgtatctag tggataatgc
241    acaccttccc tgagtccagag cctgcaaaaa gcaanggaac gaatggagaa ngtgcaacaa
301    gcagaagggg ggctgcaaag ctgcctanga ctatgtttcc tggcaaaaCT TCCGAAAGCC
361    ATTCTCCa aatangtnt ngaagaagaa gaggaggagg aggaggagga ggaggagcag
421    cagcagcagc agcagcatga aagagccccg cttggaaggc ggtttggatt ttatttgtgt
481    gttttgtgga ttctttttat tttgctttac aatgcatct tacaCCAAAA TCATCTGGCA
541    TTAAaaatga at

```

Letras en mayúscula y subrayadas indican secuencias complementarias a los iniciadores (NCBI, 2008b).

### 3.2.5.3 Programa para PCR:

Se utilizó un solo programa de PCR (Tabla 8) para los iniciadores de los loci 1118, 311 y 5, debido a la similitud entre sus temperaturas de hibridación o anillamiento. El programa consta de los siguientes pasos: desnaturalización inicial de 15 min a 95 °C, 35 ciclos a 94 °C (desnaturalización) durante 30 s, con una temperatura de hibridación o anillamiento de 55 °C durante 1 min y 30 s, y a 72 °C (extensión) por 1 min; y una extensión final de 60 °C por 10 min, seguido por una disminución de temperatura hasta 22 °C.

**Tabla 8.** Programa de PCR para los loci 1118, 311 y 5.

15min	95 °C	
30seg	94 °C	35 ciclos
1min30s	55 °C	
1min	72 °C	
10min	60 °C	
&	22 °C	

### 3.2.5.4 Electroforesis de los productos de PCR

Para verificar la amplificación de los productos de PCR, se preparó un gel de agarosa al 2% con el protocolo previamente descrito. El tampón utilizado es buffer TAE 1x pH 7.7. Se utiliza para visualizar y comprobar la amplificación de fragmentos de ADN. La calidad del ADN se debía evaluar visualizando la presencia de bandas nítidas de bajo peso molecular, y observando el grado de ruptura visible, presentándose como un rastro a partir de esa banda

La cantidad de ADN extraído de una muestra se midió cualitativamente haciendo una comparación de la intensidad de fluorescencia emitida por dicha muestra con la de una muestra control perteneciente a la escalera de ADN FastRuler™.

### 3.2.6 Análisis de Muestras (Electroforesis Capilar)

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis capilar en un analizador genético ABI PRISM® 310 de Applied Biosystems. El Analizador Genético 310® es un sistema compuesto por el equipo instrumental, una computadora Macintosh®, varios programas y reactivos (Applied Biosystems, 2001a).

El funcionamiento de este sistema radica en la detección de la fluorescencia utilizando colorantes fluorescentes llamados fluorocromos (sustancias que tienen la propiedad de emitir un fotón de una longitud de onda determinada cuando captan o son excitados por un fotón incidente de otra longitud de onda específica), que se unen a los productos de extensión ACGT durante reacciones de análisis del ADN, incorporándose por medio de iniciadores 5' o terminadores 3' dideoxinucleotidos, utilizando polimerasas para la extensión de los iniciadores (Applied Biosystems, 2001b).

El sistema de detección de fluorescencia funciona por medio de electroforesis capilar, en donde la base o medio de separación es un polímero incluido dentro de un capilar de sílice de unos 50 µm de diámetro y longitud variable. Por medio de acciones automatizadas, cada muestra fluorocromada se coloca sucesivamente en contacto con un electrodo catódico junto con una terminación del capilar de vidrio lleno de polímero. Un electrodo anódico correspondiente en la otra terminación del capilar se encuentra inmerso en un buffer, creando una corriente eléctrica. Mientras la corriente fluye por el capilar, una porción de la muestra entra en el mismo, en un proceso denominado inyección electrocinética. Luego, la terminación cercana al cátodo se coloca en el buffer y se aplica la corriente una vez más para continuar con la electroforesis.

Cuando los nucleótidos alcanzan la ventana de detección en la cubierta capilar, un láser excita los marcadores fluorescentes. Una cámara CCD (por sus

siglas en inglés: Dispositivo de Cargas Interconectadas) capta el nivel de fluorescencia emitida por los marcadores, y luego el software interpreta el resultado como tamaño de los fragmentos determinando la longitud de la secuencia.

### **3.2.6.1 Preparación de los productos amplificados**

Previamente a la electroforesis capilar se lleva a cabo el siguiente protocolo:

- Se prepara cada muestra (en tubos de muestra de Analizador Genético 310) con 12 µl de formamida desionizada (para resuspender muestras antes de la inyección electrocinética en sistemas de electroforesis capilar) con 0.5 µl de marcador de peso molecular ROX (GeneScan®-500HD [ROX]<sup>TM</sup>), como un estándar para referencia de tamaño marcador ROX 500 y 1 µl de ADN.
- Se cubre el tubo con un tabique y se agita en un vortex.
- Se desnaturalizan los fragmentos de ADN (las muestras se colocan nuevamente en el termociclador a 95° C durante 2 min. para separar las hebras).
- Se coloca la mezcla en hielo, aplicando así un golpe térmico por 3 min., con el fin de retardar la reacción. Un golpe térmico consiste en un cambio de temperatura brusco desde 95° C (desnaturaliza o abre las hebras del ADN), hasta enfriarse en hielo (evita que las hebras se vuelvan a unir), ya que sólo es posible analizar los fragmentos mientras estén desnaturalizados en forma monocatenaria.
- Se colocan las muestras en la bandeja del automuestreador del secuenciador ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer.

### **3.2.7 Análisis de Datos Crudos**

El software ABI PRISM® 310 Data Collection capta los datos crudos (fluorescencia detectada) en el corrido del análisis de fragmentos, los cuales se toman a partir del nivel de fluorescencia detectada por la cámara CCD (Applied Biosystems, 2001b). Este programa contiene información sobre la emisión del espectro de fluorescencia en los marcadores y procesa los datos crudos como tamaño de fragmentos o concentración relativa de los mismos para el uso de la aplicación utilizada para el análisis.

Los datos crudos son analizados automáticamente por el software de análisis GeneScan® (Applied Biosystems, 2001c). Para determinar el tamaño, fragmentos de ADN, en este caso microsatélites, se comparan con fragmentos contenidos dentro del marcador estándar.

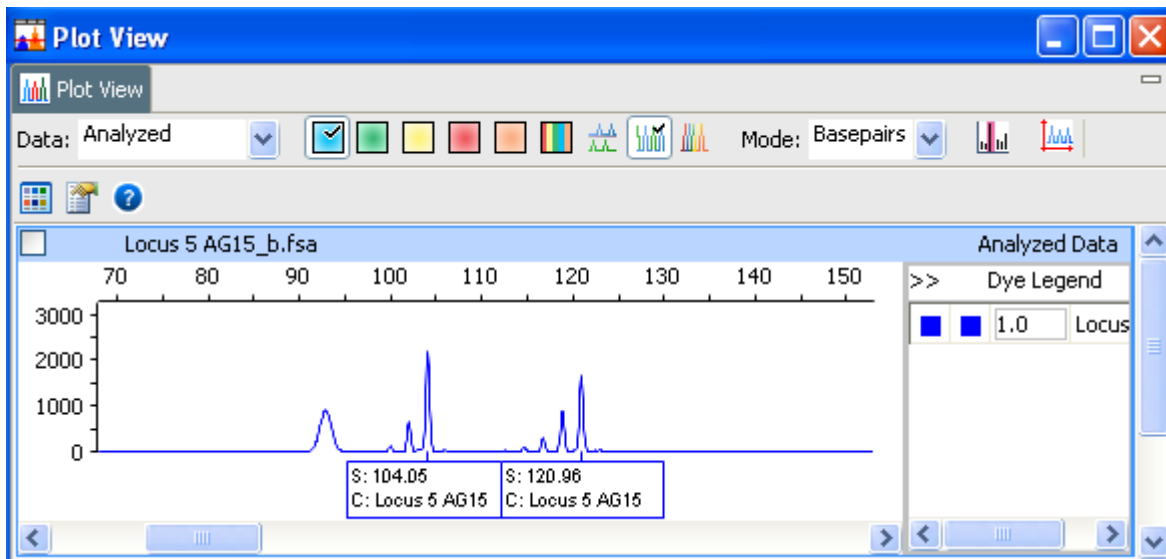
### **3.2.8 Interpretación de Datos Analizados**

Se utilizó el programa Peak Scanner™ (Applied Biosystems, 2006) para obtener la longitud exacta de los fragmentos en pares de bases. Peak Scanner™ realiza análisis de los datos crudos, obviando el análisis previo de GeneScan® por ser un software más reciente. Una vez asignados los tamaños de pares de bases a cada muestra por el software, se realizó la interpretación manual de los electroferogramas para genotipificar (determinar el genotipo).

Peak Scanner™ se encarga de permitir la visualización de electroferogramas que contienen información sobre cada locus analizado, representando cada fragmento como un pico (Fig.1). De esta manera es posible identificar el genotipo de cada individuo en cada locus, determinando si es homocigoto o heterocigoto, como también determinar el número de repeticiones del motivo y el tamaño del fragmento. Los electroferogramas son representaciones en picos de los datos de tamaño y cantidad basados en fragmentos de ácidos nucleícos fluorocromados que han sido

sometidos a electroforesis en el analizador genético y procesado por un software de análisis genético.

Los datos generados por los picos en un electroferograma pueden mostrar información sobre la cantidad y tamaño de los fragmentos, la Altura de Pico (Peak Height) y los pares de bases (Base Pairs), respectivamente. La altura de un pico se determina por la intensidad de la señal en el punto fluorescente más alto de un fragmento fluorocromado. Base pairs (bp) consta de la unidad del tamaño de un fragmento, las pares de bases. El número de bp indica la longitud estimada del fragmento de ácido nucleico, relativa al marcador estándar.



**Fig. 1** Ventana para visualización de electroferogramas e identificación de picos verdaderos en el software Peak Scanner™.

Según Litt y Luty (1989), Goldstein y Schlötterer (1999), Azofeifa (2006), Posso y Ghneim (2006), como también Allendorf y Luikart (2007) el polimorfismo dado por la variación de la longitud de cada fragmento amplificado representa un alelo diferente en el mismo locus, por lo que es suficiente determinar los alelos presentes en cada muestra para llevar a cabo la identificación del genotipo de cada individuo.

Debido a la naturaleza diploide de la especie en estudio, el perfil electroforético de un individuo podía presentar 1 ó 2 picos principales (representando alelos), interpretándose como un genotipo homocigótico o heterocigótico, respectivamente.

### 3.3 Análisis de Resultados

Una vez establecida la base de datos de los genotipos, se llevaron a cabo una serie de análisis empleando la aplicación GenAEx 6.0© (Peakall y Smouse, 2006) de Microsoft Excel y el programa Genepop 4.0© (Raymond y Rousset, 1995).

#### 3.3.1 Conteo alélico

El primer dato que se examinó ante la serie de genotipos fue la cantidad de alelos distintos ( $A$ ) identificados para cada locus. El conteo alélico, o el número de alelos total ( $Na$ ), se determina por conteo directo. Este dato en cambio nos ayuda a determinar el número de individuos ( $N$ ) utilizado para cada locus, el cual se utilizará para las próximas fórmulas a seguir.

Normalmente  $N$  consiste en el número de muestras analizadas, no obstante al enfrentar una pérdida de datos, es posible que  $N$  no sea igual en todos los loci analizados en un estudio. Por consecuencia,  $N$  se define para cada locus como el número de muestras con una amplificación exitosa (Peakall y Smouse, 2006). Para determinar  $N$  se puede realizar un conteo directo, o se puede utilizar la fórmula (i) tomando en cuenta que los individuos en estudio pertenecen a una especie diploide.

$$(i.) N = \frac{Na}{2}$$

Siendo  $N$  el número de muestras con una amplificación exitosa y  $Na$  el número de alelos total observados para un locus determinado.

### 3.3.2 Frecuencia alélica

La frecuencia alélica se calculó individualmente por locus. Determinada para cada alelo, se puede obtener de una forma simple por medio de conteo directo de la proporción de alelos distintos, aunque es posible obtener el mismo resultado por medio de la siguiente fórmula:

$$(ii.) \textit{fr} = \frac{2N_{xx} + N_{xy}}{2N}$$

Siendo *fr* la frecuencia para el alelo “x”, *N<sub>xx</sub>* el número de individuos homocigotos del alelo “x”, *N<sub>xy</sub>* el número de individuos heterocigotos del alelo “x” y *N* el número de muestras para el locus al cual pertenece el alelo “x”, en este caso el número de individuos a los que se logró determinar el genotipo (Peakall y Smouse, 2006).

### 3.3.3. Estimación de variación genética

En la presente sección se consideran las medidas utilizadas para cuantificar la variación genética del grupo estudiado, examinando los distintos niveles de heterocigosidad necesarios, el índice de fijación y el número de alelos efectivos. De suma importancia, se debe señalar que los índices y medidas expuestas a continuación se utilizan de forma general en poblaciones naturales o cautivas, es en este respecto que se debe tener mucho cuidado al introducirlas al contexto de la muestra procesada, la cual, como se ha establecido previamente, no constituye una población en términos biológicos.



### 3.3.3.1 Heterocigosidad

Para los cálculos posteriores fue necesario determinar tanto la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) como la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), los cuales se expresan en frecuencias, cuantificándose entre 0 y 1. La  $H_o$  se calculó para cada locus, donde el número de heterocigotos se determinó por conteo directo, y utilizando  $N$  para cada locus individual se empleó la fórmula (iii.).

$$(iii.) H_o = \frac{\text{No. de Hets.}}{N}$$

Hoelzel (1992) indica que la  $H_e$  promedio de  $n$  loci dentro de una población es la mejor medida general de variación genética. Nei, citado por Allendorf y Luikart (2007), se refiere a esta medida como diversidad de genes, y señala que se puede interpretar como a) la proporción promedio de heterocigotos por locus en una población panmíctica, o b) la proporción esperada de loci heterocigóticos en un individuo escogido de forma aleatoria. Se hace constar que en el presente estudio el contexto en el que habla Nei se aplica para secuencias de repeticiones cortas (microsatélites), obviando su referencia a genes (secuencias codificantes).

$$(iv.) H_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

La fórmula (iv.) se utilizó para determinar la  $H_e$  para cada locus, siendo  $H_e$  la heterocigosidad esperada, y  $p_i$  la frecuencia del  $i$ ésimo alelo (Peakall y Smouse, 2006).

### 3.3.3.2 Índice de fijación

Desarrollados por Sewall Wright (1931, 1951), los estadísticos  $F$  son una medida del déficit de heterocigotos relativo a las proporciones esperadas por el equilibrio Hardy-Weinberg en la población en estudio. Estos estadísticos compuestos por un índice básico del cual se derivan, éste siendo  $F$ , el cual según Wright es la proporción por la cual la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) se encuentra reducida en relación a la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) en una población de apareamiento aleatorio con las mismas frecuencias alélicas.

Aunque los estadísticos  $F$  ayudan a verificar o inferir el grado de aislamiento genético de las poblaciones (MARN, 2003), utilizando solamente el índice de fijación ( $F$ ) se logra expresar matemáticamente una estimación de los niveles de desviación de las proporciones Hardy-Weinberg del presente grupo en estudio.

$$(v.) F = 1 - (H_o / H_e)$$

Se calculó por locus, por medio de la fórmula (v.) donde  $F$  es el índice de fijación,  $H_o$  es la heterocigosidad observada y  $H_e$  la heterocigosidad esperada; aunque es también posible utilizar la fórmula (vi.) (Peakall y Smouse, 2006). Los valores se pueden encontrar en un rango de entre -1 y 1.

$$(vi.) F = \frac{H_e - H_o}{H_e}$$

Cuando se trata de  $F$ , se esperan valores cerca de cero bajo condiciones de apareamiento aleatorio, mientras que los valores positivos indican la presencia de endogamia o de alelos nulos. Por lo contrario, los valores negativos indican un exceso de heterocigosidad, debido a un apareamiento selectivo o selección heterocigótica, suponiendo que la muestra proviene de una población silvestre.

### 3.3.3.3 Número de alelos efectivos

El número de alelos efectivos ( $A_e$ ) es el número de alelos que al poseer la misma frecuencia presentan la heterocigosidad u homocigosidad observada. Sin embargo, este parámetro no proporciona más información sobre el número de alelos presentes en un locus que cualquier cálculo de heterocigosidad (Allendorf y Luikart, 2007). Esta medida facilita una comparación entre loci con frecuencias alélicas distintas.

Se puede calcular utilizando la fórmula (vii.), donde  $A_e$  es número de alelos efectivos, y  $p_i$  es la frecuencia del  $i$ ésimo alelo (Peakall y Smouse, 2006). Es importante hacer notar la posibilidad de obtener el mismo resultado haciendo uso de la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) con la fórmula (viii.), debido a la relación del uso de la suma de las frecuencias alélicas elevada al cuadrado ( $\sum p_i^2$ ) vista en la fórmula (iv.) (Allendorf y Luikart, 2007).

$$(vii.) A_e = 1 / \sum p_i^2$$

$$(viii.) A_e = 1 / 1 - H_e$$

### 3.3.4 Principio de Hardy-Weinberg

Postulada en 1908 de forma independiente por el matemático inglés George Hardy y el médico alemán Wilhelm Weinberg, propone el modelo más simple de la genética de poblaciones: *una población con apareamiento aleatorio en donde no se presenten factores que causen cambios genéticos de generación en generación* (Allendorf y Luikart, 2007).

En poblaciones naturales para que este modelo tenga lugar, se suponen varias condiciones: una población de gran tamaño en donde los apareamientos se

dan al azar (población panmíctica), y la ausencia de mutaciones, selección natural y migración. Debido a que la herencia mendeliana no tiende a favorecer a un alelo, básicamente las frecuencias alélicas y genotípicas permanecerán constantes de generación en generación y la población no evolucionará.

La ley de Hardy-Weinberg, (también llamado equilibrio de Hardy-Weinberg, o principio de Hardy-Weinberg) ha sido una gran herramienta para la investigación de la genética de poblaciones desde los principios de los 1900s (Crow, 1986), y con la aparición de las técnicas de la biología molecular y celular, la cantidad de información genética ha incrementado exponencialmente, resultando en un uso generalizado de las proporciones de Hardy-Weinberg. A continuación se explica la aplicación de esta ley en el presente estudio.

#### **3.3.4.1 Proporciones Hardy-Weinberg (EHW)**

En el caso de un locus con dos alelos codominantes ( $a$  y  $b$ ), la frecuencia esperada de los tres genotipos se establece según la siguiente fórmula: (ix)  $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$ , donde  $p$  y  $q$  son las dos frecuencias alélicas para  $a$  y  $b$ , respectivamente;  $p^2$  y  $q^2$  son las frecuencia de homocigotos  $aa$  y  $bb$ , respectivamente; y  $2pq$  la frecuencia de heterocigotos  $ab$  (Hardy, 1908). Según Allendorf y Luikart (2007), el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) se extiende a más de dos alelos con dos reglas:

1. La frecuencia esperada de homocigotos para cualquier alelo es la frecuencia de ese alelo elevada al cuadrado.
2. La frecuencia esperada de cualquier heterocigoto es dos veces el producto de la frecuencia de los dos alelos presentes en el heterocigoto.

### 3.3.4.2 Prueba del EHW

Las frecuencias genotípicas de muestras de poblaciones naturales pueden ser puestas a prueba fácilmente para verificar si se ajustan al EHW, pero las muestras procesadas en el presente estudio no provienen de una población natural. A pesar de eso, se realizó esta prueba para determinar cuánto se desviaría la muestra de las proporciones del EHW si los individuos provinieran de una población panmíctica, con el fin de establecer lo siguiente: *la desviación de proporciones Hardy-Weinberg de las muestras suponiendo que las muestras forman una población (en cautiverio)*.

Esto ayudará a estimar el estado de las frecuencias alélicas y genotípicas de una posible población cautiva compuesta por la colección de individuos muestreados, y por consecuencia, lograr una mejor simulación de las condiciones a las que se debe someter para lograr que las frecuencias alélicas permanezcan lo más constante posible para obtener una población viable. Según Smith (1970) ninguna población natural se ajusta exactamente a todas las condiciones supuestas por el EHW (porque si no, no se diera la evolución), por lo que ninguna población se encuentra exactamente en un EHW, pero lo importante es determinar cuánto se aproximan las frecuencias alélicas y genotípicas al EHW.

Lo anterior se evalúa por medio de una Prueba de Adherencia (verificación del ajuste de las frecuencias observadas a las esperadas), es decir, si las frecuencias observadas se ajustan a lo esperado por el EHW. Una de las maneras puede ser la utilización de la aplicación de la prueba de chi-cuadrado ( $X^2$ ) obtenido de la siguiente manera:

$$(x.) \quad X^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

Siendo O el número de individuos observados y E el número de individuos esperado. En la fórmula (x.) se calcula el valor de chi-cuadrado para cada genotipo y se suman los totales para obtener un solo valor. El valor  $X^2$  incrementa

proporcionalmente directo a la diferencia entre los valores observados y esperados (Allendorf y Luikart, 2007).

Para aplicar esta prueba se requiere establecer la hipótesis nula, *en este caso la hipótesis nula es que las muestras de la colección de individuos se encuentran en EHW*. La prueba funciona bajo la suposición de que la hipótesis nula es correcta.

El valor  $\chi^2$  luego se compara con una tabla de distribución utilizando los grados de libertad ( $Gf$ ), un estimador del número de categorías independientes en una prueba particular, los cuales en este caso son iguales al número de genotipos posibles menos el número de alelos (equivalente a la fórmula xi.). El resultado es la probabilidad (valor-P) de que la hipótesis nula sea verdadera.

$$(xi.) \quad Gf = \frac{[A(A-1)]}{2}$$

Por ejemplo, al tener dos alelos a y b, se tienen tres clases de datos observados, (genotipos aa, ab y bb), cuyos valores esperados se calcularon con  $p^2 + 2pq + q^2$ , utilizando una sola frecuencia génica ya que  $p+q = 1$  (Hardy, 1908); por lo que en ese caso los grados de libertad se limitan a 1 (número de genotipos menos número de alelos:  $3 - 2 = 1$ ).

Por convención, si la probabilidad estimada por una prueba estadística es menor a un valor- $\alpha$  (nivel de significancia), entonces la diferencia entre los valores observados y esperados se dice que es significativa (no es probable que sea debido al azar). Esto se debe a que el valor- $\alpha$  se utiliza para calcular un intervalo de confianza ( $[1-\alpha]100\%$ ). En el presente estudio se utilizó un valor- $\alpha$  de 0.05 para computar un intervalo de confianza del 95% utilizado en la mayoría de publicaciones y el más idóneo para poder evitar un error tipo II, que en este caso es aceptar que la muestra se encuentra en EHW cuando no lo está.

El método de cálculo utilizado en GenAEx© (Peakall y Smouse, 2006) paso por paso se puede apreciar a continuación:

1- Frecuencia genotípica esperada

$$= (\text{frecuencia de alelo } x) \times (\text{frecuencia de alelo } y)$$

2- Conteo de genotipos observados (conteo directo)

3- Conteo de genotipos esperados =  $(\text{frecuencia genotípica}) \times (\text{numero de muestras})$

4- Diferencia entre resultado de (2) y (3)

$$= (\text{conteo genotipo observado} - \text{conteo genotipico esperado})$$

5- Resultado de (4) elevado al cuadrado

$$= [(\text{conteo genotipo observado}) - (\text{conteo genotipico esperado})]^2$$

6- Resultado de (5) dividido entre (3)

$$= \frac{[(\text{conteo genotipo observado}) - (\text{conteo genotipico esperado})]^2}{(\text{conteo genotipico esperado})}$$

7- Suma de todos los resultados de (6) =  $\chi^2$

### 3.3.4.3 Prueba exacta del EHW

Hedrick (2005) hace notar que los resultados de chi-cuadrado para EHW deben ser tratados con cautela cuando el tamaño de la muestra es menor a cincuenta (<50) y cuando los números esperados son menores a cinco (<5) en genotipos esperados. En situaciones en las que se trata con muestras pequeñas se presenta cierta parcialidad debido a la discrepancia entre los genotipos observados y la frecuencia de los posibles números de genotipos predichos por las proporciones Hardy-Weinberg. Demostrado por Levene (1949), en una muestra finita de  $N$  individuos, los heterocigotos se ven incrementados por una tasa de  $1/(2N-1)$  mientras que los homocigotos disminuyen de forma equivalente (Allendorf y Luikart, 2007).

Para superar las limitaciones de números esperados pequeños con la prueba de chi-cuadrado, Fisher (1935) propone el uso de pruebas exactas, que se llevan a cabo determinando las probabilidades de todas las muestras posibles suponiendo que la hipótesis nula es cierta. Esto usualmente se lleva a cabo a través de una computadora debido a las inmensas cantidades de valores-P que se deben computar, esto junto con la exactitud de la prueba de ahí se deriva el nombre de pruebas exactas (Raymond y Rousset, 1995).

Al realizar pruebas de adherencia al EHW en loci con muchos alelos, como lo son los microsátélites, se crea un problema debido a que varios genotipos tendrían números esperados extremadamente pequeños. Esto afecta cuando se trabajan con muestras pequeñas, en los cuales no se representan todos los genotipos posibles.

La prueba exacta en el presente estudio se realizó por medio del programa Genepop®, y opera bajo los principios de un proceso Monte Carlo (MC). Consiste en realizar simulaciones con el mismo número de individuos ( $N$ ) y la misma proporción de alelos ( $fr$  alélica) que la muestra original, permaneciendo estas constantes en todas las simulaciones a excepción de la heterocigosidad. La operación, llamada Cadena de Markov Monte Carlo (MCMC) consiste en los siguientes pasos según (Raymond y Rousset, 1995):

- 1- Un paso de desmemorización: se basa en una cadena de Markov, un modelo matemático de naturaleza estocástica que consiste en una serie de eventos en la cual la probabilidad de que un evento ocurra depende del evento anterior, por lo se dice que es una cadena con “memoria”. Si este paso es lo suficientemente largo, el estado de la cadena al final será independiente del estado inicial. Se utilizaron 10,000 pasos de desmemorización.
- 2- Un paso de lotes o tandas: éstas son las simulaciones basadas en el proceso Monte Carlo de crear una muestra de  $N$  individuos igual a la muestra original



utilizando la misma frecuencia alélica. Esto crea N individuos diploides en cada tanda con una heterocigosidad distinta. Se usaron 5,000 simulaciones.

Para cada tanda se calcula el chi-cuadrado cuyo valor se compara con el de los datos observados; la proporción de valores  $X^2$  computados que resulten en un valor-P igual o mayor que el observado proveen una estimación independiente de la probabilidad de que la hipótesis nula sea cierta (Raymond y Rousset, 1995). Esto se resume en la fórmula  $K / N$ , donde K es el número de valores-P iguales o mayores a los datos observados y N el número de simulaciones realizadas (Binder y Heermann, 1989 citado por Fernández-Rosado. F, 2008).

Lo anterior descrito se puede resumir en que la prueba exacta es simplemente un procedimiento de permutación en donde todas las posibles combinaciones de genotipos son generadas y además sus respectivas probabilidades calculadas, cuya proporción de valores iguales o mayores a lo observado proveen una estimación exacta de la probabilidad de que la hipótesis nula sea cierta.

### **3.3.5 Alelos nulos**

Los alelos nulos aparecen en marcadores moleculares de repeticiones cortas en tándem cuando sucede una mutación que imposibilita su detección; en loci microsatelitales son aquellos que no amplifican durante la PCR produciendo una pérdida alélica ('allelic dropout' en inglés). Estos alelos contienen sustituciones en uno o ambos sitios de hibridación de los iniciadores, que no permiten una amplificación durante la PCR, haciendo imposible su detección (Dakin y Avise, 2004; Brookfield, 1996). Esto significa que la presencia de un alelo nulo en un individuo heterocigoto (alelo nulo y alelo normal) se detectaría como un individuo homocigoto (solamente se detectaría un solo pico verdadero en el electroferograma) y un homocigoto simplemente no se detecta.

Se estimaron las frecuencias de los posibles alelos nulos en cada uno de los tres loci utilizando el software Genepop©, que funciona con el algoritmo iterativo de máxima esperanza (ME) de Brookfield (1996), el cual determina las frecuencias de los alelos nulos que maximizan la probabilidad de obtener los datos observados de una población en EHW. Conocer estas frecuencias ayuda a explicar la razón de una sobreabundancia de individuos homocigotos y además proveen valores reales de las demás frecuencias alélicas asumiendo la presencia de alelos nulos.

Genepop© toma el alelo con el número más alto de un locus como el alelo nulo, y computa la frecuencia de todos los alelos y la cantidad de individuos homocigotos para un alelo  $X$ , y los heterocigotos del alelo  $X$  y el alelo nulo. La frecuencia del alelo nulo que se obtiene es aquella que más se aproxima a la necesaria para complementar la frecuencia alélica nueva.

## 4. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente estudio se presentan a continuación, clasificados según el locus analizado, los datos de los cálculos de probabilidades y el valor para su aplicación práctica.

Por consecuencia, se expone de forma ordenada y esquematizada todos los resultados obtenidos, se realiza un análisis del estado de los tres loci, incluyendo frecuencias alélicas, el resultado de las pruebas aplicadas del equilibrio Hardy-Weinberg, así como otros parámetros de interés de la conservación biológica.

### 4.1 Visualización de los perfiles electroforéticos

Cada una de las muestras amplificadas se sometió a electroforesis capilar en un analizador genético ABI PRISM® 310 para poder determinar su genotipo utilizando los tres loci microsatelitales 1118, 311 y 5.

La altura de los picos obtenidos en los electroferogramas de los microsatélites varió considerablemente, inclusive entre repeticiones, ya que no todas las muestras amplificaron con la misma eficacia y, en consecuencia, no emitían luz con la misma intensidad. Esto es porque la altura de cada pico es directamente proporcional a la fluorescencia detectada, que a su vez está determinada por la cantidad del fragmento de ADN amplificado.

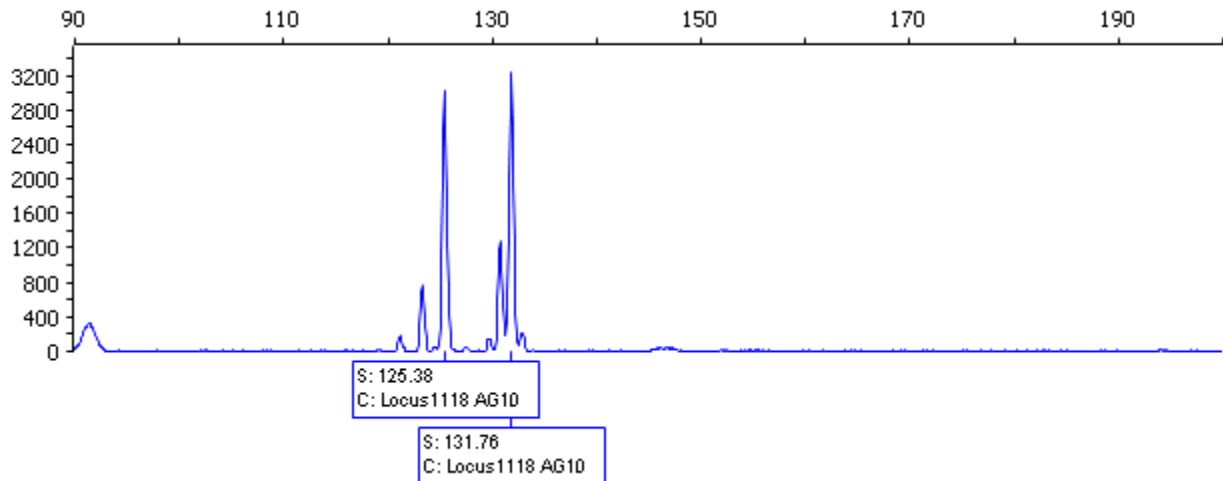
Durante la interpretación se debía tener en cuenta la presencia de picos adicionales a los picos principales que podían dificultar la identificación de éstos. Específicamente los picos tartamudos o “stutter peaks” en inglés (Walsh *et al.*, 1996), productos de PCR resultantes de un deslizamiento de la polimerasa sobre la secuencia nucleotídica en donde una unidad de repetición queda mal apareada y no interviene en la formación de la nueva cadena, perdiéndose una o varias unidades de repetición. Estos productos de menor tamaño molecular producen picos a la izquierda del pico principal (por tener una menor longitud de fragmento), y con una

altura generalmente inferior a la del pico principal (debido a la menor cantidad del respectivo fragmento verdadero en la muestra).

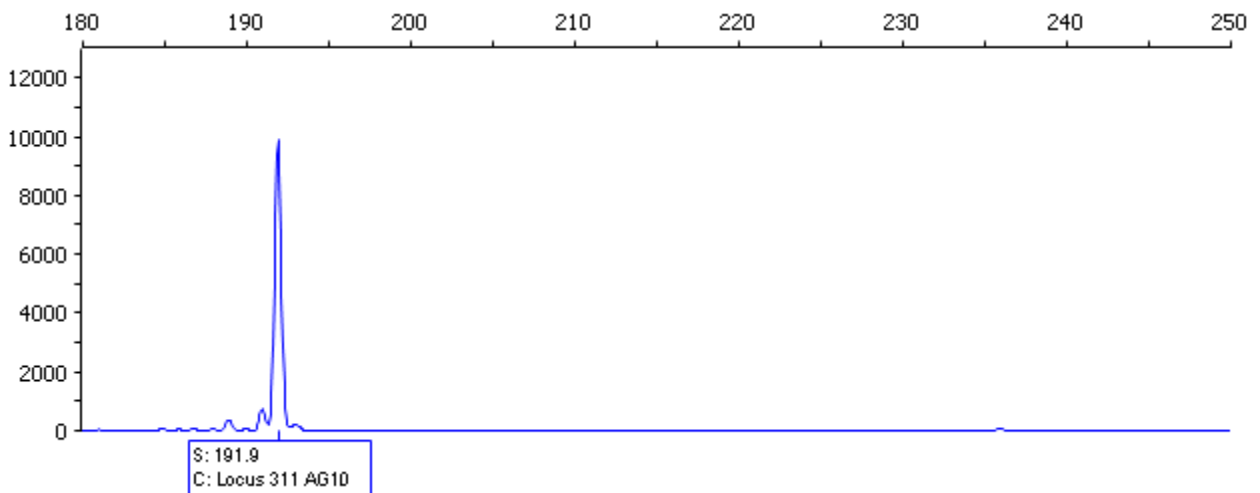
En los perfiles electroforéticos obtenidos, los picos tartamudos normalmente tenían 2, 4, y hasta 6 nucleótidos menos que los alelos “verdaderos” y su altura disminuía a medida que se alejaba del alelo “verdadero”.

Es importante señalar la presencia de picos “+A”, aquellos picos con un nucleótido de más que el alelo real (adición por parte de la *Taq* Polimerasa de un nucleótido con la base adenina al final del fragmento), apareciendo como picos independientes o como picos partidos (Applied Biosystems, 2002). Podía presentarse con mayor o menor intensidad que el alelo “verdadero”.

Se seleccionó la muestra AG10 (véase tabla 4) para representar la visualización de un individuo heterocigoto (Fig. 2) y un homocigoto (Fig.3) para los loci 1118 y 311, respectivamente. En el eje “x” se encuentra señalado el número de pares de bases (bp) en la parte superior, con el que se puede determinar la longitud del fragmento amplificado; el eje “y” despliega la altura del pico, representando la cantidad amplificada de la muestra por medio de unidades de fluorescencia. Se debe recordar que tanto la altura del pico y la longitud del fragmento se estiman con relación al marcador estándar (GeneScan®-500HD [ROX]™).



**Fig. 2** Electroferograma de la muestra AG10 para locus 1118, típico de un individuo heterocigoto. Se observan los picos de los alelos verdaderos 125 y 131 propiamente señalados, a la vez se encuentran presentes picos tartamudos a la izquierda y pequeños picos +A a la derecha de los picos verdaderos.



**Fig. 3** Electroferograma de la muestra AG10 para locus 311, típico de un individuo homocigoto. Señalado se encuentra el pico del alelo verdadero 190, se presentan indicios de picos tartamudos a la izquierda y un pico +A a la derecha del pico verdadero.

## 4.2 Genotipos observados

Con el presente trabajo fue posible identificar los genotipos de 18 muestras de *Ateles geoffroyi*, en donde se obtuvo un poder de identificación del 89%, ya que es posible diferenciar todos los individuos entre sí, a excepción de dos, aun con una pérdida de datos de 16% y 22% para loci 1118 y 311 respectivamente, debido a una falta de amplificación en las muestras AG1, AG3 y AG14 para locus 1118 y en las muestras AG2, AG4, AG5 y AG18 para locus 311. Esto nos confiere una colección de genotipos únicos de 16 individuos para este grupo. Es importante destacar que las muestras AG1 y AG14 fueron las únicas que no se lograron identificar genotípicamente entre sí y resultaron ser indistinguibles entre ellas mismas utilizando estos tres loci, ya que ambas no amplificaron para locus 1118 y comparten genotipos para locus 311 (190/190) y locus 5 (114/114), a pesar de eso al tomar el factor de género es posible diferenciarlos debido a que AG1 es macho y AG14 es hembra (Tabla 4).

Es importante destacar el contraste entre genotipos homocigóticos y heterocigóticos, ya que la proporción homocigotos:heterocigotos era de de 7:8 para locus 1118 (N=15), 13:1 en locus 311 (N=14) y 7:11 con respecto al locus 5 (N=18).

En el cuadro 1 se observa que de las 18 muestras, 7 de ellas no amplificaron para un locus (3 y 4 muestras para locus 1118 y 311, respectivamente), sin embargo éstas no dejaron de amplificar para los otros dos loci.

**Cuadro 1.** Genotipos obtenidos con los tres loci microsatélites.

Muestra	Locus 1118		Locus 311		Locus 5	
AG1	0	0	190	190	114	114
AG2	147	147	0	0	106	124
AG3	0	0	193	193	108	114
AG4	125	125	0	0	110	110
AG5	145	153	0	0	114	114
AG6	125	153	190	190	124	124
AG7	125	153	193	193	104	122
AG8	131	131	190	236	104	112
AG9	147	147	190	190	114	122
AG10	125	131	190	190	120	124
AG11	145	151	195	195	112	112
AG12	159	159	190	190	104	124
AG13	153	153	193	193	114	114
AG14	0	0	190	190	114	114
AG15	125	155	190	190	104	120
AG16	131	147	190	190	120	122
AG17	145	147	190	190	104	114
AG18	151	151	0	0	104	114

Entre los 36 genotipos posibles con los alelos detectados para el locus 1118 se observaron 13, repitiéndose solamente dos de ellas, 147/147 (en AG2 y AG9) y 125/153 (en AG6 y AG7); se observaron los 2 genotipos antes mencionados con frecuencias relativas de 0.133 y 11 genotipos con frecuencias relativas de 0.067 (cuadro 2).

Existen 10 permutaciones de genotipos para locus 311 de los cuales se observaron 4, entre los cuales se destaca el genotipo 190/190 por ser el de mayor presencia detectada entre los tres loci estudiados con una frecuencia relativa de 0.643; también es importante hacer notar el genotipo 193/193 con una frecuencia

relativa de 0.214, mientras que los genotipos 195/195 y 190/236 se encuentran a una frecuencia relativa de 0.071 (cuadro 2.).

Hay 45 genotipos distintos posibles en el locus 5, de los cuales se observaron 14, de los que se destacan los genotipos 114/114 y 104/114 con frecuencias relativas de 0.222 y 0.111, respectivamente, mientras que los demás genotipos comparten una frecuencia relativa de 0.056 (cuadro 2.).

En total se logró observar un tercio de los genotipos posibles (cuadro 2), promediando 10.33 genotipos distintos observados entre un promedio de 30.33 genotipos posibles entre los tres loci (cuadro 5).



**Cuadro 2.** Frecuencias genotípicas observadas.

Locus 1118			Locus 311			Locus 5		
N=15			N=14			N=18		
Genotipo	Fr. Absoluta	Fr. Relativa	Genotipo	Fr. Absoluta	Fr. Relativa	Genotipo	Fr. Absoluta	Fr. Relativa
125125	1	0.067	190190	9	0.643	104104	0	0.000
125131	1	0.067	190193	0	0.000	104106	0	0.000
131131	1	0.067	193193	3	0.214	106106	0	0.000
125145	0	0.000	190195	0	0.000	104108	0	0.000
131145	0	0.000	193195	0	0.000	106108	0	0.000
145145	0	0.000	195195	1	0.071	108108	0	0.000
125147	0	0.000	190236	1	0.071	104110	0	0.000
131147	1	0.067	193236	0	0.000	106110	0	0.000
145147	1	0.067	195236	0	0.000	108110	0	0.000
147147	2	0.133	236236	0	0.000	110110	1	0.056
125151	0	0.000				104112	1	0.056
131151	0	0.000				106112	0	0.000
145151	1	0.067				108112	0	0.000
147151	0	0.000				110112	0	0.000
151151	1	0.067				112112	1	0.056
125153	2	0.133				104114	2	0.111
131153	0	0.000				106114	0	0.000
145153	1	0.067				108114	1	0.056
147153	0	0.000				110114	0	0.000
151153	0	0.000				112114	0	0.000
153153	1	0.067				114114	4	0.222
125155	1	0.067				104120	1	0.056
131155	0	0.000				106120	0	0.000
145155	0	0.000				108120	0	0.000
147155	0	0.000				110120	0	0.000
151155	0	0.000				112120	0	0.000
153155	0	0.000				114120	0	0.000
155155	0	0.000				120120	0	0.000
125159	0	0.000				104122	1	0.056
131159	0	0.000				106122	0	0.000
145159	0	0.000				108122	0	0.000
147159	0	0.000				110122	0	0.000
151159	0	0.000				112122	0	0.000
153159	0	0.000				114122	1	0.056
155159	0	0.000				120122	1	0.056
159159	1	0.067				122122	0	0.000
						104124	1	0.056
						106124	1	0.056
						108124	0	0.000
						110124	0	0.000
						112124	0	0.000
						114124	0	0.000
						120124	1	0.056
						122124	0	0.000
						124124	1	0.056

Se presentan frecuencias absolutas y relativas para cada genotipo posible de los tres loci estudiados.

### 4.3 Conteo alélico

Al realizar un conteo del número de alelos ( $N_a$ ) observados para cada locus en el cuadro 3, es evidente que  $N_a$  no concuerda para los tres loci, esto es porque el número de individuos ( $N$ ) utilizado para cada locus es distinto, debido a la pérdida de datos observada en el cuadro 1. En total se identificaron 8 alelos para el locus 1118, 4 en el locus 311 y 9 correspondientes al locus 5.

**Cuadro 3.** Conteo alélico y número total de alelos observado.

<b>Locus</b>	<b><math>N_a</math></b>	<b>n/Alelo</b>	<b>Contados</b>
<b>Locus 1118</b>	$N_a=30$	125	6
		131	4
		145	3
		147	6
		151	3
		153	5
		155	1
		159	2
<b>Locus 311</b>	$N_a=28$	190	19
		193	6
		195	2
		236	1
<b>Locus 5</b>	$N_a=36$	104	6
		106	1
		108	1
		110	2
		112	3
		114	12
		120	3
		122	3
		124	5

Las letras “ $N_a$ ” representan el número total de alelos observados (conteo alélico) para un locus determinado.

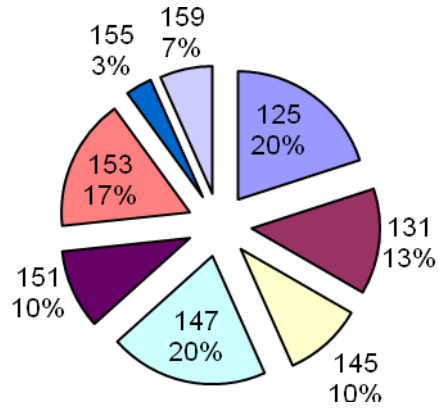
#### 4.4 Frecuencia alélica

Los alelos más comunes encontrados son los siguientes: los alelos 125 y 147 para el locus 1118 en donde ambos presentan una frecuencia de 0.2, el alelo 190 para el locus 311 con una frecuencia de 0.68 y el alelo 114 para el locus 5 que presenta una frecuencia de 0.33 (cuadros 3 y 4).

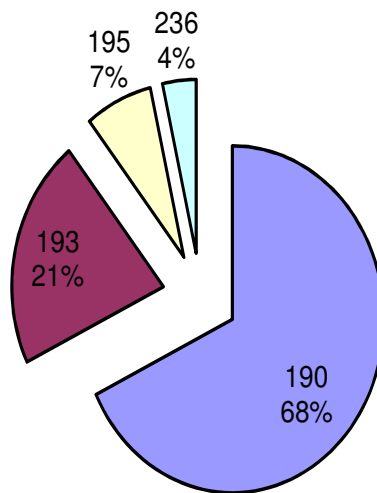
**Cuadro 4.** Frecuencia alélica y el tamaño de la muestra.

<b>Locus</b>	<b>N</b>	<b>n/Alelo</b>	<b><i>fr</i></b>
<b>Locus 1118</b>	N = 15	125	0.200
		131	0.133
		145	0.100
		147	0.200
		151	0.100
		153	0.167
		155	0.033
		159	0.067
<b>Locus 311</b>	N = 14	190	0.679
		193	0.214
		195	0.071
		236	0.036
<b>Locus 5</b>	N = 18	104	0.167
		106	0.028
		108	0.028
		110	0.056
		112	0.083
		114	0.333
		120	0.083
		122	0.083
		124	0.139

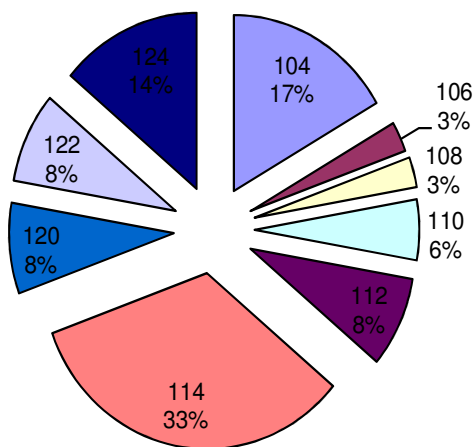
La frecuencia alélica se puede medir en un rango del 1 a 0 o por porcentaje, como se encuentra en las figuras 4, 5 y 6 para los loci 1118, 311 y 5, respectivamente.



**Fig. 4** Composición alélica de la muestra (N) para el locus 1118. N para el locus 1118 resultó ser 15, debido a que no amplificaron tres muestras durante PCR.

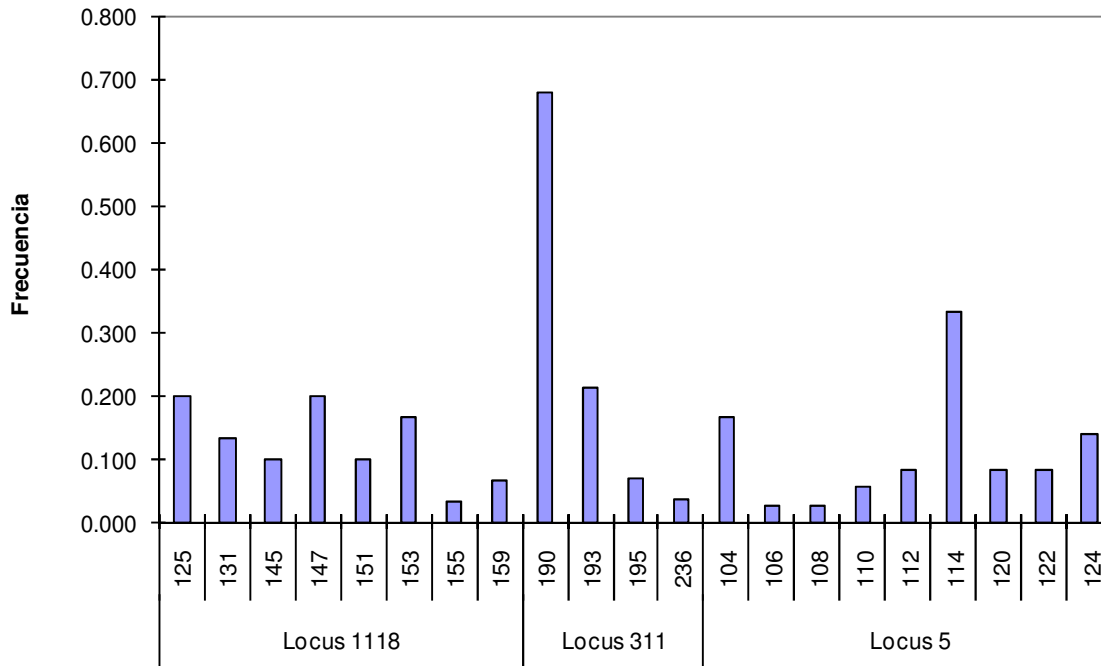


**Fig. 5** Composición alélica del la muestra (N) para el locus 311. N para el locus 311 resultó ser 14, debido a que no amplificaron cuatro muestras durante PCR.



**Fig. 6** Composición alélica del la muestra (N) para el locus 5. N para el locus 5 resultó ser 18, debido a que la totalidad de muestras amplificaron exitosamente durante PCR.

Según los resultados es evidente que resalta una disparidad entre ciertos alelos y otros, especialmente los alelos 190 y 114 para los loci 311 y 5, respectivamente, lo que se puede apreciar en la Figura 7. Las frecuencias a las que estos alelos se observan componen una gran cantidad del conteo alélico de sus respectivos loci, ocupando aproximadamente 2/3 del conteo alélico para el locus 311, y 1/3 del conteo alélico para el locus 5 (cuadro 4).



**Fig. 7** Frecuencias alélicas de los tres loci en estudio. La figura representa una comparación de las frecuencias alélicas entre los loci 1118, 311 y 5.

## 4.5 Variación genética

Es importante hacer notar que las gráficas presentadas anteriormente nos dan una idea de la composición y frecuencia alélica de este grupo de individuos, pero para poder conocer su diversidad genética con el objetivo de determinar si se encuentra dentro de un parámetro considerado natural, fue necesario realizar los cálculos que se describieron anteriormente en el apartado 3.3.3, cuyos resultados se exponen en el cuadro 5.

El número de alelos observados fueron 8, 4 y 9 (promedio 7), mientras que el número de alelos efectivos fue de 6.618, 1.950 y 5.445 para los loci 1118, 311 y 5, respectivamente. De interés metodológico es la diferencia entre los tres loci estudiados, por lo que se exponen los parámetros comparables, incluyendo los genotipos observados y los genotipos posibles, la  $H_o$  y  $H_e$  como también el  $F$ . Se detectó una  $H_o$  de 0.533, 0.071 y 0.611 para los loci 1118, 311 y 5, respectivamente, con un promedio de 0.405. Resalta el locus 311, con una deficiencia de heterocigotos bastante alta, mientras que en los loci 1118 y 5 se denota que más de la mitad de individuos en ambos loci son heterocigotos. Se calculó una  $H_e$  de 0.849, 0.487 y 0.816 para los loci 1118, 311 y 5, respectivamente, marcadamente distinta y mayor a la  $H_o$ , evidenciado en el  $F$  promedio de 0.492 (0.372, 0.853 y 0.251 para los loci 1118, 311 y 5, respectivamente).

**Cuadro 5.** Parámetros comparables entre los loci 1118, 311 y 5.

<b>Locus</b>	<b>N</b>	<b>A</b>	<b>Ae</b>	<b>No. de genotipos distintos observados</b>	<b>No. de genotipos distintos posibles</b>	<b><math>H_o</math></b>	<b><math>H_e</math></b>	<b>F</b>
<b>Locus 1118</b>	15	8.000	6.618	13	36	0.533	0.849	0.372
<b>Locus 311</b>	14	4.000	1.950	4	10	0.071	0.487	0.853
<b>Locus 5</b>	18	9.000	5.445	14	45	0.611	0.816	0.251
<b>Promedio</b>	15.667	7.000	4.671	10.333	30.333	0.405	0.717	0.492

Tamaño de la muestra (N), Número de Alelos (A), Número de Alelos Efectivos (Ae), Número de genotipos observados, Número de genotipos posibles, Heterocigosidad Observada ( $H_o$ ), Heterocigosidad Esperada ( $H_e$ ) e Índice de Fijación (F).

#### 4.6 Proporciones Hardy-Weinberg

Es evidente a simple vista en la figura 7, la presencia de un alto grado de homocigosidad para el loci 311, sin embargo, para comprobar si las frecuencias alélicas no se encuentran en EHW, se llevó a cabo una prueba de chi-cuadrado para determinar si la desviación entre las proporciones Hardy-Weinberg observadas y esperadas de esta agrupación de individuos es mayor a la que se esperaría debido solamente a la casualidad. Esto nos indica si las frecuencias alélicas de la agrupación se asemeja a la de una población panmíctica con el mismo número de alelos.

Dado que por medio de una expansión binomial es posible predecir las proporciones genotípicas de dos alelos en un locus determinado bajo ciertas condiciones (Hardy, 1908), cuando se trata de tres o más alelos por locus (como en el presente estudio) es necesario utilizar una expansión multinomial, por lo que cada locus requirió de una expansión distinta para representar la frecuencia del equilibrio de las proporciones genotípicas.

Para el locus 1118, donde se detectaron 8 alelos distintos, expresados como la fórmula (xii):

$$\begin{aligned} & (a+b+c+d+e+f+g+h)^2 = a^2 + 2ab + 2ac + 2ad + 2ae + 2af + 2ag + 2ah \\ \text{(xii.) } & + b^2 + 2bc + 2bd + 2be + 2bf + 2bg + 2bh + c^2 + 2cd + 2ce + 2cf + 2cg + 2ch + d^2 \\ & + 2de + 2df + 2dg + 2dh + e^2 + 2ef + 2eg + 2eh + f^2 + 2fg + 2fh + g^2 + 2gh + h^2 \end{aligned}$$

Luego, en el locus 311, de solo 4 alelos distintos, la fórmula (xiii) que expresa las proporciones fue relativamente menos compleja:

$$\text{(xiii.) } (a+b+c+d)^2 = a^2 + 2ab + 2ac + 2ad + b^2 + 2bc + 2bd + c^2 + 2cd + d^2$$



Por último, el locus 5 requirió de la fórmula (xiv) para acomodar las frecuencias de sus 9 alelos:

$$(xiv.) \quad (a+b+c+d+e+f+g+h+i)^2 = a^2 + 2ab + 2ac + 2ad + 2ae + 2af + 2ag + 2ah + 2ai + b^2 + 2bc + 2bd + 2be + 2bf + 2bg + 2bh + 2bi + c^2 + 2cd + 2ce + 2cf + 2cg + 2ch + 2ci + d^2 + 2de + 2df + 2dg + 2dh + 2di + e^2 + 2ef + 2eg + 2eh + 2ei + f^2 + 2fg + 2fh + 2fi + g^2 + 2gh + 2gi + h^2 + 2hi + i^2$$

Sin embargo, cabe destacar que las fórmulas anteriores no se resolvieron para la obtención de las frecuencias genotípicas, sino que se utilizaron los métodos utilizados por GenAIEx© resumidos en los siete pasos descritos en el apartado 3.3.4.2.

A continuación se presentan los datos computados en cada paso para calcular si la desviación entre las proporciones genotípicas observadas y las proporciones Hardy-Weinberg esperadas difieren más de lo que se esperaría al azar por medio de la prueba de EHW usando chi-cuadrado.

#### 4.6.1 Prueba de EHW para Locus 1118

A continuación se presentan, por medio de matrices, los pasos utilizados para llevar a cabo el cálculo del  $X^2$  que se realizaron por medio de GenAIEx© en el locus 1118. Los cuadros 6 a 11 representan los siete pasos resumidos en matrices para el fácil manejo de los datos: (i) el cálculo de la frecuencia genotípica (cuadro 6); (ii) conteo de los genotipos observados (cuadro 7); (iii) conteo de los genotipos esperados (cuadro 8); (iv) la diferencia entre los conteos de genotipos observados y los genotipos esperados (cuadro 9); (v) la potenciación cuadrada de la diferencia entre los conteos de genotipos observados y los genotipos esperados (cuadro 10); (vi) la potenciación cuadrada de la diferencia entre los conteos de genotipos observados y los genotipos esperados dividida entre el conteo genotípico esperado y (vii) la suma de los mismos que resulta en el  $X^2$  (cuadro 11).

Además, es importante recalcar el contraste entre el número de genotipos observados y los esperados (cuadros 7 y 8) por lo que en el cuadro 12 se expone una comparación directa entre las dos matrices. Una visualización de las diferencias se puede apreciar en la figura 8.

**Cuadro 6.** Frecuencia genotípica esperada para el locus 1118.

	125	131	145	147	151	153	155	159
125	0.040	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
131	0.053	0.018	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
145	0.040	0.027	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
147	0.080	0.053	0.040	0.040	0.000	0.000	0.000	0.000
151	0.040	0.027	0.020	0.040	0.010	0.000	0.000	0.000
153	0.067	0.044	0.033	0.067	0.033	0.028	0.000	0.000
155	0.013	0.009	0.007	0.013	0.007	0.011	0.001	0.000
159	0.027	0.018	0.013	0.027	0.013	0.022	0.004	0.004

**Cuadro 7.** Número de genotipos observados en el locus 1118.

	125	131	145	147	151	153	155	159
125	1	0	0	0	0	0	0	0
131	1	1	0	0	0	0	0	0
145	0	0	0	0	0	0	0	0
147	0	1	1	2	0	0	0	0
151	0	0	1	0	1	0	0	0
153	2	0	1	0	0	1	0	0
155	1	0	0	0	0	0	0	0
159	0	0	0	0	0	0	0	1

**Cuadro 8.** Número de genotipos esperados en el locus 1118.

	<b>125</b>	<b>131</b>	<b>145</b>	<b>147</b>	<b>151</b>	<b>153</b>	<b>155</b>	<b>159</b>
<b>125</b>	0.600	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>131</b>	0.800	0.267	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>145</b>	0.600	0.400	0.150	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>147</b>	1.200	0.800	0.600	0.600	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>151</b>	0.600	0.400	0.300	0.600	0.150	0.000	0.000	0.000
<b>153</b>	1.000	0.667	0.500	1.000	0.500	0.417	0.000	0.000
<b>155</b>	0.200	0.133	0.100	0.200	0.100	0.167	0.017	0.000
<b>159</b>	0.400	0.267	0.200	0.400	0.200	0.333	0.067	0.067

**Cuadro 9.** Diferencia entre los conteos de los genotipos observados y esperados en el locus 1118.

	<b>125</b>	<b>131</b>	<b>145</b>	<b>147</b>	<b>151</b>	<b>153</b>	<b>155</b>	<b>159</b>
<b>125</b>	0.400	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>131</b>	0.200	0.733	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>145</b>	-0.600	-0.400	-0.150	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>147</b>	-1.200	0.200	0.400	1.400	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>151</b>	-0.600	-0.400	0.700	-0.600	0.850	0.000	0.000	0.000
<b>153</b>	1.000	-0.667	0.500	-1.000	-0.500	0.583	0.000	0.000
<b>155</b>	0.800	-0.133	-0.100	-0.200	-0.100	-0.167	-0.017	0.000
<b>159</b>	-0.400	-0.267	-0.200	-0.400	-0.200	-0.333	-0.067	0.933

**Cuadro 10.** Potenciación cuadrada de la diferencia entre los conteos de los genotipos observados y esperados en el locus 1118.

	<b>125</b>	<b>131</b>	<b>145</b>	<b>147</b>	<b>151</b>	<b>153</b>	<b>155</b>	<b>159</b>
<b>125</b>	0.160	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>131</b>	0.040	0.538	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>145</b>	0.360	0.160	0.023	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>147</b>	1.440	0.040	0.160	1.960	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>151</b>	0.360	0.160	0.490	0.360	0.723	0.000	0.000	0.000
<b>153</b>	1.000	0.444	0.250	1.000	0.250	0.340	0.000	0.000
<b>155</b>	0.640	0.018	0.010	0.040	0.010	0.028	0.000	0.000
<b>159</b>	0.160	0.071	0.040	0.160	0.040	0.111	0.004	0.871

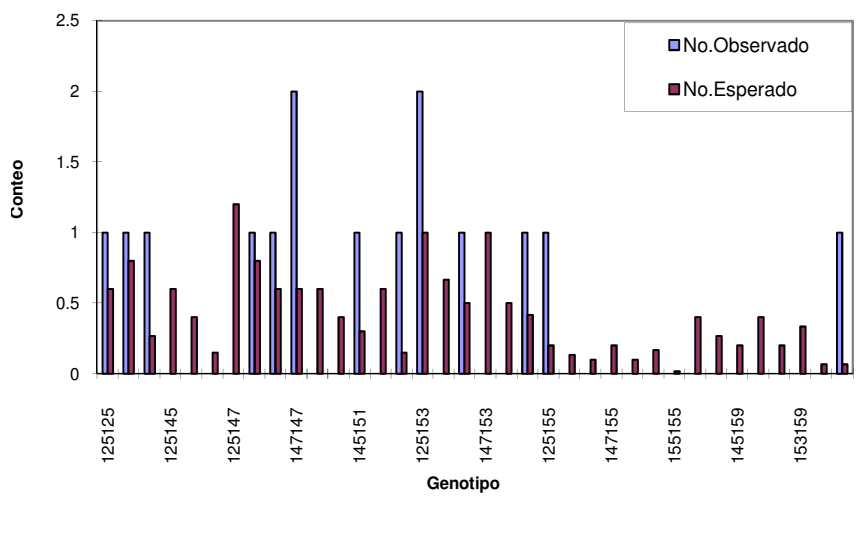
**Cuadro 11.** Potenciación cuadrada de la diferencia entre los conteos de los genotipos observados y esperados en el locus 1118 dividida entre el conteo esperado.

	<b>125</b>	<b>131</b>	<b>145</b>	<b>147</b>	<b>151</b>	<b>153</b>	<b>155</b>	<b>159</b>
<b>125</b>	0.267	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>131</b>	0.050	2.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>145</b>	0.600	0.400	0.150	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>147</b>	1.200	0.050	0.267	3.267	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>151</b>	0.600	0.400	1.633	0.600	4.817	0.000	0.000	0.000
<b>153</b>	1.000	0.667	0.500	1.000	0.500	0.817	0.000	0.000
<b>155</b>	3.200	0.133	0.100	0.200	0.100	0.167	0.017	0.000
<b>159</b>	0.400	0.267	0.200	0.400	0.200	0.333	0.067	13.067
Total ( $X^2$ ) =								39.650

**Cuadro 12.** Comparación entre el número de genotipos observados con el número de genotipos esperados para el locus 1118.

<b>Genotipo</b>	<b>No. Observado</b>	<b>No. Esperado</b>
125125	1	0.600
125131	1	0.800
131131	1	0.267
125145	0	0.600
131145	0	0.400
145145	0	0.150
125147	0	1.200
131147	1	0.800
145147	1	0.600
147147	2	0.600
125151	0	0.600
131151	0	0.400
145151	1	0.300
147151	0	0.600
151151	1	0.150
125153	2	1.000
131153	0	0.667
145153	1	0.500
147153	0	1.000
151153	0	0.500
153153	1	0.417
125155	1	0.200
131155	0	0.133
145155	0	0.100
147155	0	0.200
151155	0	0.100
153155	0	0.167
155155	0	0.017
125159	0	0.400
131159	0	0.267
145159	0	0.200
147159	0	0.400
151159	0	0.200
153159	0	0.333
155159	0	0.067
159159	1	0.067
<b>Total</b>	15	15.000

Alude a los cuadros 7 y 8, haciendo una comparación directa entre ellos.



**Fig. 8** Comparación entre el conteo de genotipos observados y esperados en el locus 1118. Por conveniencia se marcan los genotipos de dos en dos. La figura representa una comparación gráfica del cuadro 12.

#### 4.6.2 Prueba de EHW para Locus 311

Tal como se describió para el locus 1118 en el apartado 4.6.1, se repitieron los mismos siete pasos para el locus 311, los que se presentan en los cuadros 13 al 18.

En el cuadro 19 se presenta la comparación entre el número de genotipos observados y los esperados para el locus 311, representado visualmente en la figura 9.

**Cuadro 13.** Frecuencia genotípica esperada para el locus 311.

	<b>190</b>	<b>193</b>	<b>195</b>	<b>236</b>
<b>190</b>	0.460	0.000	0.000	0.000
<b>193</b>	0.291	0.046	0.000	0.000
<b>195</b>	0.097	0.031	0.005	0.000
<b>236</b>	0.048	0.015	0.005	0.001

**Cuadro 14.** Número de genotipos observados en el locus 311.

	<b>190</b>	<b>193</b>	<b>195</b>	<b>236</b>
<b>190</b>	9	0	0	0
<b>193</b>	0	3	0	0
<b>195</b>	0	0	1	0
<b>236</b>	1	0	0	0

**Cuadro 15.** Número de genotipos esperados en el locus 311.

	<b>190</b>	<b>193</b>	<b>195</b>	<b>236</b>
<b>190</b>	6.446	0.000	0.000	0.000
<b>193</b>	4.071	0.643	0.000	0.000
<b>195</b>	1.357	0.429	0.071	0.000
<b>236</b>	0.679	0.214	0.071	0.018

**Cuadro 16.** Diferencia entre los conteos de los genotipos observados y esperados en el locus 311.

	<b>190</b>	<b>193</b>	<b>195</b>	<b>236</b>
<b>190</b>	2.554	0.000	0.000	0.000
<b>193</b>	-4.071	2.357	0.000	0.000
<b>195</b>	-1.357	-0.429	0.929	0.000
<b>236</b>	0.321	-0.214	-0.071	-0.018

**Cuadro 17.** Potenciación cuadrada de la diferencia entre los conteos de los genotipos observados y esperados en el locus 311.

	<b>190</b>	<b>193</b>	<b>195</b>	<b>236</b>
<b>190</b>	6.521	0.000	0.000	0.000
<b>193</b>	16.577	5.556	0.000	0.000
<b>195</b>	1.842	0.184	0.862	0.000
<b>236</b>	0.103	0.046	0.005	0.000



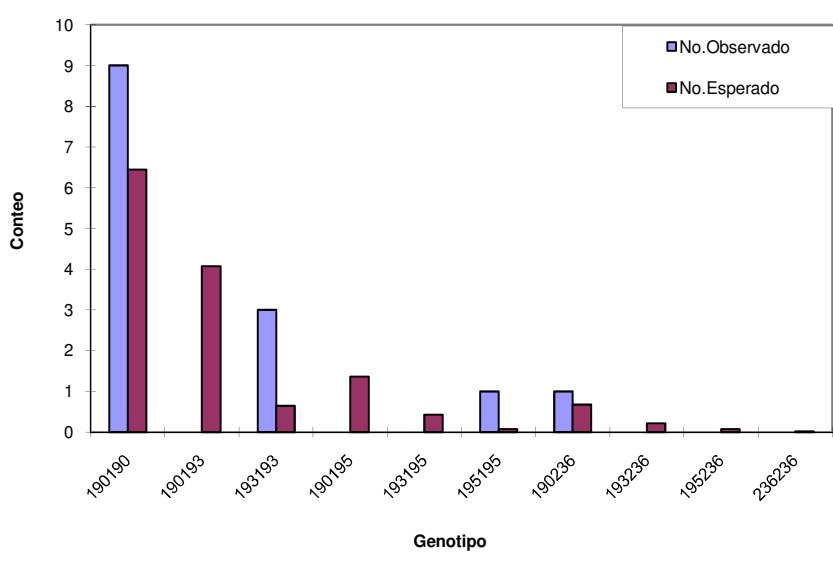
**Cuadro 18.** Potenciación cuadrada de la diferencia entre los conteos de los genotipos observados y esperados en el locus 311 dividida entre el conteo esperado.

	<b>190</b>	<b>193</b>	<b>195</b>	<b>236</b>
<b>190</b>	1.012	0.000	0.000	0.000
<b>193</b>	4.071	8.643	0.000	0.000
<b>195</b>	1.357	0.429	12.071	0.000
<b>236</b>	0.152	0.214	0.071	0.018
Total ( $X^2$ ) =				28.039

**Cuadro 19.** Comparación entre el número de genotipos observados con el número de genotipos esperados para el locus 311.

<b>Genotipo</b>	<b>No. Observado</b>	<b>No. Esperado</b>
<b>190190</b>	9	6.446
<b>190193</b>	0	4.071
<b>193193</b>	3	0.643
<b>190195</b>	0	1.357
<b>193195</b>	0	0.429
<b>195195</b>	1	0.071
<b>190236</b>	1	0.679
<b>193236</b>	0	0.214
<b>195236</b>	0	0.071
<b>236236</b>	0	0.018
<b>Total</b>	14	14.000

Alude a los cuadros 14 y 15, haciendo una comparación directa.



**Fig. 9** Comparación entre el conteo de genotipos observados y esperados en el locus 311. La figura representa una comparación gráfica del cuadro 19.

### 4.6.3 Prueba de EHW para Locus 5

Al igual que en el locus 1118 en el apartado 4.6.1 se exponen los siete pasos utilizados para obtener el  $X^2$ , presentados en las matrices de los cuadros 20 al 25. Luego, en el cuadro 26, se contrastan el número de genotipos observados y los esperados para el locus 5, representándose de forma visual en la figura 10.

**Cuadro 20.** Frecuencia genotípica esperada para el locus 5.

	104	106	108	110	112	114	120	122	124
104	0.028	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
106	0.009	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
108	0.009	0.002	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
110	0.019	0.003	0.003	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
112	0.028	0.005	0.005	0.009	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000
114	0.111	0.019	0.019	0.037	0.056	0.111	0.000	0.000	0.000
120	0.028	0.005	0.005	0.009	0.014	0.056	0.007	0.000	0.000
122	0.028	0.005	0.005	0.009	0.014	0.056	0.014	0.007	0.000
124	0.046	0.008	0.008	0.015	0.023	0.093	0.023	0.023	0.019

**Cuadro 21.** Número de genotipos observados en el locus 5.

	<b>104</b>	<b>106</b>	<b>108</b>	<b>110</b>	<b>112</b>	<b>114</b>	<b>120</b>	<b>122</b>	<b>124</b>
<b>104</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>106</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>108</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>110</b>	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<b>112</b>	1	0	0	0	1	0	0	0	0
<b>114</b>	2	0	1	0	0	4	0	0	0
<b>120</b>	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>122</b>	1	0	0	0	0	1	1	0	0
<b>124</b>	1	1	0	0	0	0	1	0	1

**Cuadro 22.** Número de genotipos esperados en el locus 5.

	<b>104</b>	<b>106</b>	<b>108</b>	<b>110</b>	<b>112</b>	<b>114</b>	<b>120</b>	<b>122</b>	<b>124</b>
<b>104</b>	0.500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>106</b>	0.167	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>108</b>	0.167	0.028	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>110</b>	0.333	0.056	0.056	0.056	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>112</b>	0.500	0.083	0.083	0.167	0.125	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>114</b>	2.000	0.333	0.333	0.667	1.000	2.000	0.000	0.000	0.000
<b>120</b>	0.500	0.083	0.083	0.167	0.250	1.000	0.125	0.000	0.000
<b>122</b>	0.500	0.083	0.083	0.167	0.250	1.000	0.250	0.125	0.000
<b>124</b>	0.833	0.139	0.139	0.278	0.417	1.667	0.417	0.417	0.347

**Cuadro 23.** Diferencia entre los conteos de los genotipos observados y esperados en el locus 5.

	<b>104</b>	<b>106</b>	<b>108</b>	<b>110</b>	<b>112</b>	<b>114</b>	<b>120</b>	<b>122</b>	<b>124</b>
<b>104</b>	-0.500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>106</b>	-0.167	-0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>108</b>	-0.167	-0.028	-0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>110</b>	-0.333	-0.056	-0.056	0.944	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>112</b>	0.500	-0.083	-0.083	-0.167	0.875	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>114</b>	0.000	-0.333	0.667	-0.667	-1.000	2.000	0.000	0.000	0.000
<b>120</b>	0.500	-0.083	-0.083	-0.167	-0.250	-1.000	-0.125	0.000	0.000
<b>122</b>	0.500	-0.083	-0.083	-0.167	-0.250	0.000	0.750	-0.125	0.000
<b>124</b>	0.167	0.861	-0.139	-0.278	-0.417	-1.667	0.583	-0.417	0.653

**Cuadro 24.** Potenciación cuadrada de la diferencia entre los conteos de los genotipos observados y esperados en el locus 5.

	<b>104</b>	<b>106</b>	<b>108</b>	<b>110</b>	<b>112</b>	<b>114</b>	<b>120</b>	<b>122</b>	<b>124</b>
<b>104</b>	0.250	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>106</b>	0.028	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>108</b>	0.028	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>110</b>	0.111	0.003	0.003	0.892	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>112</b>	0.250	0.007	0.007	0.028	0.766	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>114</b>	0.000	0.111	0.444	0.444	1.000	4.000	0.000	0.000	0.000
<b>120</b>	0.250	0.007	0.007	0.028	0.063	1.000	0.016	0.000	0.000
<b>122</b>	0.250	0.007	0.007	0.028	0.063	0.000	0.563	0.016	0.000
<b>124</b>	0.028	0.742	0.019	0.077	0.174	2.778	0.340	0.174	0.426

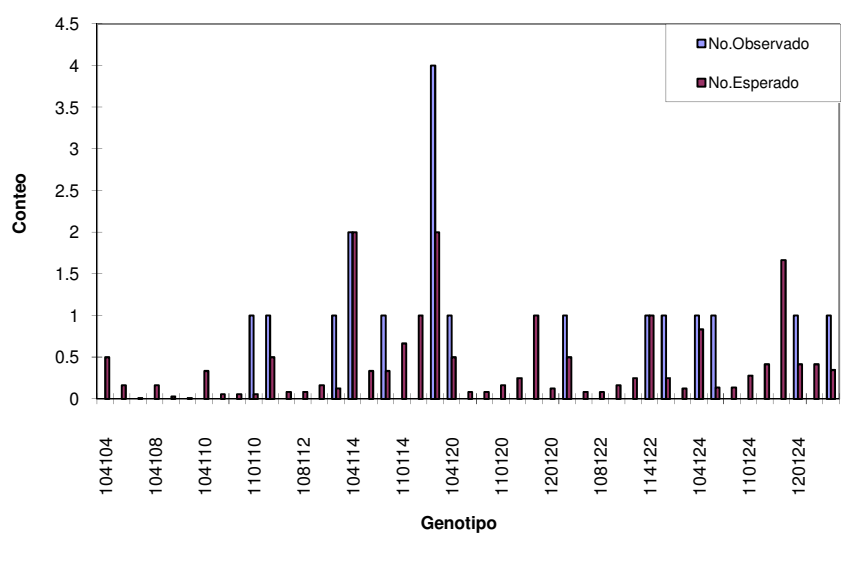
**Cuadro 25.** Potenciación cuadrada de la diferencia entre los conteos de los genotipos observados y esperados en el locus 5 dividida entre el conteo esperado.

	<b>104</b>	<b>106</b>	<b>108</b>	<b>110</b>	<b>112</b>	<b>114</b>	<b>120</b>	<b>122</b>	<b>124</b>
<b>104</b>	0.500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>106</b>	0.167	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>108</b>	0.167	0.028	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>110</b>	0.333	0.056	0.056	16.056	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>112</b>	0.500	0.083	0.083	0.167	6.125	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>114</b>	0.000	0.333	1.333	0.667	1.000	2.000	0.000	0.000	0.000
<b>120</b>	0.500	0.083	0.083	0.167	0.250	1.000	0.125	0.000	0.000
<b>122</b>	0.500	0.083	0.083	0.167	0.250	0.000	2.250	0.125	0.000
<b>124</b>	0.033	5.339	0.139	0.278	0.417	1.667	0.817	0.417	1.227
Total ( $X^2$ ) =									45.68

**Cuadro 26.** Comparación entre el número de genotipos observados con el número de genotipos esperados para el locus 5.

<b>Genotipo</b>	<b>No. Observado</b>	<b>No. Esperado</b>
104104	0	0.500
104106	0	0.167
106106	0	0.014
104108	0	0.167
106108	0	0.028
108108	0	0.014
104110	0	0.333
106110	0	0.056
108110	0	0.056
110110	1	0.056
104112	1	0.500
106112	0	0.083
108112	0	0.083
110112	0	0.167
112112	1	0.125
104114	2	2.000
106114	0	0.333
108114	1	0.333
110114	0	0.667
112114	0	1.000
114114	4	2.000
104120	1	0.500
106120	0	0.083
108120	0	0.083
110120	0	0.167
112120	0	0.250
114120	0	1.000
120120	0	0.125
104122	1	0.500
106122	0	0.083
108122	0	0.083
110122	0	0.167
112122	0	0.250
114122	1	1.000
120122	1	0.250
122122	0	0.125
104124	1	0.833
106124	1	0.139
108124	0	0.139
110124	0	0.278
112124	0	0.417
114124	0	1.667
120124	1	0.417
122124	0	0.417
124124	1	0.347
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>18.000</b>

Alude a los cuadros 21 y 22.



**Fig. 10** Comparación entre el conteo de genotipos observados y esperados en el locus 5. Por conveniencia se marcan los genotipos de tres en tres. La figura representa una comparación gráfica del cuadro 26.

Es importante mencionar que resalta la diferencia entre el número de genotipos observados y esperados (vistos en los cuadros 12, 19 y 26), observándose una clara sobreabundancia de genotipos homocigóticos y una deficiencia de heterocigotos (cuadro 27).

**Cuadro 27.** Comparación entre el número de homocigotos y heterocigotos observado con lo esperado.

	Locus 1118		Locus 311		Locus 5		Total	
	Homo.	Hetero.	Homo.	Hetero.	Homo.	Hetero.	Homo.	Hetero.
<b>Observados</b>	7	8	13	1	7	11	27	20
<b>Esperados</b>	2.27	12.73	7.16	6.84	3.31	14.7	12.74	34.27



#### 4.6.4 Resultados de prueba del EHW

Con un valor- $\alpha$  de 0.05, el método del chi-cuadrado (cuadro 28) nos confiere valores-P no significativos de 0.071 y 0.129 para los loci 1118 y 5, respectivamente. Sin embargo, se obtiene un valor-P significativo de 0.000 para locus 311.

**Cuadro 28.** Valores-P, chi-cuadrado y grados de libertad para cada locus estudiado.

Locus	ChiCuadrado	GL	Prob
Locus 1118	39.650	28	0.071
Locus 311	28.039	6	0.000
Locus 5	45.680	36	0.129

Se utilizó el método tradicional de  $X^2$  en GenAlEx©.

#### 4.6.5 Resultados de prueba exacta del EHW

Se estableció en el apartado 3.3.4.3, que la prueba exacta del EHW de Genepop© resulta en una estimación del valor-P mucho más exacta, cuyos valores-P se observan en el cuadro 29, en donde los tres loci resultan tener una desviación significativa de lo esperado. Las probabilidades para los loci 1118, 311 y 5 son 0.0107, 0.000 y 0.0293, respectivamente y se utilizó un valor- $\alpha$  de 0.05 al igual que en la prueba inicial de EHW.

**Cuadro 29.** Valores-P para cada locus estudiado utilizando la prueba exacta.

Locus	Valor-P
Locus 1118	0.0107
Locus 311	0.0000
Locus 5	0.0293

## 4.7 Alelos nulos

Luego de observar en las distintas etapas del análisis de datos cierta tendencia a presentar indicios de la presencia de alelos nulos, como una falta de amplificación de muestras para ciertos loci (se hace notar la falta de amplificación de tres muestras en locus 1118 y cuatro muestras en locus 311) y un aparente exceso de homocigotos especialmente en el locus 311 (alta frecuencia de unos pocos alelos, véase figura 7; alta  $F$  positiva, véase figuras 8, 9 y 10; bajo número de alelos efectivos, ver cuadro 5), se realizó una prueba con Genepop© para calcular la frecuencia de alelos nulos que coincidan con los datos observados en los tres loci para mantener objetividad. La frecuencia de alelos nulos que coinciden con los datos observados son 0.2416 para el locus 1118, 0.3732 para el locus 311 y 0.1820 para el locus 5 (cuadro 30).

Se mantiene que el locus 311 presenta la más alta frecuencia de alelos nulos, seguido del locus 1118, esto concuerda con la pérdida de datos anterior, donde no amplificaron 3 y 4 muestras, respectivamente. Se observó una menor presencia de alelos nulos en el locus 5, el cual amplificó en todas las muestras. A pesar de eso, se debe tomar en cuenta que el factor más importante para el cálculo es la homocigosidad, con 0.151, 0.513 y 0.184 para los loci 1118, 311 y 5, respectivamente, el cual indica una discrepancia entre las frecuencias de alelos nulos computadas de los loci 1118 y 5.

**Cuadro 30.** Frecuencias esperadas de alelos nulos en los loci estudiados.

	<b>Alelo</b>	<b>frecuencia</b>	<b>Homocigotos</b>	<b>Heterocigotos nulos</b>	<b>Homocigotos aparentes</b>
<b>Locus 1118</b>	125	0.1642	0.2536	0.7464	1
	131	0.0991	0.1702	0.8298	1
	145	0.0938	0.0000	0.0000	0
	147	0.1390	0.4467	1.5533	2
	151	0.0663	0.1206	0.8794	1
	153	0.1317	0.2142	0.7858	1
	155	0.0313	0.0000	0.0000	0
	159	0.0333	0.0644	0.9356	1
	Nulo	0.2416			
<b>Locus 311</b>	190	0.4455	3.3635	5.6365	9
	193	0.1132	0.3949	2.6051	3
	195	0.0348	0.0446	0.9554	1
	236	0.0333	0.0000	0.0000	0
		Nulo	0.3732		
<b>Locus 5</b>	104	0.1579	0.0000	0.0000	0
	106	0.0263	0.0000	0.0000	0
	108	0.0263	0.0000	0.0000	0
	110	0.0282	0.0719	0.9281	1
	112	0.0561	0.1336	0.8664	1
	114	0.2538	1.6429	2.3571	4
	120	0.0789	0.0000	0.0000	0
	122	0.0789	0.0000	0.0000	0
	124	0.1114	0.2343	0.7657	1
		Nulo	0.1820		

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 Perfiles electroforéticos

Se observó una falta de amplificación en ciertas muestras para los loci 1118 y 311 lo que se puede deber a diversas razones, entre las cuales está una posible degradación del ADN (pérdida de la configuración de la molécula de ADN o parte de ella que es de interés), aunque esto generalmente imposibilita la amplificación de la muestra para la mayoría de los loci, y este no es el caso.

Otra causa más probable de esta falta de amplificación podría ser la presencia de alelos nulos de PCR, que pueden estar presentes en algunos loci microsatélites. Como ya se ha mencionado, la presencia de alelos nulos en heterocigotos los hace aparentar como homocigotos, esto podría explicar el exceso de homocigotos observados en relación con el número esperado. En cambio un individuo homocigoto para un alelo nulo no amplificaría, imposibilitando una detección de picos en el electroferograma.

### 5.2 Resultados analíticos

El conteo alélico es análogo a la frecuencia alélica y, en práctica, es preferible hablar de la frecuencia, ya que se pueden cuantificar comparaciones entre loci, por lo que se tratará más que todo la frecuencia alélica en el presente apartado.

Es importante destacar que en el presente estudio se observó un promedio de 7 alelos por locus al utilizar tres loci microsatelitales, mientras que Ruiz-Garcia *et al.* (2007) obtuvieron promedios de 4.666 en 84 individuos de *Alouatta palliata*, 5.250 en 48 individuos de *Alouatta seniculus*, 3.571 en 7 individuos de *Alouatta macconnelli* y 3.142 en 20 individuos de *Alouatta caraya* al utilizar nueve microsatélites distintos. Una comparación más directa es con Di Fiore y Fleischer (2004) con 66 individuos de *Lagothrix lagotricha*, en donde identificaron los loci 1118 y 311 y obtuvieron promedios de 14 y 5 alelos, respectivamente. En el presente estudio se reportan 8 y 4 alelos para estos loci, considerándose aun una gran

diversidad alélica a pesar de haber estudiado una pequeña muestra (utilizándose 18 individuos); este menor número de alelos se puede justificar al tener en cuenta que loci microsatelitales identificados en otras especies suelen producir niveles inferiores de variación al ser detectadas en especies no emparentadas inmediatamente, lo que según Ellegren *et al.* (1997) se debe a cierta predilección o inclinación inevitable a desarrollar loci microsatelitales más largos de lo normal para la especie focal, creando un sesgo al realizar comparaciones directas entre especies no emparentadas inmediatamente, es decir, se suele producir niveles inferiores de variación genética al aplicar loci microsatelitales en especies distintas a la focal.

Según el conteo alélico, es evidente al observar las frecuencias alélicas, que ciertos alelos simplemente se encuentran en menor cantidad que otros, por lo que es posible que ciertos alelos tengan frecuencias tan altas que dificulten la diferenciación entre muestras dificultando una identificación de las mismas. Lo anterior se manifiesta al observar el exceso de homocigotos del alelo 190 en el locus 311 en comparación con lo esperado evidenciado por el índice de fijación de 0.853, que en esta situación  $F$  se puede leer como la proporción por la cual la homocigosidad observada se encuentra aumentada en relación a la homocigosidad esperada.

## **5.3 Resultados estadísticos**

### **5.3.1 Variación genética**

Según los datos expuestos por Frankham *et al.* (2002) donde citan a otros autores, se calculó que para especies no amenazadas las heterocigosidades a menudo se encuentran entre 0.62 y 0.79 con un  $H$  promedio de 0.71, mientras que para especies amenazadas las heterocigosidades oscilan entre 0.20 y 0.62 promediando un  $H$  de 0.42, por lo que la heterocigosidad esperada encontrada para esta investigación en general indica que la colección de individuos presenta una cantidad aceptable de variación genética, con un promedio de 0.717, donde  $H_e$  para los loci individuales 1118, 311 y 5 es 0.849, 0.487 y 0.816, respectivamente. La  $H_e$  calculada en el presente estudio coincide con el promedio calculado por Frankham *et*

*al.* (2002), lo que resulta extraño al considerar que la especie en cuestión se encuentra amenazada por peligro de extinción y los resultados obtenidos muestran una variación genética mas alta del rango esperado según trabajos anteriores para especies amenazadas con peligro de extinción.

A pesar de que la *He* presenta una buena cantidad de variación genética, al calcular el índice de fijación se observa una clara deficiencia de heterocigotos, con una *F* promedio de 0.492 (0.372, 0.853 y 0.251 para los loci 1118, 311 y 5 respectivamente), ya que en poblaciones esto indica la presencia de ya sea endogamia o de alelos nulos no identificados (Frankham *et al.* 2002; Hedrick, 2005; Allendorf y Luikart, 2007). Al tratarse de muestras de individuos en cautiverio con poca probabilidad de estar relacionados, es factible descartar la posibilidad de endogamia (a no ser por un antiguo cuello de botella anterior), por lo que una posible explicación del aparente exceso de homocigotos es la presencia de alelos nulos, o bien se explica debido a que los individuos muestreados se encontraban en cautiverio y no estaban juntos por lo que es probable que provengan de poblaciones genéticamente distintas.

Los datos anteriores se corroboran con el número de alelos efectivos, el cual se utilizó para lograr una comparación entre los loci, ya que se deriva directamente de la heterocigosidad esperada. Entre mayor sea la heterocigosidad esperada, mayor será el número de alelos efectivos, por lo que se considera una forma alterna de medir variación genética. Se calculó que los loci 1118 y 5 tienen 6.618 y 5.445 de *Ae*, respectivamente, lo cual se refleja en la *He* de cada uno. El locus 311 en cambio se calcula con un 1.95 *Ae*, que concuerda con su baja *He*. El hecho de que el *Ae* no se asemeje al número de alelos observado se debe a que el *Ae* solamente se iguala al número de alelos real cuando todos los alelos son igualmente frecuentes, y en la mayoría de casos, *Ae* es menor que *A* (Frankham *et al.* 2002).

### 5.3.2 Equilibrio Hardy-Weinberg

La prueba exacta del EHW indica que la colección de individuos en su conjunto no cumple con las condiciones del EHW en los tres loci estudiados, obteniéndose valores-P para los loci 1118, 311 y 5 de 0.0107, 0.000 y 0.0293, respectivamente, por lo cual se rechaza la hipótesis nula de que estos dos loci se encuentran en proporciones Hardy-Weinberg. Esto es de esperarse debido a la diversidad del origen de los individuos muestreados que compone la colección de individuos, ya que estos probablemente provienen originalmente de poblaciones y tropas distintas.

Al determinar un valor-P estadísticamente significativo, es decir, que los genotipos son significativamente diferentes a lo esperado, es posible explicar esta significancia debido a la deficiencia demostrativa de heterocigotos observados en comparación con lo esperado bajo EHW.

La ley de Hardy-Weinberg dicta que bajo las condiciones de una población grande (suficientemente amplia como para minimizar los efectos de la deriva genética), en organismos diploides con apareamientos al azar y generaciones no traslapadas o discretas, las frecuencias genotípicas en un locus se determinan por medio de las frecuencias alélicas, y tanto las frecuencias genotípicas como las alélicas permanecerán constantes en generaciones posteriores siempre que no experimente mutación, migración y selección o que estos sean insignificantes (Frankham *et al.* 2002; Hedrick, 2005; Allendorf y Luikart, 2007).

Aunque la violación de cualquiera de las condiciones anteriores puede que no resulte en una desviación del EHW, una desviación del EHW es un indicador de la violación de al menos una de las condiciones propuestas de la ley de Hardy-Weinberg, por lo que amerita un estudio a mayor profundidad en cualquier población. Poblaciones en cautiverio se encuentran sujetas a las mismas condiciones, sin embargo, el contexto en el cual se aplican puede cambiar, especialmente en la

presente colección de individuos con respecto a las condiciones determinadas en su mayoría por el ser humano. Migración y selección (sexual o natural) se convierten en condiciones dominadas por la entidad encargada de la población cautiva.

Ahora bien, las pruebas para demostrar el EHW indican si la frecuencia alélica que da lugar a los genotipos observados se considera que es al azar, pero no proporciona ninguna información acerca de la población. Es claro que la colección de individuos utilizada no es panmíctica, es decir, que los distintos centros no están intercambiando individuos reproductores; y son fundadas con una adquisición de individuos de orígenes distintos y si se toma como pie de cría de una población controlada o cautiva, esta formaría la primera generación con la que se podría empezar a trabajar, aplicando cruces diseñados y seleccionados para simular las condiciones del EHW para controlar las frecuencias alélicas identificadas en el presente trabajo de generación en generación.

### **5.3.3 Alelos nulos**

Se denota que las frecuencias de alelos nulos pueden no representar datos muy reales, debido a que se consideran una estimación de las frecuencias alélicas en el caso que las faltas de amplificación y un exceso homocigótico se deben a la presencia de alelos nulos. Hedrick (2005), indica que loci microsatelitales con sobreabundancia de homocigotos puede ser que presenten alelos nulos, lo que podría explicar en alguna medida los resultados observados en este estudio, en donde la mayor frecuencia de alelos nulos correspondió al locus 311, seguido por el locus 1118 y por último el locus 5, obteniéndose igual distribución en el *F*.

La falta de amplificación en los loci 311, 1118 y 5 con 22%, 16% y 0%, respectivamente, podría indicar que los datos o presencia calculada de alelos nulos en este caso particular debe considerarse como un fuerte indicativo de la presencia de alelos nulos en la colección de muestras.



## 6. CONCLUSIONES

- El análisis electroforético revela que al utilizar únicamente los tres loci microsatelitales estudiados no es posible establecer el perfil genético individual de los individuos, ya que solamente se obtuvo un nivel de identificación de 89%.
- El mayor obstáculo para la identificación del perfil genético es la pérdida de datos, la cual se dio en dos loci: 1118 y 311, al no amplificarse 3 (16%) y 4 (22%) muestras, respectivamente. Surge de dos posibilidades: a) una degradación del ADN lo suficientemente severa para prevenir la amplificación del fragmento, y b) la presencia de una mutación que produzca un cambio en la configuración del oligonucleótido flanqueante a la repetición en tándem, imposibilitando la detección del fragmento y produciendo pérdidas alélicas llamadas alelos nulos.
- La suposición de que las pérdidas alélicas por la falta de amplificación se deba a la presencia de alelos nulos, no se puede establecer con el presente estudio. Se determinó la frecuencia de alelos nulos para los tres loci, sin embargo, esto no confirma su presencia, solamente realizando una secuenciación del fragmento se puede determinar si realmente se esté dando este fenómeno o si solamente se debe a una degradación del ADN.
- La colección de individuos de *Ateles geoffroyi* utilizados en el presente estudio, según las pruebas exactas realizadas para los tres loci estudiados, no se encuentra en un equilibrio de Hardy-Weinberg, debido a un déficit de heterocigotos.
- En base a lo anterior, una población formada por el acervo génico de los tres loci estudiados de la colección de individuos muestreados no lograría mantener constantes las frecuencias alélicas que la componen si se mantienen aislados.

## 7. RECOMENDACIONES

- Para ampliar la gama de distintos alelos y genotipos posibles con el fin de aumentar el valor conservacionista es necesario muestrear una mayor cantidad de individuos en estudios posteriores, lo que incluye individuos en cautiverio e individuos pertenecientes a poblaciones naturales. Con este mismo fin es lógico aumentar el número de loci utilizados, así incrementando el poder identificador de los genotipos resultantes, superando las dificultades provistas por fallos durante la amplificación y por alelos nulos.
- Con el propósito de minimizar el estrés del animal y facilitar el muestreo es aconsejable en cualquier estudio de conservación el uso de métodos de muestreo menos invasivos, especialmente si se trata de poblaciones naturales. Para realizar PCR solo es necesario una cantidad mínima de sangre o raíz de pelo para la extracción de ADN nuclear, una de las principales razones por lo que se optó por utilizar microsatélites. A pesar de eso, existen otras fuentes de ADN nuclear recomendables, como lo son las células epiteliales en las heces, sin embargo es necesario conocer el animal de origen, lo que crea problemas al realizar muestreos de poblaciones naturales.
- Los 18 individuos muestreados puede que no sean suficientes para iniciar una buena población en cautiverio o como pie de cría. Con tener un banco genético de los individuos es suficiente para empezar un plan de apareamiento, manteniendo abiertas las posibilidades de apareo entre individuos por medio de inseminación artificial. Luego, si se determina que una reducción en la variabilidad de microsatélites correlaciona a una reducción de genes sujetos a selección, será necesario realizar muestreos generacionales para determinar las medidas de conservación a tomar.

- Para fines de biblioteca genética o para una futura inyección alélica a poblaciones silvestres, sería necesario manipular artificialmente las condiciones que supone el EHW, para lograr mantener constantes las frecuencias alélicas o para aumentar algunas específicas, esto debido al hecho de que la colección de individuos de *Ateles geoffroyi* no se encuentra en un EHW en los tres loci estudiados. Esto deberá tenerse en cuenta y orientar cualquier programa de conservación biológica para esta especie. Los individuos muestreados pueden ser utilizados para diseñar un programa de conservación *ex situ*, partiendo de cruces dirigidos con aquellos individuos heterocigotos, para lo cual será necesario establecer un programa de intercambio, entre Centros de Rescate, de individuos reproductores.
- *A. geoffroyi* es el único compañero primate del ser humano en El Salvador. Al no poder asegurar su supervivencia y su integridad genética con simples medidas conservacionistas estamos fallando como la especie responsable de la biosfera. Así como el ser humano impacta negativamente, debe empeñarse en impactar positivamente, haciendo uso de todo recurso posible, y tomando ventaja de las tecnologías disponibles, tales como las técnicas moleculares que se tengan al alcance.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

ALLENDORF, F.W., y LUIKART, G.. 2007. Conservation and the Genetics of Populations. Blackwell Publishing, MA, USA.

APPLIED BIOSYSTEMS. 2001a. ABI PRISM® Genetic Analyzer User's Manual. Applied Biosystems USA.

\_\_\_\_\_. 2001b. ABI PRISM® Genetic Analyzer User Guide. Applied Biosystems USA.

\_\_\_\_\_. 2001c. ABI PRISM® GeneScan Analysis Software User Guide. Applied Biosystems USA.

\_\_\_\_\_. 2002. StockMarks® Horse and Cattle Paternity PCR Typing Kits Protocol. Applied Biosystems USA.

\_\_\_\_\_. 2006. PeakScanner™ Software Version 1.0 Reference Guide. Applied Biosystems USA.

AZOFEIFA, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. Disponible en <[http://www.eefb.ucr.ac.cr/Revistas/AgronomíaMesoamericana/Vol.%2017\(2\)%202006/rev\\_bibliográfica/Azofeifa-marcadores.pdf](http://www.eefb.ucr.ac.cr/Revistas/AgronomíaMesoamericana/Vol.%2017(2)%202006/rev_bibliográfica/Azofeifa-marcadores.pdf)> [Consulta: 23 Mar. 2007]

BOWCOCK, A. M., RUIZ-LINARES, A., TOMFOHRDE, J. MINCH, E., KIDD, J. R., y CAVALLI-SFORZA, L. L. 1994. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368(6470):455-457.

BRINKMANN, B., KLINTSCHAR, M., NEUHUBER, F., HÜHNE, J. y ROLF, B. 1998. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *American Journal of Human Genetics* 62:1408–1415.

BROOKFIELD, J. K. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* 5: 453-455.

CHAMBERS, G. y MACAVOY, E. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology. B.*, 126:455-476.

- CLAROS, M. 1998. Marcadores moleculares: Qué son, cómo se obtienen y para qué valen. Encuentros en la biología. Disponible en <<http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS49/marcadores.html>> [Consulta: 2 abr. 2007]
- CITES. 2007. Appendices I, II and III. Disponible en <<http://www.cites.org/>> [Consulta: 29 Abr. 2007]
- COLLINS, A. C., y DUBACH, J. M. 2000. Phylogenetic relationships among spider monkeys (*Ateles*): Based on mitochondrial DNA variation. International Journal of Primatology 21(3):381–420.
- COLLINS, A.C. y DUBACH, J.M. 2001. Nuclear DNA variation in spider monkeys (*Ateles*). Molecular Phylogenetics and Evolution 19(1):67-75.
- COLORADO STATE UNIVERSITY. Enero 10 de 1999. Tandemly Repeated (Satellite) DNA. Disponible en <<http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/genetics/medgen/dnatesting/satellites.html>> [Consulta: 30 Abr. 2007]
- COMO PARK ZOO AND CONSERVATORY, MINNESOTA. Abril 2006. Spidermonkey. Disponible en <[http://www.comozooconservatory.org/zoo/spider monkey.htm](http://www.comozooconservatory.org/zoo/spider%20monkey.htm)> [Consulta: 24 Mar. 2007]
- CROW, J.F. 1986. Basic Concepts in Population Genetics. Freeman, New York.
- CUARON, A.D, MORALES, A., SHEDDEN, A., RODRIGUEZ-LUNA, E., y DE GRAMMONT, P.C. 2008a. *Ateles geoffroyi*. 2008 IUCN Red List of Threatened Species. IUCN 2008. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)> [Consulta: 17 Mar. 2009]
- CUARON, A.D, MORALES, A., SHEDDEN, A., RODRIGUEZ-LUNA, E., y DE GRAMMONT, P.C. 2008b. *Ateles geoffroyi ssp. vellerosus*. 2008 IUCN Red List of Threatened Species. IUCN 2008. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)> [Consulta: 17 Mar. 2009]
- DAKIN, E. E y AVISE, J. C. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. Heredity 93:504-509.

- DEFLEER, T. R. 2003. Los Primates de Colombia. Conservación Internacional de Colombia. Bogotá.
- DIERINGER, D. y SCHLÖTTERER, C. 2003. Two distinct modes of microsatellite mutation processes: Evidence from the complete genomic sequences of nine species. *Genome Research* 13:2242–2251.
- DI FIORE, A. y R.C. FLEISCHER, R.C. 2004. Microsatellite markers for woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha*) and their amplification in other New World primates (Primates: Platyrrhini). *Molecular Ecology Notes* 4(2):246-249.
- ELLEGREN, H., MOORE, S., ROBINSON, N., BYRNE, K., WARD, W. y SHELDON, B. C. 1997. Microsatellite evolution – a reciprocal study of repeat lengths at homologous loci in cattle and sheep. *Molecular Biology and Evolution* 14:854-860.
- ELLEGREN, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5:435-445.
- Federal Bureau of Investigation. 2000. Quality assurance standards for forensic DNA testing laboratories and for convicted offender DNA databasing laboratories. *Forensic Science Communications* 2(3).
- FERNÁNDEZ ROSADO, F. 2008. Análisis de 15 loci tipo short tandem repeats (STR) en la población de paraguay para su uso en identificación forense. Tesis de Doctorado. Universidad de Granada.
- FISHER, R. A. 1935. The logic of inductive inference. *Journal of the Royal Statistics Society* 98:39-54.
- FLEAGLE, JOHN G. 1988. *Primate Adaptation and Evolution*. Academic Press, San Diego, USA.
- FRANKEL, O. H. 1974. Genetic conservation: our evolutionary responsibility. *Genetics* 78:53-65.
- FRANKHAM, R., BALLOU, J.D., y BRISCOE, D.A. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, New York, USA.

- FROEHLICH, J. W., SUPRIANTNA, J., y FROEHLICH, P. H. 1991. Morphometric analyses of *Ateles*: systematic and biogeographic implications. *American Journal of Primatology* 25(1):1–22.
- GALLO, M. 2005. Estudio Ambiental Área Piloto Bahía de Jiquilisco. Disponible en <<http://www.marn.gob.sv/uploaded/content/category/1238122496.pdf>>. [Consulta: 10 de Abr. 2007]
- GOLDSTEIN, D.P. y SCHLÖTTERER, C. 1999. *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, New York, USA.
- GOROG, A. 2002. "*Ateles geoffroyi*" (On-line), Animal Diversity Web. Disponible en <[http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Ateles\\_geoffroyi.html](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Ateles_geoffroyi.html)> [Consulta: 30 Abr. 2007]
- GROVES, C. P. 1989. *A Theory of Human and Primate Evolution*. Clarendon Press, Oxford.
- HARDING, R. BOYCE, A. CLEGG, J. 1992. The evolution of tandemly repetitive dna - recombination rules. *Genetics* 132:847-859.
- HARDY, G..H. 1908. Mendelian proportions in a mixed population. *Science* 28: 49-50.
- HEDRICK, P.W. 2005. *Genetics of Populations (Third Edition)*. Jones and Bartlett, Boston, USA.
- HERNANDEZ-CAMACHO, J., y COOPER, R. W. 1976. The nonhuman primates of Colombia. Thorington, R. W., and Heltne, P. G. (eds.), *Neotropical Primates: Field Studies and Conservation*, National Academy of Sciences, Washington, D.C.
- HERSHKOVITZ, P. 1969. The evolution of mammals in southern continents. VI The Recent mammals of the Neotropical region: A zoogeographic and ecological review. *Quarterly Review of Biology* 44(1):1–70.

- HERSHKOVITZ, P. 1970. Notes on Tertiary Platyrrhine monkeys and description of a new genus from the Late Miocene of Colombia. *Folia Primatologica* 12(1):1–37.
- HERSHKOVITZ, P. 1977. *Living New World Monkeys (Platyrrhini), Volume 1 with an Introduction to Primates*. University of Chicago Press, Chicago, USA.
- HOBBS, R. J., y MOONEY, H. A. 1998. Broadening the extinction debate: population deletions and additions in California and Western Australia. *Conservation Biology* 12(2):271-283.
- HOELZEL, A. R. (ed.). 1992. *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach*. IRL Press, New Cork, USA.
- HORWICH, R.H. y LYON, J. 1998. *A Belizean Rain Forest: the Community Baboon Sanctuary*. Orangutan press, Gay Mills, WI, USA.
- HUGHES, J. B., DAILY, G. C. y EHRLICH, P. R. 1997. Population diversity: its extent and extinction. *Science* 278:689-692.
- ITIS. 2007. ITIS Report. Disponible en <<http://www.itis.gov/>>. [Consulta: 9 Dic. 2007]
- UICN. 2004. *Red list of threatened species. A global species assesment*. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- KARP, A.; KRESOVICH, S.; BHAT, K.; AYAD, W.; HODGKIN, T. 1997. *Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies*. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Roma, Italia.
- KELLOGG, R., y E. A. GOLDMAN. 1944. Review of the spider monkeys. *Proceedings of the U.S. National Museum* 96:1–45
- KONSTANT, W., MITTERMEIER, R. A., y NASH, S. D. 1985. Spider monkeys in captivity and in the wild. *Primate Conservation* 5:82–109.
- LEVENE, H. 1949. On a matching problem arising in genetics. *Annals of Mathematical Statistics*. 20:91-94.



- LEVINSON, G. y GUTMAN, G. A. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA evolution. *Molecular Biology and Evolution* 4: 203-221.
- LITT, M. y J. A. LUTY. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeats within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* 44:397-401.
- MEINE, C. D. 1998. Moving mountains: Aldo Leopold and a Sand County Almanac. *Wildlife Society Bulletin* 26:697-706.
- Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales (MARN). 1997. Primer Informe de País. Formulación de la Estrategia Nacional, Plan de Acción y Primer Informe de País sobre Biodiversidad Biológica. San Salvador, El Salvador.
- Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2003. Manual de inventarios de la biodiversidad. MARN, San Salvador, ES. San Salvador, El Salvador.
- MORALES-HERNÁNDEZ, V. K. 2003. Estudio preliminar de la población de *Ateles geoffroyi* "mono araña" en Chaguantique y El Tercio, departamento de Usulután, El Salvador. Tesis de Licenciatura, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad de El Salvador.
- MORERA, L., D.F. DE ANDRÉS, M. BARBANCHO, J.J. GARRIDO y C.J. BARBA. 1999. Detección de variabilidad genética por microsatélites en el alano español. *Archivos de zootecnia*, 48(181):63-70.
- MYERS, N., y A. H. KNOLL. 2001. The biotic crisis and the future of evolution. *Proceedings of the National Academy Sciences, USA* 98(10):5389-5392.
- NCBI<sup>(1)</sup>, 2008. GenBank. Nucleotide. Disponible en <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=41393815>>. [Consulta: 3 Jul. 2008]
- NCBI<sup>(2)</sup>, 2008. GenBank. Nucleotide. Disponible en <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=41393816>>. [Consulta: 3 Jul. 2008]
- NOWAK, RM. 1999. *Walker's Mammals of the World*. Johns Hopkins University Press. Baltimore and London.

- PEAKALL, R. y SMOUSE P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6(1):288-295.
- PICCA, A; HELGUERA, M; SALOMÓN, N; CARRERA, A. 2004. Marcadores moleculares. *Biología y mejoramiento vegetal*. Disponible en <<http://www.argenbio.org/h/biblioteca/libro/09114.pdf>> [Consulta: 3 Abr. 2007]
- PONSUKSILI, S., WIMMERS, K., SCHMOLL, F., HORST P., y SCHELLANDER, K. 1999. Comparison of multilocus DNA fingerprints and microsatellites in an estimate of genetic distance in chicken. *Journal of Heredity* 90(6):656-659.
- POSSO DUQUE D., y T. GHNEIM HERRERA. 2006. Uso de marcadores microsatélites para la estimación de diversidad genética en plantas. *Manual de laboratorio*. Caracas, Venezuela.
- RALLO, P., BELAJ, A., DE LA ROSA, R., TRUJILLO, I. 2002. Marcadores moleculares (en línea). Córdoba, España. Disponible en <[http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayo-junio\\_2000/almazara/almazara1.htm](http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayo-junio_2000/almazara/almazara1.htm)> [Consulta: 1 Ago. 2002]
- RAYMOND, M. y ROUSSET, F. 1995. Genepop (Version 1.2.): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86(3):248–249.
- ROWE, N. 1996. *The Pictorial Guide to the Living Primates*. Pogonias Press. East Hampton, New York.
- RYLANDS, A. B., SCHNEIDER, H., LANGGUTH, A., MITTERMEIR, R. A., GROVES, C. P. y RODRIGUEZ-LUNA, E. 2000. An assessment of the diversity of New World Primates. *Neotropical Primates* 8(2):61-93.
- RUIZ-GARCIA, M., ESCOBAR-ARMEL, P., MUDRY, M., ASCUNCE, M., GUTIERREZ-ESPELETA, G. y SHOSTELL J.M. 2007. Genetic Variability in Four *Alouatta* Species Measured by Means of Nine DNA Microsatellite Markers: Genetic Structure and Recent Bottlenecks. *Folia Primatologica* 78:73-87.

- RYLANDS, A. B., GROVES, C. P., MITTERMEIER, R. A., CORTES-ORTIZ, L. y HINES, J. J. 2006. Taxonomy and distributions of Mesoamerican primates. En Estrada, A., Garber, P., Pavelka, M., y Luecke, L. *New Perspectives in the Study of Mesoamerican Primates*. Springer, New York.
- SILVA-LOPEZ, G., MOTTA-GILL, J., y HERNANDEZ, A. I. 1996. Taxonomic notes on *Ateles geoffroyi*. *Neotropical Primates* 4(2):41–44.
- SLAMOVITS, C. y ROSSI, I M. 2002. Satellite DNA: agent of chromosomal evolution in mammals. A review. *Neotropical Mammal* 9(2):297-308
- SMITH, C. A. B. 1970. A note on testing the Hardy-Weinberg law. *Annals of Human Genetics*. 33:377-383
- TAUTZ, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17(16):6463-6471
- UGARKOVIC, D y PLOHL, M. (2002) Variation in satellite DNA profiles—causes and effects. *The EMBO Journal* 21(22):5955–5959
- WALSH, P.S., FILDES, N.J., y REYNOLDS, R. 1996. Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Research* 24(14):2807-2812.
- WATSON, J. D., y CRICK, F. H. 1953. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171(4357):737-738.
- WOODRUFF, D. S. 2001. Declines of Biomes and the future of evolution. *Proceedings of the National Academy Sciences, USA* 98(10):5471-5476.
- WRIGHT, S. 1931. Evolution in Mendelian Populations. *Genetics* 16:97-159.
- WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15:323-354.

# **ANEXOS**

## ANEXO 1:

Ficha para la recolección de datos utilizada durante los muestreos en campo.

No. _____	Lugar: _____
Fecha: _____	
Nombre: _____	Genero: _____ Edad: _____
Medidas:	
Cráneo: _____	Cuello: _____ Pecho: _____ Pelvis: _____
Brazo: _____	Palma: _____ Pata: _____ Planta: _____
Cola: _____	Cuerpo: _____
Nota:	
_____	
_____	
_____	
_____	
_____	
No. _____	Lugar: _____
Fecha: _____	
Nombre: _____	Genero: _____ Edad: _____
Medidas:	
Cráneo: _____	Cuello: _____ Pecho: _____ Pelvis: _____
Brazo: _____	Palma: _____ Pata: _____ Planta: _____
Cola: _____	Cuerpo: _____
Nota:	
_____	
_____	
_____	
_____	
_____	

## ANEXO 2:

### BITACORA DE CAMPO DE: “APLICACIÓN DE MICROSATELITES PARA IDENTIFICACIÓN DEL GENOTIPO DE *Ateles geoffroyi* ‘MONO ARAÑA’ ENCONDICIONES DE CAUTIVERIO”

---

AG62			
Lugar	Parque Recreativo Montegrande, San Miguel	Cráneo:	31 cm.
Fecha	15/01/2008	Cuello:	23 cm.
Genero	Macho ♂	Pecho:	46 cm.
Edad	6-7 años	Pelvis:	40 cm.
Nombre	Loco	Brazo:	56 cm.
		Palma:	14 cm.
		Pata:	54 cm.
		Planta:	15 cm.
		Cola:	72 cm.
		Cuerpo:	125 cm.

---

AG63			
Lugar	Parque Recreativo Montegrande, San Miguel	Cráneo:	30 cm.
Fecha	15/01/2008	Cuello:	25 cm.
Genero	Macho ♂	Pecho:	43 cm.
Edad	5 años	Pelvis:	40 cm.
Nombre	Marcial	Brazo:	53 cm.
		Palma:	13 cm.
		Pata:	56 cm.
		Planta:	17 cm.
		Cola:	68 cm.
		Cuerpo:	109 cm.

Nota: Único ejemplar del Parque Recreativo Montegrande con una procedencia silvestre confirmada, del “Cantón El Mono”, departamento de Usulután, El Salvador.

---

AG64			
Lugar	Parque Recreativo Montegrande, San Miguel	Cráneo:	29 cm.
Fecha	15/01/2008	Cuello:	20 cm.
Genero	Hembra ♀	Pecho:	39 cm.
Edad	3 años	Pelvis:	34 cm.
Nombre	Panchita	Brazo:	49 cm.
		Palma:	13 cm.
		Pata:	52 cm.
		Planta:	18 cm.
		Cola:	77 cm.
		Cuerpo:	127 cm.

---

AG65			
Lugar	Parque Recreativo Montegrande, San Miguel	Cráneo:	34 cm.
Fecha	15/01/2008	Cuello:	27 cm.
Genero	Hembra ♀	Pecho:	40 cm.
Edad	6 años	Pelvis:	40 cm.
Nombre	Tania	Brazo:	60 cm.
		Palma:	14 cm.
		Pata:	61 cm.
		Planta:	17 cm.
		Cola:	87 cm.
		Cuerpo:	120 cm.

---

Nota: Ejemplar proviene de casa particular, originaria del Departamento de La Paz.

<hr/>			
AG66			
Lugar	Parque Recreativo Montegrande, San Miguel	Cráneo:	32 cm.
Fecha	15/01/2008	Cuello:	22 cm.
Genero	Macho ♂	Pecho:	46 cm.
Edad	6 años	Pelvis:	37 cm.
Nombre	Florentin	Brazo:	52 cm.
		Palma:	12.5 cm.
		Pata:	57 cm.
		Planta:	16.5 cm.
		Cola:	72 cm.
		Cuerpo:	121 cm.
<hr/>			
AG67			
Lugar	Parque Recreativo Montegrande, San Miguel	Cráneo:	28 cm.
Fecha	15/01/2008	Cuello:	29 cm.
Genero	Hembra ♀	Pecho:	35 cm.
Edad	7 años	Pelvis:	36 cm.
Nombre	Rosita	Brazo:	57 cm.
		Palma:	11.5 cm.
		Pata:	55 cm.
		Planta:	17 cm.
		Cola:	83 cm.
		Cuerpo:	130 cm.
<hr/>			
AG68			
Lugar	Parque Recreativo Montegrande, San Miguel	Cráneo:	30 cm.
Fecha	15/01/2008	Cuello:	26 cm.
Genero	Hembra ♀	Pecho:	37 cm.
Edad	8 años	Pelvis:	38 cm.
Nombre	Chepa	Brazo:	55 cm.
		Palma:	13.5 cm.
		Pata:	62.5 cm.
		Planta:	18 cm.
		Cola:	83.5 cm.
		Cuerpo:	125.5 cm.
<hr/>			
AG69			
Lugar	Parque Recreativo Montegrande, San Miguel	Cráneo:	29 cm.
Fecha	15/01/2008	Cuello:	27 cm.
Genero	Macho ♂	Pecho:	37 cm.
Edad	8 años	Pelvis:	39 cm.
Nombre	Chepe	Brazo:	52 cm.
		Palma:	11.5 cm.
		Pata:	60 cm.
		Planta:	16.5 cm.
		Cola:	80 cm.
		Cuerpo:	128 cm.
<hr/>			

AG70			
Lugar	LaGeo - Central geotérmica de Berlín, Usulután	Cráneo:	—
Fecha	31/01/2008	Cuello:	—
Genero	Hembra ♀	Pecho:	—
Edad	>30 años	Pelvis:	—
Nombre	Gorda	Brazo:	—
		Palma:	—
		Pata:	—
		Planta:	—
		Cola:	—
		Cuerpo:	—
Nota: Proviene de una Gasolinera Shell de Colon, La Libertad. Demostró alta resistencia al anestésico; solamente se logro obtener muestras de folículo piloso.			
AG71			
Lugar	LaGeo - Central geotérmica de Berlín, Usulután	Cráneo:	27.5 cm.
Fecha	31/01/2008	Cuello:	21 cm.
Genero	Macho ♂	Pecho:	37 cm.
Edad	>30 años	Pelvis:	35.5 cm.
Nombre	Seco	Brazo:	54 cm.
		Palma:	12 cm.
		Pata:	57 cm.
		Planta:	15 cm.
		Cola:	75 cm.
		Cuerpo:	114 cm.
Nota: Proviene de una Gasolinera Shell de Colon, Departamento de La Libertad. Peso: 12.5 kg			
AG72			
Lugar	LaGeo - Central geotérmica de Berlín, Usulután	Cráneo:	29 cm.
Fecha	31/01/2008	Cuello:	19.5 cm.
Genero	Hembra ♀	Pecho:	34 cm.
Edad	>7 años	Pelvis:	36 cm.
Nombre	Chele	Brazo:	58.5 cm.
		Palma:	13 cm.
		Pata:	55 cm.
		Planta:	16 cm.
		Cola:	74 cm.
		Cuerpo:	113 cm.
Nota: Proviene de San Miguel Pelaje color Amarillo claro			
AG73			
Lugar	LaGeo - Central geotérmica de Berlín, Usulután	Cráneo:	30 cm.
Fecha	31/01/2008	Cuello:	18.5 cm.
Genero	Hembra ♀	Pecho:	41 cm.
Edad	>30 años	Pelvis:	38.5 cm.
Nombre	Seca	Brazo:	63 cm.
		Palma:	14 cm.
		Pata:	60 cm.
		Planta:	17.5 cm.
		Cola:	86 cm.
		Cuerpo:	129.5 cm.
Nota: Estuvo en el Parque Zoológico Nacional de El Salvador Peso: 6.8 kg			



<hr/>			
AG74			
Lugar	Finca San Ernesto (Comasagua), La Libertad	Cráneo:	30 cm.
Fecha	06/02/2008	Cuello:	23.5 cm.
Genero	Macho ♂	Pecho:	*
Edad	*	Pelvis:	*
Nombre	Viejo	Brazo:	*
		Palma:	15 cm.
Nota:	* No se logro determinar	Pata:	60.5 cm.
Peso: 6.5 kg		Planta:	18 cm.
		Cola:	*
		Cuerpo:	*
<hr/>			
AG75			
Lugar	Finca San Ernesto (Comasagua), La Libertad	Cráneo:	31 cm.
Fecha	06/02/2008	Cuello:	19.5 cm.
Genero	Hembra ♀	Pecho:	44 cm.
Edad	*	Pelvis:	45.5 cm.
Nombre	Pancha	Brazo:	59 cm.
		Palma:	13 cm.
Nota:		Pata:	57 cm.
Peso: 6.8 kg		Planta:	16 cm.
		Cola:	70.5 cm.
		Cuerpo:	127 cm.
<hr/>			
AG76			
Lugar	Finca San Ernesto (Comasagua), La Libertad	Cráneo:	30 cm.
Fecha	06/02/2008	Cuello:	26 cm.
Genero	Macho ♂	Pecho:	37.5 cm.
Edad	*	Pelvis:	35.5 cm.
Nombre	Chayanne	Brazo:	51 cm.
		Palma:	14.5 cm.
Nota:		Pata:	57 cm.
Peso: 7.0 kg		Planta:	16 cm.
		Cola:	83.5 cm.
		Cuerpo:	126.5 cm.
<hr/>			
AG77			
Lugar	Finca San Ernesto (Comasagua), La Libertad	Cráneo:	29 cm.
Fecha	06/02/2008	Cuello:	19 cm.
Genero	Hembra ♀	Pecho:	39.5 cm.
Edad	*	Pelvis:	45 cm.
Nombre	Zarca	Brazo:	57 cm.
		Palma:	13.5 cm.
Nota:		Pata:	56.5 cm.
		Planta:	18 cm.
		Cola:	74.5 cm.
		Cuerpo:	111 cm.
<hr/>			

AG78			
Lugar	Finca San Ernesto (Comasagua), La Libertad	Cráneo:	28.5 cm.
Fecha	06/02/2008	Cuello:	26 cm.
Genero	Macho ♂	Pecho:	35.5 cm.
Edad	*	Pelvis:	35. cm.
Nombre	Chabelito	Brazo:	55.5 cm.
		Palma:	11.5 cm.
Nota: Pelaje color amarillo claro		Pata:	56 cm.
Peso: 6.75 kg		Planta:	16.5 cm.
		Cola:	75.5 cm.
		Cuerpo:	116 cm.
AG79			
Lugar	Finca San Ernesto (Comasagua), La Libertad	Cráneo:	29 cm.
Fecha	06/02/2008	Cuello:	19.5 cm.
Genero	Hembra ♀	Pecho:	38.5 cm.
Edad	*	Pelvis:	39 cm.
Nombre	Gringa	Brazo:	59.5 cm.
		Palma:	13.5 cm.
Nota: Pelaje color amarillo claro		Pata:	62.5 cm.
Peso: 7.0 kg		Planta:	17.5 cm.
		Cola:	87 cm.
		Cuerpo:	130 cm.

Todas las muestras han sido tomadas en El Salvador, sin embargo en la mayoría la procedencia silvestre se desconoce. Dosis utilizada: 0.1 cc Silacina y 0.5 cc Clorhidrato de Ketamina.

SILVIO JAVIER CRESPI GUZMAN

### **ANEXO 3:**

Materiales y reactivos utilizados durante la elaboración del presente estudio.

#### **Reactivos:**

- Buffer TAE (tris-acetate–EDTA). (EDTA, ácido etilendiaminotetraacético. Puede coordinar a metales de transición de forma reversible.)
- Agar polvo.
- Bromuro de etidio.
- Cloro 1%. (para limpiar y descartar puntas usadas)
- Etanol 20% (para limpiar y esterilizar instrumentos metálicos)
- H<sub>2</sub>O destilada
- Chelex resina (cargada negativamente que se une a cationes de metal que inhiben la reacción de PCR.)
- Proteinasa K
- Iniciadores (oligonucleótidos cebadores de PCR)

PROMEGA™ Wizard™ Genomic DNA Purification Kit contiene para muestras de 300 µl de sangre, en 100 extracciones:

100 ml Solución de lisis celular

50 ml Solución de lisis nuclear

25 ml Solución para precipitación de proteínas 50 ml Solución de rehidratación de ADN 250 µl Solución RNAsa.

QIAGEN™ QIAquick PCR Purification Kit contiene:

Taq buffer con KCl

MgCl<sub>2</sub>

dNTPs (deoxinucleósidos trifosfatados)

Polimerasa Taq (produce síntesis de DNA por la región entre los dos iniciadores)

**Equipo:**

- Vortex.
- Autoclave.
- Microondas.
- Freezer y refrigeradora.
- Centrifuga Eppendorf™.
- Termocicladores: Eppendorf™ mastercycler personal, Applied Biosystems™ Gene Amp™ PCR System 2400.
- Secuenciador genético: ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer.

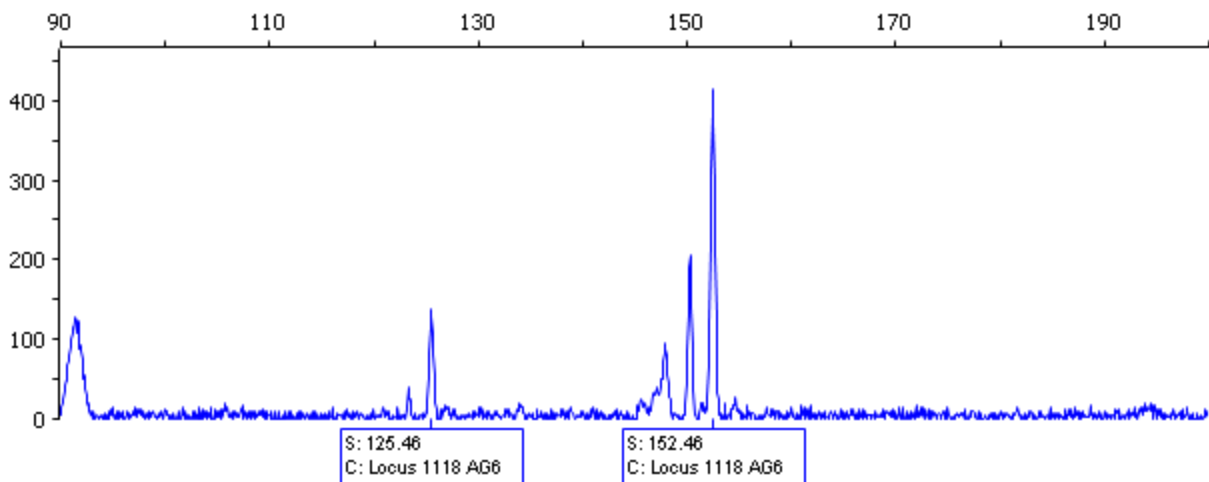
**Otros Materiales:**

- Tubos Vacutainer™
- Puntas de micropipetas 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl.
- Micropipetas eppendorf™.
- Gradillas para tubos eppendorf™.
- Tubos de microcentrífuga eppendorf™.
- Papel parafilm™.
- Sharpie™ permanent marker.
- Papel toalla.
- Guantes Blossom™.
- Etiquetas y calcomanías para rotular.
- bolsas plasticas Ziplock®

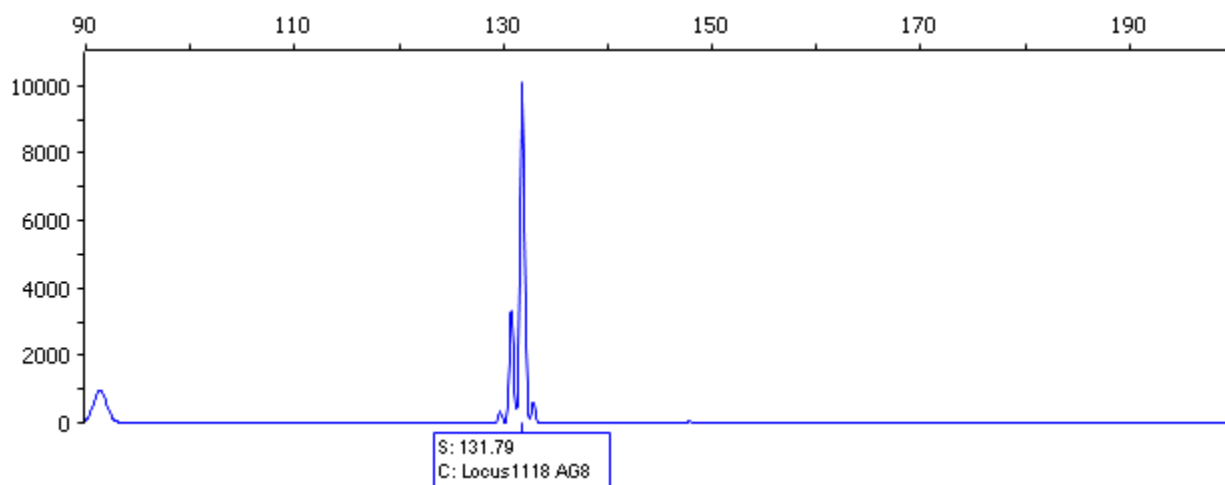
## ANEXO 4:

Perfiles electroforéticos de las muestras AG6, AG8, AG10 y AG15, representativas del total de muestras totales. Se encuentran señaladas las longitudes de los fragmentos en pares de bases (bp), el número de la muestra y los loci dentro de los cuales se identificaron los alelos. Eje “x” representa el numero de pares de bases, mientras que el eje “y” despliega la altura del pico, representando la cantidad del fragmento amplificado.

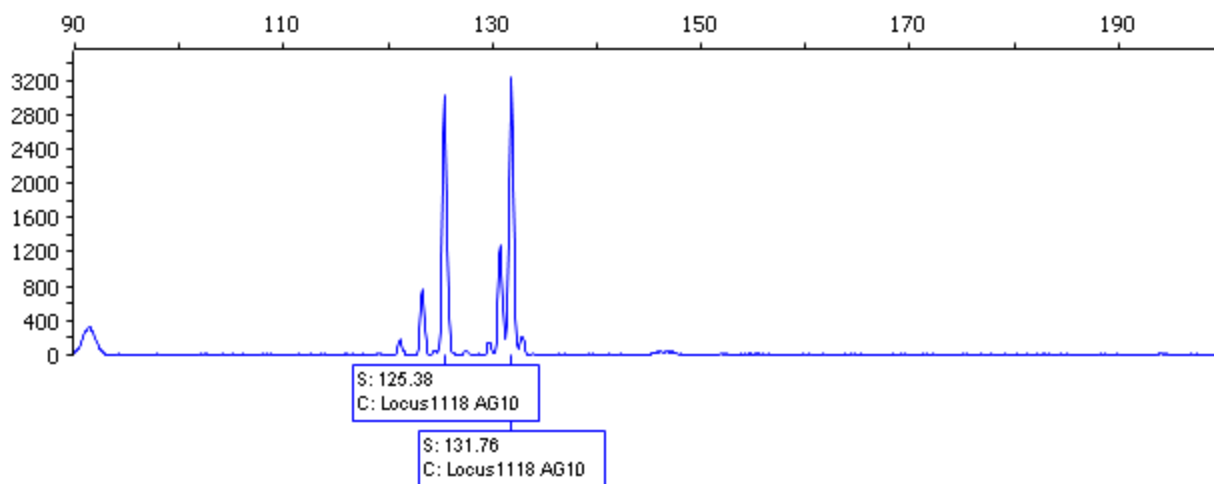
### Electroferogramas para el locus 1118



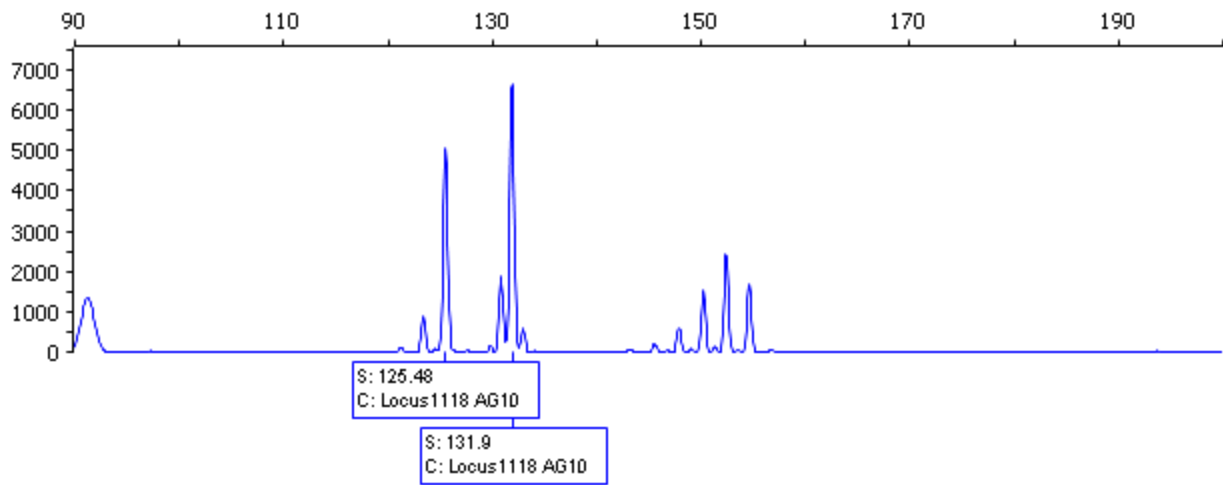
**Fig. 1** Electroferograma de la muestra AG6 para locus 1118.



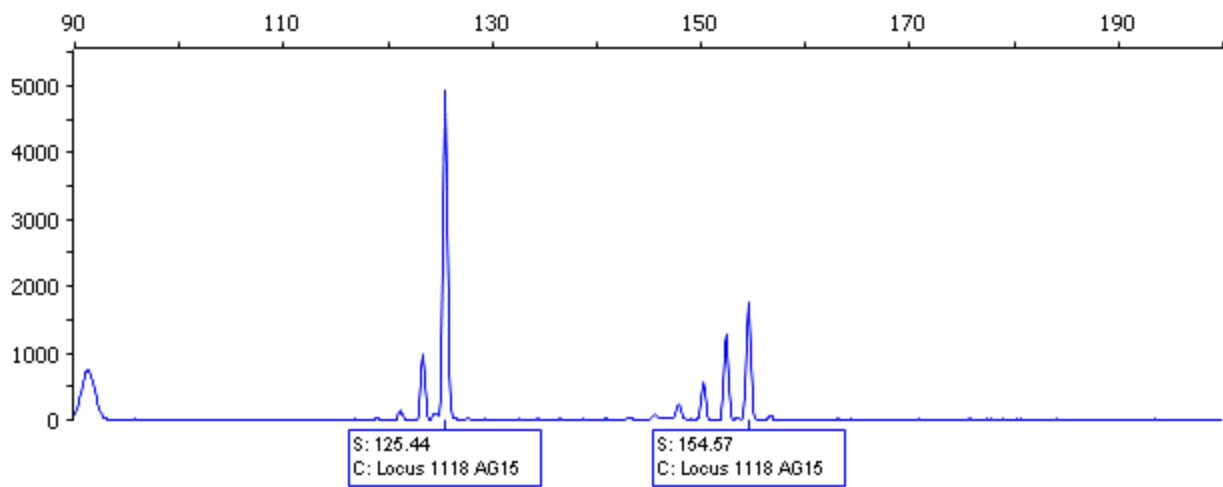
**Fig. 2** Electroferograma de la muestra AG8 para locus 1118.



**Fig. 3** Electroferograma de la muestra AG10 para locus 1118.

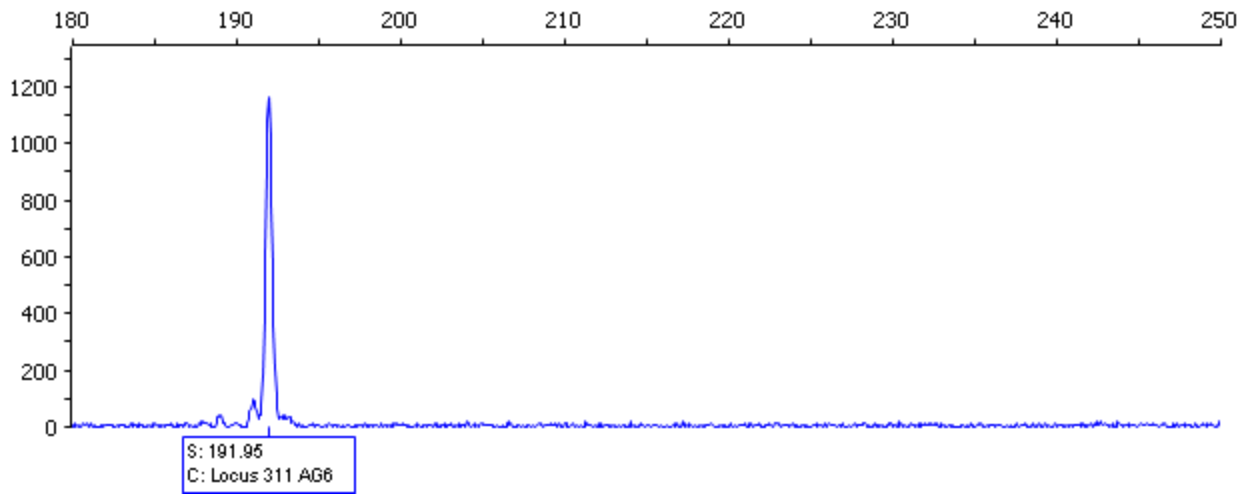


**Fig. 4** Electroferograma de la muestra AG10 para locus 1118 contaminada por otra muestra. Evidenciada por el grupo de picos a la derecha de los alelos verdaderos.

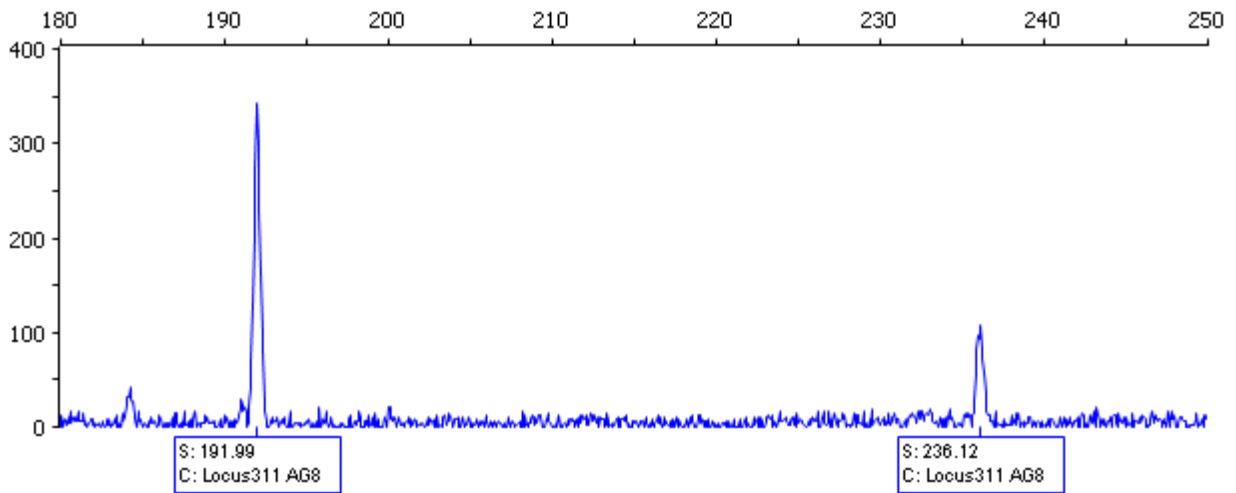


**Fig. 5** Electroferograma de la muestra AG15 para locus 1118.

## Electroferogramas para locus 311

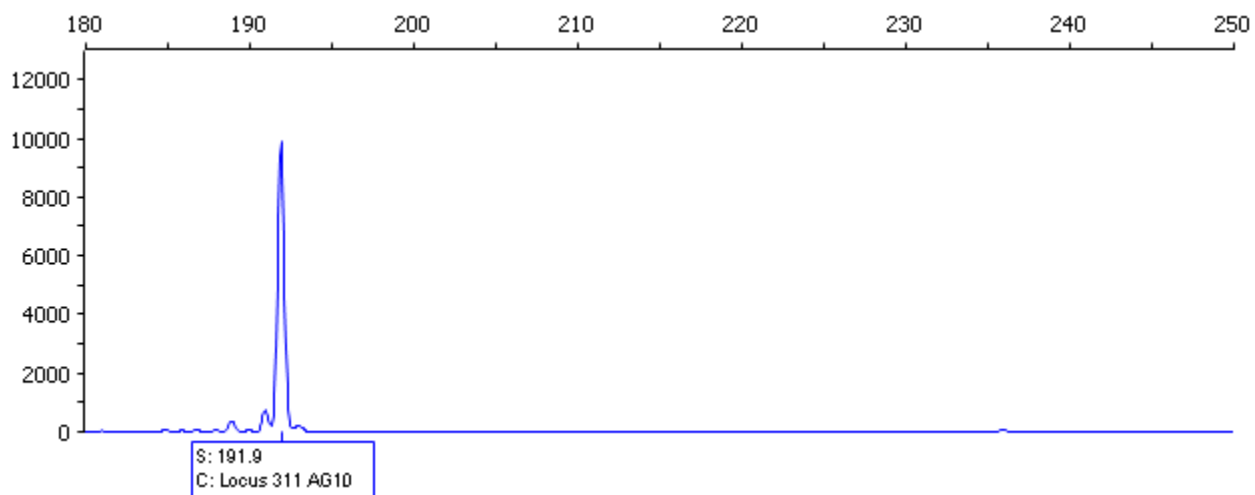


**Fig. 6** Electroferograma de la muestra AG6 para locus 311.

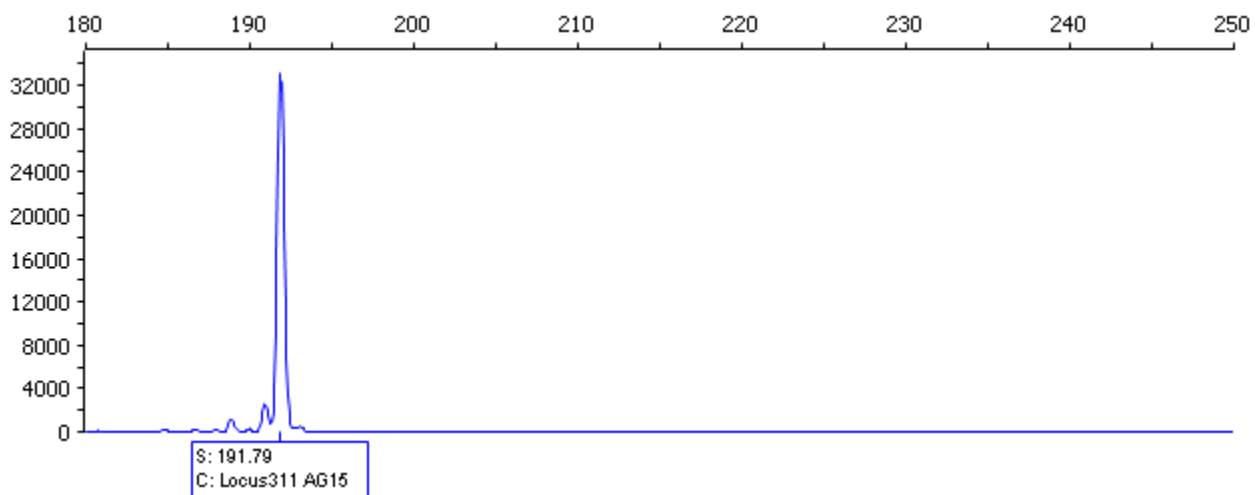


**Fig. 7** Electroferograma de la muestra AG8 para locus 311.



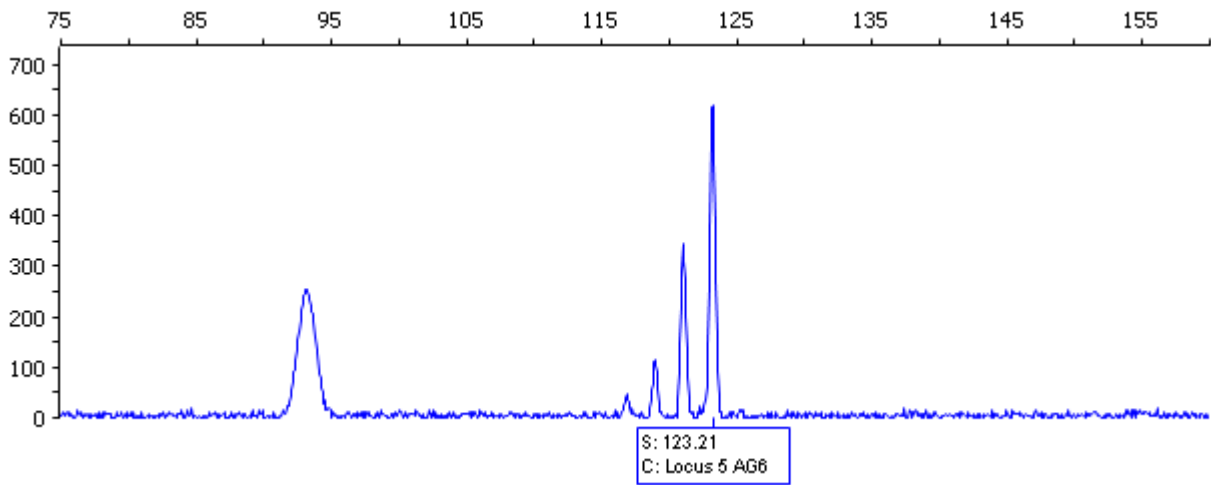


**Fig. 8** Electroferograma de la muestra AG10 para locus 311.

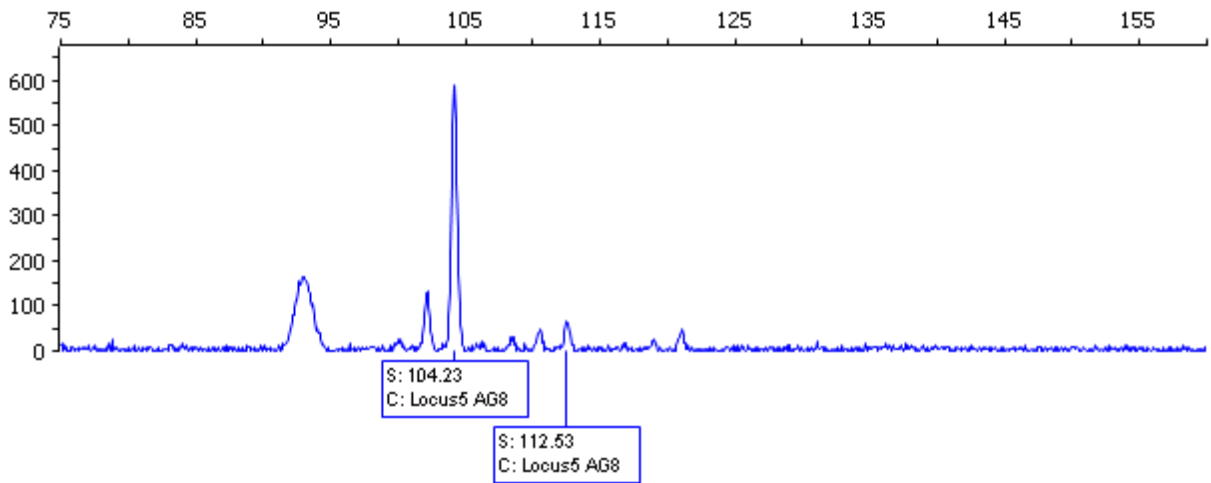


**Fig. 9** Electroferograma de la muestra AG15 para locus 311.

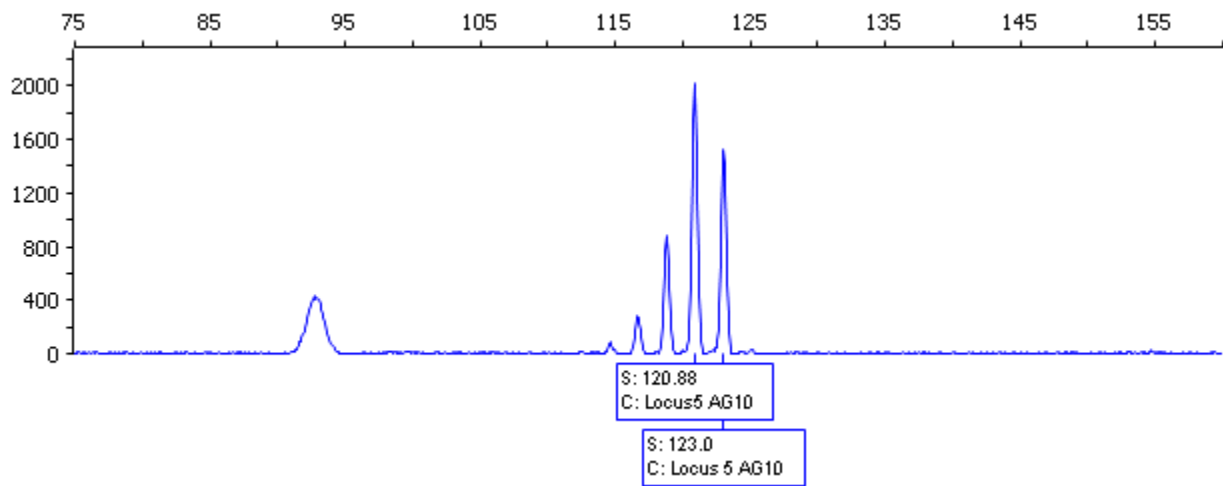
## Electroferogramas para locus 5



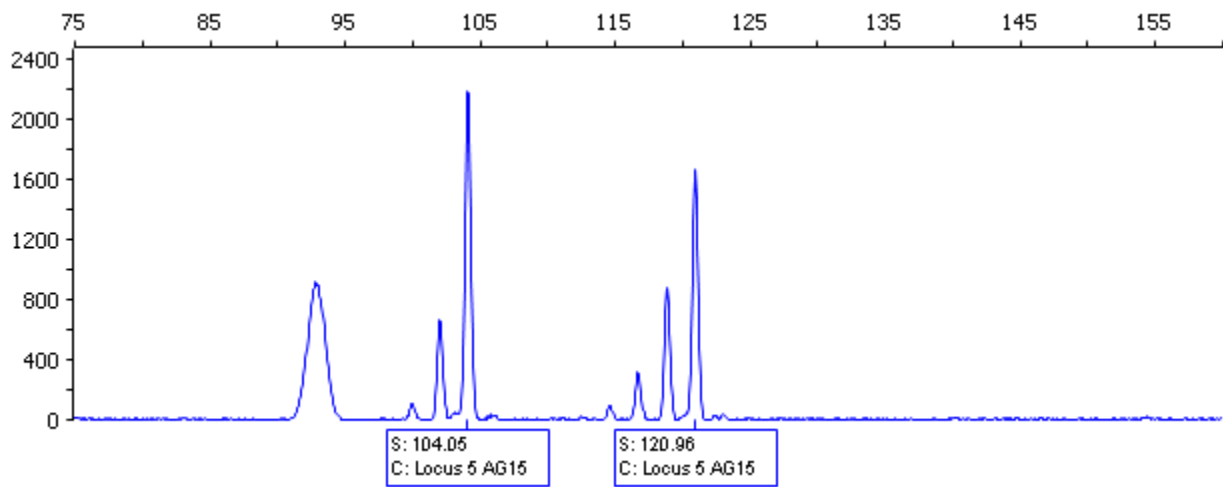
**Fig. 10** Electroferograma de la muestra AG6 para locus 5.



**Fig. 11** Electroferograma de la muestra AG8 para locus 5.



**Fig. 12** Electroferograma de la muestra AG10 para locus 5.



**Fig. 13** Electroferograma de la muestra AG15 para locus 5.

## ANEXO 5:

Inicio del muestreo realizado después de la debida sedación de los animales.



**Fig. 14** Manejo de mono durante la toma de muestra.



**Fig. 15** Manera correcta de sostener un mono.



**Fig. 16** Medidas y toma de muestras biológicas.



**Fig. 17** Almacenamiento y transporte de muestras sanguíneas.



**Fig. 18** PROMEGA™ Wizard™ Genomic DNA Purification Kit.



**Fig. 19** Resina quelante Chelex-100.