



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

**CARACTERIZACIÓN DEL EXÓN 7 DEL GEN *FOXP2* EN EL
CENZONTE MEXICANO *Mimus polyglottos***

TESIS INDIVIDUAL

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL TÍTULO
DE

LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA

PRESENTA

ERENDIRA ANAI DE LA TORRE GONZÁLEZ

DIRIGIDO POR

DR. FAUSTO ARELLANO CARBAJAL

C.U., SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, MÉXICO 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

**CARACTERIZACIÓN DEL EXÓN 7 DEL GEN *FOXP2* EN EL
CENZONTLE MEXICANO *Mimus polyglottos***

TESIS INDIVIDUAL

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL TÍTULO
DE

LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA

PRESENTA

ERENDIRA ANAI DE LA TORRE GONZÁLEZ

DIRIGIDO POR

DR. FAUSTO ARELLANO CARBAJAL

SINODALES

FAUSTO ARELLANO CARBAJAL

DIRECTOR

ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES

SINODAL

RUBÉN PINEDA LÓPEZ

SINODAL

ROLANDO TENOCH BÁRCENAS LUNA

SINODAL

Querétaro, Qro., a 10 de Septiembre de 2016.

H. Consejo Académico de la Facultad de Ciencias Naturales
H. Consejo Interno de la Licenciatura en Microbiología
P R E S E N T E

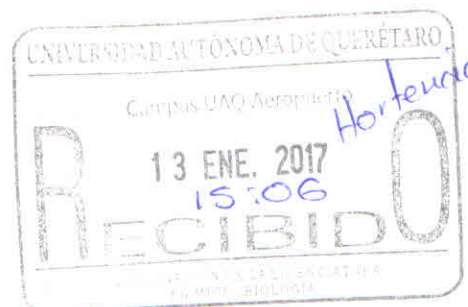
Por este conducto comunico a ustedes que he revisado el trabajo de Tesis Individual.

Titulado: **CARACTERIZACIÓN DEL EXÓN 7 DEL GEN *FOXP2* EN EL CENZONTLE MEXICANO *Mimus polyglottos***. De la alumna Erendira Anai De la torre González con número de expediente 178439 de la Licenciatura en Microbiología, y una vez habiéndolo encontrado satisfactorio, doy **mi voto aprobatorio**, para que continúe sus trámites de titulación.

A T E N T A M E N T E



Fausto Arellano Carbajal
10884
Director



Querétaro, Qro., a 28 de Noviembre de 2016.

H. Consejo Académico de la Facultad de Ciencias Naturales
H. Consejo Interno de la Licenciatura en Microbiología
P R E S E N T E

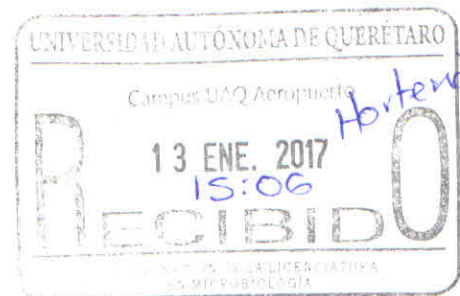
Por este conducto comunico a ustedes que he revisado el trabajo de Tesis Individual.

Titulado: CARACTERIZACIÓN DEL EXÓN 7 DEL GEN *FOXP2* EN EL CENZONTLE MEXICANO *Mimus polyglottos*. De la alumna Erendira Anai De la torre González con número de expediente 178439 de la Licenciatura en Microbiología, y una vez habiéndolo encontrado satisfactorio, doy **mi voto aprobatorio**, para que continúe sus trámites de titulación.

ATENTAMENTE



Rubén Pineda López
Clave: 3215
Asesor



Querétaro, Qro., a 28 de Noviembre de 2016.

H. Consejo Académico de la Facultad de Ciencias Naturales
H. Consejo Interno de la Licenciatura en Microbiología
P R E S E N T E

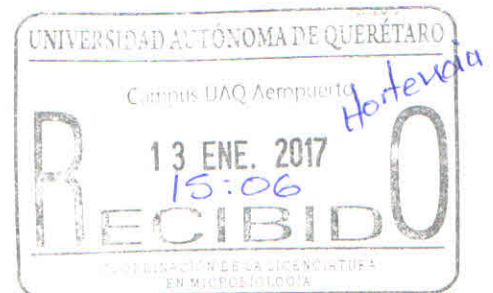
Por este conducto comunico a ustedes que he revisado el trabajo de Tesis Individual.

Titulado: CARACTERIZACIÓN DEL EXÓN 7 DEL GEN *FOXP2* EN EL CENZONTLE MEXICANO *Mimus polyglottos*. De la alumna Erendira Anai De la torre González con número de expediente 178439 de la Licenciatura en Microbiología, y una vez habiéndolo encontrado satisfactorio, doy **mi voto aprobatorio**, para que continúe sus trámites de titulación.

A T E N T A M E N T E



Angelina Rodriguez Torres
Clave: 644
Asesor



Querétaro, Qro., a 28 de Noviembre de 2016.

H. Consejo Académico de la Facultad de Ciencias Naturales
H. Consejo Interno de la Licenciatura en Microbiología
PRESENTE

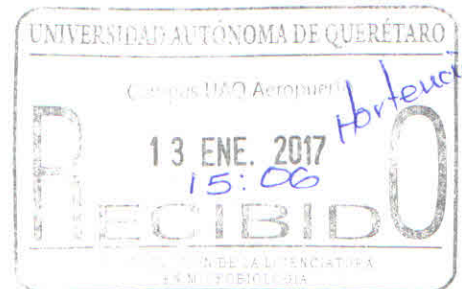
Por este conducto comunico a ustedes que he revisado el trabajo de Tesis Individual.

Titulado: CARACTERIZACIÓN DEL EXÓN 7 DEL GEN *FOXP2* EN EL CENZONTLE MEXICANO *Mimus polyglottos*. De la alumna Erendira Anai De la torre González con número de expediente 178439 de la Licenciatura en Microbiología, y una vez habiéndolo encontrado satisfactorio, doy **mi voto aprobatorio**, para que continúe sus trámites de titulación.

ATENTAMENTE



Rolando Tenoch Bárcenas Luna
Clave: 6547
Asesor



ÍNDICE GENERAL.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
ÍNDICE DE CUADROS.....	4

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUCCIÓN	7
2. ANTECEDENTES	11
2.1.1 Sustratos cerebrales implicados en el aprendizaje vocal en aves y humanos	11
2.1.2 Aprendizaje vocal en aves.....	13
2.2 FACTORES MOLECULARES ASOCIADOS AL LENGUAJE.....	15
2.3 FOXP2.....	17
2.4 FOXP2 y el aprendizaje vocal en aves	19
2.5 Evolución molecular de <i>FOXP2</i>	22
2.6 <i>Mimus polyglottos</i>	26
3. HIPÓTESIS	29
4. OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo general.....	30
4.2 Objetivos específicos	30
5. METODOLOGÍA	31

5.1	MATERIALES.....	31
5.1.1	Muestras biológicas.....	31
5.2	MÉTODOS	33
5.2.1	Extracción de ADN.....	33
5.2.2	Amplificación de fragmentos por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).....	33
5.2.3	Purificación	34
5.2.4	Secuenciación.....	35
5.2.5	Análisis de secuencias	35
6.	RESULTADOS.....	35
6.1	Obtención de ADN genómico.....	35
6.2	Identificación molecular por medio del marcador molecular citocromo B (CYB).....	37
6.3	Análisis de la secuencia nucleotídica del exón 7 del gen <i>FOXP2</i> en <i>M. polyglottos</i>	39
6.4	Comparación del exón 7 de <i>M. polyglottos</i> con aves cantoras y no cantoras.....	41
6.5	Comparación del exón 7 de <i>M. polyglottos</i> con otros organismos vertebrados.	44
7.	DISCUSIÓN	55
8.	CONCLUSIONES.....	62
9.	BIBLIOGRAFÍA	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Similitudes anatómicas del telencéfalo entre aves cantoras y humano.....	9
Figura 2. Regiones cerebrales y subsistemas de vocalización de aves oscinas y humano.	12
Figura 3. Estructura y dominios funcionales de la proteína FOXP2.....	18
Figura 4. Expresión de FOXP2 en diferentes etapas de aprendizaje del canto en pinzón cebra y canario.....	20
Figura 5. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de FOXP2 esquematizado de manera parcial de humano, chimpancé, chimpancé pigmeo, gorilla, orangután y ratón.....	23
Figura 6. Esquema que representa a individuos de diferentes órdenes y los cambios en la secuencia proteica de FOXP2 a nivel evolutivo.	24
Figura 7. Diferencia celular de neuronas y dendritas del cuerpo estriado de ratones de tipo silvestre y ratón con FOXP2 humanizado	25
Figura 8. <i>M. polyglottos</i> doméstico del que se obtuvo muestra para este estudio (Cnz 2).	32
Figura 9. Amplicones del marcador citocromo b visualizados en un gel de agarosa al 1%.....	38
Figura 10. Productos generados con los oligonucleótidos reportados (Webb y Zhang, 2007) para el exón 7 de <i>FOXP2</i> en <i>M. polyglottos</i>	39
Figura 11. Alineamiento de la secuencia parcial del exón 7 de <i>M. polyglottos</i>	40
Figura 12. Alineamiento de la secuencia parcial de FOXP2 de aves	42
Figura 13. Árbol de distancias basado en el método Neighbor-Joining (NJ) generado a partir de la matriz de distancias de 79 pb del exón 7 del gen <i>FOXP2</i> de <i>M. polyglottos</i>	43
Figura 14. Alineamiento parcial del exón 7 de <i>FOXP2</i> de vertebrados.....	45
Figura 15. Árbol de distancias basado en el método Neighbor-Joining (NJ) generado a partir de la matriz de distancias de 80 pb del exón 7 del gen <i>FOXP2</i> de <i>M. polyglottos</i> y otros organismos vertebrados.....	46
Figura 16. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 7 de <i>M. polyglottos</i> (Cnz 1).....	48
Figura 17. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 7 de <i>M. polyglottos</i> (Cnz 2).....	49
Figura 18. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 7 de <i>M. polyglottos</i> (Cnz 3).....	50
Figura 19. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 7 de <i>M. polyglottos</i> (Cnz 4).....	51
Figura 20. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 7 de <i>M. polyglottos</i> (Cnz 5).....	52
Figura 21. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 7 de <i>M. polyglottos</i> (Cnz 6).....	53
Figura 22. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 7 de <i>M. polyglottos</i> (Cnz 7).....	54

Figura 23. Matriz de comparación de pares de las secuencias parciales del exón 7 de aves cantoras, no cantoras y el control, el delfín con las secuencias de los cenizales 55

Figura 24. Matriz de comparación de pares de la secuencia parcial del exón 7 de *FOXP2* de vertebrados y cenizales. 57

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cebadores empleados para la identificación de las muestras por medio de la amplificación del citocromo B (L14816 y H15173) y para la amplificación del exón 7 del gen *FOXP2* (e7F y e7R)..... 34

Cuadro 2. Concentración y calidad del ADN genómico obtenido de tres protocolos usados 37

RESUMEN

Aves y humanos comparten similitudes cerebrales necesarias para el aprendizaje vocal a nivel anatómico, funcional y molecular. FOXP2 es un factor de transcripción que regula genes críticos involucrados en el habla y lenguaje. Mutaciones en este factor de transcripción causan anomalías en la función de los genes diana provocando discapacidades en el habla y lenguaje en humanos. En aves, los niveles de expresión de FOXP2 incrementan durante la etapa del canto plástico, etapa en la que las aves memorizan, reproducen, modifican y crean nuevos cantos a partir de uno escuchado. La secuencia de FOXP2, es altamente conservada entre muchas especies de vertebrados. Sin embargo, dos variaciones de nucleótidos localizadas en el exón 7 de humanos, que generan aminoácidos diferentes, sugieren que son clave en la evolución para el desarrollo del lenguaje complejo humano. De estas dos variaciones de aminoácidos, sólo una es compartida con carnívoros (N325S). El cenizote mexicano, *Mimus polyglottos*, es un ave paseriforme característica por ser muy versátil, ya que tiene la capacidad de producir cientos de cantos intra e inter especie y de objetos inanimados, y continuar aprendiendo cantos a lo largo de toda su vida. En este estudio, se obtuvo la secuencia parcial del exón 7 de FOXP2 de *M. polyglottos* y se observó que presenta dos variaciones en la secuencia de nucleótidos que difieren de otras aves. Así mismo, al realizar el alineamiento de la predicción de aminoácidos generada a partir de la secuencia de nucleótidos, se observó que la variación de guanina en lugar de adenina en la posición 18 del alineamiento realizado, genera una serina en lugar de asparagina en la posición 325, sustitución que es compartida por carnívoros y se encuentra ausente en las secuencias actualmente reportadas de FOXP2 de aves cantoras y no cantoras. Esta variación podría ser clave durante la evolución de *M. polyglottos* que puede explicar su alta versatilidad.

Palabras clave: FOXP2, Cenizote, *M. polyglottos*, lenguaje, polimorfismos, habla, repertorio de cantos.

ABSTRACT

Birds and humans share brain similarities necessary for vocal learning to anatomical, functional and molecular level. FOXP2 is a transcription factor that regulates critical genes involved in speech and language. Mutations in this transcription factor produce defects in the function of target genes causing disabilities in speech and language in humans. In birds, expression levels of FOXP2 increase during the stage of plastic singing where birds memorize, reproduce, modify and create new songs from a model listened. FOXP2 sequence is highly conserved between many species of vertebrates. However, two nucleotide variations localized in exon 7 human, which generate different amino acids, suggest that these are key for the development and evolution of human complex language. Of these two amino acid variations, only one is shared with carnivores (N325S). Mexican mockingbird, *Mimus polyglottos*, is a passerine bird characteristic of being very versatile, since it has the capacity to produce hundreds of songs intra and inter species and inanimate objects, and continue learning songs throughout its entire life. In this work, the partial sequence of exon 7 FOXP2 *M. polyglottos* was obtained and two variations in nucleotide sequence were found, which differ from other birds. Also, when performing the alignment of the predicted amino acid generated from the nucleotide sequence, it was observed that the variation of guanine instead of adenine at position 18 of the alignment performed, generates a serine instead of asparagine at position 325, replacement that is shared by carnivores and is absent in the currently reported sequences of FOXP2 of songbirds and non-singers. This variation could be key during the evolution of *M. polyglottos* which may explain its high versatility.

Key words: FOXP2, Mockingbird, *M. polyglottos*, language, polymorphisms, speech, song repertoire.

1. INTRODUCCIÓN

El lenguaje, de acuerdo a Haesler et al., (2004), Scharff y Haesler (2005), Deacon, (2010) y Diéguez-Vide y Peña-Casanova (2012), es un fenómeno biológico y social en el que la habilidad de transmitir una infinidad de ideas, significados y estructuras conceptuales complejas, se da por medio de un conjunto de combinaciones finitas de signos y sonidos. El lenguaje se compone de una parte fonológica, que es la combinación de elementos auditivos que forma una estructura significativa y otra parte que involucra la sintaxis compositiva, la cual construye expresiones más complejas (Suzuki et al., 2016). El habla, como una característica propia del lenguaje, es un medio de comunicación que requiere de dos elementos: un canal acústico y una transmisión vocal – auditiva (Martín Municio, 1984; Fitch, 2012). La vocalización del habla es compleja, ya que se requiere de: estructuras vocales adecuadas, poseer una amplia variedad fonética y tener la capacidad de aprender vocalmente (Fitch, 2012).

Enard et al. (2002); White et al. (2006); Collier et al., (2014) y Condro y White (2014), establecen que el lenguaje es una característica única de humanos, sin embargo, muchos componentes del lenguaje, como el aprendizaje vocal, son compartidos por otros organismos (Fitch, 2012). Con el fin de comprender los mecanismos neuronales del aprendizaje vocal y su implicación con el habla en humanos, se han realizado estudios de las habilidades de la comunicación en otros animales no humanos.

El aprendizaje vocal es una habilidad motora sensorial que requiere la memorización y la imitación a partir de un modelo auditivo (Nottebohm y Liu, 2010) y con ello, modificar vocalizaciones innatas y aprendidas a fin de crear nuevos sonidos a partir de la improvisación de estos para emplearnos en diferentes contextos (Wilbrecht y Nottebohm, 2003; White et al., 2006; Webb y Zhang, 2005 y Condro y White, 2014a). El aprendizaje vocal requiere del aprendizaje auditivo, el cual es la habilidad de asociar un sonido escuchado a una acción (Jarvis, 2007) y aunque es necesario, no es suficiente para el aprendizaje vocal (Jarvis, 2004). Este tipo de aprendizaje está ampliamente distribuido en vertebrados (Jarvis, 2007; Petkov y Jarvis, 2012). Por otra parte, el aprendizaje vocal

es un rasgo que sólo presentan algunas especies como cetáceos (ballenas y delfines), pinnípedos, elefantes, murciélagos, humanos y tres órdenes de aves: oscinas (Passeriformes), loros (Psittaciformes) y colibríes Trochiliformes (Wilbrecht y Nottebohm, 2003; Webb y Zhang, 2005). Sin embargo, a pesar de compartir este rasgo, no todos tienen las mismas habilidades en términos de la complejidad del canto y el habla, así como no todos pueden vocalizar o imitar sonidos de otras especies (Wilbrecht y Nottebohm, 2003; Nottebohm y Liu, 2010). El humano es el aprendiz vocal más hábil, ya que puede producir y aprender una infinidad de vocalizaciones a lo largo de su vida (Jarvis, 2004). La ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*), loros y algunas aves paseriformes como los cenizos, tienen un grado de complejidad mayor, ya que pueden producir cientos, incluso miles, de combinaciones de sonidos, trinos y llamados aprendidos (Jarvis, 2004; Petkov y Jarvis, 2012) mientras que otras aves cantoras como el pinzón cebrado (*Taenophygia guttata*), tiene un grado de complejidad vocal menor, al poder producir y emitir un solo tipo de canto (Petkov y Jarvis, 2012).

Los organismos que no presentan aprendizaje vocal (o también llamados aprendices no vocales), por el contrario, no pueden producir los sonidos escuchados. Petkov y Jarvis, establecen una clasificación para agrupar a aquellos organismos que, a través de los adultos y el contexto social, aprenden a usar vocalizaciones innatas para responder a alguna situación (Petkov y Jarvis, 2012). Como por ejemplo, los llamados de alarma de monos tumbili (*Chlorocebus pygerythrus*) y gallos (*Gallus gallus*) para alertar a otros sobre un depredador (Jarvis, 2007; Petkov y Jarvis, 2012). Una de las principales diferencias entre aprendices vocales y no vocales, radica en la ausencia de regiones neurobiológicas como regiones paliales, subpaliales y estriales, que son necesarias para el aprendizaje vocal (Jarvis, 2007).

El aprendizaje vocal en aves cantoras y el aprendizaje del habla en humanos comparte muchas similitudes a nivel fisiológico, neurológico y de comportamiento (Haesler et al., 2004; Teramitsu et al., 2004). Al comparar las principales divisiones del sistema nervioso central del humano con otros vertebrados (como las aves cantoras), se observó que dichas estructuras (mesencéfalo, cerebro posterior, tálamo, cerebelo y telencéfalo)

estaban presentes (Figura 1). Lo que los convierte en un buen modelo para estudiar y comprender estos procesos.

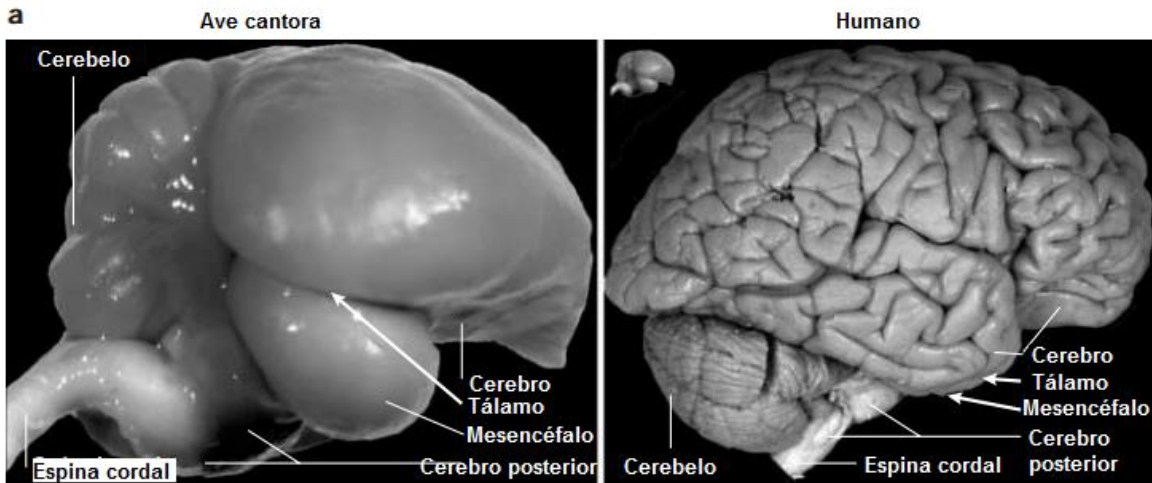


Figura 1. Similitudes anatómicas del telencéfalo de aves cantoras y humano. En ambas estructuras, se observa que poseen cerebelo, región talámica, mesencéfalo y espina cordal. Figura tomada de (Jarvis et al., 2005).

El factor de transcripción FOXP2 está implicado en anomalías del habla y el lenguaje (Lai et al., 2001; Enard et al., 2002). Debido a que eventos de mutación, traslocación, introducción de codones de paro prematuros afectan de manera crucial el funcionamiento de la proteína (Lai et al., 2001; Li et al., 2004; Benítez-Burraco, 2008). Por lo que es importante que funcione correctamente durante etapas fetales y durante etapas críticas del aprendizaje vocal para que el individuo pueda hablar o cantar adecuadamente (White et al., 2006; Wohlgemuth et al., 2014).

A nivel evolutivo, la variación presente en la secuencia de FOXP2 se cree que ha sido clave para la adquisición del lenguaje en humanos, ya que dos mutaciones ocurrieron después de la divergencia del humano con el chimpancé (Zhang et al., 2002; Webb y Zhang, 2005). Posterior a la fijación de estas mutaciones, pasaron al menos seis millones de años para que el hombre aprendiera a hablar (Marcus, 2004). Estas mutaciones, que generan los dos cambios de aminoácidos en la proteína, se encuentran localizados en el

exón 7 de la secuencia de nucleótidos del gen *FOXP2* (Webb y Zhang, 2005), sugiriendo que a nivel evolutivo, las variaciones en este factor de transcripción han tenido un impacto relevante durante la adquisición del habla y el lenguaje en humanos (Zhang et al., 2002; Enard et al., 2002; Shu et al., 2005).

Hasta la fecha, pocos son los estudios que abordan la posible relación entre la variación en la secuencia de *FOXP2* con alguna ventaja como la capacidad de tener un repertorio complejo. En su investigación, Li et al., (2007), mencionan que murciélagos ecolocalizadores que muestran una complejidad en sus señales de ecolocalización, presentan una alta variación de sustituciones (en su mayoría no sinónimas) en la secuencia de *FOXP2* en los exones 7 y 17, especulando la posibilidad de que la evolución acelerada que ha tenido *FOXP2* en estos murciélagos, tenga un papel importante en la coordinación sensorimotora así como un papel en la ecolocalización.

Ya que las sustituciones en el factor de transcripción *FOXP2* en murciélagos ecolocalizadores podrían estar implicadas en la complejidad de señales de ecolocalización, se quiso determinar si en aves con cantos versátiles, como lo es el cenizote *M. polyglottos*, se presentan variaciones en la secuencia del exón 7 de *FOXP2* que sugieran la posibilidad de un papel de *FOXP2* en la evolución y el desarrollo del repertorio de los cantos.

2. ANTECEDENTES

2.1.1 Sustratos cerebrales implicados en el aprendizaje vocal en aves y humanos

En mamíferos, los sonidos son generados por medio de un órgano vocal denominado laringe. En aves, esta estructura se conoce como siringe (Wilbrecht y Nottebohm, 2003). En mamíferos, las regiones se encuentran estratificadas en capas celulares mientras que en aves, la estratificación es nuclear (Jarvis, 2007).

Los humanos dependen de una vía para la vocalización y la producción del habla. Esta vía involucra diferentes estructuras como la corteza motora primaria, regiones en la corteza media y lateral inferior, la corteza premotora, la corteza motora suplementaria, el cerebelo y estructuras subcorticales como el tálamo y parte de los ganglios basales (Petkov y Jarvis, 2012).

El subsistema de aprendizaje vocal en humanos consiste en una vía de la corteza motora primaria, que parte de la región laringeal motora del córtex (LMC) al núcleo ambiguo (Am, Xllts en aves), y que proyecta hacia los músculos de la laringe, controlando la producción de sonidos aprendidos vocalmente (Figura 2) (Jarvis, 2007; Petkov y Jarvis, 2012).

La corteza premotora adyacente en humanos es requerida para el aprendizaje del habla y para la producción de la sintaxis, constituye la parte de un circuito cortical del habla o también conocido como circuito cortical-estriado-talámico, el cual abarca desde la corteza de la insula anterior (aINS), el área de Broca, la corteza lateral prefrontal dorsal anterior (DLPFC), el área motora anterior suplementaria (aSMA), hasta al cíngulo anterior. Para la producción de llamados innatos, el circuito involucrado es el sistema límbico y engloba proyecciones de la amígdala, de la corteza orbito frontal y la corteza del cíngulo anterior del periacueducto gris (PAG) Este sistema está conservado entre primates (Jarvis, 2007; Petkov y Jarvis, 2012).

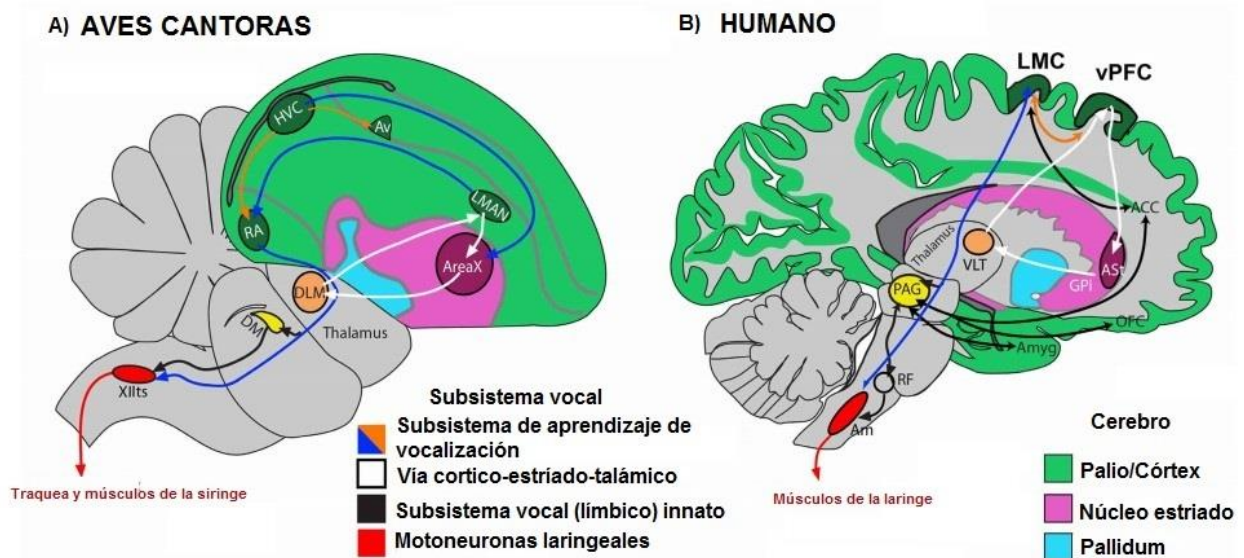


Figura 2. Regiones cerebrales y subsistemas de vocalización de aves oscinas y humano. Figura modificada de Petkov y Jarvis, 2012. A) Principales áreas, núcleos y subsistemas involucrados en el aprendizaje vocal en aves cantoras. B) principales circuitos cerebrales empleados para el aprendizaje vocal en humanos.

Jarvis en 2007, describe las regiones y los circuitos implicados en el aprendizaje vocal en aves, menciona que las áreas vocales cerebrales se dividen en siete núcleos telencefálicos, cuatro posteriores y tres anteriores (Jarvis, 2007). El nombre de estos núcleos y los circuitos implicados, varía para aves oscinas, loros y colibríes. Los núcleos posteriores conforman la vía vocal posterior que proyecta al núcleo nidopallial vocal (HVC), al núcleo vocal arcopallial (RA), al mesencéfalo premotor vocal (DM) y a la medula de neuronas motoras vocales Xllts; siendo este último el responsable de proyectar las conexiones hacia los músculos de la siringe (Figura 2) (Jarvis, 2007; Petkov y Jarvis, 2012).

El segundo circuito denominado vía vocal anterior o circuito de la vía del cerebro anterior (que interconecta al palio con los ganglios basales y el tálamo), está conformado por los núcleos anteriores. En este, el núcleo vocal palial (LMAN) proyecta hacia el núcleo vocal estriado, o área X. Este a su vez, proyecta al tálamo dorsal (DLM) y finalmente, DLM proyecta al tálamo dorsal posterior del núcleo palial (LMAN) (Figura 2) (Petkov y Jarvis, 2012). Cabe señalar que en todas las aves hay una entrada al tronco cerebral de la región

de DM para Xllts, que al igual que como ocurre con la proyección PAG en mamíferos para el núcleo ambiguo, controla la producción de vocalizaciones innatas (Petkov y Jarvis, 2012). Esta vía es necesaria para la modificación del canto (Condro y White, 2014a) y es similar en términos de su conectividad, a los circuitos corticales talámicos ganglionales basales de mamíferos (Hilliard et al., 2012).

2.1.2 Aprendizaje vocal en aves

En muchas aves cantoras, el aprendizaje vocal comienza a partir de las primeras experiencias de la cría, en el llamado para el alimento hasta antes de la madurez sexual. De manera general, la cría comienza a producir un subconjunto de sonidos de manera repetitiva, después comienza a estructurar y ordenar sonidos que ha ido aprendiendo y forma un canto plástico. Finalmente, el canto o los cantos son cristalizados y serán estos los que el ave emitirá en su vida adulta (Wilbrecht y Nottebohm, 2003). A pesar de seguir un patrón en la adquisición del canto, el aprendizaje vocal entre especies varía en los tiempos de adquisición de los primeros cantos, el comportamiento durante el aprendizaje y la variedad en el repertorio de los cantos aprendidos (Wilbrecht y Nottebohm, 2003; Nottebohm y Liu, 2010).

El pinzón vulgar (*Fringilla coelebs*) tiene dialectos vocales locales, por lo que sólo imitan el canto entre su misma especie. Durante la etapa juvenil, después de escuchar el canto de un adulto, los pinzones más jóvenes producen un subcanto suave e incoherente, a modo de práctica que carece de significado (Wilbrecht y Nottebohm, 2003). Poco a poco, el pinzón va incorporando sonidos que anteriormente eran utilizados en el contexto de la petición de alimentos. El canto plástico es más estructurado y mucho menos variable que el subcanto. En el canto plástico se puede reconocer los sonidos que el menor está imitando y que usará en la madurez sexual, volviéndose este canto cada vez más similar al del modelo imitado. En la siguiente etapa del aprendizaje del canto, este se cristaliza, es decir, la plasticidad cesa y dicho canto se retiene en los próximos años (Nottebohm y

Liu, 2010). A diferencia de otras aves cantoras, como el canario, el pinzón vulgar no imita el canto de otras aves (Nottebohm y Liu, 2010) ya que el grado de complejidad vocal sintáxica difiere. Por ejemplo en bengalí rojo (*Amandava amandava*) y en pinzón cebra, es menor. El canario y el pinzón bengalí (*Lonchura striata*) es intermedio y en el periquito (*Melopsittacus undulatus*), es mayor (Haesler et al., 2004).

En el pinzón cebra, después de un lapso de 40 días, se vuelven independientes de sus progenitores y a partir de esta etapa, es que comienzan a aprender y a vocalizar sus subcantos. Si presencian el canto de un tutor, los subcantos se modifican inmediatamente para asemejar el patrón del tutor. Con la práctica, la tendencia del canto se vuelve menos variable y más similar al canto que están imitando. Sin embargo, de acuerdo a Nottebohm y Liu (2010), pueden continuar con el patrón de sílabas del canto del tutor que escuchan primero o pueden aprender a vocalizar de manera general, sin ningún patrón de canto y con el tiempo cambian la dirección del canto, es decir, alternan sílabas con el fin de que su subcanto sea similar al que escuchan de su tutor (Nottebohm y Liu, 2010).

Nottebohm y Liu (2010), describen que en el caso de los canarios, desde jóvenes aprenden diferentes tipos de sílabas que van repitiendo constantemente y de manera variable, hasta formar un subcanto más complejo. De 6 a 8 meses después de adquirir del subcanto, los canarios juveniles estructuran su canto. En canarios criados en cautiverio, el modelo que suelen seguir es el del ave más vieja, por lo que en este caso, el canto de ambos será similar. En estas aves ocurre un fenómeno particular en el que, el canto adulto tiene la misma estructura y una calidad en el tono similar a las aves aisladas. Para comprobar que el aprendizaje vocal del canario estuviera presente y descartar que todas las tonalidades adquiridas eran resultado de vocalizaciones innatas se dispuso de un experimento con canarios jóvenes que iniciaban su etapa de adquisición del subcanto y en aislamiento, los cuales fueron instruidos con aparatos que emitían canciones sintetizadas realizadas por un ordenador similares al que emiten canarios. Con el tiempo, los canarios imitaron estos cantos sintéticos. Cuando estos canarios llegaron a la madurez sexual, sólo mantuvieron aquellos sonidos que lograron dominar y al llegar a su etapa adulta, el canto de los individuos fue reconfigurado y se producía el canto

típico del canario. Los autores proponen que este fenómeno podría ser resultado de un comportamiento nato aprendido para su éxito en términos de inducción a las hembras para la construcción del nido y la puesta de huevos. Cabe señalar, que a diferencia de otras aves cantoras, los canarios pueden modificar su repertorio de canto durante su vida (Nottebohm y Liu, 2010).

Para medir el tamaño del repertorio de cantos, Devoogd y colaboradores (1993) describen diversas medidas para estimar la complejidad del canto como el tamaño del repertorio del canto, el número de diferentes cantos producidos y el número de sílabas diferentes. Así mismo, mencionan que el tamaño del repertorio de canto varía de uno a cientos. Sin embargo, independientemente del tamaño del repertorio, el número de diferentes tipos de sílabas puede diferir (Devoogd et al., 1993). Por lo que, en aves cantoras, el tamaño del repertorio vocal puede variar de uno a cientos de cantos. La frecuencia de los cantos, el número de sílabas diferentes empleadas para cada canto, y la variabilidad de los cantos en un periodo determinado de tiempo dependen de la complejidad en el repertorio vocal de cada ave. Como por ejemplo, las aves *Parus major* y *Emberiza calandra*, que a pesar de presentar el mismo número de cantos (de dos a tres) pero el número de sílabas de cada ave, varía, siendo tres para *P. major* y 20 para *E. calandra* (Devoogd et al., 1993).

2.2 FACTORES MOLECULARES ASOCIADOS AL LENGUAJE

Hoy en día se conoce que el lenguaje es una habilidad compleja que involucra la interacción de muchos genes (Spiteri et al., 2007). Esto se desconocía en la década de los años 90, año en que el caso de los individuos de una familia denominada KE, fue uno de los más estudiados, ya que en las tres generaciones analizadas, cerca de la mitad de sus miembros padecía alteraciones en la adquisición del habla y lenguaje (Fisher et al., 1998; Nudel y Newbury, 2013; Condro y White, 2014b). Entre los rasgos fenotípicos se destaca el déficit de la capacidad de dividir palabras en fonemas y el déficit en habilidades

gramaticales que implica la producción de inflexiones o cambios en el tono de voz; además, los miembros afectados presentaban dispraxia del desarrollo verbal, un trastorno del desarrollo del lenguaje que afecta la articulación con respecto a la secuenciación de los movimientos orofaciales (Lai et al., 2001; Nudel y Newbury, 2013). De acuerdo al análisis de pedigríe, este rasgo afectaba de igual forma a hombres y mujeres (Fisher et al., 1998). Mediante la genotipificación con marcadores para microsatélites en el genoma, Fisher y colaboradores (1998) identificaron que esta anomalía era monogénica y que su patrón de herencia era autosómica dominante, ya que en los miembros afectados la mutación era heterocigota (Lai et al., 2001; Nudel y Newbury, 2013). También determinaron que el o los genes responsables se encontraban en la región 7q31 (denominado locus SPCH1) del brazo largo del cromosoma 7 (Fisher et al., 1998). Más tarde, Lai y colaboradores (2001) previeron el primer vínculo molecular asociado a esta anomalía en el habla. Ellos identificaron a *FOXP2* como el gen implicado en la anomalía en el desarrollo del lenguaje en miembros de la familia KE y en un individuo independiente, denominado CS, que presentaba un desorden en el habla y en el lenguaje similar al de la familia KE, asociado a una traslocación recíproca en el cromosoma 5 y 7 (Lai et al., 2001; Li et al., 2004; Scharff y Haesler, 2005; Webb y Zhang, 2005).

Los 27 miembros afectados de la familia KE presentaron una mutación puntual en el exón 14 en donde hay una sustitución de aminoácidos de una arginina (R) por una histidina (H) en la posición 553 (R553H), que afectó el dominio de unión al ADN de la proteína FOXP2. Esta mutación causa déficit en la producción de secuencias complejas de movimientos orofaciales que provocan dispraxia y deficiencia en el aprendizaje (Lai et al., 2001; White et al., 2006; Fisher y Scharff, 2009). Mientras que en un paciente denominado "CS", el punto de interrupción de la traslocación cromosómica en la secuencia codificante de la región q31.2 del cromosoma 7, fue localizada en una región 200 pb en el intrón entre los exones 3b y 4. Al mapear esta región, se observó que en dicho punto de ruptura se interrumpía al gen *FOXP2*, entre los exones 3 y 4 y como consecuencia, había una terminación prematura de la traducción de FOXP2 (Lai et al.,

2001; Benítez-Burraco, 2008). Basados en estos casos, la disrupción en una copia del gen parece ser suficiente para desarrollar un déficit en el habla. Estos hallazgos se establecieron las primeras bases genéticas de desórdenes del habla y el lenguaje y por otra, generó nuevas áreas de investigación a nivel genético, molecular, neurológico, clínico y evolutivo (Tolosa Montero, 2009).

2.3 FOXP2

Para la nomenclatura del gen se tomó como referencia la empleada en la investigación de Wohlgemuth et al. (2014), donde FOXP2 y FoxP2 se utiliza para referirse a la proteína en humanos y organismos no humanos y en cursiva, *FOXP2* Y *FoxP2* para el gen.

FOXP2 es una proteína que pertenece a una familia de factores de transcripción que tienen un dominio de unión a ADN *forkhead* (FOX) conservado (Bruce y Margolis, 2002; Scharff y Haesler, 2005; Fisher y Scharff, 2009; Sin et al., 2015). A partir de su secuencia genómica, se genera un producto principal con una longitud de 715 aminoácidos. Además del dominio Fox, la estructura proteica contiene un dedo de zinc, una región N terminal rica en glutamina, que puede funcionar como una cremallera polar que permite la unión a otros factores de transcripción y crear una unidad transcripcional multiproteica (Figura 3) (Bruce y Margolis, 2002; Scharff y Haesler, 2005). Adyacente a esta región, hay dos regiones de poliglutamina que son codificadas por mezclas de repeticiones CAG y CAA (Enard et al., 2002). La longitud de estas regiones de poliglutamina varía entre taxones, así mismo, los polimorfismos presentes en esta región, no afectan de manera funcional a la proteína (Enard et al., 2002; Benítez-Burraco, 2008). FOXP2 actúa principalmente como un represor directo de la transcripción al unirse a diferentes secuencias en regiones promotoras de un grupo específico de genes blanco (Scharff y Haesler, 2005).

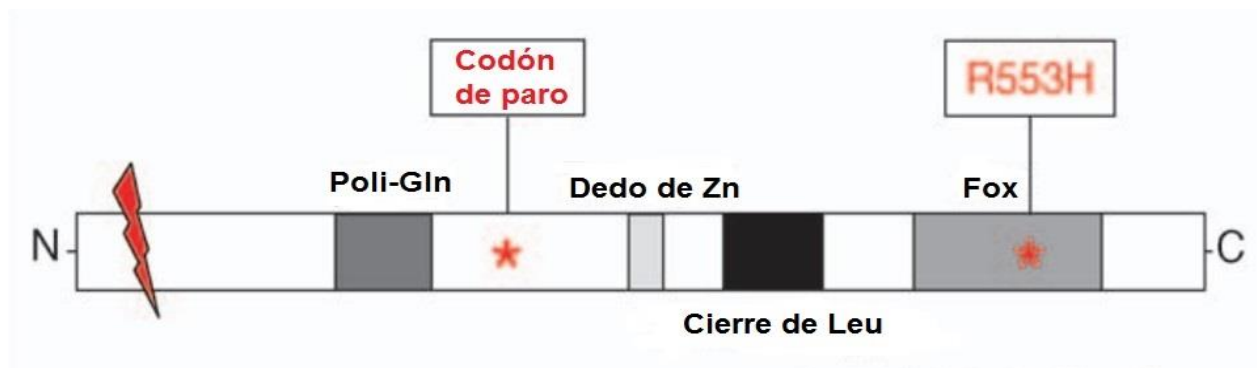


Figura 3. Estructura y dominios funcionales de la proteína FOXP2. Figura obtenida y adaptada de Scharff y Haesler, 2005. El relámpago rojo marca el punto de traslocación cromosómica presente en el paciente denominado CS. El primer asterisco indica la introducción de un codón de paro prematuro en un paciente. El segundo asterisco en rojo, señala la localización física de la mutación en la posición 553 de arginina (R) a histidina (H) presente en los miembros de la familia KE. Poli-Gln: región de poliglutaminas. Cierre de Leu: cierre de leucinas.

Para que la actividad transcripcional ocurra, FOXP2 debe monodimerizar o heterodimerizar con FOXP1, FOXP4 u otros factores de transcripción como la proteína co-represora transcripcional de unión a C-terminal 1 (CtBP1) (Scharff y Haesler, 2005; Fisher y Scharff, 2009). Las interacciones de homo o hetero dimerización dependen del motivo conservado de la cremallera de leucina para su unión al ADN (Li et al., 2004). El dedo de zinc tipo C₂H₂, que se encuentra adyacente a la cremallera de leucina, modula la especificidad de la interacción entre proteínas FoxP (Scharff y Haesler, 2005).

Los blancos moleculares de FOXP2 comprenden una red de genes con relevancia en fenotipos del habla y el lenguaje (Scharff y Haesler, 2005), los cuales, han sido implicados en desórdenes de disfunción en el lenguaje como lo es el receptor tirosina quinasa MET en un amplio espectro de desórdenes de autismo, el gen candidato de la esquizofrenia DISC1, el complejo SRPX2-uPaR involucrado en la epilepsia de áreas cerebrales requeridas para el habla y DVD-CAS y CNTNAP2, gen que codifica una neurexina transmembranal CASPR2, que contribuye a formas típicas en el trastorno específico del lenguaje (TEL) (Graham y Fisher, 2013). De este último, se conoce que FOXP2 se une

al primer intrón de CNTNAP2 y regula negativamente su transcripción (Condro y White, 2014a).

En el desarrollo embrionario, se ha observado que la proteína ortóloga FOXP2 en ratón, se expresa durante la morfogénesis del pulmón y en circuitos de distribución que implican múltiples áreas del cerebro, incluidas las capas profundas corticales, el cuerpo estriado, el cerebelo, tálamo y olivas inferiores (Condro y White, 2014b). FOXP1, 2 Y 4 y otros miembros de la familia FOX, se expresan en tejido neural embrionario, indicando que pueden mediar la diferenciación y la neurogénesis (Spiteri et al., 2007). FOXP2 además, promueve el desarrollo de circuitos implicados en el aprendizaje vocal mediante el desarrollo de neuritas (Scharff y Haesler, 2005).

2.4 FOXP2 y el aprendizaje vocal en aves

Por su similitud en el comportamiento en el aprendizaje vocal con humanos, la anatomía cerebral y el papel conservado de FOXP2, en términos de los patrones de expresión en tejidos neurales durante el desarrollo cerebral, las aves cantoras emergieron como un modelo de estudio para analizar la función de FOXP2 y su relación con el aprendizaje vocal (Webb y Zhang, 2005; Wohlgemuth et al., 2014).

Anomalías estructurales y funcionales en el cerebro de individuos con mutaciones en FOXP2, muestran que los ganglios basales son una zona clave crítica (Haesler et al., 2004). Durante el desarrollo del cerebro de roedores y humano, el cuerpo estriado (el cual yace en los ganglios basales) es el sitio donde la expresión de FOXP2 es más alta (Haesler et al., 2004; Teramitsu et al., 2004; Enard et al., 2009; Chiu et al., 2014). Así mismo, en aves, el área X es parte del circuito de los ganglios basales o circuito anterior del prosencéfalo (AFP) y este, comparte características electrofisiológicas, neuroquímicas y funcionales a los ganglios basales humanos (Haesler et al., 2004; Scharff y Haesler, 2005).

En un estudio realizado por Haesler y colaboradores (2004) en aves cantoras y no cantoras, se mostró que en el área X, la expresión de FOXP2 incrementa durante los días 35 al 50, que corresponde al periodo plástico en el aprendizaje de los cantos en el pinzón cebra. Así mismo, FOXP2 disminuye sus niveles de expresión cuando la cristalización del canto ocurre. Mientras que en el canario, los niveles de expresión de FOXP2 en el área X, cambian conforme a la estación del año (Figura 4) teniendo una mayor expresión durante fases en el que el canto se volvía inestable, esto, en los meses de Julio, Agosto y Septiembre, meses en los que estas aves añaden silabas en su repertorio de cantos, provocando que el canto sea variable. En la temporada de apareamiento, el canto es estable y los niveles de expresión de FOXP2 disminuyen.

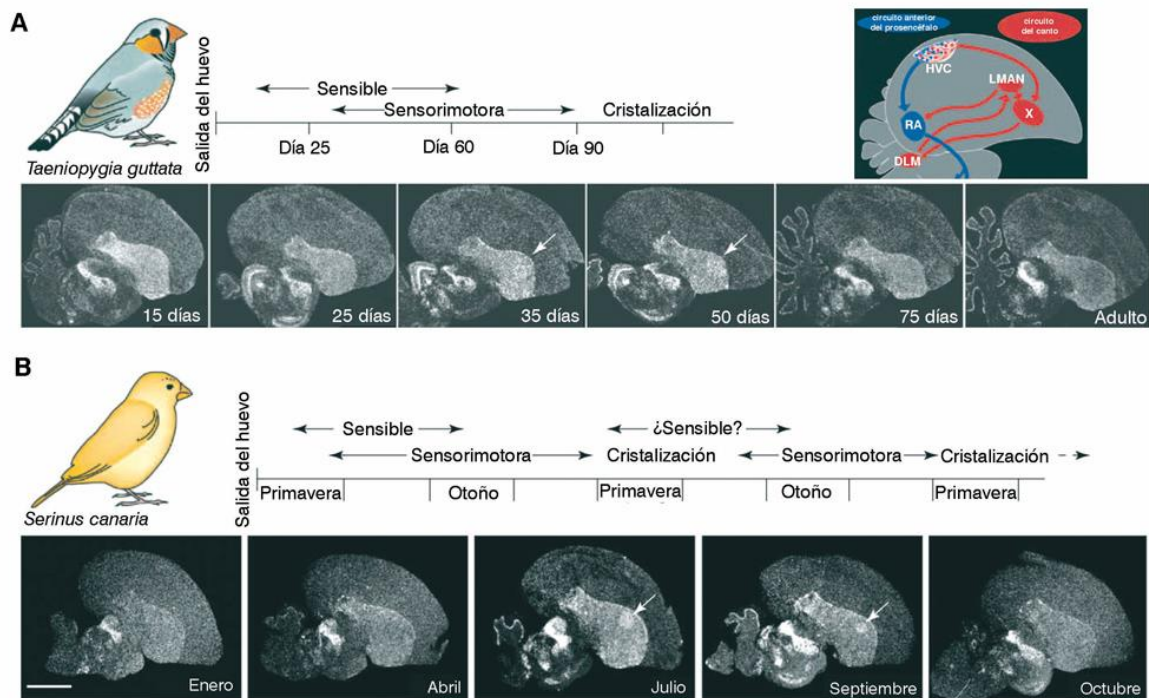


Figura 4. Expresión de FOXP2 en diferentes etapas de aprendizaje del canto en pinzón cebra y canario. A) Variación en la expresión de FOXP2 en diferentes etapas del aprendizaje del canto en el pinzón cebra. **B)** Variación en la expresión del canario en diferentes estaciones del año. Imagen tomada del sitio web del departamento de Biolingüística de la Universidad de Oviedo, modificada a partir de la original de Scharff, et al. 2005.

La principal diferencia entre las aves cantoras y no cantoras, yace en la ausencia de las estructuras cerebrales necesarias para aprender vocalmente. Por ello, Haesler y colaboradores (2004) al comparar los niveles de expresión de FOXP2 en aves cantoras y no cantoras de ambos sexos, encontraron que la expresión de FOXP2 no varió en el cuerpo estriado y el tálamo dorsal (Haesler et al., 2004).

En cuanto a aves con diferente grado de complejidad de canto, se reportó un estudio en el que se quiso determinar si la expresión de FOXP2 variaba en gorriones bengali (*Lonchura striata*), el cual tiene un repertorio de canto mayor y más variable que el del pinzón cebra. Contrario a lo que se esperaba, al menos para este caso, no se encontró evidencia de que la complejidad del canto estuviera relacionado con variaciones cualitativas o cuantitativas en la expresión FOXP2 en el sistema de canto (Wohlgemuth et al., 2014). Sin embargo, sería interesante evaluar los niveles de expresión en otras aves que tienen un repertorio musical mayor.

Se ha observado que la disminución de la expresión de FOXP2 en el área X del pinzón cebra juvenil muestra una disminución en la capacidad para controlar y modular la variabilidad de la canción, ya que la disminución de los niveles de FOXP2 en el área X evita la imitación exacta del canto del tutor al dificultar la capacidad para generar y seleccionar los programas motores que producen el canto del tutor (Murugan et al., 2013; Wohlgemuth et al., 2014). Por lo que la expresión de FOXP2, es crucial para el aprendizaje de cantos en aves.

También, se ha visto que la ausencia de la expresión de FOXP2 en etapas del desarrollo, produce fenotipos distintos. En ratones con ambas copias de *FOXP2* disruptivas, se observó que su comportamiento de exploración se redujo y que tal como sucede en recién nacidos, emiten vocalizaciones ultrasónicas de campo reducido y presentan una modulación de frecuencia mayor en comparación con los ratones control (Shu et al., 2005; Condro y White, 2014). Mostrando que *FOXP2* es un gen crítico para el comportamiento vocal en ratones jóvenes y adultos.

2.5 Evolución molecular de *FOXP2*

Los genes responsables del fenotipo específico de humanos pudieron haber sido alterados bajo presión selectiva provocando cambios en la tasa de sustitución y en sus patrones a nivel de secuencias proteicas (Zhang et al., 2002). Un análisis evolutivo de *FOXP2* realizado por Zhang y colaboradores (2002) mostró que este factor de transcripción es altamente conservado. Este análisis se realizó con la secuencia de *FOXP2* de humano, chimpancé, gorila, orangután, mono Rhesus y el ratón, se observó que esta proteína ha sido blanco de la presión de selección después de la divergencia entre humano y primates no humanos (Scharff y Haesler, 2005); ya que durante esta divergencia, se produjeron las dos sustituciones no sinónimas fijas en humanos, que fueron seleccionadas positivamente al no mostrar una tasa de mutación elevada (Enard et al., 2002; Zhang et al., 2002; Scharff y Haesler, 2005). Ratones y el ancestro común de humanos y chimpancé, divergieron hace 70 millones de años, y en esta separación, se produjo un solo cambio de aminoácido en *FOXP2* (Enard et al., 2002; Webb y Zhang, 2005).

Chimpancés y humanos divergieron hace aproximadamente 6 millones de años, y después de esta divergencia, ocurrieron las dos mutaciones (T303N y N325S) que están ausentes en chimpancé (Enard et al., 2002; Graham y Fisher, 2013). Cabe destacar que estos cambios también están presentes en linajes humanos antiguos como lo son los Neandartales (Condro y White, 2014b).

Las dos sustituciones de aminoácidos corresponden a una treonina (Thr o T) que cambia a una asparagina (Asn o N) en la posición 303 y una asparagina (N) que cambia a una serina (Ser o S) en la posición 325, los nucleótidos responsables de este cambio de aminoácidos, se encuentran localizados en el exón 7 del gen que codifica a *FOXP2* (Figura 5) (Webb y Zhang, 2005; Nudel y Newbury, 2013). La sustitución correspondiente a N325S, es compartida con carnívoros y murciélagos, sugiriendo que este cambio por sí solo no es suficiente para la función proteica del *FOXP2* humano (Nudel y Newbury, 2013). Mientras que el cambio T303N parece ser única en humanos, ya que no se ha

encontrado en algún otro mamífero y vertebrado analizado (Figura 6) (Scharff y Haesler, 2005; Webb y Zhang, 2005; Nudel y Newbury, 2013).

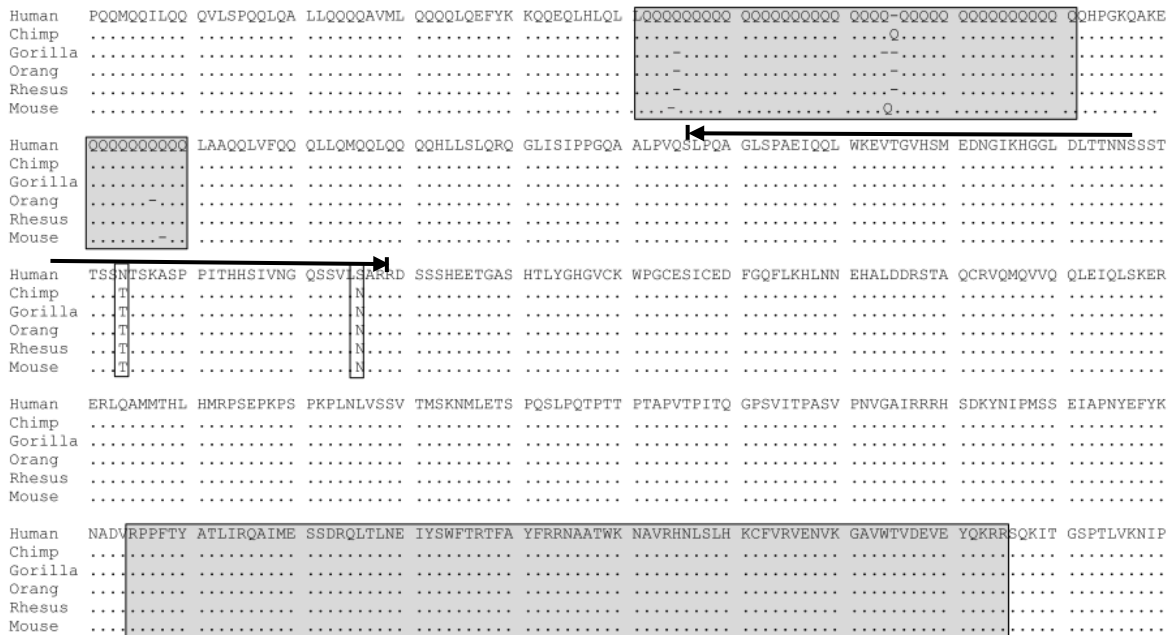


Figura 5. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de FOXP2 esquematizado de manera parcial de humano, chimpancé, chimpancé pigmeo, gorilla, orangután y ratón. Los puntos indican aminoácidos idénticos, guiones (-) muestran gaps. El primer recuadro indica el tramo de poliglutaminas, el segundo recuadro engloba la secuencia correspondiente al dominio *forkhead*. Con flechas se señala los aminoácidos codificados que yacen en el exón 7 de la secuencia genética de FOXP2. Imagen tomada de (Enard et al., 2002).

Orders	Species	Site 303	325
Galliformes (Aves)	Chicken (<i>Gallus gallus</i>)	Thr	Asn
Hyracoidea	Hyrax (<i>Procavia capensis</i>)	Thr	Asn
Tubulidentata	Aardvark (<i>Orycteropus afer</i>)	Thr	Asn
Artiodactyla	Pig (<i>Sus scrofa</i>)	Thr	Asn
	Cow (<i>Bos taurus</i>)	Thr	Asn
Cetacea	Whale (<i>Balaena mysticetus</i>)	Thr	Asn
Perissodactyla	Zebra (<i>Equus grevyi</i>)	Thr	Asn
	Tapir (<i>Tapirus sp.</i>)	Thr	Asn
	Cat (<i>Felis catus</i>)	Thr	Ser
Carnivora	Dog (<i>Canis familiaris</i>)	Thr	Ser
	Wolf (<i>Chrysocyon brachyurus</i>)	Thr	Ser
	Wolverine (<i>Gulo gulo</i>)	Thr	Ser
	Bear (<i>Ursus maritimus</i>)	Thr	Ser
	Fox (<i>Alopex lagopus</i>)	Thr	Ser
	Seal (<i>Phoca vitulina</i>)	Thr	Ser
	Sea lion (<i>Zalophus californianus</i>)	Thr	Ser
Chiroptera	Bat (<i>Tadarida sp.</i>)	Thr	Asn
Rodentia	Mouse (<i>Mus musculus</i>)	Thr	Asn
	Hamster (<i>Cricetulus griseus</i>)	Thr	Asn
Lagomorpha	Rabbit (<i>Sylvilagus floridanus</i>)	Thr	Asn
Insectivora	Mole (<i>Condylura cristata</i>)	Thr	Asn
Scandentia	Tree shrew (<i>Tupaia belangeri</i>)	Thr	Asn
Primates	Lemur (<i>Lemur catta</i>)	Thr	Asn
	Tamarin (<i>Saguinus oedipus</i>)	Thr	Asn
	Rhesus monkey (<i>Macaca mulatta</i>)	Thr	Asn
	Orangutan (<i>Pongo pygmaeus</i>)	Thr	Asn
	Gorilla (<i>Gorilla gorilla</i>)	Thr	Asn
	Common chimp (<i>Pan troglodytes</i>)	Thr	Asn
	Pygmy chimp (<i>Pan paniscus</i>)	Thr	Asn
	Human (<i>Homo sapiens</i>)	Asn	Ser

Figura 6. Esquema que representa a individuos de diferentes órdenes y los cambios en la secuencia proteica de FOXP2 a nivel evolutivo. Imagen tomada de (Zhang et al., 2002).

Como se mencionó anteriormente, humanos y aves cantoras requieren aprender vocalmente para el aprendizaje y la vocalización del habla y cantos respectivamente, Webb y Zhang (2005) realizaron una comparación con la secuencia de aminoácidos codificada por el exón 7 de *FOXP2* en aves que presentan aprendizaje vocal y no vocal. En sus resultados muestran que la secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia nucleotídica del exón 7, fue similar a la secuencia del ratón y estas secuencias de aves, no compartían las sustituciones presentes en humanos (Webb y Zhang, 2005; Nudel y Newbury, 2013).

Para comprobar si estas sustituciones están involucradas en algún fenotipo específico del humano, Enard y colaboradores (2009) utilizaron al ratón para determinar los cambios que presenta el organismo al introducir las sustituciones humanas T303N y N325S. Observaron que *FOXP2* se expresó en neuronas de la espina media, constituyen cerca

del 90% de las neuronas del cuerpo estriado. También *FOXP2^{hum}* tiene un efecto significativo en los patrones de expresión de genes en el cuerpo estriado.

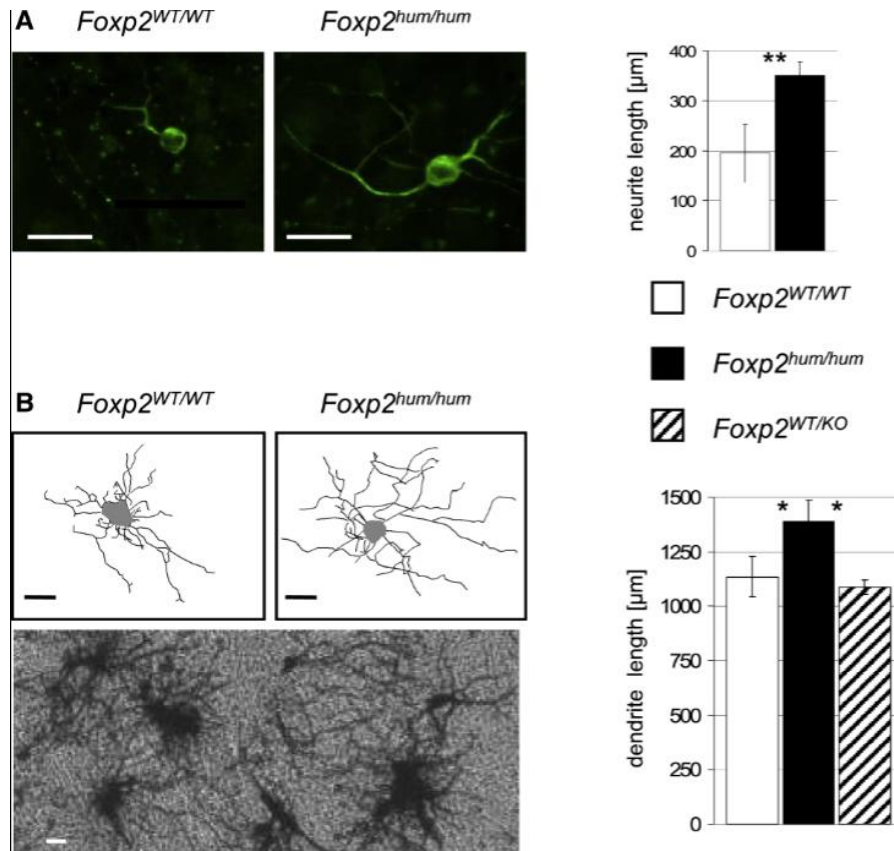


Figura 7. Diferencia celular de neuronas y dendritas del cuerpo estriado de ratones de tipo silvestre y ratón con FOXP2 humanizado. **A)** Neuronas del cuerpo estriado en ratón de tipo silvestre (*FOXP2^{WT/WT}*) y humanizado (*FOXP2^{hum/hum}*) marcadas con β -tubulina III verde como marcador. En el panel derecho, se muestra de manera cuantitativa la longitud de neuronas en micrómetros del ratón de tipo silvestre, el ratón humanizado con las variaciones de humanos (S303N y N325S) para el factor de transcripción FOXP2. **B)** Ilustraciones representativas de la tinción de Golgi-Cox de dendritas del cuerpo estriado de individuos control y humanizados para FOXP2. En el panel derecho, se muestra de manera cuantitativa, la longitud de las dendritas para los tres individuos. Imagen tomada de (Enard et al., 2009).

FOXP2 tiene un efecto positivo sobre los receptores de dopamina D1 de neuronas de la espina media, además de afectar las proyecciones axonales y sus propiedades electrofisiológicas (Figura 7). Al comparar la proliferación y diferenciación *in vitro* del ratón

con alelos tipo silvestre y el ratón humanizado, se observó que los dos genotipos no difirieron significativamente en el crecimiento o en el rango de supervivencia durante la proliferación. Sin embargo, sí se mostró que las dendritas eran 80% más largas con respecto al control y al medir la longitud total de estas células, se observó que tenían ramificaciones dendríticas 22% más largas que en el ratón de tipo silvestre (Figura 7).

Sugiriendo con este estudio que alteraciones en los circuitos de ganglios basales corticales, a causa de los dos cambios de aminoácidos en FOXP2, pueden haber sido importantes para la evolución del habla y el lenguaje en humanos (Enard et al., 2009).

2.6 *Mimus polyglottos*

M. polyglottos es un ave paseriforme que pertenece a la familia de los mímidos. Mide alrededor de 25 cm de largo y no presenta dimorfismo sexual marcado (Nelson, 2014). Se distribuye desde el Sureste de Canadá, al sur de México. En la República Mexicana, se encuentra en toda la zona norte y centro (Instituto Nacional de Ecología, 1997) en zonas áridas y semihúmedas. Estas zonas en las que habita normalmente son abiertas con matorrales y árboles dispersos, también se pueden encontrar en la periferia de bosques y en ciudades (Instituto Nacional de Ecología, 1997; Nelson, 2014).

Su alimentación es omnívora, ya que se alimenta de insectos como polillas, escarabajos, mariposas, hormigas, saltamontes y una gran variedad de frutos como bayas, pasas, manzanas, etc. (Farnsworth et al., 2011; Nelson, 2014). Los cenizos norteros normalmente son monógamos, pero la bigamia y poligamia puede ocurrir (Farnsworth et al., 2011). Pueden tener hasta 4 crías cada temporada de cría.

Ambos sexos cantan. Sin embargo, es el macho quien puede aprender cerca de 200 cantos durante toda su vida (Farnsworth et al., 2011). Los cantos son adquiridos tras la imitación de sonidos, llamados y otros cantos; ya sea de otros individuos de su misma especie, otras aves o incluso de objetos inanimados. A lo largo de su vida, continúan agregando sonidos. Derrickson (1988), menciona algunas etapas en el que el canto varía,

que forman parte del ciclo anual de los cenizotes y que corresponden a la reproducción cuando el macho se encuentra en su territorio sin la presencia de hembras, la etapa del cortejo y el inicio de la construcción del nido por parte de la hembra, la construcción del nido por el macho, el periodo de incubación; y cantos que corresponden a situaciones adversas, como el canto interpretado por las noches por un macho sin pareja, después de que un nido fuera destruido por un depredador, el periodo que se da justo antes de la deserción del territorio a finales del verano y el canto con función en la vigilancia del territorio.

En la etapa del cortejo y durante la construcción del nido, el número de cantos del macho incrementa. No obstante, estos cantos disminuyen durante la incubación y el cuidado de las crías (Derrickson, 1987; Derrickson, 1988).

En México, *M. polyglottos* se conoce como *centzontlatole* (cenizote) del nahúatl *centzontlatolli*. *Centzontli* significa 400 lenguas y *tlatolli*, el que tiene innumerables voces, y en conjunto significa ave de las 400 voces (Cruces Carbajal, 2006). Su nombre hace referencia a su capacidad de producir una gran variedad de cantos.

M. polyglottos, el pájaro gato (*Dumetella carolinensis*) y el cuilacoche rojizo (*Toxostoma rufum*) pertenecen al grupo taxonómico de los zorzales imitadores, conocidos por su gran variedad de cantos (Thompson et al., 2000). El pájaro gato y el cenizote cantan cientos de elementos vocales mientras que el cuilacoche rojizo canta hasta miles de cantos. Esta variabilidad, en conjunto con la complejidad de los cantos ejecutados en un periodo determinado de tiempo, se le conoce como versatilidad, y a estas tres aves, se les conoce por ser muy versátiles (Boughey y Thompson, 1976).

Cada uno se caracteriza por ejecutar un número de repeticiones particular. El pájaro gato vocaliza un canto una vez, los cuilacoche rojos interpretan y repiten un canto hasta dos veces y el cenizote repite un canto varias veces (7 o más) antes de ejecutar otro canto distinto (Derrickson, 1988; Thompson et al., 2000). A diferencia de otras aves, la manera en cómo los cenizotes estructuran sus sonidos, notas y episodios (secuencias de

repetición inmediata de los cantos), es muy característica de ellos (Thompson et al., 2000).

La estructura de cada episodio es especie específica y aporta información importante como su identidad individual y la propensión en su comportamiento como la disposición de atacar a un intruso (Thompson et al., 2000).

Hasta la fecha, la versatilidad del canto de los cenizotes no ha sido abordada y dado que el factor de transcripción FOXP2 tiene implicaciones en el desarrollo del habla y lenguaje, y que en el humano, variaciones en la secuencia del exón 7 han tenido impacto en el desarrollo del lenguaje, quisimos examinar si el exón 7 de FOXP2 del cenizote, presenta variaciones a nivel de nucleótidos que difirieran entre otras aves cantoras y no cantoras, así como de organismos vertebrados. Por lo que se amplificó la secuencia del exón 7 del cenizote para compararla con la de los organismos previamente reportados, con objeto de explorar si en aves versátiles como lo es el cenizote *M. polyglottos*, se presenta variaciones en la secuencia de FOXP2 que sugiera la posibilidad de que FOXP2 tuviera un papel en la evolución y el desarrollo del repertorio de los cantos.

3. HIPÓTESIS

1. La secuencia del exón 7 del gen *FOXP2* en *M. polyglottos* presenta variaciones nucleotídicas en comparación con otros organismos vertebrados.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar el exón 7 del gen *FOXP2* en *M. polyglottos*.

4.2 Objetivos específicos

1. Estandarizar un protocolo y condiciones necesarias para la extracción de ADN en plumas de ave.
2. Identificar a nivel molecular el género de las muestras obtenidas.
3. Generar y caracterizar la secuencia exón 7 del gen *FOXP2* de *M. polyglottos*.
4. Determinar si se presenta alguna variación a nivel de nucleótidos en la secuencia del exón 7 del gen *FOXP2* de *M. polyglottos* en comparación con las secuencias de organismos vertebrados que presentan aprendizaje vocal y no vocal.

5. METODOLOGÍA

5.1 MATERIALES

5.1.1 Muestras biológicas

En estudios genéticos en aves, comúnmente se hace uso de la sangre como fuente de obtención de ADN genómico. Sin embargo, el método de obtención de sangre, además de ser invasivo y provocar estrés en el ave, puede afectar negativamente al organismo sino es realizado por un experto. El uso de plumas como fuente de ADN genómico es una alternativa no invasiva y viable, ya que el plumaje es renovado a través de una etapa de muda de plumas que forma parte de su ciclo biológico anual (Bello et al., 2001; Marin et al., 2009). En este trabajo, se obtuvieron las plumas de muda de siete cenizotes y un loro (todos domésticos) del estado de Querétaro. Las plumas de cada individuo se almacenaron en bolsas herméticas por separado a temperatura ambiente.



Figura 8. *M. polyglottos* doméstico del que se obtuvo muestra para este estudio (Cnz 2).

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Extracción de ADN

Se probaron tres protocolos de extracción de ADN de ápices de plumas de ave descritos por Bello, et al. 2001; Prager y Stoneking, 1999, y el del kit comercial DNeasy® Blood & Tissue, QIAGEN, con algunas modificaciones. Para todos los métodos de extracción, se emplearon dos ápices de pluma de 3 cm para plumas largas y 0.5 cm para plumas cortas por tubo para cada individuo. Las muestras fueron digeridas con 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml), 20 µl de solución DTT (0.1M) y 300 µl de buffer ATL, para el protocolo del kit comercial; con 500 µl de buffer de lisis (50mM Tris-HCl, pH8; 20mM EDTA pH8; SDS 2% y 9 µl de proteinasa K (20mg/ml) para el protocolo descrito por Bello et al. 2001; o con 900µl de buffer de lisis (10mM Tris-base, 10mM EDTA, 2% SDS) y 9 µl de proteinasa K (20 mg/ml), para el protocolo descrito por Prager y Stoneking, 1999. En todos los casos, las digestiones fueron incubadas a 56°C por 10 horas, agitándose cada hora.

La calidad y cuantificación del ADN fue medida en un espectrofotómetro NanoDrop modelo 2000c marca Thermo Scientific.

5.2.2 Amplificación de fragmentos por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés)

Las reacciones de PCR se prepararon de acuerdo a las instrucciones del fabricante de la enzima Taq DNA Polymerase recombinant INVITROGEN®. Se realizaron gradientes de temperatura PCR a diferentes temperaturas de alineamiento de los cebadores para el exón 7 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cebadores empleados para la identificación de las muestras por medio de la amplificación del citocromo B (L14816 y H15173) y para la amplificación del exón 7 del gen FOXP2 (e7F y e7R).

Cebador	Secuencia	Referencia
L14816	5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3'	Parson et al. 2000
H15173	5'-CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'	
e7F	5'-GAAGACAATGGCATTAAACATGGAGG-3'	Webb y Zhang, 2005
e7R	5'-GAATAAAGCTCATGAGATTTACCTGTC-3'	

La mezcla de reacción de PCR fue preparada con agua grado biología molecular, 10X buffer de PCR, 50mM MgCl₂, 10mM mix de dNTPs, 10mM de cada cebador y 5U/μl de Taq ADN polimerasa recombinante por cada reacción. Para la identificación molecular se emplearon los oligonucleótidos universales para el marcador molecular citocromo b (CYB) Parson et al., 2000, bajo las siguientes condiciones: un ciclo a 94°C por un minuto seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 50°C a 30 segundos y 72°C a un minuto, al final de los ciclos se agregó una etapa de extensión final a 72°C por 7 minutos.

Para la amplificación del exón 7 se emplearon los cebadores reportados por Webb y Zhang (2005), bajo las siguientes condiciones: un ciclo a 94°C por un minuto seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 50°C a 30 segundos y 72°C a un minuto, y al finalizar los ciclos, se añadió una etapa de extensión final a 72°C por 7 minutos.

Para corroborar que los productos de PCR fueran los esperados, se realizó una separación por electroforesis en gel de agarosa (BIO-RAD, grado biología molecular) al 1% a 100 mA por 30 minutos. Las bandas generadas se visualizaron en un fotodocumentador modelo 5000 marca BIO-RAD.

5.2.3 Purificación

Los productos de PCR del marcador citocromo b, fueron purificados con las columnas de purificación QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.2.4 Secuenciación

Para los productos purificados del marcador CYB, se utilizó el servicio de secuenciación del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) (<http://labsergen.langebio.cinvestav.mx/labsergen/index1.html>).

Para los productos de PCR amplificados para el exón 7 del gen *FOXP2* se utilizó el servicio de secuenciación de MacroGen Korea (<http://www.macrogen.com>).

5.2.5 Análisis de secuencias

El electroferograma fue visualizado con el software Bioedit v.7.2.5 para observar la calidad de las secuencias. Para determinar la identidad de las secuencias generadas para el CYB, cada secuencia fue alineada en el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y se consideraron aquellas secuencias que presentaron un porcentaje de identidad del 99%. Para corroborar que las secuencias amplificadas correspondieran al gen *FOXP2*, se realizó el mismo procedimiento y se tomaron en cuenta aquellas secuencias con un porcentaje de identidad <95%. La edición de las secuencias se realizó con el programa Serial Cloner 2.6. El alineamiento de las mismas fue hecho con el programa CLC Sequence Viewer 7. Se empleó el software PAUP versión 4.0a150 para la generación de una matriz de comparación por pares de las secuencias para determinar la similitud entre las secuencias generadas con otras reportadas.

6. RESULTADOS

6.1 Obtención de ADN genómico

A pesar de que el uso de plumas como fuente de ADN genómico es un método no invasivo y relativamente más fácil en cuanto su obtención, existe el problema de obtener una baja concentración de ADN (Harvey et al., 2006). Por lo que se evaluaron tres métodos para seleccionar el protocolo más eficiente en términos de generar una mayor concentración de ADN y un nivel de pureza aceptable.

Inicialmente, en los protocolos se recomendaba usar el ápice de una pluma y dejar algunas horas de la noche en incubación a 54 °C o 56 °C, con el buffer de lisis para la degradación de la cutícula de la pluma, que se encuentra conformada por queratina, un compuesto con gran resistencia al agua, bacterias y enzimas (Senar, 2004). Sin embargo, tras realizar una prueba piloto, se decidió colocar dos ápices de pluma para cada ejemplar y el tiempo de incubación fue de 10 horas, con el fin de asegurar la degradación de la queratina.

Con base en las mediciones de concentración y pureza de las pruebas realizadas de los tres diferentes métodos de extracción de ácidos nucleicos para ápices (o cálamo) de pluma, se seleccionó el protocolo del kit DNeasy® Blood & Tissue, QIAGEN, con el cual se tuvo mayor concentración de ADN (Cuadro 2). Esto se podría explicar ya que los kits comerciales aseguran una alta pureza en la extracción, debido a que la eliminación de contaminantes y la recuperación del ADN son más eficientes (Velázquez et al., 2014). Probablemente al realizar los otros protocolos de extracción, los contaminantes no se eliminaron correctamente o se requería más tiempo durante la degradación de la cutícula del cálamo para obtener concentraciones mayores de ADN.

Haciendo uso del protocolo del kit DNeasy® Blood & Tissue, QIAGEN, se extrajo el ADN genómico de los 8 individuos muestreados de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

Cuadro 2. Concentración y calidad del ADN genómico obtenido de tres protocolos usados. Se seleccionó el protocolo con el que se obtuvo una mayor concentración de ácidos nucleicos y una relación de pureza 260/280 cercana a 2.

Muestra	Protocolo	Concentración de ácidos nucleicos (µg/ml)	A 260	A 280	260/280	260/230
Cnz 2	Bello et al., 2002	0.3	-0.006	-1.54	-1.54	0.04
Cnz 2	Bello et al., 2002	0.1	-0.001	-0.006	-0.12	0.05
Cnz 2	Prager y Stoneking, 1999	0.9	0.018	0.003	6.06	-2.46
Cnz 2	Prager y Stoneking, 2000	2.9	0.058	0.026	2.25	0.17
Cnz 2	Dneasy® Blood & Tissue, QIAGEN	12.9	0.258	0.123	2.1	0.29
Cnz 2	Dneasy® Blood & Tissue, QIAGEN	18.5	0.37	0.22	1.68	0.31
Cnz 2	Dneasy® Blood & Tissue, QIAGEN	16.1	0.322	0.16	2.01	0.33
Cnz 2	Dneasy® Blood & Tissue, QIAGEN	14.8	0.296	0.146	2.02	0.3

6.2 Identificación molecular por medio del marcador molecular Citocromo B (CYB).

La secuencia nucleotídica del gen citocromo b, localizado en el ADN mitocondrial, es utilizada para la identificación de vertebrados en estudios taxonómicos y filogenéticos (Hsieh et al., 2001; Parson et al., 2000). El alto número de copias del ADN mitocondrial hace que este locus sea adecuado para el análisis de muestras donde el ADN pudiera estar degradado o sólo se puede obtener poca concentración, como en ejemplares de huesos, cabello y plumas (Parson et al., 2000). Además, se ha visto que no es necesario obtener la secuencia completa de este gen, con amplificarlo de manera parcial, resulta ser efectiva para la identificación de especies (Hsieh et al., 2001). Para amplificar la secuencia parcial de CYB, se utilizaron los cebadores reportados por Parson et al., 2000 (Cuadro 1) y la reacción de PCR se trabajó con las mismas condiciones recomendadas.

De acuerdo al revelado del gel de electroforesis, se obtuvo un amplicón de alrededor de 350 pb (Figura 9). El tamaño de este producto coincide con los datos reportados por (Parson et al., 2000), donde el tamaño del amplicón a obtener es de 358 pb. Una vez que se obtuvieron las secuencias de este fragmento para las 8 muestras de plumas y se determinó que la calidad de la secuencia era adecuada, se procedió a hacer un alineamiento de las secuencias con la herramienta de búsqueda básica de alineamientos locales (BLAST, por sus siglas en inglés), para determinar la identidad de las muestras con base en el porcentaje de similitud. Las 7 muestras de plumas correspondieron al ceniztle *Mimus polyglottos* con un porcentaje de identidad del 99%. La muestra control, correspondió al loro de corona lila *Amazona finschi* con un 99% de identidad, coincidiendo con las características taxonómicas del organismo.

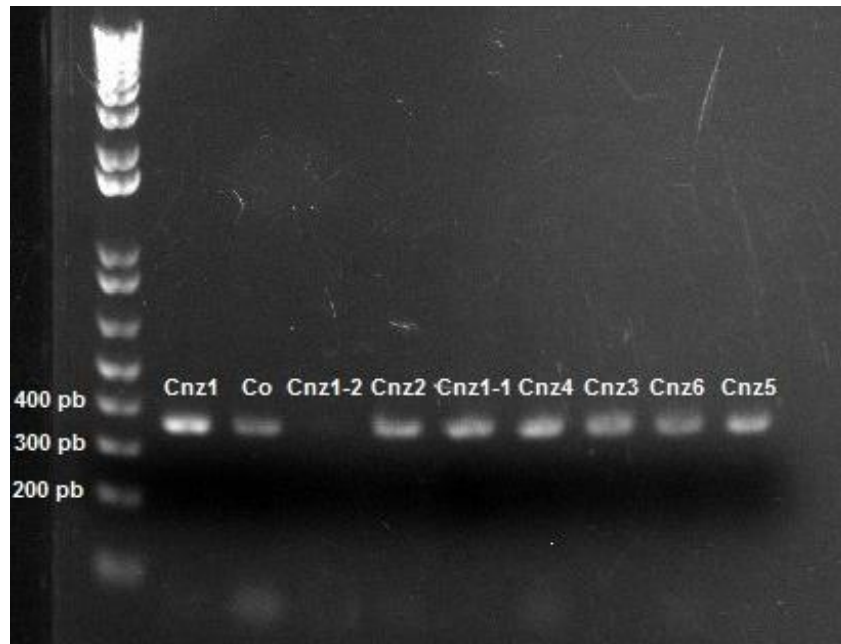


Figura 9. Amplicones del marcador citocromo b visualizados en un gel de agarosa al 1%. Todas las muestras presentaron una banda de un tamaño aproximado de 350 pb. La muestra Co fungió como control externo. La muestra Cnz7 y Cnz7-2 representan al mismo individuo de la misma forma que Cnz1 y Cnz1-1.

6.3 Análisis de la secuencia nucleotídica del exón 7 del gen *FOXP2* en *M. polyglottos*.

Para amplificar la secuencia del exón 7 de *FOXP2*, se emplearon los oligonucleótidos descritos por Webb y Zhang (2005) (Cuadro 1). Se realizaron reacciones de PCR a diferentes temperaturas de alineamiento para determinar la temperatura adecuada de los oligos. Una vez establecida, se realizaron las reacciones de PCR para las 7 muestras de ADN de *M. polyglottos*. Los amplicones generados fueron visualizados en un gel de agarosa al 1 %. Dado que nuestro producto fue una amplificación parcial del exón 7, el tamaño esperado era similar al producto que reportan Webb y Zhang (2005) de 130 a 150 pb, mismo que se observa en el gel de agarosa (Figura 10).



Figura 10. Productos generados con los oligonucleótidos reportados (Webb y Zhang, 2007) para el exón 7 de *FOXP2* en *M. polyglottos*.

Una vez obtenidas las secuencias, se analizó la calidad con el software Bioedit v.7.2.5. El criterio para determinar dicha calidad fue que las lecturas de cada base fueran superiores al ruido de la línea base, como se muestran en las secuencias parciales en

las figuras 10 a 16, segmento A. Posteriormente, las secuencias se editaron con el software Serial Cloner 2.6. Una vez editadas, se confirmó que cada fragmento correspondiera a FOXP2 mediante un alineamiento con el programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local BLAST. Todas las secuencias tuvieron un 96 % de identidad con la secuencia genómica *FOXP2* de otros organismos.

Después de confirmar la identidad de las secuencias, se hizo un alineamiento con el programa CLC Sequence Viewer 7.6.1, entre las 7 secuencias del exón 7 de *FOXP2* de *M. polyglottos* para determinar la variación a nivel de nucleótidos.

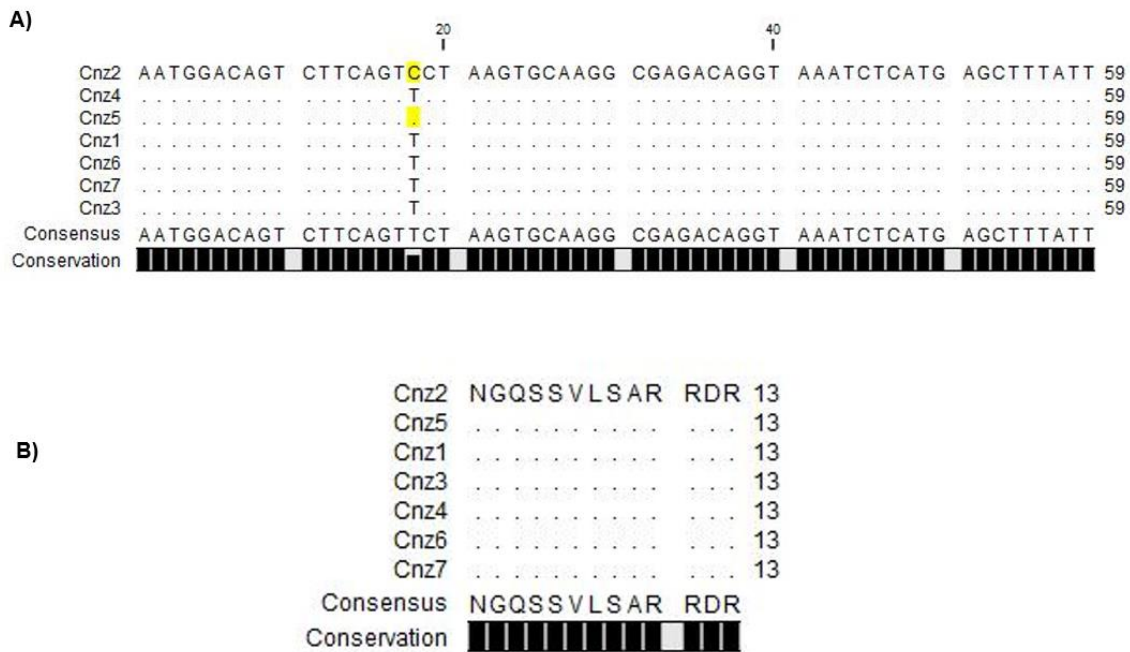


Figura 11. A) Alineamiento de la secuencia de nucleótidos del exón 7 de *FOXP2*. En amarillo se denota la variación de nucleótidos. Los puntos representan nucleótidos idénticos respecto a la secuencia consenso. **B)** Predicción de aminoácidos de la secuencia parcial del exón 7 de *M. polyglottos*.

Posteriormente, con Serial Cloner 2.6 se hizo una predicción de aminoácidos para observar si alguna de las variaciones era una sustitución sinónima o no sinónima. Dichas predicciones de aminoácidos fueron alineadas y editadas con CLC Sequencer Viewer

7.6.1. Se observó que la variación nucleotídica presentada en la figura 11 A, no generó un cambio de aminoácido en la secuencia predictiva parcial de FOXP2 (Figura 11 B).

6.4 Comparación del exón 7 de *M. polyglottos* con aves cantoras y no cantoras.

Para determinar si la secuencia del exón 7 de *M. polyglottos* era similar al de otras aves, se obtuvo la secuencia del exón 7 de FOXP2 de 14 aves no cantoras, 16 aves cantoras y un mamífero como grupo externo, en la base de datos de Genbank. Estas se alinearon con el programa CLC para compararlas con las secuencias del cenizote (Figura 11 A).

Se observó que el exón 7 de las aves cantoras y no cantoras está muy conservada, como se había reportado anteriormente en la comparación realizada por Webb y Zhang (2005) en cuanto a aves.

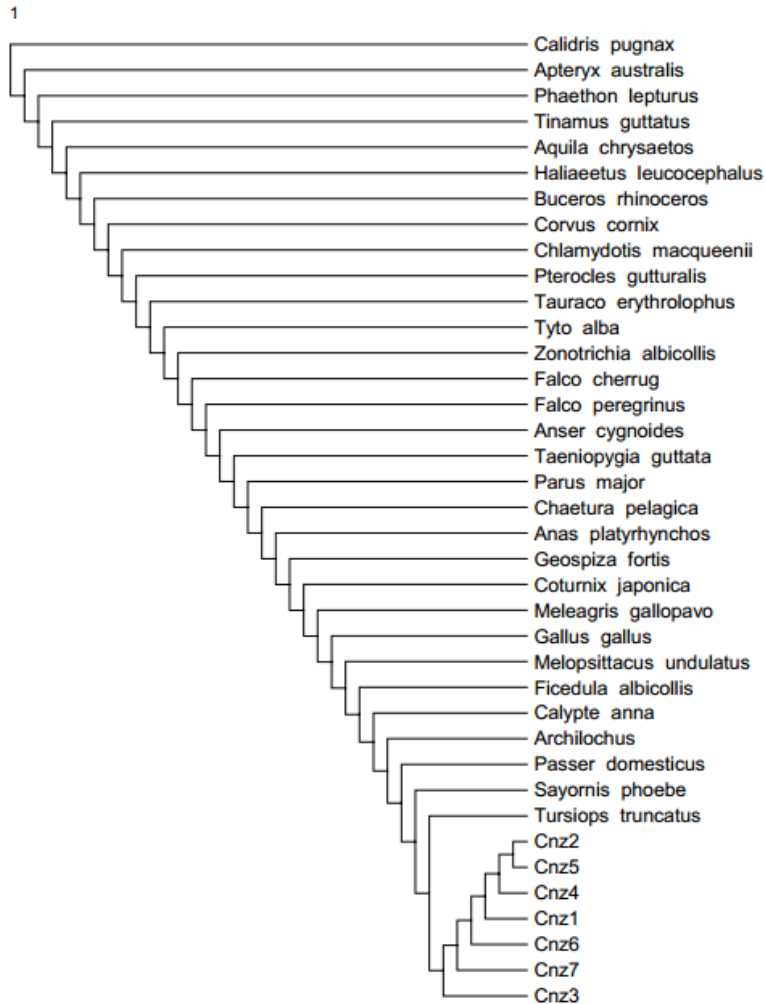


Figura 13. Árbol de distancias basado en el método Neighbor-Joining (NJ) generado a partir de la matriz de distancias de 79 pb del exón 7 del gen *FOXP2* de *M. polyglottos*. Se emplearon 14 aves no cantoras, 16 aves cantoras y 1 mamífero.

Las secuencias de los 7 cenizontes presentaron dos variaciones en la secuencia de nucleótidos. Una variación fue compartida únicamente en dos individuos (Cnz 2 y Cnz5) en la posición 18, mientras que la otra variación, presente en la posición 23, está presente en los siete individuos analizados y estuvo ausente en todos los organismos comparados.

Al determinar si dichas sustituciones en la secuencia de nucleótidos cambiaban la secuencia a nivel de aminoácidos, se realizó una predicción de aminoácidos con el software Serial Cloner 2.6. La variación observada en la posición 18 fue una sustitución sinónima, ya que el cambio de nucleótido no generó otro aminoácido (Figura 11 B), mientras que, la variación en la posición 23 generó otro aminoácido (N a S) diferente al que se muestra en la secuencia consenso (Figura 11 B).

Para corroborar esta diferencia en la secuencia de nucleótidos, con el software PAUP4 se generó una matriz de comparación por pares de las secuencias del exón 7 de aves cantoras, no cantoras y cenzontles. Esta matriz muestra cuantitativamente la diferencia entre una secuencia con otra (Figura 23). A partir de la matriz de distancias generada, se generó un árbol mediante el método Neighbor-Joining (NJ), para reflejar el grado de similitud entre las secuencias del exón 7 de cada organismo. Como se puede observar en la figura 13, el exón 7 de todos los cenzontles, está agrupado en una misma terminal, siendo el delfín, el organismo con mayor similitud.

Dado que las secuencias del exón 7 de los cenzontles fueron similares a la secuencia del mamífero control, se hizo una comparación con otros organismos vertebrados para determinar qué tan similares son sus secuencias.

6.5 Comparación del exón 7 de *M. polyglottos* con otros organismos vertebrados.

De la misma forma en la que se compararon las secuencias del exón 7 de los cenzontles con aves cantoras y no cantoras, se generó un alineamiento con la secuencia de 3 primates no humanos (*Pan troglodytes*, *Macaca mulatta* y *Pongo pygmaeus*), humano (*Homo sapiens*), un reptil (*Alligator mississippiensis*), el delfín mular (*Tursiops truncatus*), ratón (*Mus musculus*), rata (*Rattus norvegicus*), un anfibio (*Xenopus tropicalis*), murciélago (*Aselliscus tricuspidatus*), gato (*Felis catus*), perro doméstico (*Canis lupus*) y el pinzón cebrá (*Taeniopygia guttata*) para su comparación.

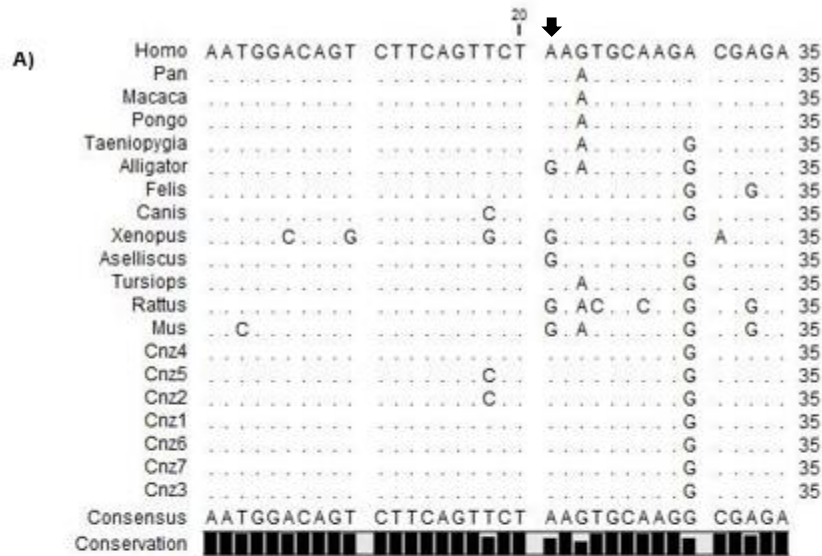


Figura 14. Alineamiento parcial del exón 7 de *FOXP2* de vertebrados. **A)** Alineamiento de la secuencia del exón 7 de *FOXP2* de las 7 muestras de cenizante y otros organismos vertebrados. **B)** Predicción de aminoácidos a partir de la secuencia del exón 7 de *FOXP2*. Los puntos indican nucleótidos y aminoácidos iguales con respecto a la secuencia consenso.

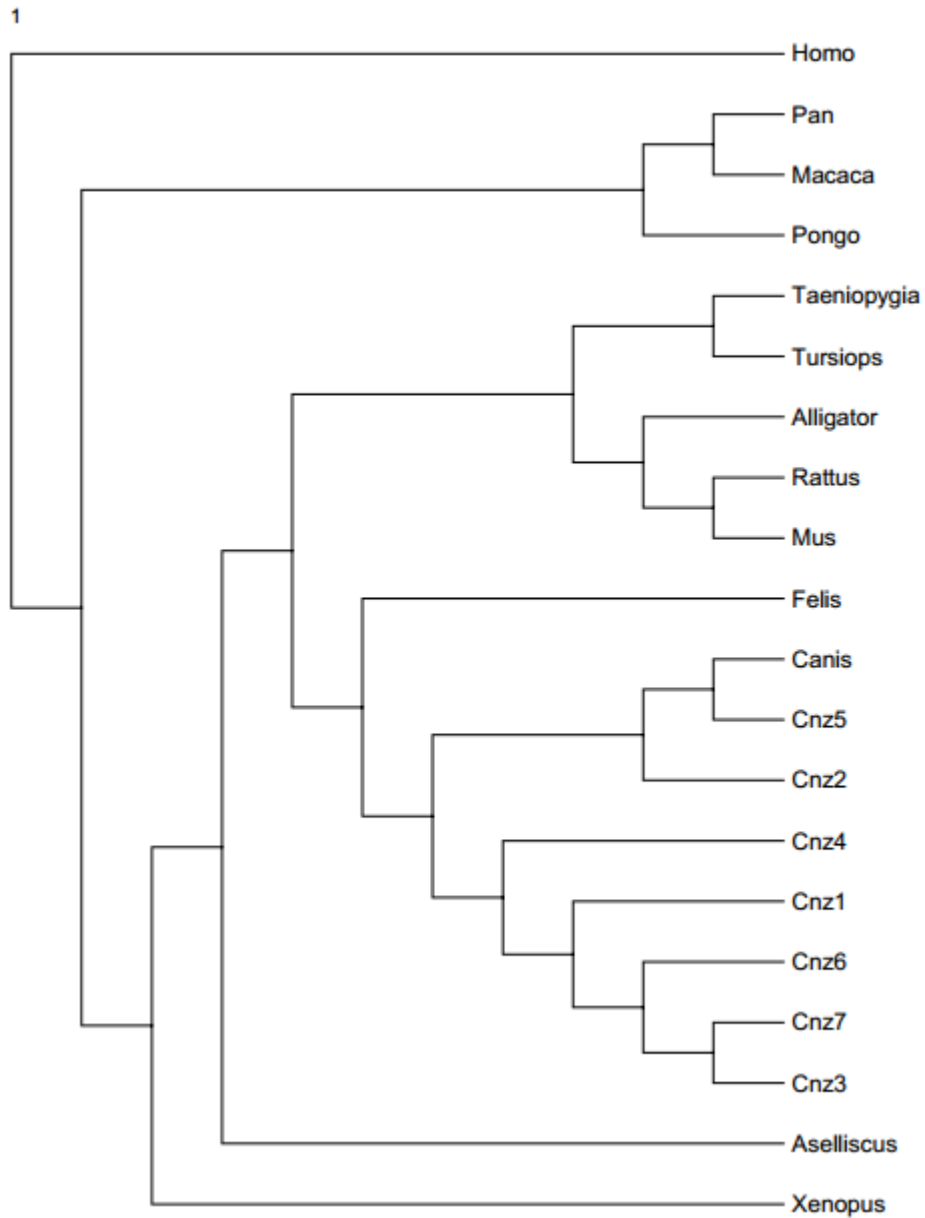


Figura 15. Árbol de distancias basado en el método Neighbor-Joining (NJ) generado a partir de la matriz de distancias de 80 pb del exón 7 del gen *FOXP2* de *M. polyglottos* y otros organismos vertebrados.

En la Figura 14 se muestra el alineamiento generado del exón 7 de *FOXP2* de los organismos antes mencionados con las secuencias del cenzontle. Como se puede observar, la secuencia del exón 7 presenta variaciones entre organismos. Una de estas

variaciones, la que presentaron únicamente los cezontles (G en la posición 23), también se encuentra presente en las secuencias equivalentes del exón 7 del gato, perro, rana africana, murciélago y humano, en la misma posición del alineamiento (Figura 14 A). Al hacer la predicción de aminoácidos del exón 7 en algunos organismos vertebrados, y alinear dichas secuencias, se muestra que esta variación de nucleótido genera un cambio de asparagina a serina que únicamente está presente en humano, carnívoros y en cezontle (Figura 14 B).

Para determinar la similitud entre las secuencias, se generó una matriz de comparación de pares con PAUP4 (Figura 24) y a partir de esta matriz, se realizó el árbol basado en el método Neighbor-Joining (Figura 15). Como se muestra en el árbol, el exón 7 del cezontle 2 y 5 es muy parecido al de perro. Mientras que la secuencia correspondiente a los cezontles 1, 3, 4, 6 y 7 tienen mayor grado de similitud formando una terminal, y esta terminal es similar a la secuencia del exón 7 del gato.

Estos resultados sugieren que una de las dos sustituciones que ocurrieron en el exón 7 del gen *FOXP2* en humanos y que se sabe que a nivel de aminoácidos, una es compartida con carnívoros (N325S), también está presente en *M. polyglottos*.

A) Cnz 1

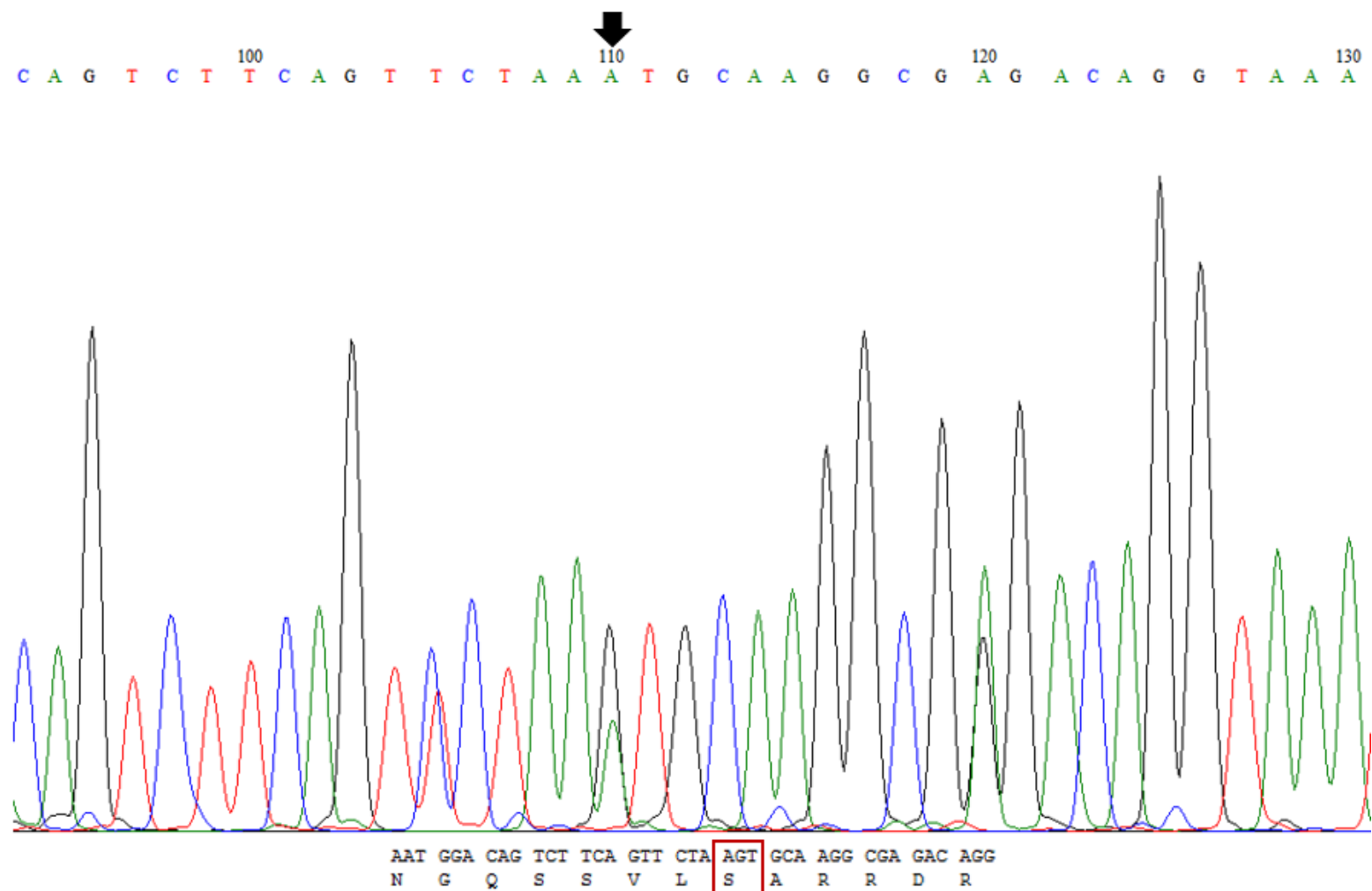
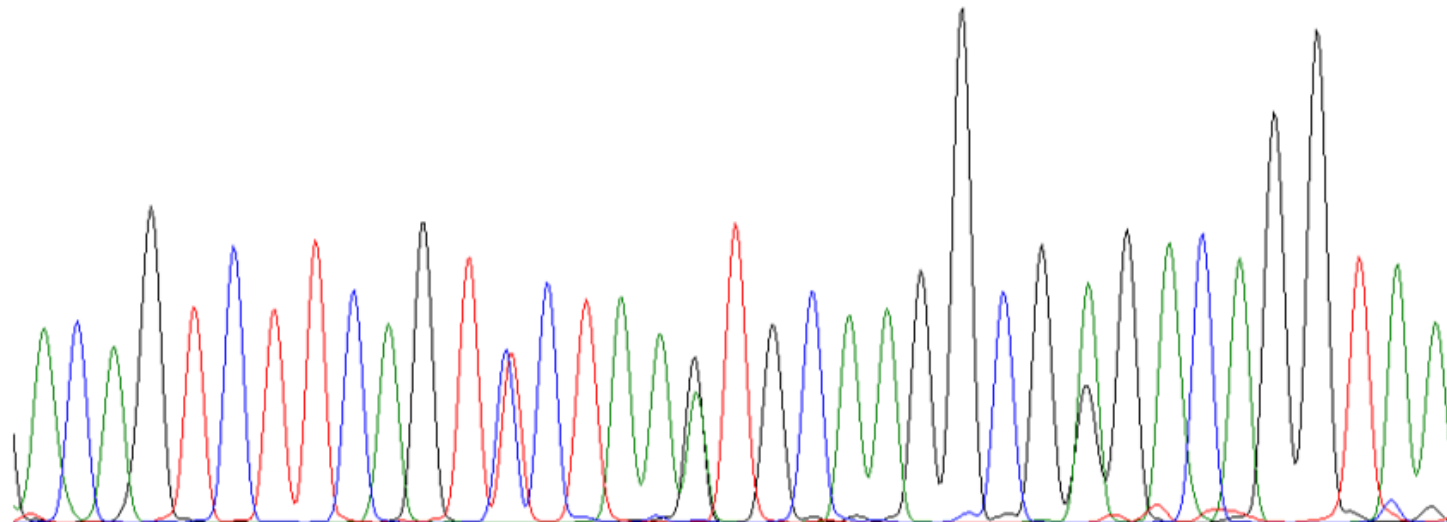


Figura 16. A) Electroferograma de la secuencia parcial del exón 7 de *M. polyglottos* (Cnz 1). La flecha indica la sustitución de nucleótido en la secuencia. **a)** Predicción de aminoácidos de la secuencia del exón 7. El recuadro muestra el cambio de aminoácido que corresponde a la posición 325.

B) Cnz 2

100
110
120
130
A C A G T C T T C A G T C C T A A A T G C A A G G C G A G A C A G G T A A



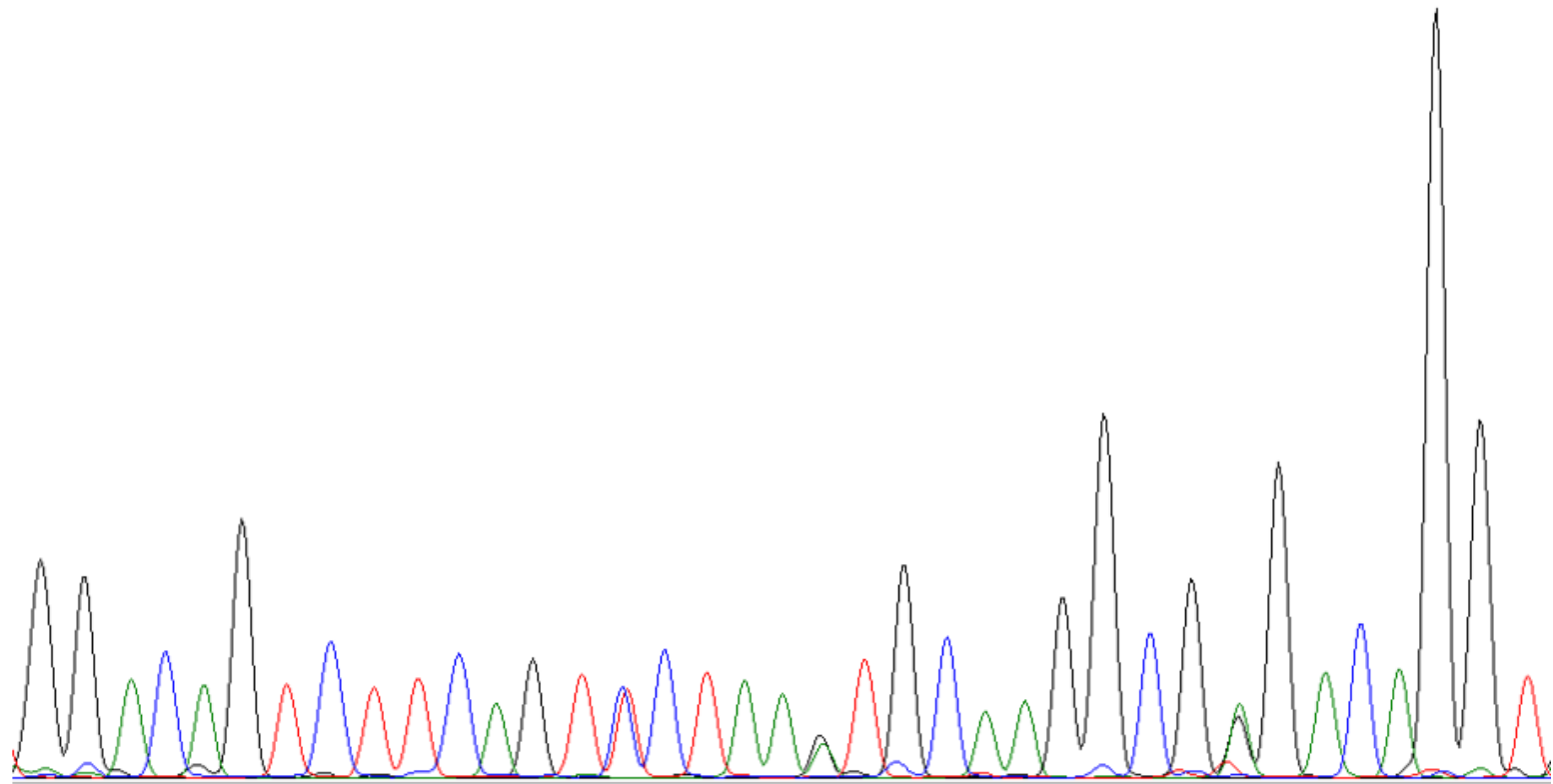
b)

CAT	CTT	TCC	ATA	GTG	AAT	GGA	CAG	TCT	TCA	GTC	CTA	AGT	GCA	AGG	CGA	GAC	AGG
H	L	S	I	V	N	G	Q	S	S	V	L	S	A	R	R	D	R

Figura 17. B) Electroferograma de la secuencia parcial del exón 7 de *M. polyglottos* (Cnz 2). La flecha indica la sustitución de nucleótido en la secuencia. **b)** Predicción de aminoácidos de la secuencia del exón 7. El recuadro muestra el cambio de aminoácido que corresponde a la posición 325.

C) Cnz 3

G G A C A G ¹⁰⁰ T C T T C A G T T C ¹¹⁰ T A A G T G C A A G ¹²⁰ G C G A G A C A G G ¹³⁰ T



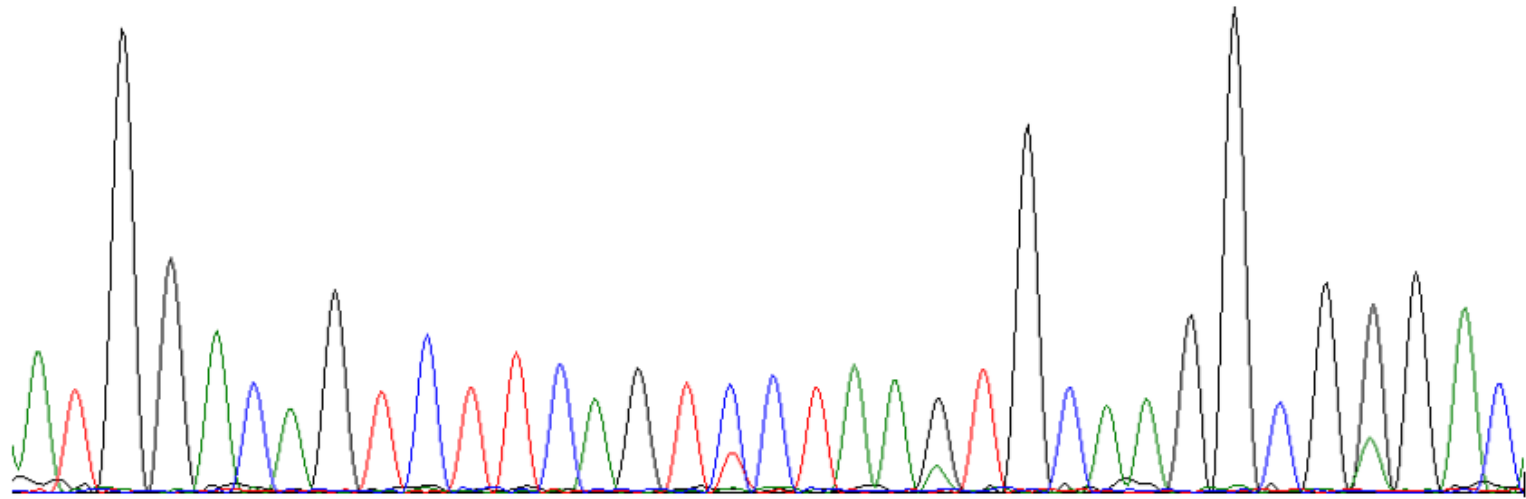
c)

AAT GGA CAG TCT TCA GTT CTA AGT GCA AGG CGA GAC AGG
 N G Q S S V L S A R R D R

Figura 18. C) Electroferograma de la secuencia parcial del exón 7 de *M. polyglottos* (Cnz 3). La flecha indica la sustitución de nucleótido en la secuencia. **c)** Predicción de aminoácidos de la secuencia del exón 7. El recuadro muestra el cambio de aminoácido que corresponde a la posición 325.

D) Cnz 4

A T G G A C A G T ¹⁰⁰ C T T C A G T C C T ¹¹⁰ A A G T G C A A G G ¹²⁰ C G G G A C



d) T TCC AAA GCA TCA CCA CCA ATA ACC CAT CAT TCC ATA GTG AAT GGA CAG TCT TCA GTC CTA AGT GCA AGG CGG GAC AGG TAA ATC TCA TGA GCT TTA TT
S K A S P P I T H H S I V N G Q S S V L S A R R D R * I S * A L X

Figura 19. D) Electroferograma de la secuencia parcial del exón 7 de *M. polyglottos* (Cnz 4). La flecha indica la sustitución de nucleótido en la secuencia. **d)** Predicción de aminoácidos de la secuencia del exón 7. El recuadro muestra el cambio de aminoácido que corresponde a la posición 325.

E) Cnz 5

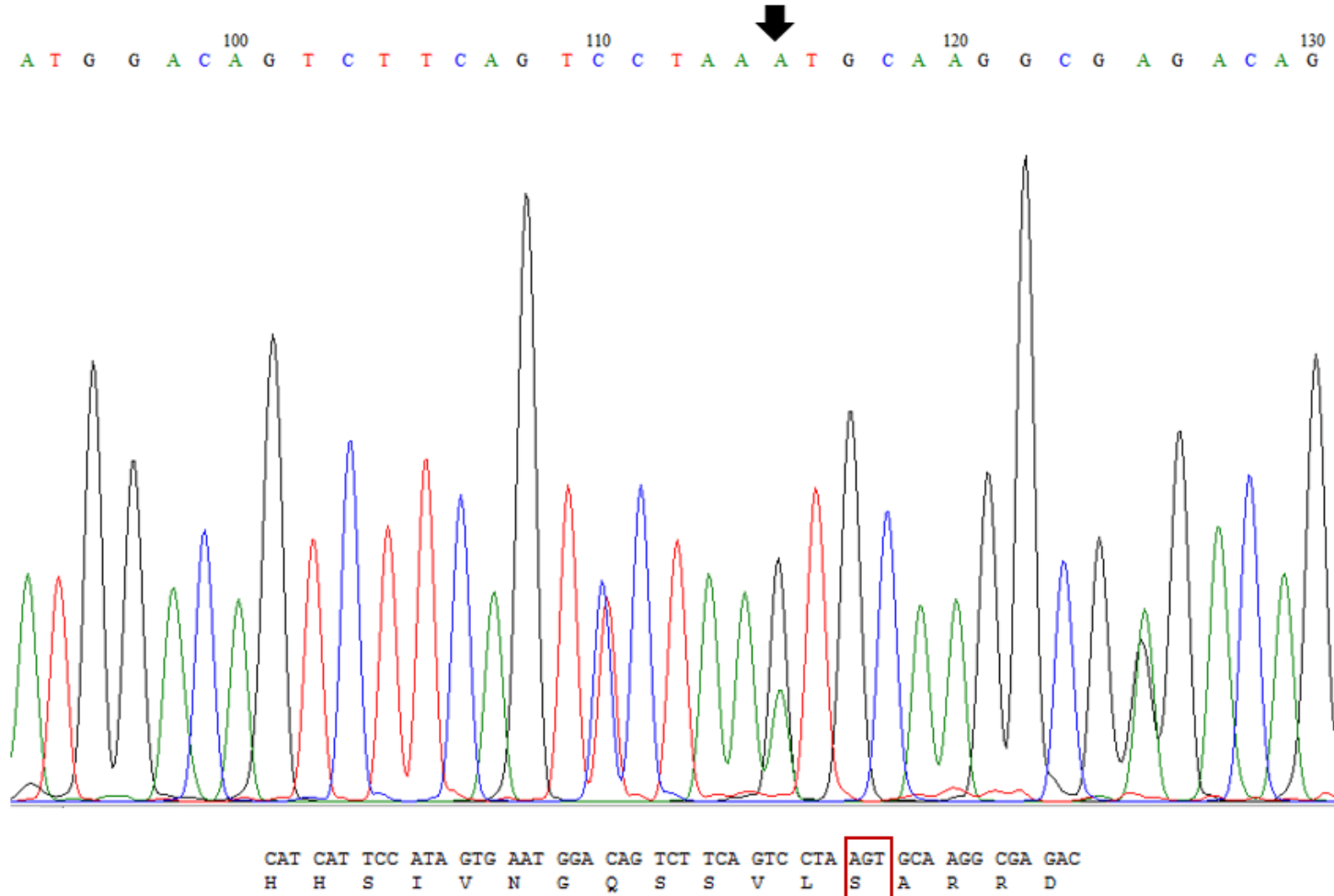


Figura 20. E) Electroferograma de la secuencia parcial del exón 7 de *M. polyglottos* (Cnz 5). La flecha indica la sustitución de nucleótido en la secuencia. **e)** Predicción de aminoácidos de la secuencia del exón 7. El recuadro muestra el cambio de aminoácido que corresponde a la posición 325.

G) Cnz 7

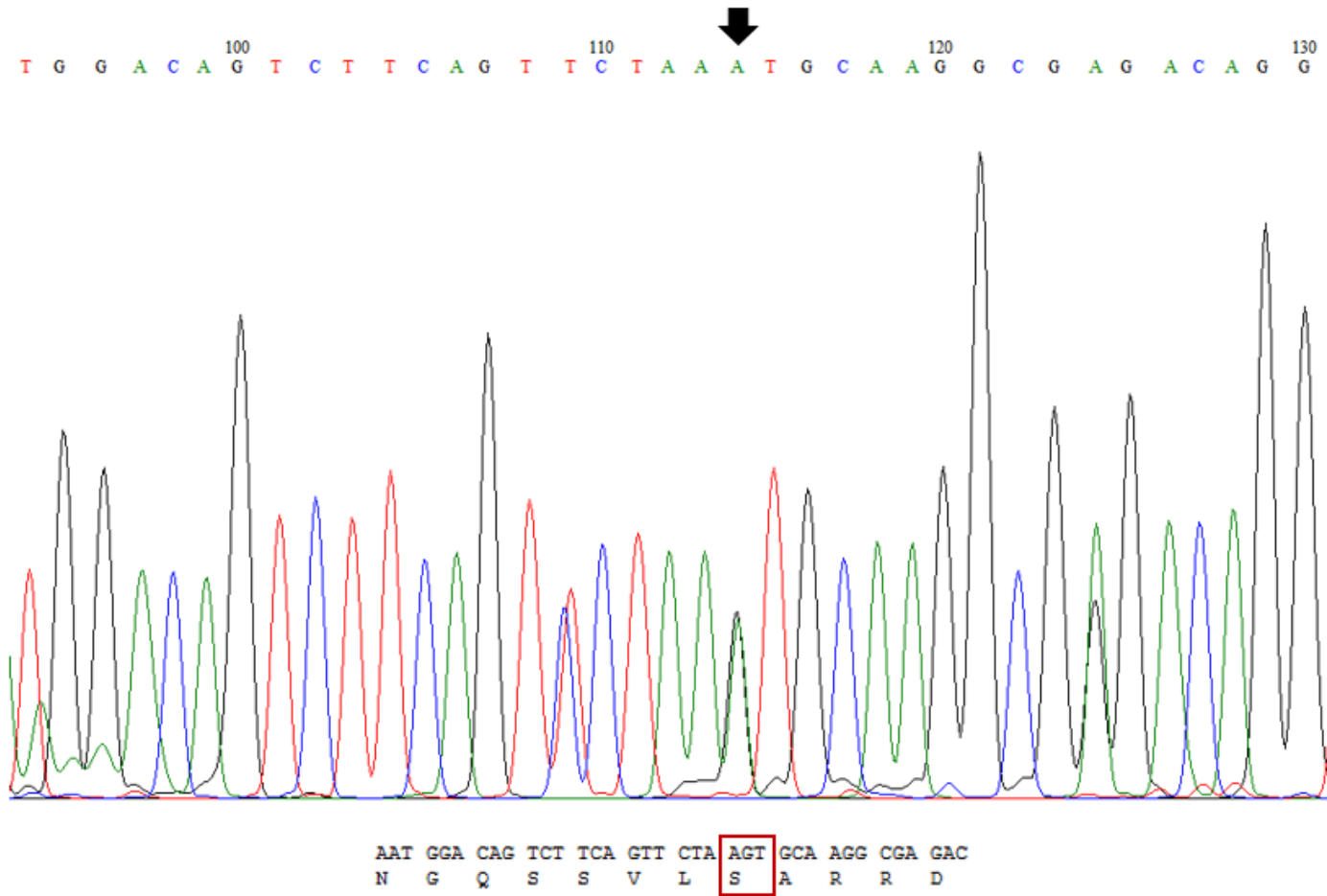


Figura 22. G) Electroferograma de la secuencia parcial del exón 7 de *M. polyglottos* (Cnz 7). La flecha indica la sustitución de nucleótido en la secuencia. **g)** Predicción de aminoácidos de la secuencia del exón 7. El recuadro muestra el cambio de aminoácido que corresponde a la posición 325.

Figura 23. Matriz de comparación de pares de las secuencias parciales del exón 7 de aves cantoras, no cantoras y el control, el delfín con las secuencias de los cenozontles. El cero (0) indica que son secuencias iguales, sin ninguna diferencia.

	<i>Calidris pugnax</i>	<i>Apteryx australis</i>	<i>Phaethon lepturus</i>	<i>Tinamus guttatus</i>	<i>Aquila chrysaetos</i>	<i>Haliaeetus leucocephalus</i>	<i>Buceros rhinoceros</i>	<i>Corvus cornix</i>	<i>Chlamydotis macqueenii</i>	<i>Pterocles gutturalis</i>	<i>Tauraco erythrolophus</i>	<i>Tyto alba</i>	<i>Zonotrichia albicollis</i>	<i>Falco cherrug</i>	<i>Falco peregrinus</i>	<i>Anser cygnoides</i>
<i>Calidris pugnax</i>																
<i>Apteryx australis</i>	0															
<i>Phaethon lepturus</i>	0	0														
<i>Tinamus guttatus</i>	0	0	0													
<i>Aquila chrysaetos</i>	0	0	0	0												
<i>Haliaeetus leucocephalus</i>	0	0	0	0	0											
<i>Buceros rhinoceros</i>	0	0	0	0	0	0										
<i>Corvus cornix</i>	0	0	0	0	0	0	0									
<i>Chlamydotis macqueenii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0								
<i>Pterocles gutturalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
<i>Tauraco erythrolophus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
<i>Tyto alba</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
<i>Zonotrichia albicollis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
<i>Falco cherrug</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
<i>Falco peregrinus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Anser cygnoides</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Taeniopygia guttata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Parus major</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetura pelagica</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Anas platyrhynchos</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Geospiza fortis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Coturnix japonica</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Meleagris gallopavo</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gallus gallus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Melospittacus undulatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ficedula albicollis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Calypte anna</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Archilochus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Passer domesticus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sayornis phoebe</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Tursiops truncatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cnz2</i>	0.05555556	0.05555556	0.05555556	0.05555556	0.05555556	0.05555556	0.05555556	0.05555556	0.05555556	0.05555556	0.05555556	0.05555556	0.05555556	0.055556	0.05555556	0.05555556
<i>Cnz4</i>	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.027778	0.02777778	0.02777778
<i>Cnz5</i>	0.05555556	0.05555556	0.05555556	0.05555556	0.05555556	0.05555556	0.05555556	0.05555556	0.05555556	0.05555556	0.05555556	0.05555556	0.05555556	0.055556	0.05555556	0.05555556
<i>Cnz1</i>	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.027778	0.02777778	0.02777778
<i>Cnz6</i>	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.027778	0.02777778	0.02777778
<i>Cnz7</i>	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.027778	0.02777778	0.02777778
<i>Cnz3</i>	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.02777778	0.027778	0.02777778	0.02777778

Continuación figura 23.

	Taeniopygia guttata	Parus major	Chaetura pelagica	Anas platyrhynchos	Geospiza fortis	Coturnix japonica	Meleagris gallopavo	Gallus gallus	Melospitacus undulatus	Ficedula albicollis	Calypte anna	Archilochus	Passer domesticus	Sayornis phoebe	Tursiops truncatus	Cnz2	Cnz4	Cnz5	Cnz1	Cnz6	Cnz7	Cnz3
<i>Calidris pugnax</i>																						
<i>Apteryx australis</i>																						
<i>Phaethon lepturus</i>																						
<i>Tinamus guttatus</i>																						
<i>Aquila chrysaetos</i>																						
<i>Haliaeetus leucocephalus</i>																						
<i>Buceros rhinoceros</i>																						
<i>Corvus corax</i>																						
<i>Chlamydotes macqueenii</i>																						
<i>Pterocles gutturalis</i>																						
<i>Tauraco erythrolophus</i>																						
<i>Tyto alba</i>																						
<i>Zonotrichia albicollis</i>																						
<i>Falco cherrug</i>																						
<i>Falco peregrinus</i>																						
<i>Anser cygnoides</i>																						
<i>Taeniopygia guttata</i>																						
<i>Parus major</i>	0																					
<i>Chaetura pelagica</i>	0	0																				
<i>Anas platyrhynchos</i>	0	0	0																			
<i>Geospiza fortis</i>	0	0	0	0																		
<i>Coturnix japonica</i>	0	0	0	0	0																	
<i>Meleagris gallopavo</i>	0	0	0	0	0	0																
<i>Gallus gallus</i>	0	0	0	0	0	0	0															
<i>Melospitacus undulatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0														
<i>Ficedula albicollis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0													
<i>Calypte anna</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
<i>Archilochus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
<i>Passer domesticus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0										
<i>Sayornis phoebe</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0									
<i>Tursiops truncatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
Cnz2	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556						
Cnz4	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778					
Cnz5	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0.0555556	0	0.0277778				
Cnz1	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0	0.0277778			
Cnz6	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0	0.0277778		
Cnz7	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0	0	0	
Cnz3	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0.0277778	0	0.0277778	0	0	0

Figura 24. Matriz de comparación de pares de la secuencia parcial del exón 7 de FOXP2 de vertebrados y cenzontles.

	Homo	Pan	Macaca	Pongo	Taeniopygia	Alligator	Felis	Canis	Xenopus	Aselliscus	Tursiops	Rattus	Mus	Cnz4	Cnz5	Cnz2	Cnz1	Cnz6	Cnz7	Cnz3	
Homo																					
Pan	0.0285714																				
Macaca	0.0285714	0																			
Pongo	0.0285714	0	0																		
Taeniopygia	0.0571429	0.0285714	0.0285714	0.0285714																	
Alligator	0.0857143	0.0571429	0.0571429	0.0571429	0.02857143																
Felis	0.0571429	0.0857143	0.0857143	0.0857143	0.05714286	0.0857143															
Canis	0.0571429	0.0857143	0.0857143	0.0857143	0.05714286	0.0857143	0.0571429														
Xenopus	0.1428571	0.1714286	0.1714286	0.1714286	0.2	0.1714286	0.2	0.1714286													
Aselliscus	0.0571429	0.0857143	0.0857143	0.0857143	0.05714286	0.0285714	0.0571429	0.0571429	0.1428571												
Tursiops	0.0571429	0.0285714	0.0285714	0.0285714	0	0.0285714	0.0571429	0.0571429	0.2	0.0571429											
Rattus	0.1714286	0.1428571	0.1428571	0.1428571	0.11428571	0.0857143	0.1142857	0.1714286	0.2571429	0.1142857	0.1142857										
Mus	0.1428571	0.1142857	0.1142857	0.1142857	0.08571429	0.0571429	0.0857143	0.1428571	0.2285714	0.0857143	0.0857143	0.0857143									
Cnz4	0.0285714	0.0571429	0.0571429	0.0571429	0.02857143	0.0571429	0.0285714	0.0285714	0.1714286	0.0285714	0.0285714	0.1428571	0.1142857								
Cnz5	0.0571429	0.0857143	0.0857143	0.0857143	0.05714286	0.0857143	0.0571429	0	0.1714286	0.0571429	0.0571429	0.1714286	0.1428571	0.0285714							
Cnz2	0.0571429	0.0857143	0.0857143	0.0857143	0.05714286	0.0857143	0.0571429	0	0.1714286	0.0571429	0.0571429	0.1714286	0.1428571	0.0285714	0						
Cnz1	0.0285714	0.0571429	0.0571429	0.0571429	0.02857143	0.0571429	0.0285714	0.0285714	0.1714286	0.0285714	0.0285714	0.1428571	0.1142857	0	0.0285714	0.0285714					
Cnz6	0.0285714	0.0571429	0.0571429	0.0571429	0.02857143	0.0571429	0.0285714	0.0285714	0.1714286	0.0285714	0.0285714	0.1428571	0.1142857	0	0.0285714	0.0285714	0				
Cnz7	0.0285714	0.0571429	0.0571429	0.0571429	0.02857143	0.0571429	0.0285714	0.0285714	0.1714286	0.0285714	0.0285714	0.1428571	0.1142857	0	0.0285714	0.0285714	0	0			
Cnz3	0.0285714	0.0571429	0.0571429	0.0571429	0.02857143	0.0571429	0.0285714	0.0285714	0.1714286	0.0285714	0.0285714	0.1428571	0.1142857	0	0.0285714	0.0285714	0	0	0		

7. DISCUSIÓN

En cuanto a la obtención del ADN a partir de plumas de muda, el tiempo de la degradación con proteinasa K y sales es de suma importancia ya que degrada proteínas de la estructura del ápice, como la queratina (Pabisch et al., 2010), para liberar el contenido celular. Por ello, tras pruebas anteriores, la degradación del cálamo se realizó a una duración final de diez horas, ya que en pruebas previas, la concentración de ADN obtenido resultaron en concentraciones negativas de acuerdo a las lecturas en el espectrofotómetro (datos no mostrados). También, al incrementar el número de ejemplares de ápices para la extracción, la concentración de ADN era mayor. En los protocolos se manejaba un ápice por reacción, sin embargo, en este trabajo se emplearon dos ápices por reacción a fin de obtener mayor concentración de ADN. A partir de esta modificación, las lecturas de las concentraciones de ADN fueron mayores en comparación a aquellas en las que se empleaba un solo ápice.

A pesar de que la cantidad y la calidad del ADN obtenido de muestras de plumas es menor en comparación al que se obtiene de tejido o sangre (López et al., 2011), la cantidad obtenida fue suficiente para realizar las reacciones de PCR necesarias para contestar los objetivos de esta tesis.

Hasta la fecha, la versatilidad del canto de los cenizotes ha sido abordada en cuanto a la medición del repertorio de cantos ejecutados y su comportamiento asociado (Derrickson, 1988). Actualmente, no hay estudios o evidencia que relacionen la variedad de los cantos con algún componente genético, neuronal y molecular, específicamente, si hay alguna mutación relacionada con esta capacidad.

En este trabajo, se abordó si había variedad nucleotídica en el exón 7 del factor de transcripción FOXP2 en *M. polyglottos*, ya que en análisis previos, se ha visto que en este exón se localizan los nucleótidos responsables de generar las dos mutaciones vinculadas al desarrollo del lenguaje en humanos, la Asn 303 y la Ser 325. Nuestros resultados muestran que, a nivel de nucleótidos y en comparación

con aves con y sin la capacidad de aprender vocalmente y otros vertebrados, *M. polyglottos* presenta variación en dos bases, C en lugar de T en la posición 18 y G en lugar de A en la posición 23. A excepción de estas dos sustituciones, la secuencia parcial del exón 7 de FOXP2 en *M. polyglottos* está conservada, como se había reportado previamente. Al realizar la predicción de aminoácidos, se observa que una de estas sustituciones (la G en lugar de A), genera un aminoácido diferente. Al alinear la secuencia parcial de aminoácidos de otros organismos y los cezontles, observamos que dicho cambio de aminoácido corresponde a uno de las sustituciones clave durante la evolución de FOXP2, la serina en la posición 325, la cual se encuentra únicamente en carnívoros y humanos. Esto es relevante ya que ninguna otra secuencia de FOXP2 de ave, secuenciada hasta la fecha, presenta esta variación.

De la misma forma, Li y colaboradores (2007), estudiaron la variación de la secuencia de FOXP2 y si esta tenía relación con la capacidad de aprender vocalmente en murciélagos ecolocalizadores, ya que las señales de ecolocalización, además de ser diversas y tener información tonal compleja, pueden modificar la respuesta de reacción de sus objetivos. Se observó que los murciélagos ecolocalizadores compartían la variación Ser 325 al igual que dos carnívoros secuenciados. Sin embargo, los autores mencionan que la ausencia de este aminoácido en otros linajes de murciélago, junto con su presencia en los carnívoros, sugieren que es poco probable que se asocie al aprendizaje vocal (Li et al., 2007) y se desconoce su relación directa con la complejidad de las vocalizaciones.

Este cambio de Asn a Ser, de acuerdo a un modelado proteico *In silico*, predice que la sustitución N325S podría ser un blanco de fosforilación para proteínas cinasas C (Sigrid, 2008). Esta sustitución, se produjo de manera independiente en carnívoros y algunos murciélagos, sugiriendo que este cambio no es suficiente para la complejidad funcional de FOXP2 humana sino que se requiere también, la otra sustitución que hasta el momento es única en humanos (T303N) (Nudel y Newbury, 2013).

A pesar de la falta de evidencia, por si sola, la variación N325S en la proteína puede proporcionar una ventaja evolutiva, ya que por el grupo hidroxilo que posee la serina en comparación al grupo amida que contiene la asparagina, podría conferir en menor o mayor proporción, cambios estructurales en la proteína, que afecten el plegado de la proteína y por ende, su interacción con otras proteínas.

Por otra parte, la evidencia mostrada en el trabajo de Enard y colaboradores (2009), mostraron que la introducción de las dos sustituciones de aminoácidos de FOXP2 presentes en humanos en embriones de ratón, cambió morfológicamente las neuronas de la espina media, incrementando la longitud de las dendritas del cuerpo estriado (Enard et al., 2009). Esto es importante ya que, de acuerdo con los autores, impacta en los circuitos cortico ganglio basales, circuito relevante para el habla y el lenguaje en humanos y aves cantoras (Enard et al., 2009). Por lo que, estas sustituciones, generaron consecuencias funcionales en FOXP2 involucradas en la expansión de circuitos que pueden haber contribuido a la complejidad en el habla.

De manera similar, un estudio realizado en aves oscinas mostró que el volumen del núcleo vocal HVC y el repertorio de cantos se correlacionaba positivamente (Devoogd et al., 1993). También se observó una fuerte correlación entre el volumen de HVC y el área X, a lo cual, los autores sugieren que la ampliación de un núcleo se asocia a la expansión del otro. Sin embargo, a pesar de que el área X es necesaria para el sistema del aprendizaje y ejecución del canto, el área HVC es la única asociada a la complejidad del canto (Devoogd et al., 1993). En este estudio, *M. polyglottos* junto con *T. rufum*, son las aves con mayor repertorio, con una mayor complejidad de cantos y por lo tanto, presentan un mayor volumen del núcleo HVC.

La adquisición y la extensión de los circuitos neuronales que hacen posible el control voluntario de las vocalizaciones, es una marca distintiva en la evolución del habla humano (Enard et al., 2009). Esta expansión en esta capacidad del habla, está asociada a las dos variaciones nucleotídicas en la secuencia del exón 7 de FOXP2 en humanos, como se mostró con el ratón con la proteína FOXP2 humanizada. Una de estas sustituciones, la Ser 325 que está presente en humanos, carnívoros y murciélagos, se ha encontrado en cenizos. De manera similar a lo que ocurre en

murciélagos ecolocalizadores y *M. polyglottos*, tienen la capacidad de ejecutar ecolocalizaciones y cantos complejos, respectivamente y ambos organismos, presentan esta variación. Por lo que se sugiere que esta variación puede alterar la dinámica de FOXP2 con otras proteínas que afectan de alguna manera, los circuitos de núcleos cerebrales implicados en la ejecución de cantos.

Este trabajo se abordó el primer análisis de una región nucleotídica parcial de FOXP2 en aves mimidas, entre las que se encuentra *T. rufum* y *D. carolinensis*. Queda por determinar si hay otras variaciones en la secuencia de FOXP2 de *M. polyglottos* que pudieran ser cruciales en el funcionamiento de la proteína o que le confieran alguna ventaja, por lo cual sería interesante obtener la secuencia completa del gen FOXP2 de *M. polyglottos* para determinar si hay alguna otra variación que, probablemente, pudiera ser clave para la habilidad de aprender y ejecutar cientos de cantos. También queda por abordar los niveles de expresión en tejido cerebral, particularmente en el área X y el área HVC, durante el desarrollo y durante diferentes etapas anuales de *M. polyglottos*, ya que se mencionó anteriormente, continuamente aprende y modifica cantos y además, dependiendo la estación del año, cambia el comportamiento del canto de acuerdo a las circunstancias que afronta el individuo, como la defensa del territorio, el cortejo o el canto nocturno.

Así mismo, falta analizar la secuencia en individuos de vida libre, ya que los analizados en esta tesis, corresponden a cenizotes domesticados. Se requiere de generar más información sobre el organismo para poder explicar las posibles variables que se presentaran en el estudio ya que en los resultados del electroferograma, se puede apreciar que en el nucleótido responsable de generar serina en lugar de asparagina, aminoácido clave a nivel evolutivo, la lectura en el pico entre un nucleótido y otro (A y G) en algunos organismos analizados están próximos. Esto podría explicarse a la heterocigosidad de FOXP2. Sin embargo, no se puede llegar a una conclusión clara debido a la ausencia de datos que permitan explicar esto.

8. CONCLUSIONES

Las plumas de muda son una excelente alternativa no invasiva, como fuente de ADN genómico para estudios genéticos en cenizotes.

El cenizote *M. polyglottos*, presenta dos variaciones nucleotídicas (una sinónima y otra no sinónima) en la secuencia parcial del exón 7 del gen *FOXP2*.

La variación no sinónima del exón 7 de *M. polyglottos* no está presente en las secuencias de aves cantoras y no cantoras secuenciadas hasta la fecha.

La secuencia del exón 7 del cenizote tiene una mayor similitud a carnívoros como el gato (*F. catus*), tejón porcino (*Arctonyx collaris*), entre otros y al humano (*H. sapiens*).

9. BIBLIOGRAFÍA

- Bello, N., Francino, O., Sánchez, A., 2001. Isolation of Genomic DNA from Feathers. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13, 162–164. doi:10.1177/104063870101300212
- Benítez-Burraco, A., 2008. FOXP2 y la biología molecular del lenguaje: nuevas evidencias. I. Aspectos fenotípicos y modelos animales. *Rev. Neurol.* 46, 289–298.
- Bruce, H.A., Margolis, R.L., 2002. FOXP2: novel exons, splice variants, and CAG repeat length stability. *Hum. Genet.* 111, 136–144. doi:10.1007/s00439-002-0768-5
- Chiu, Y.-C., Li, M.-Y., Liu, Y.-H., Ding, J.-Y., Yu, J.-Y., Wang, T.-W., 2014. Foxp2 regulates neuronal differentiation and neuronal subtype specification. *Dev. Neurobiol.* 74, 723–738. doi:10.1002/dneu.22166
- Collier, K., Bickel, B., van Schaik, C.P., Manser, M.B., Townsend, S.W., 2014. Language evolution: syntax before phonology? *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 281. doi:10.1098/rspb.2014.0263
- Condro, M.C., White, S.A., 2014a. Distribution of language-related Cntnap2 protein in neural circuits critical for vocal learning: Cntnap2 protein in songbird brain. *J. Comp. Neurol.* 522, 169–185. doi:10.1002/cne.23394
- Condro, M.C., White, S.A., 2014b. Recent Advances in the Genetics of Vocal Learning. *Comp. Cogn. Behav. Rev.* 9, 75–98. doi:10.3819/ccbr.2014.90003
- Cruces Carbajal, R., 2006. Lo que México aportó al mundo. LD Books.
- Deacon, T.W., 2010. A role for relaxed selection in the evolution of the language capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 9000–9006. doi:10.1073/pnas.0914624107
- Derrickson, K.C., 1988. Variation in Repertoire Presentation in Northern Mockingbirds. *The Condor* 90, 592–606. doi:10.2307/1368348
- DERRICKSON, K.C., 1987. Behavioral Correlates of Song Types of the Northern Mockingbird (*Mimus polyglottos*). *Ethology* 74, 21–32. doi:10.1111/j.1439-0310.1987.tb00918.x

- Devoogd, T.J., Krebs, J.R., Healy, S.D., Purvis, A., 1993. Relations between Song Repertoire Size and the Volume of Brain Nuclei Related to Song: Comparative Evolutionary Analyses amongst Oscine Birds. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 254, 75. doi:10.1098/rspb.1993.0129
- Diéguez-Vide, F., Peña-Casanova, J., 2012. Cerebro y lenguaje, sintomatología neurolingüística. *Medica Panamericana*.
- Enard, W., Gehre, S., Hammerschmidt, K., Hölter, S.M., Blass, T., Somel, M., Brückner, M.K., Schreiweis, C., Winter, C., Sohr, R., Becker, L., Wiebe, V., Nickel, B., Giger, T., Müller, U., Groszer, M., Adler, T., Aguilar, A., Bolle, I., Calzada-Wack, J., Dalke, C., Ehrhardt, N., Favor, J., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Hans, W., Hölzlwimmer, G., Javaheri, A., Kalaydjiev, S., Kallnik, M., Kling, E., Kunder, S., Moßbrugger, I., Naton, B., Racz, I., Rathkolb, B., Rozman, J., Schrewe, A., Busch, D.H., Graw, J., Ivandic, B., Klingenspor, M., Klopstock, T., Ollert, M., Quintanilla-Martinez, L., Schulz, H., Wolf, E., Wurst, W., Zimmer, A., Fisher, S.E., Morgenstern, R., Arendt, T., Hrabé de Angelis, M., Fischer, J., Schwarz, J., Pääbo, S., 2009. A Humanized Version of Foxp2 Affects Cortico-Basal Ganglia Circuits in Mice. *Cell* 137, 961–971. doi:10.1016/j.cell.2009.03.041
- Enard, W., Przeworski, M., Fisher, S.E., Lai, C.S.L., Wiebe, V., Kitano, T., Monaco, A.P., Paabo, S., 2002. Molecular evolution of FOXP2, a gene involved in speech and language. *Nature* 418, 869–872. doi:10.1038/nature01025
- Farnsworth, G., Londono, G.A., Ungvari Martin, J., Derrickson, K.C., Breitwisch, R., 2011. Northern Mockingbird (*Mimus polyglottos*), *The Birds of North America Online*.
- Fisher, S.E., Scharff, C., 2009. FOXP2 as a molecular window into speech and language. *Trends Genet.* 25, 166–177. doi:10.1016/j.tig.2009.03.002
- Fisher, S.E., Vargha-Khadem, F., Watkins, K.E., Monaco, A.P., Pembrey, M.E., 1998. Localisation of a gene implicated in a severe speech and language disorder. *Nat Genet* 18, 168–170. doi:10.1038/ng0298-168

- Fitch, W.T., 2012. Evolutionary Developmental Biology and Human Language Evolution: Constraints on Adaptation. *Evol. Biol.* 39, 613–637. doi:10.1007/s11692-012-9162-y
- Graham, S.A., Fisher, S.E., 2013. Decoding the genetics of speech and language. *Neurogenetics* 23, 43–51. doi:10.1016/j.conb.2012.11.006
- Haesler, S., Wada, K., Nshdejan, A., Morrissey, E.E., Lints, T., Jarvis, E.D., Scharff, C., 2004. FoxP2 Expression in Avian Vocal Learners and Non-Learners. *J. Neurosci.* 24, 3164–3175.
- Harvey, M.G., Bonter, D.N., Stenzler, L.M., Lovette, I.J., 2006. A comparison of plucked feathers versus blood samples as DNA sources for molecular sexing. *J. Field Ornithol.* 77, 136–140. doi:10.1111/j.1557-9263.2006.00033.x
- Hilliard, A.T., Miller, J.E., Fraley, E.R., Horvath, S., White, S.A., 2012. Molecular Microcircuitry Underlies Functional Specification in a Basal Ganglia Circuit Dedicated to Vocal Learning. *Neuron* 73, 537–552. doi:10.1016/j.neuron.2012.01.005
- Hsieh, H.-M., Chiang, H.-L., Tsai, L.-C., Lai, S.-Y., Huang, N.-E., Linacre, A., Lee, J.C.-I., 2001. Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals. *Forensic Sci. Int.* 122, 7–18. doi:10.1016/S0379-0738(01)00403-0
- Instituto Nacional de Ecología, 1997. Guía de aves canoras y de ornato. CONABIO.
- Jarvis, E.D., 2007. Neural systems for vocal learning in birds and humans: a synopsis. *J. Ornithol.* 148, 35–44. doi:10.1007/s10336-007-0243-0
- JARVIS, E.D., 2004. Learned Birdsong and the Neurobiology of Human Language. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1016, 749–777. doi:10.1196/annals.1298.038
- Lai, C.S.L., Fisher, S.E., Hurst, J.A., Vargha-Khadem, F., Monaco, A.P., 2001. A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. *Nature* 413, 519–523. doi:10.1038/35097076
- Li, G., Wang, J., Rossiter, S.J., Jones, G., Zhang, S., 2007. Accelerated FoxP2 Evolution in Echolocating Bats. *PLoS ONE* 2, e900. doi:10.1371/journal.pone.0000900
- Li, S., Weidenfeld, J., Morrissey, E.E., 2004. Transcriptional and DNA Binding Activity of the Foxp1/2/4 Family Is Modulated by Heterotypic and Homotypic Protein

- Interactions. *Mol. Cell. Biol.* 24, 809–822. doi:10.1128/MCB.24.2.809-822.2004
- López, D.M., Bustamante, B.E.H., López, G.A., Gartner, G.J.C.-V., Páez, F.A.R., 2011. Determinación del sexo en aves de la familia furnariidae a través de técnicas moleculares.
- Marcus, G., 2004. Behold the Talking Chimp. *The Scientist*.
- MARIN, G., CARVAJAL, Y., GUILARTE, E., 2009. MUDA Y REPRODUCCION EN AVES PASSERIFORMES EN UN ECOTONO BOSQUE PALUSTRE-BOSQUE BASIMONTANO NEOTROPICAL. *SABER Rev. Multidiscip. Cons. Investig. Univ. Oriente* 21, 244–249.
- Martín Municio, A., 1984. *Biología del habla y del lenguaje*.
- Michael J. Boughey, Thompson, N.S., 1976. Species Specificity and Individual Variation in the Songs of the Brown Thrasher (*Toxostoma rufum*) and Catbird (*Dumetella carolinensis*). *Behaviour* 57, 64–90.
- Murugan, M., Harward, S., Scharff, C., Mooney, R., 2013. Diminished FoxP2 Levels Affect Dopaminergic Modulation of Corticostriatal Signaling Important to Song Variability. *Neuron* 80, 1464–1476. doi:10.1016/j.neuron.2013.09.021
- Nelson, R., 2014. *Common Birds of North America: An Illustrated Guide to 50 of the Most Common North American Birds*. MaxHouse.
- Nottebohm, F., Liu, W.-C., 2010a. The origins of vocal learning: New sounds, new circuits, new cells. *Brain Lang.* 115, 3–17. doi:10.1016/j.bandl.2010.05.002
- Nudel, R., Newbury, D.F., 2013. FOXP2: FOXP2. *Wiley Interdiscip. Rev. Cogn. Sci.* 4, 547–560. doi:10.1002/wcs.1247
- Pabisch, S., Puchegger, S., Kirchner, H.O.K., Weiss, I.M., Peterlik, H., 2010. Keratin homogeneity in the tail feathers of *Pavo cristatus* and *Pavo cristatus mut. alba*. *J. Struct. Biol.* 172, 270–275. doi:10.1016/j.jsb.2010.07.003
- Parson, W., Pegoraro, K., Niederstätter, H., Föger, M., Steinlechner, M., 2000. Species identification by means of the cytochrome b gene. *Int. J. Legal Med.* 114, 23–28. doi:10.1007/s004140000134

- Petkov, C.I., Jarvis, E., 2012. Birds, primates, and spoken language origins: behavioral phenotypes and neurobiological substrates. *Front. Evol. Neurosci.* 4, 12. doi:10.3389/fnevo.2012.00012
- Prager, R., Stoneking, M., 1999. Extracting high-quality DNA from shed reptile skins: a simplified method. *Biotechniques* 26, 1052–1054.
- Scharff, C., Haesler, S., 2005. An evolutionary perspective on FoxP2: strictly for the birds? *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 694–703. doi:10.1016/j.conb.2005.10.004
- Senar, J.C., 2004. Mucho más que plumas. *Monogr. Mus. Ciencias Nat.* 2.
- Shu, W., Cho, J.Y., Jiang, Y., Zhang, M., Weisz, D., Elder, G.A., Schmeidler, J., De Gasperi, R., Sosa, M.A.G., Rabidou, D., Santucci, A.C., Perl, D., Morrissey, E., Buxbaum, J.D., 2005. Altered ultrasonic vocalization in mice with a disruption in the Foxp2 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9643–9648. doi:10.1073/pnas.0503739102
- Sigrid, M.S., 2008. FOXP2 and the evolution of human speech and language, in: *Ultra-High Throughput Sequencing Analysis of FOXP2 Occupancy in the Human Genome*. UMI, p. 114.
- Sin, C., Li, H., Crawford, D.A., 2015. Transcriptional Regulation by FOXP1, FOXP2, and FOXP4 Dimerization. *J. Mol. Neurosci.* 55, 437–448. doi:10.1007/s12031-014-0359-7
- Spiteri, E., Konopka, G., Coppola, G., Bomar, J., Oldham, M., Ou, J., Vernes, S.C., Fisher, S.E., Ren, B., Geschwind, D.H., 2007. Identification of the Transcriptional Targets of FOXP2, a Gene Linked to Speech and Language, in Developing Human Brain. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 1144–1157.
- Suzuki, T.N., Wheatcroft, D., Griesser, M., 2016. Experimental evidence for compositional syntax in bird calls. *Nat Commun* 7.
- Teramitsu, I., Kudo, L.C., London, S.E., Geschwind, D.H., White, S.A., 2004. Parallel FoxP1 and FoxP2 Expression in Songbird and Human Brain Predicts Functional Interaction. *J. Neurosci.* 24, 3152–3163. doi:10.1523/JNEUROSCI.5589-03.2004

- Thompson, N.S., Abbey, E., Wapner, J., Logan, C., Merritt, P.G., Pooth, A., 2000. Variation in the bout structure of Northern Mockingbird (*Mimus polyglottus*) singing. *Bird Behav.* 13, 93–98.
- Tolosa Montero, M.A., 2009. Gen FOXP2: Esquizofrenia, alucinaciones auditivas y lenguaje. Universitat de València.
- Velázquez, L.P.A., Martínez, M. del C.A., Romero, A.C., 2014. Extracción y purificación de ADN, in: HERRAMIENTAS MOLECULARES APLICADAS EN ECOLOGÍA: ASPECTOS TEÓRICOS Y PRÁCTICOS. México, p. 274.
- Webb, D.M., Zhang, J., 2005. FoxP2 in Song-Learning Birds and Vocal-Learning Mammals. *J. Hered.* 96, 212–216. doi:10.1093/jhered/esi025
- White, S.A., Fisher, S.E., Geschwind, D.H., Scharff, C., Holy, T.E., 2006. Singing Mice, Songbirds, and More: Models for FOXP2 Function and Dysfunction in Human Speech and Language. *J. Neurosci.* 26, 10376–10379. doi:10.1523/JNEUROSCI.3379-06.2006
- Wilbrecht, L., Nottebohm, F., 2003. Vocal learning in birds and humans. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 9, 135–148. doi:10.1002/mrdd.10073
- Wohlgemuth, S., Adam, I., Scharff, C., 2014. FoxP2 in songbirds. *SI Commun. Lang.* 28, 86–93. doi:10.1016/j.conb.2014.06.009
- Zhang, J., Webb, D.M., Podlaha, O., 2002. Accelerated Protein Evolution and Origins of Human-Specific Features: FOXP2 as an Example. *Genetics* 162, 1825–1835.