

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**“ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA
EXTRACCIÓN DE ADN DE MUESTRAS FECALES DE
LOBO DE PÁRAMO (*Lycalopex culpaeus*)”**

Previa la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

MILTON GIOVANNI QUINGA SOCASI

SANGOLQUÍ, 24 de Septiembre de 2012

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Milton Giovanni Quinga Socasi

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Grace Tatiana Páez Barrera

DELEGADO UNIDAD DE ADMISIÓN Y REGISTRO

Abg. Carlos Orozco Bravo MSc.

Lugar y Fecha: Sangolquí, 24 de Septiembre de 2012

CERTIFICACIÓN

Dra. María Augusta Chávez

Dr. Freddy Proaño

Certifican:

Que el trabajo titulado “ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE MUESTRAS FECALES DE LOBO DE PÁRAMO (*Lycalopex culpaeus*)”, realizado por MILTON GIOVANNI QUINGA SOCASI, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple las normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a la relevancia académica y científica del trabajo presentado recomiendan su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a MILTON GIOVANNI QUINGA SOCASI que lo entregue a ING. GRACE TATIANA PAEZ BARRERA, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, 24 de Septiembre de 2012.

Dra. María Augusta Chávez

DIRECTORA

Dr. Freddy Proaño

CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, Milton Giovanni Quinga Socasi

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE MUESTRAS FECALES DE LOBO DE PÁRAMO (*Lycalopex culpaeus*)”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 24 de Septiembre de 2012.

Milton Giovanni Quinga Socasi

AUTORIZACIÓN

Yo, Milton Giovanni Quinga Socasi

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución el trabajo “ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE MUESTRAS FECALES DE LOBO DE PÁRAMO (*Lycalopex culpaeus*)”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 24 de Septiembre de 2012.

Milton Giovanni Quinga Socasi

DEDICATORIA

A Dios, por mostrarme que pese a los inconvenientes que se presentan en la vida, siempre hay una luz eternal que vela por las personas que tienen fe.

A mis padres Alfonso y Blanca, por su apoyo incondicional, amor y consejos a lo largo de mi vida. Sus enseñanzas me han convertido en una mejor persona y hoy puedo decir que esta meta alcanzada es sin duda un triunfo para ustedes.

A mis hermanos Santiago, Francisco, Moisés, Mayra y a mis familiares, por los momentos compartidos y la confianza depositada en mí.

Milton Quinga

AGRADECIMIENTOS

A la Escuela Politécnica del Ejército (ESPE) que financió este proyecto mediante los PROYECTOS DE INICIACIÓN CIENTÍFICA 2011.

A la Dr. María Augusta Chávez, por la confianza depositada en mí, por ser mi directora de tesis y haberme brindado la posibilidad de trabajar con técnicas de biología molecular que es un área que me apasiona.

A la Dr. María Claudia Segovia, por su tiempo, paciencia y apoyo científico en la realización de este proyecto de investigación.

Al Dr. Freddy Proaño, por ser mi codirector de tesis y por el tiempo invertido en la realización de la investigación.

Al Dr. Ricardo Oliva, por su apoyo científico en la realización del proyecto.

Al Dr. Marcelo Grijalva, Director del Laboratorio de Biotecnología Humana de la ESPE por su apoyo logístico y académico a la investigación.

A los Doctores Pamela Soltis (Curator of the lab Molecular Systematics and Genetic Evolution-FLMNH), Douglas Soltis (Distinguished Professor, lab Molecular Systematic and Genetic Evolution) y Dr. Matt Gitzendanner (Assistant Scientist, lab Molecular Systematic and Genetic Evolution), por su apoyo brindado en la síntesis de los microsatélites empleados en este estudio.

A las Ingenieras Gabriela Granja, Cristina Albán y Gabriela Zapata por sus consejos y ayuda en la implementación de las técnicas moleculares.

Al personal del Zoológico de Quito en Guayllabamba que proporcionó los controles positivos para la estandarización del protocolo.

Al Ministerio del Ambiente (Dirección provincial de Pichincha) que facilitó la Investigación en el Parque Nacional Cayambe-Coca, mediante la autorización de investigación científica N° 41-2011-IC-FAU-DPAP-MA.

A todos los profesores de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, por sus enseñanzas a lo largo de esta vida universitaria.

A mis amigos con los cuales compartí muchas vivencias en este año de tesis en el laboratorio de biotecnología, en especial a Eliana Boada, Kary Calvopiña, Salomé Funes, Andrea Hernández, Karla Ortiz, Saskya Carrera, Rosa Andrade, Rosa Grijalva, Alejandra Llerena, Liseth Cantuña, Wladimir Enríquez, Christian Andrade, Patricio Delgado, Santiago Pazmiño, gracias por todo.

A los amigos, que he conocido a lo largo de mi vida, en especial a Carla Flores, Ibeth Ramírez, Andrea Alulema, Mary Cuichán, Sully Márquez, William Pinto, Mabel Cadena y Silvia Pachacama, gracias por brindarme su amistad.

Milton Quinga

INDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	II
CERTIFICACIÓN	III
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	IV
AUTORIZACIÓN	V
DEDICATORIA	VI
AGRADECIMIENTOS	VII
INDICE DE CONTENIDOS	IX
LISTADO DE TABLAS	XIV
LISTADO DE FIGURAS	XVI
NOMENCLATURA	XVIII
RESUMEN	XX
ABSTRACT	XXI
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema.....	2
1.3 Objetivos de la investigación	4
1.3.1 Objetivo general	4
1.3.2 Objetivos específicos.....	4
1.4 Marco teórico	5
1.4.1 El lobo de páramo <i>Lycalopex culpaeus</i>	5
1.4.1.1 Descripción.....	5
1.4.1.2 Clasificación taxonómica	6
1.4.1.3 Análisis filogenético de los zorros de Sudamérica.....	6
1.4.1.4 Hábitat	7
1.4.1.5 Distribución	8
1.4.1.6 Métodos empleados para determinar la abundancia de cánidos silvestres	9
1.4.1.7 Principales amenazas del lobo de páramo	10
1.4.1.8 Medidas de Conservación.....	11
1.4.2 Genética de la conservación y marcadores moleculares en la conservación de especies y su biodiversidad genética	12

1.4.3	Muestreo no invasivo en animales silvestres.....	12
1.4.3.1	Estandarización del protocolo de extracción de ADN.....	13
1.4.3.2	Extracción de ADN a partir de heces	15
1.4.3.3	Factores que afectan la extracción y amplificación del ADN fecal.....	15
1.4.3.4	Métodos de conservación del ADN fecal	16
1.4.4	Marcadores mitocondriales.....	17
1.4.4.1	Citocromo b (<i>Cytb</i>).....	18
1.4.5	Marcadores microsatélites SSR	20
1.4.6	Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR)	21
1.4.7	Sistema de hipótesis o pregunta de investigación.....	23
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS		24
2.1	Participantes	24
2.2	Zona de Estudio	24
2.2.1	Trabajo de campo	24
2.2.2	Trabajo de Laboratorio	25
2.3	Período de tiempo de la investigación	25
2.4	Diseño	25
2.5	Procedimiento	26
2.5.1	Obtención de controles positivos.....	26
2.5.2	Obtención de controles negativos.....	27
2.5.3	Recolección de muestras fecales en los páramos del Parque Nacional Cayambe-Coca.....	27
2.5.4	Validación de los tres métodos de extracción de ADN fecal	30
2.5.4.1	Conservación de las muestras fecales.....	31
2.5.4.2	Pretratamiento de las muestras fecales antes de extraer su ADN	31
2.5.4.3	Extracción manual de ADN fecal, método Dodecil sulfato de sodio/cloroformo-alcohol isoamílico (SDS/CAI).....	31
2.5.4.4	Extracción manual de ADN fecal, método bromuro de cetiltrimetilamonio/cloroformo-alcohol isoamílico (CTAB/CAI).....	32
2.5.4.5	Extracción manual de ADN fecal, método 2 bromuro de cetiltrimetilamonio/cloroformo-alcohol isoamílico (2CTAB/CAI).....	33
2.5.5	Extracción de ADN de controles positivos y negativos	33
2.5.5.1	Extracción de ADN a partir de sangre total.....	33
2.5.5.2	Extracción de ADN a partir de pelo	34

2.5.6	Determinación del mejor método de extracción de ADN fecal.....	34
2.5.7	Estandarización del método de extracción de ADN para muestras fecales recolectadas en el zoológico de Quito	35
2.5.8	Evaluación de la eficacia del protocolo de extracción de ADN fecal.....	35
2.5.9	Determinación de integridad, pureza y concentración del ADN extraído	35
2.5.9.1	Electroforesis en geles de agarosa	35
2.5.9.2	Cuantificación de ADN mediante fluorometría.....	36
2.5.9.3	Determinación de la pureza del ADN y cuantificación en espectrofotómetro	36
2.5.10	Amplificación del ADN mitocondrial por PCR	36
2.5.10.1	Diseño de cebadores (primers).....	36
2.5.10.2	Optimización de la PCR.....	38
2.5.10.2.1	Temperatura de hibridación de los primers (Ta)	38
2.5.10.2.2	Ensayo de adyuvantes en muestras fecales	39
2.5.10.3	Ensayo de Sensibilidad	40
2.5.10.4	Ensayo de Especificidad	41
2.5.10.5	Amplificación de todas las muestras fecales recolectadas.....	41
2.5.10.6	Visualización de Resultados	42
2.5.11	Amplificación de microsatélites en ADN nuclear por PCR	42
2.5.11.1	Elección de microsatélites.....	42
2.5.11.2	Optimización de la PCR.....	43
2.5.11.2.1	Temperatura de hibridación de los primers (Ta).....	43
2.5.11.2.2	Ensayo de Adyuvantes en muestras fecales.....	44
2.5.11.3	Ensayo de Sensibilidad en muestra fecal	45
2.5.11.4	Ensayo de Especificidad	45
2.5.11.5	Amplificación de todas las muestras fecales recolectadas.....	45
2.5.11.6	Visualización de Resultados	46
2.5.12	Análisis de amplificación	47
2.5.13	Identificación de parásitos gastrointestinales	47
CAPÍTULO 3: RESULTADOS		49
3.1	Recolección de muestras fecales en los páramos del Parque Nacional Cayambe-Coca y Zoológico de Quito.....	49
3.2	Validación de tres métodos de extracción de ADN fecal (SDS/CAI, CTAB/CAI y 2CTAB/CAI).....	52
3.3	Extracción de ADN de controles positivos y negativos.....	55

3.4	Determinación del mejor método de extracción de ADN fecal	56
3.5	Estandarización de la extracción de ADN a partir de muestras fecales recolectadas en el zoológico de Quito.....	58
3.6	Evaluación de la eficacia del protocolo de extracción de ADN fecal	59
3.7	Amplificación del ADN mitocondrial por PCR.....	62
3.7.1	Optimización de la PCR	62
3.7.1.1	Temperatura de hibridación de los primers (Ta)	62
3.7.1.2	Ensayo de adyuvantes en muestras fecales.....	62
3.7.2	Ensayo de sensibilidad.....	63
3.7.3	Ensayo de especificidad.....	64
3.7.4	Amplificación de todas las muestras fecales recolectadas.....	64
3.8	Amplificación de microsatélites por PCR.....	66
3.8.1	Optimización de la PCR	66
3.8.1.1	Temperatura de annealing (Ta).....	66
3.8.1.2	Ensayo de Adyuvantes en muestras fecales.....	69
3.8.2	Ensayo de sensibilidad en muestra fecal	70
3.8.3	Ensayo de especificidad.....	70
3.8.4	Amplificación en todas las muestras fecales recolectadas.....	72
3.9	Análisis de amplificación.....	74
3.9.1	Amplificación de ADN mitocondrial y microsatélites en muestras fecales	74
3.9.2	Evaluación de la amplificación del citocromo b en función del tiempo de almacenamiento de las muestras fecales.....	75
3.9.3	Facilidad de la técnica para identificar muestras fecales	76
3.10	Identificación de Parásitos gastrointestinales en muestras fecales de lobo de páramo	77
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN		79
4.1	Recolección de muestras	80
4.2	Conservación de la muestra fecal.....	80
4.3	Validación de tres métodos de extracción de ADN a partir de muestras fecales ...	81
4.4	Determinación del mejor método de extracción de ADN fecal	82
4.5	Evaluación de la eficacia del protocolo de extracción de ADN fecal	83
4.6	Amplificación del ADN mitocondrial fecal por PCR	84
4.7	Amplificación de microsatélites en el ADN fecal.....	86

4.8	Eficiencia en la amplificación de ADN fecal en todas las muestras fecales recolectadas	89
4.9	Identificación de parásitos gastrointestinales en muestras fecales de lobo de páramo	92
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES		93
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES		95
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA		97

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1. Clasificación taxonómica del lobo de páramo (Tirira, 2007).	6
Tabla 1.2. Métodos directos e indirectos para determinar la abundancia de cánidos silvestres.....	9
Tabla 1.3. Estudios realizados en el Ecuador en torno al análisis no invasivo de mamíferos en peligro de extinción.....	13
Tabla 1.4. Regiones del ADN mitocondrial utilizadas en estudios poblacionales de carnívoros.....	18
Tabla 2.1. Clasificación de las heces en función de la edad de deposición de la muestra fecal.....	30
Tabla 2.2. DCA, para elegir el método de extracción de ADN fecal.	34
Tabla 2.3. Diseño de primers para amplificar un segmento de 200 pb del <i>Cytb</i> en el lobo de páramo. Datos editados de Primer BLAST.....	38
Tabla 2.4. Temperaturas de hibridación de los primers para amplificar el <i>Cytb</i> en el material genético el lobo de páramo.	39
Tabla 2.5. Concentración de reactivos en la PCR optimizada para la amplificación del <i>Cytb</i> en muestras fecales de lobo de páramo.	40
Tabla 2.6. Programación del termociclador para la amplificación del <i>Cytb</i> en muestras fecales de lobo de páramo.....	40
Tabla 2.7. Diluciones seriadas de ADN fecal, ensayo para amplificar el <i>Cytb</i>	41
Tabla 2.8. Microsatélites utilizados en el material genético del lobo de páramo.	43
Tabla 2.9. Programación del termociclador para la amplificación de cinco microsatélites en el material genético del lobo de páramo en muestras sanguíneas.....	44
Tabla 2.10. Temperaturas de hibridación para cinco microsatélites de zorro, aplicados en el material genético del lobo de páramo.	44
Tabla 2.11. Diluciones seriadas de ADN fecal, ensayo microsatélites.....	45
Tabla 2.12. Concentración de reactivos estandarizada para la amplificación PCR de los microsatélites CPH8 y CPH2 en muestras fecales de lobo de páramo, utilizando Taq polimerasa platinum (Invitrogen™).	46
Tabla 2.13. Programación del termociclador estandarizada para la amplificación de los microsatélites CPH8, CPH2 en el material genético del lobo de páramo en muestras fecales.	46
Tabla 2.14. Valores asignados para amplificación.	47
Tabla 3.1. Total de muestras fecales recolectadas y clasificadas en función de la edad de deposición de la muestra (Datos obtenidos del Anexo C).	49

Tabla 3.2. Valores de cuantificación y pureza de ADN de controles positivos y negativos.	55
Tabla 3.3. Temperatura de alineamiento óptima para la amplificación de 5 microsatélites en el material genético del lobo de páramo.	69
Tabla 3.4. Amplificación del <i>Cytb</i> en muestras fecales de lobo de páramo en función del tiempo de almacenamiento.	76
Tabla 3.5. Rendimiento del protocolo de extracción y amplificación de ADN estandarizado en muestras fecales de lobo de páramo.....	77

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. 1. Lobos de páramo (<i>Lycalopex culpaeus</i>) tomados con trampa de cámara en el Parque Nacional Cayambe-Coca, Ecuador.	6
Figura 1. 2. Árbol evolutivo utilizando de los canidos máxima parsinomía.	7
Figura 1. 3. Mapa de distribución del lobo de páramo en América del Sur.	8
Figura 1. 4. Mapa de distribución del lobo de páramo en Ecuador.	9
Figura 1. 5. Esquema del ADN mitocondrial en carnívoros.	18
Figura 1. 6. Marcadores moleculares utilizados para la identificación de carnívoros descritos en la bibliografía empleados en diferentes artículos científicos.	19
Figura 1. 7. Marcadores microsatélites <i>SSR</i> . Ejemplo de un di-nucleótido A-C(n).	20
Figura 1. 8. Esquema de la amplificación de ADN por PCR.	23
Figura 2. 1. Recolección de muestras sanguíneas y fecales de una pareja de lobos de páramo del zoológico de Quito en Guayllabamba.	27
Figura 2. 2. Mapa de los sitios de muestreo en el Parque Nacional Cayambe-Coca.	28
Figura 2. 3. Recolección de muestras fecales en los páramos del Parque Nacional Cayambe-Coca.	29
Figura 2. 4. Alineamiento entre la secuencia del <i>Cytb</i> de lobo de páramo. Programa de alineamiento de secuencias ClustalX 2.0.	38
Figura 3. 1. Muestras fecales categorizadas en función de la edad de deposición.	49
Figura 3. 2. Ubicación GPS de las muestras recolectas en el Área 1.	50
Figura 3. 3. Ubicación GPS de las muestras recolectas en el Área 2.	50
Figura 3. 4. Ubicación GPS de las muestras recolectas en el Área 3.	51
Figura 3. 5. Ubicación GPS de las muestras recolectas en el Área 4.	51
Figura 3. 6. Ubicación GPS de las muestras recolectas en el Área 5.	51
Figura 3. 7. Ubicación GPS de las muestras recolectas en el Área 6.	52
Figura 3. 8. Muestras fecales recolectadas según el tipo de muestreo.	52
Figura 3. 9. Validación de tres métodos de extracción de ADN fecal.	53
Figura 3. 10. Alícuota de ADN fecal.	54
Figura 3. 11. Valores promedio de cuantificación y pureza de ADN.	54
Figura 3. 12. Extracción de ADN de controles positivos y negativos.	55
Figura 3. 13. Determinación del mejor método de extracción de ADN fecal.	57
Figura 3. 14. Valores promedio de cuantificación y pureza en 5 muestras de ADN fecal.	58
Figura 3. 15. Extracción de ADN de una muestra fecal del Zoológico.	59
Figura 3. 16. Extracción de ADN en 47 muestras fecales recolectadas.	60

Figura 3. 17. Valores promedio de cuantificación y pureza de 47 muestras de ADN fecal, aplicando el método de extracción 2CTAB/CAI.	61
Figura 3. 18. Amplificación del <i>Cytb</i> , ensayo de temperaturas.	62
Figura 3. 19. Amplificación del <i>Cytb</i> , ensayo adyuvante BSA.	63
Figura 3. 20. Amplificación del <i>Cytb</i> , ensayo sensibilidad.	64
Figura 3. 21. Amplificación del <i>Cytb</i> , ensayo de especificidad.	64
Figura 3. 22. Amplificación del <i>Cytb</i> en 47 muestras fecales.	65
Figura 3. 23. Amplificación del <i>Cytb</i> empleando Taq platinum.	66
Figura 3. 24. Amplificación de 5 microsatélites en ADN nuclear de lobo de páramo empleando Taq polimerasa (FLMNH).	67
Figura 3. 25. Amplificación de 5 microsatélites en ADN nuclear de lobo de páramo empleando Taq polimerasa platinum (Invitrogen™).	68
Figura 3. 26. Amplificación de los microsatélites (CPH8 y CPH2), ensayo con BSA.	69
Figura 3. 27. Amplificación del microsatélites CPH2, ensayo sensibilidad.	70
Figura 3. 28. Amplificación de 5 microsatélites en ADN nuclear de lobo de páramo, ensayo de especificidad.	71
Figura 3. 29. Amplificación de 2 microsatélites en muestras fecales frescas.	72
Figura 3. 30. Amplificación de microsatélites CPH8 y CPH2 en muestras fecales semifrescas húmedas.	73
Figura 3. 31. Amplificación de microsatélites CPH8 y CPH2 en muestras fecales semifrescas secas.	73
Figura 3. 32. Amplificación de los microsatélites CPH8 y CPH2 en muestras fecales residuos.	74
Figura 3. 33. Porcentajes de amplificación e intensidad de banda en muestras fecales.	75
Figura 3. 34. Distribución de la amplificación de muestras fecales en función del tiempo de almacenamiento.	76
Figura 3. 35. Quistes de <i>Eimeria spp.</i>	77
Figura 3. 36. Huevos de <i>Ascaris spp.</i> 1y 2	78

NOMENCLATURA

+: Control positivo

16S: Gen 16S, rRNA

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ADNmt: ADN mitocondrial

ANOVA: Análisis de Varianza

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNr: ARN ribosomal

ARNt: ARN de transferencia

ATP6: Gen ATP sintetasa 6 (incluyendo una porción que se sobrepone con ATP8)

bp: Pares de bases

BSA-acety: Albúmina sérica bovina acetilada

BSA-FV: Albúmina sérica bovina sin acetilar

CAI: Cloroformo-alcohol isoamilico

CDA: Bromuro de cetildimetilamonio

CITES: Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna

CN: Control negativo de la extracción.

COI: Gen citocromo oxidasa I

CR: Región control del ADNmt

CTAB: Bromuro de cetiltrimetilamonio

Cytb: Gen citocromo b

dNTPs: Desoxiribonucleótidos trifosfato

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FLMNH: *Florida Museum of Natural History*. Museo de Historia Natural de Florida.

G+C: Contenido de guanina más citosina

GPS: *Global Positioning System*, sistema de posicionamiento global

Kb: Kilobase

LDS: Dodecil sulfato de litio

M: Marcador de peso molecular

mA: Miliamperios

MAE: Ministerio del Ambiente, Ecuador

mM: mili Molaridad

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RAPD: *Random Amplification of Polymorphic DNA*, ADN polimórfico amplificado al azar

RFLP: *Restriction fragment length polymorphism*, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.

SDS: Dodecil sulfato de sodio

Spp. Especie

SSR: *Simple sequence repeats*, repeticiones cortas de ADN en tándem

Ta: Temperatura de hibridación o annealing de los primers

Taq: *Thermus aquaticus*

Tm: Temperatura de fusión o melting del ADN

UICN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

V: Voltios

μM micro Molaridad

RESUMEN

Lycalopex culpaeus, conocido en el Ecuador como lobo de páramo o zorro andino es un cánido endémico que habita en los Andes de Sudamérica. La falta de estudios sobre su ecología y el alto riesgo de extinción de la especie en el Ecuador, han hecho de vital importancia establecer nuevos métodos que permitan recopilar información de la especie. En este contexto, esta investigación se propuso estandarizar un protocolo de extracción de material genético (ADN) a partir de muestras fecales de lobo de páramo. Este tipo de protocolo permite obtener información ecológica y genética valiosa de la especie, sin la necesidad del contacto directo con el animal. De igual manera, disminuye los costos del muestreo ya que no es necesaria la captura de los lobos. En este estudio se evaluaron tres métodos manuales para la extracción de ADN a partir de muestras fecales recolectadas en el Parque Nacional Cayambe-Coca: el método SDS/CAI utilizado para extraer ADN de heces humanas, CTAB/CAI aplicado en heces de monos aulladores del Brasil (*Alouatta caray*) y 2CTAB/CAI empleado en heces de primates del mediterráneo (*Macaca sylvanus*) y gorilas (*Gorilla g. gorilla*). Los resultados visualizados en geles de agarosa al 0.8% muestran una extracción positiva para los tres métodos. La cuantificación del ADN y la evaluación de su pureza mediante la medición de su absorbancia a 260/280 nm demostraron que el mejor método es 2CTAB/CAI con valores promedio de 51.16 ng/μl de ADN y pureza de 1.65. Posteriormente se realizaron procesos de amplificación con un gen mitocondrial (citocromo b) y microsatélites. La amplificación del citocromo b (78.72%) permitió identificar la presencia de lobos de páramo en la zona a través de sus muestras fecales. De igual manera, valores de eficiencia en la amplificación de microsatélites del 56.76% para CPH8 y 59.46% para CPH2, demostraron que se puede aplicar este tipo de marcadores identificados en otros cánidos para el material genético del lobo de páramo. Estas características convierten al protocolo de extracción y posterior amplificación de ADN fecal en una técnica aplicable para iniciar estudios genéticos enfocados en la conservación de este cánido en nuestro país. Además de la posibilidad de aplicarla a otras especies de mamíferos amenazados en el Ecuador.

Palabras clave: Ecuador, *Lycalopex culpaeus*, lobo de páramo, extracción ADN de heces, citocromo b, microsatélites.

ABSTRACT

Lycalopex culpaeus known in Ecuador as Andes fox is an endemic canid distributed in the Andes. The lack of information about its ecology and natural history had encouraged researchers to look for new methods and the high risk of extinction the species in Ecuador, have done of vital importance establish new methods to collect information about the species. In this context, the research proposed to standardize a protocol for extraction of genetic material (DNA) from fecal samples of Paramo wolf. This type of protocol allows obtain ecological information and genetic valuable of the species, without the need for direct contact with animals. Kikewise, lowers costs of sampling because it is not necessary to capture wolves. In this study evaluated three manual methods for extracting DNA from fecal samples collected in Cayambe-Coca National Park: the SDS/CAI method used to extract DNA from human feces, CTAB/CAI applied in feces of Brazilian howler monkeys (*Alouatta caray*) and 2CTAB/CAI used in feces of Mediterranean primates (*Macaca sylvanus*) and gorillas (*Gorilla g. gorilla*). The results visualized in agarose gels showed a 0.8% positive for all three extraction methods. DNA quantification and evaluation of its purity by measuring its absorbance at 260/280 nm showed that the best method is (2CTAB/CAI) with average values of 51.16 ng/ul and 1.65 of purity. Later were performed amplification processes with a mitochondrial gene (cytochrome b) and microsatellites. The amplification of cytochrome b (78.72%) allowed identify the presence of Paramo wolves in the area through their fecal samples. Kikewise, values of efficiency in amplifying of microsatellite CPH8 of 56.76% and 59.46% for CPH2 demonstrated that can be apply this type of markers identified in other canids for Paramo wolf genetic material. These features make the extraction protocol and later fecal DNA amplification in a technique applicable to initiate genetic studies focused on the conservation of this canid in our country. Besides the possibility to apply to other species of threatened mammals in Ecuador.

Keywords: Ecuador, *Lycalopex culpaeus*, Andean fox, stool DNA extraction, cytochrome b, microsatellites.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

El Ecuador, es considerado como un país “megadiverso” pese a su reducida superficie territorial ocupando la posición 17 en ranking mundial. Su gran biodiversidad se debe a la presencia de un alto número de ecosistemas producto de la ubicación geográfica del país en la zona ecuatorial, la presencia de la cordillera de los Andes y la influencia de las corrientes marinas en nuestras costas. Estos factores han permitido la formación de tres regiones continentales en el Ecuador: Costa, Sierra, Amazonía y una Región Insular que son las Islas Galápagos. La numerosa cantidad de hábitats presentes en estas regiones son el hogar de alrededor de 16.000 especies de plantas vasculares, el 10% de la flora mundial y alrededor de 2.700 especies de animales, el 11,17 % de la fauna mundial (Tirira & Burneo, 2011; Báez, 2012). En cuanto a mamíferos, el Ecuador ocupa el noveno puesto en el mundo con 404 especies de las cerca de 5.000 existentes. Sin embargo debido a la pérdida y fragmentación de los hábitats naturales del país, las especies de mamíferos amenazadas se han incrementado, situando al Ecuador en el primer puesto en Latinoamérica y el segundo en el mundo en cuanto al número de especies amenazadas, con un total de 104, dando como resultado que de cuatro especies de mamíferos del país, una se encuentre en peligro en el Ecuador (Tirira & Burneo, 2011).

Una de estas especies amenazadas es el lobo de páramo (*Lycalopex culpaeus*). Este cánido habita los Andes de Sudamérica y se encuentra ampliamente distribuido en la región (Jiménez *et al.*, 2008). Para el caso del Ecuador, se encuentra principalmente en los pisos templados y altoandinos de todo el país (Tirira, 2007). A pesar de su nombre común, (*Lycalopex culpaeus*), se trata de un zorro de gran tamaño que se caracteriza por tener una coloración de pelaje en su mayoría rojiza, una gran cola, con un comportamiento solitario y territorial que hacen necesario grandes extensiones de hábitat para sostener una población viable (Palacios, 2007; Jiménez & Novaro, 2004). A pesar de su amplio rango, los estudios sobre esta especie en nuestro país son escasos,

caso contrario a lo que ocurre en Chile y Argentina donde se ha puesto énfasis al estudio de este carnívoro (Palacios, 2007; Jiménez & Novaro, 2004; Novaro, 1997; Novaro & Funes, 1994).

En cuanto a su estado de conservación en el Ecuador, el lobo de páramo ha enfrentado amenazas como la caza, su persecución por ser un depredador de animales domésticos y la posible pérdida de variabilidad genética debido a la pérdida y fragmentación de su hábitat, que han atentado con su sobrevivencia (Tirira, 2007; Zapata-Ríos *et al.*, 2011). Estas múltiples amenazas han incentivado a tomar medidas para su conservación como la declaración de especie protegida desde 2002, su inclusión en la segunda edición del Libro rojo de los mamíferos del Ecuador de 2011 en la categoría *Vulnerable* (especie silvestre que enfrenta un alto riesgo de extinción en estado silvestre), y por último incrementar las investigaciones en torno al lobo de páramo, para llenar los vacíos de información sobre la especie en el país (Zapata-Ríos *et al.*, 2011).

1.2 Justificación del problema

A pesar de que el lobo de páramo es uno de los animales más comunes en el páramo ecuatoriano, existe poca información disponible sobre su ecología, distribución, requerimientos de hábitat, variabilidad genética y estado real de conservación, datos fundamentales para establecer planes de manejo y conservación de esta especie (Zapata-Ríos & Suárez, 2005). En los últimos años, datos genéticos han revolucionado estudios de manejo y conservación de especies debido a su gran utilidad y gran cantidad de información con pocos recursos. Es importante estudiar la variabilidad genética de la especie, ya que es la fuente que permite la sobrevivencia y adaptación de las especies a los cambios ambientales. Esta información es importante para identificar sitios donde se ha perdido dicha variabilidad genética, producto de la reducción severa del tamaño de población debido a la fragmentación de su hábitat y aislamiento en las poblaciones de animales, formando cuellos de botella en donde las especies se encuentran en un alto peligro de extinción, (Godoy, 2009; González, 2003; Phillip *et al.*, 1986).

En este contexto, la genética de la conservación ha venido consolidándose en los últimos años a favor de la conservación de especies, teniendo como objetivos principales evaluar la variación genética de las poblaciones y proponer medidas para preservar la biodiversidad genética. Para esto utiliza la biología molecular, teniendo como principal herramienta a los marcadores moleculares. Su aplicación ha permitido analizar las poblaciones a nivel de individuo y especie, haciendo posible el entendimiento de su historia evolutiva, demografía y ecología. También los marcadores moleculares aportan herramientas eficientes para la identificación de especies, asignación de individuos a poblaciones, e identificación de individuos; utilizando este conocimiento para establecer estrategias adecuadas para la conservación de especies en peligro (Godoy, 2009; González, 2003; Lucchini *et al.*, 2002).

La principal problemática para la realización de este tipo de estudios es la obtención de ADN, debido a lo difícil y costoso que resulta la manipulación directa del animal y su muestreo, complicándose aun más cuando se trabaja con carnívoros. Una de las opciones es la extracción de ADN a través de muestreos no invasivos, en donde se utilizan muestras fecales, pelo, plumas, uñas y restos de tejidos para extraer ADN de animales silvestres; convirtiendo a la técnica en un método eficaz para obtener muestras biológicas de los animales de manera indirecta a través de indicios de su presencia (Paxinos *et al.*, 1997; Prugh *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005; Berry, 2007; Echegaray *et al.*, 2008). Las muestras fecales son especialmente útiles cuando se estudian a los animales silvestres y en peligro de extinción. Este ADN extraído de las heces puede ser amplificado por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que nos permite obtener fragmentos específicos de ADN de la especie en estudio de forma *in vitro*. Además la recolección de excrementos es un método de fácil aplicación, permite obtener muestras sin capturar a los animales, y se necesita menor despliegue de personal y recursos para localizar los indicios de los animales; convirtiendo a la técnica en un método menos costoso para realizar un censo masivo de las poblaciones de cánidos (Prugh *et al.*, 2005; Echegaray *et al.*, 2008).

Por otro lado, la estandarización de un protocolo para la extracción de ADN a partir de muestras fecales es un proceso difícil, debido a que el ADN del individuo a

extraer se encuentra en pequeñas cantidades, degradado o contaminado con material genético exógeno e inhibidores de la PCR presentes en las heces (Taberlet *et al.*, 1999; Broquet *et al.*, 2007). Aunque actualmente existen kits de extracción de ADN fecal rápidos y eficaces, la mayoría de estos son altamente costosos y no aplicables a la realidad nacional del Ecuador. Por lo que es necesaria la estandarización de un protocolo de extracción de ADN que sea más económico e igualmente rápido y eficiente para extraer ADN de las muestras fecales de lobo de páramo. El protocolo estandarizado podrá ser utilizado en posteriores estudios para determinar la situación actual de este carnívoro en el Ecuador y de esta manera conocer sobre su distribución, requerimientos de hábitat, ecología, abundancia y variabilidad genética. Además abrirá las puertas a una serie de estudios de genética de la conservación a nivel local y regional. Datos que son fundamentales para el manejo y conservación del lobo de páramo en nuestro país. La técnica también podrá ser aplicada en el estudio de otros animales amenazados. Convirtiéndose además en uno de los primeros estudios en el Ecuador enfocados en el lobo de páramo que utilizan técnicas moleculares.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Estandarizar un protocolo para la extracción de ADN de muestras fecales de lobo de páramo (*Lycalopex culpaeus*).

1.3.2 Objetivos específicos

- Validar tres métodos de extracción de ADN a partir de muestras fecales.
- Determinar el mejor método de extracción de ADN fecal, mediante la evaluación de concentración y pureza del ADN.
- Comprobar la calidad del ADN mitocondrial extraído mediante su amplificación utilizando cebadores específicos para el género *Lycalopex* por PCR.
- Comprobar la calidad el ADN nuclear extraído mediante la amplificación de un microsatélite identificado en otro carnívoro de la misma familia.

1.4 Marco teórico

1.4.1 El lobo de páramo *Lycalopex culpaeus*

1.4.1.1 Descripción

El género *Lycalopex* antes llamado *Pseudalopex* o *Dusicyon* comprende un grupo de cánidos endémico de América del Sur en el que actualmente se reconocen las siguientes especies: *L. culpaeus*, *L. griseus*, *L. sechurae*, *L. fulvipes*, *L. gymnocercus* y *L. vetulus*. En el Ecuador solo se ha reconocido una subespecie *Lycalopex culpaeus reissii* (Figura 1.1) (Jiménez & Novaro, 2004). El zorro culpeo, en nuestro país conocido como lobo de páramo o zorro andino es el miembro más grande de este género, y uno de los de mayor tamaño de la región, superado solo por el lobo de crin llamado también Aguara Guazú *Chrysocyon brachyurus* (Guzmán *et al.*, 2009).

En realidad se trata de un gran zorro que se caracteriza por un ladrido similar al perro doméstico, con su cabeza y patas rojizas, el vientre, cuello y boca blancos y su lomo es gris rayado de negro. La cola está muy poblada de pelos grises que se vuelven negros en su punta (Jiménez & Novaro, 2004). *Lycalopex culpaeus* es una especie dimórfica, los machos son más grandes y en promedio 1.5 veces más pesados que las hembras, el peso de un lobo juvenil es de 3.6 kg, llegando a pesar hasta 13 kg cuando es adulto, el largo de su cuerpo, incluida la cola suele estar entre 130 y 150 cm; según datos obtenidos para Chile y Argentina (Jiménez & Novaro, 2004; Palacios, 2007).

A



B



Figura 1. 1. Lobos de páramo (*Lycalopex culpaeus*) tomados con trampa de cámara en el Parque Nacional Cayambe-Coca, Ecuador.

(A) Lobo solitario, (B) Lobo con cría. (Cortesía de © Galo Zapata Ríos, 2009)

1.4.1.2 Clasificación taxonómica

La taxonomía del lobo de páramo ha sido un tema de mucho debate ya que se lo ha categorizado en diferentes géneros en los últimos años: *Canis*, *Dusicyon*, *Pseudalopex* y finalmente *Lycalopex* (Tabla 1.1). Actualmente, la taxonomía de este cánido sigue sin resolverse debido a su amplio rango de distribución, a la alta variabilidad fenotípica y a la escasez de información (Jiménez & Navarro, 2004).

Tabla 1. 1. Clasificación taxonómica del lobo de páramo. (Tirira, 2007).

Clase	Mammalia
Subclase	Theria
Orden	Carnívora
Familia	Canidae
Género	<i>Lycalopex</i>
Especie	<i>culpaeus</i>
Nombre Científico	<i>Lycalopex culpaeus</i>
Nombre Común	Lobo de páramo

1.4.1.3 Análisis filogenético de los zorros de Sudamérica

Wayne *et al.* (1997), realizó un estudio donde se analizaron 2001 pares de bases del ADN mitocondrial utilizando tres genes (citocromo b, citocromo c oxidasa I y citocromo c oxidasa II) en 23 cánidos en los que se incluye a los zorros de Sudamérica.

Los resultados indican que los zorros sudamericanos están estrechamente relacionados y difieren de las otras especies de cánidos analizados. Adicionalmente, el género *Pseudalopex* y *Lycalopex* no presentan mayor diferenciación genética entre ellos, sustentando su similitud morfológica, por lo que se recomienda que deben ser incluidos en un solo género (Figura 1.2). El taxón evolutivamente más cercano para *Lycalopex culpaeus* sería *Lycalopex vetulus*.

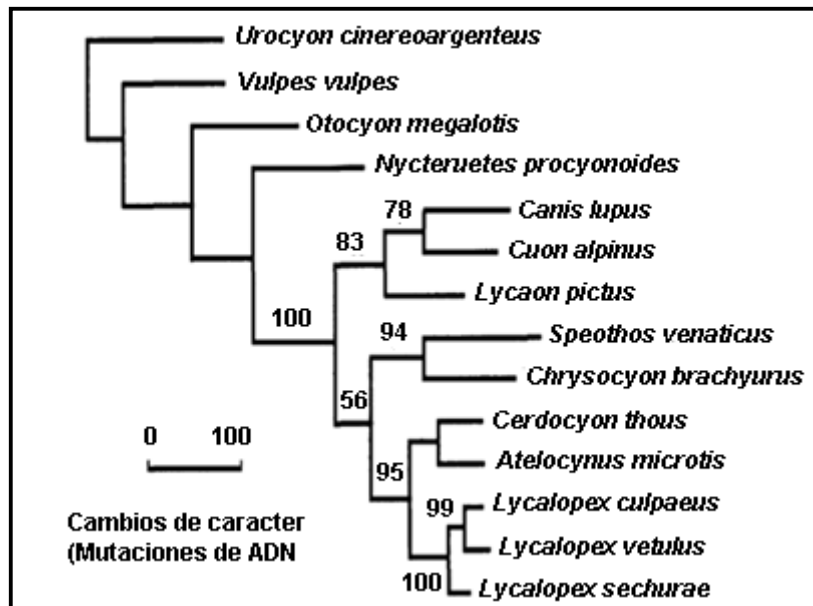


Figura 1. 2. Árbol evolutivo utilizando de los cánidos máxima parsinomia.
 Basado en el análisis de 2001 pares de bases del ADN mitocondrial (citocromo b, citocromo c oxidasa I y citocromo c oxidasa II). (Wayne *et al.*, 1997).

1.4.1.4 Hábitat

El lobo de páramo vive en diferentes hábitats que van desde las montañas altas sin vegetación, pasando por los bosques y valles, hasta llegar a los desiertos abiertos. Ingresa en los bosques andinos en los cuales alcanza mayor densidad que en terrenos abiertos. Se alimenta principalmente de pequeños roedores, conejos, insectos, frutas y bayas; pero también de carroña de guanacos y otros mamíferos domésticos como la oveja y aves de corral (Trujillo & Trujillo, 2007; Jiménez *et al.*, 2008).

1.4.1.5 Distribución

Se distribuye ampliamente a lo largo de los Andes y regiones montañosas de América del Sur, desde la Provincia de Nariño en Colombia en el Norte, pasando por Ecuador, Perú, Bolivia hasta Tierra del Fuego en Chile y la Patagonia en Argentina en el Sur (Figura 1.3) (Jiménez *et al.*, 2008). Son animales solitarios, territoriales, de hábitos diurnos y nocturnos; que raramente comparten territorio con la hembra. Su territorio es variable, presentando un rango de 3,2 km² para las hembras y 3,6 km² para los machos, llegando incluso a 10 km² en los desiertos (Jiménez & Novaro, 2004; Palacios, 2007). En época de reproducción ambos miembros de la pareja se turnan para alimentar a la camada que va de 3 a 8 ejemplares. El apareamiento ocurre entre agosto y octubre y tienen una gestación de unos 58 días (Jiménez *et al.*, 2008).



Figura 1. 3. Mapa de distribución del lobo de páramo en América del Sur.
(Modificado de Jiménez & Navarro, 2004).

En el Ecuador habita en los pisos templados y altoandinos de todo el país. Además hay registros en la zona subtropical alta del valle del río Guayllabamba, en el noroccidente de la provincia de Pichincha y en Guarumales, provincia del Azuay (Tirira, 2007; Zapata-Ríos *et al.*, 2011) (Figura 1.4).



Figura 1. 4. Mapa de distribución del lobo de páramo en Ecuador.
(Zapata-Ríos *et al.*, 2011).

1.4.1.6 Métodos empleados para determinar la abundancia de cánidos silvestres

La abundancia de los cánidos puede ser determinada mediante métodos directos que involucran la participación directa de contar animales, ya sean vivos (trampas, avistamientos) o muertos (registros de colección o muestras muertas), y mediante métodos indirectos que involucran el conteo de signos de la presencia de los animales (Tabla 1.2). Para utilizar estos métodos, se requiere de una adecuada aplicación y estandarización de la técnica a aplicarse (Gese, 2004).

Tabla 1. 2. Métodos directos e indirectos para determinar la abundancia de cánidos silvestres. (Gese, 2004).

Métodos Directos	Métodos Indirectos
Informes de colección y registros de piel	Encuestas de estaciones odoríferas
Muestras muertas en carreteras	Índices de Actividad
Conteo de animales conducidos a una área	Transectos de deposición de excretas (conteo de heces, análisis de ADN)
Encuestas con faros (animales nocturnos)	Conteo de huellas a lo largo de un transecto
Trampas cámara	Encuesta de guaridas y madrigueras
Captura por unidad de esfuerzo	Encuesta de respuesta a vocalizaciones
Captura- marca-recaptura	Frecuencias de avisos de depredación
Conteo directo por eliminación	
Transecto en tiras o muestreo en área	
Identificación de animales individuales	
Radio-telemetría	

1.4.1.7 Principales amenazas del lobo de páramo

A nivel internacional, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) destaca como la principal amenaza que enfrenta esta especie en Sudamérica a la caza para comercializar su piel (Jiménez & Novaro, 2004). Producto de ella, se exportaron de manera indiscriminada de Chile desde 1910 hasta 1984, 5 millones de pieles, de las que 1'550.000 fueron especies nativas (Torres, Castro & Oliva, 2009). García (1991) afirma que en Argentina entre los años de 1980 a 1986 se exportaron anualmente en promedio valores superiores a 100.000 pieles, entre las que también constan pieles de lobo de páramo. Adicionalmente, el lobo de páramo puede ser afectado por la persecución ya que representa un peligro para los animales de granja, la depredación causada por perros salvajes y domésticos en algunas áreas (Novaro, 1997), así como la presencia de parásitos intestinales (Jiménez & Novaro, 2004), que pueden llegar a causar problemas en sus poblaciones. Por último la UICN establece que la pérdida del hábitat no parece ser una importante amenaza para el lobo de páramo, pues e ha observado que en un hábitat libre de las amenazas antes mencionadas y con abundante alimento el lobo de páramo vuelve otra vez a proliferar (Jiménez *et al.*, 2008).

Para el caso del Ecuador, se han presentado similares amenazas, entre estas nuevamente la caza para comercializar su piel, su cola o báculo (hueso peniano) que son considerados amuletos de buena suerte, su caza por deporte o por la persecución de este animal por los campesinos que lo consideran una amenaza por ser un depredador de sus animales domésticos, principalmente de ovejas y aves de corral (Tirira, 2007; Zapata-Ríos *et al.*, 2011). Adicionalmente, una gran amenaza para el lobo de páramo en el país es la pérdida del hábitat, debido a causas antropogénicas, ya que el hombre ha destruido y quemado los páramos del Ecuador para utilizarlos como zona agrícola, por la minería y la construcción de carreteras sumando la actividad humana en torno a ellas. Esto ha ocasionado que el 58% del área de distribución histórica del lobo de páramo haya sido alterada y que del área actual de distribución, apenas el 45 % se encuentra dentro de áreas protegidas (Zapata-Ríos *et al.*, 2011). Esta fragmentación del páramo ha aislado a

las poblaciones del lobo de páramo perdiendo probablemente su variabilidad genética (Zapata-Ríos *et al.*, 2011).

1.4.1.8 Medidas de Conservación

A nivel internacional, la UICN, creó un grupo de especialistas de cánidos para iniciar esfuerzos de conservación de esta y otras especies (Zapata-Ríos *et al.*, 2011), y la incluyo en la Lista roja de Especies amenazadas, pero en la categoría ***Least Concern*** (Preocupación Menor) es decir la especie no está catalogada en peligro, ya que se considera una especie abundante y de amplia distribución en Sudamérica (Jiménez *et al.*, 2008). Por otro lado la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora silvestre (CITES), lo incluye dentro del *Apéndice II*; en el cual se listan a las especies que en la actualidad no se encuentran en peligro de extinción, pero que podrían llegar a esta situación si no hay un control estricto en el comercio de estos especímenes.

A nivel sudamericano, varios países han tomado medidas de conservación de esa especie. En Chile, la caza del lobo de páramo ha sido prohibida desde 1980, aunque la ley todavía no ha sido redactada. En el caso de Argentina la legislación lo ha considerado en peligro por decreto en 1983. Sin embargo, el comercio a nivel nacional y la exportación de pieles de lobo de páramo sigue siendo legal en la actualidad. En Perú, no se considera a esta especie en peligro de extinción y la caza puede ser legal si un plan de gestión es aprobado por el gobierno. En Bolivia, aunque la exportación de pieles fue prohibida en 1986, la especie no está protegida (Jiménez *et al.*, 2008). Finalmente para el Ecuador el lobo de páramo está protegido por la legislación desde el 8 de octubre de 2002 mediante el Registro oficial No. 679, por lo que su cacería y comercialización está prohibida en todo el territorio nacional. Además como medida de conservación; la especie ha sido incluida en la segunda edición del Libro rojo de los mamíferos del Ecuador de 2011, en la categoría ***Vulnerable***; es decir la especie enfrenta un alto riesgo de extinción en estado silvestre debido a las múltiples amenazas que ha enfrentado la especie en el país (Zapata-Ríos *et al.*, 2011).

1.4.2 Genética de la conservación y marcadores moleculares en la conservación de especies y su biodiversidad genética

Tan importante es conservar la identidad genética de las especies que en los últimos años se ha creado una disciplina: la Genética de la conservación. Sus objetivos son evaluar la variación genética de las poblaciones y proponer medidas para preservar la biodiversidad genética. Para esto utiliza la genética molecular, teniendo como principal herramienta a los marcadores moleculares, los cuales por ser variables en la estructura de su ADN permiten detectar diferencias entre especies e incluso organismos de la misma especie. Estos marcadores se pueden explorar en cualquier gen o producto génico de cualquier organismo así como en sitios donde no hay genes (González, 1998; Godoy, 2009). Su aplicación ha permitido analizar las poblaciones a nivel de individuo y especie, haciendo posible el entendimiento de su historia evolutiva, demografía y ecología. También los marcadores moleculares aportan herramientas eficientes para la identificación de especies, asignación de individuos a poblaciones, e identificación de individuos. Este conocimiento permite establecer estrategias adecuadas para la conservación de especies en peligro (Godoy, 2009).

1.4.3 Muestreo no invasivo en animales silvestres

La principal problemática para la realización de este tipo de estudios es la obtención de ADN, debido a lo difícil y costoso que resulta la manipulación y muestreo de los animales, complicándose aun más cuando se trabaja con carnívoros. Una de las opciones es la extracción de ADN a través de muestreos no invasivos que permiten obtener material sin causar estrés al animal, esto es importante cuando se trabaja con animales en peligro de extinción (Heymann *et al.*, 2006; Beja *et al.*, 2009). En este tipo de muestreos se utiliza pelo, plumas y heces de los animales en estudio para extraer su ADN (Echegaray *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2006; Berry, 2007; Prugh *et al.*, 2005; Paxinos *et al.*, 1997).

En nuestro país no se ha realizado este tipo de estudios para analizar las poblaciones de lobo de páramo, sin embargo esta técnica ya se ha aplicado para el

análisis no invasivo en dos especies de mamíferos en peligro de extinción (Tabla 1.3). Estos antecedentes convierten a este estudio en uno de los pioneros en esta área, y el primero que se enfoca en el análisis no invasivo del lobo de páramo, utilizando técnicas de biología molecular.

Tabla 1. 3. Estudios realizados en el Ecuador en torno al análisis no invasivo de mamíferos en peligro de extinción.

Autor	Investigación
Jiménez, 2009	Optimización de los Métodos de Recolección, Conservación y Extracción de DNA Nuclear a partir de Muestras de Excremento de Oso de Anteojos (<i>Tremarctos ornatus</i>).
Segovia, 2006	Escatología Molecular en <i>Lagothrix lagotricha</i> (Primates: Platyrrhini): Un método no invasivo de amplificación de ADN.

1.4.3.1 Estandarización del protocolo de extracción de ADN

El objetivo de estandarizar un protocolo de extracción de ADN es obtener un ADN íntegro, de gran cantidad y altamente puro. Su aplicación debe ser rápida, sencilla y de bajo costo. Esto se logra mediante la estandarización de cuatro pasos fundamentales para extraer el ADN de las células (Surzycki, 2000):

- **Ruptura celular:** De esta manera se libera el ADN de las células, es el primer paso para la extracción de ADN. Se puede romper las células de manera química, mecánica o enzimática. El mejor método para romper las células y obtener intacto el ADN es mediante la aplicación separada o combinada de químicos (detergentes) y enzimas. La ventaja de los detergentes es que pueden solubilizar los lípidos de la membrana celular resultando en un método menos abrasivo de lisis celular. Los detergentes usados en la lisis son el dodecil sulfato de sodio (SDS), dodecil sulfato de litio (LDS), sarcosil, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y el bromuro de cetildimetilamonio (CDA). El material usado para extraer el ADN, debe suspenderse en un buffer de lisis que mantenga la estructura del ADN durante los pasos de ruptura y purificación, además que la remoción de proteínas y ARN sea fácil y que no modifique la estructura del ADN. El buffer de lisis contiene el detergente, las

enzimas, sales para mantener la fuerza iónica como el NaCl, y EDTA que actúa como inhibidor de DNAsas (Surzycki, 2000).

- **Remoción de proteínas y RNA:** El siguiente paso es remover las proteínas y el ARN del lisado celular. La remoción de proteínas de la solución de ADN (deproteinización) depende de las diferencias físicas entre las propiedades de los ácidos nucleídos y proteínas. Los métodos empleados en función de estas diferencias son: diferencias de solubilidad (uso de solventes orgánicos como el método fenol-cloroformo-alcohol isoamílico), diferencias de solubilidad a sales o complejos (uso de detergentes CTAB o CDA con NaCl), diferencias de adsorción a superficies cargadas (uso de columnas de sílica), diferencias en volumen específico (uso de centrifugación con gradiente de densidad) y diferencias en la sensibilidad a enzimas digestivas (uso de proteinasa K). La remoción del ARN se la realiza por procedimientos enzimáticos usando RNasa (Surzycki, 2000).
- **Concentración de ADN:** Después de la remoción de proteínas y ARN, el ADN debe ser concentrado. Este paso tiene dos propósitos: concentrar el ADN de la solución de deproteinización y remover nucleótidos, aminoácidos e impurezas de bajo peso molecular. El proceso se lo realiza precipitando el ADN con alcoholes (etanol o isopropanol), con diálisis o concentrando el ADN usando compuestos que absorban el agua (Surzycki, 2000).
- **Determinación de pureza y concentración del ADN:** Finalmente en este paso se evalúan la pureza, concentración y rendimiento del ADN extraído. La espectrofotometría ultravioleta (UV), fluorometría y comparación de la intensidad de bandas en geles de agarosa es útil para determinar la concentración del ADN. La pureza del ADN sobre las proteínas se calcula al comparar la lectura de la absorbancia a 260 nm y 280 nm (Surzycki, 2000).

1.4.3.2 Extracción de ADN a partir de heces

Las heces son especialmente útiles cuando se estudian a los animales silvestres y en peligro de extinción ya que el muestreo no perturba al animal, y además son fáciles de recolectar y transportar (Terio *et al.*, 2002). Es posible extraer el ADN de los excrementos, debido a que las heces salen impregnadas con células epiteliales del intestino (Wasser *et al.*, 1997), y este ADN extraído (Figura 1.5) puede ser amplificado por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Kohne & Wayne, 1997).

Varias técnicas han sido utilizadas para extraer ADN a partir de heces de animales silvestres. El método de *guanidinium tiocianato sílica* (GuSCN/sílica) (Taberlet *et al.*, 1996; Reed *et al.*, 1997; Eggert *et al.*, 2003; Frantz *et al.*, 2003) emplea columnas de purificación para eliminar contaminantes. El método CTAB, fenol cloroformo y purificación con columnas *Millipore* (Zhang *et al.*, 2006). El método fenol-cloroformo y purificación con columnas *MicroSpin* (Ernest *et al.*, 2000). El método *Chelex 100* (Walsh *et al.*, 1991; Reed *et al.*, 1997, Frantz, 2004). El kit comercial más utilizado es “*QIAamp DNA Stool Mini Kit*”. Los estudios muestran que se puede obtener ADN de buena calidad y cantidad, eliminándose la mayoría de inhibidores de la PCR, produciendo porcentajes altos de amplificación tanto para ADN nuclear como ADN mitocondrial proveniente de excrementos de animales silvestres (Bhagavatula & Singh, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Berry, 2007; Prugh *et al.*, 2005; Echegaray *et al.*, 2008; Jiménez, 2009). Sin embargo es necesario estandarizar un método manual para extraer ADN de las heces, ya que el uso de las técnicas antes mencionadas resulta costoso para la realidad nacional y en muchos de los casos no están disponibles en el laboratorio.

1.4.3.3 Factores que afectan la extracción y amplificación del ADN fecal

Una desventaja importante en la toma de muestras fecales, es que generalmente producen pequeñas cantidades de ADN del individuo de interés, y el ADN existente está a menudo muy degradado y contaminado con material genético exógeno e inhibidores de la PCR como sales biliares, polisacáridos y bilirrubina presentes en las heces (Broquet *et al.* 2007; Taberlet *et al.*, 1999). Esto conduce a una alta tasa de error

en el análisis de microsatélites (genotipificación) y es por ello que se requiere la implementación de procedimientos especiales que garanticen la exactitud de los resultados (Waits & Paetkau 2005).

El éxito de la extracción y amplificación del ADN fecal se ven influenciados por factores extrínsecos no controlables tales como temperatura, humedad, exposición al sol, y otras variables ambientales a las cuales las heces son expuestas antes de la recolección (Farrel, Roman & Sunquist, 2000; Lucchini *et al.*, 2002). En un estudio realizados por Linn (1981), se observó que el ADN en las heces es probablemente afectado por el daño oxidativo, la hidrólisis, y la digestión enzimática. Algunos factores que igualmente influyen en la tasa de error y que pueden ser controlados por el investigador son: el intervalo de tiempo entre la deposición y la recolección, el método de conservación del ADN, la duración de almacenamiento, y las diversas técnicas de laboratorio utilizadas en los protocolos de extracción y PCR (Wasser *et al.*, 1997; Panasci, 2009).

La dieta del organismo también ha sido demostrado que influyen en las tasas de éxito de la genotipificación, debido a inhibidores de la PCR presentes en plantas ingeridas por los animales (Monteiro *et al.* 1997; Kohn & Wayne 1997) y al tejido de animales presentes en las heces (Murphy *et al.*, 2003). Adicionalmente, los resultados pueden variar según la especie y las condiciones ecológicas del lugar, por lo que se debe estandarizar la técnica para un estudio en particular, de este modo la técnica será más eficiente y con menor tasa de error (Piggott, 2004).

1.4.3.4 Métodos de conservación del ADN fecal

En varios estudios (Frantzen *et al.*,1998; Gerloff *et al.*, 1999; Piggott & Taylor, 2003; Frantz, 2004), se observó que el ADN nuclear se conserva mejor en buffer DETs (20% DMSO, 0.25 M EDTA, 100 mM Tris pH 7.5 y NaCl para saturación), mientras que el etanol al 70%, la congelación a -20°C o el secado de las heces en sílice suelen ser preferibles para conservar el ADN mitocondrial. Otros estudios señalan que la conservación con etanol al 95% y 96% igualmente dan buenos resultados para

amplificar *microsatélites*, conservándose el ADN por largos períodos (Zhang *et al.*, 2006; Bosch *et al.*, 2005). El etanol absoluto (100%) también se ha utilizado, y el ADN se conserva durante más tiempo, siendo esto útil ya que en muchos casos las muestras no pueden ser analizadas de inmediato (Wasser *et al.*, 1997; Mukherjee *et al.*, 2007). Por otra parte, el grupo de especialistas de Tapir (Tapir Specialist Group, 2006), no recomienda el uso del etanol para conservar las muestras fecales porque pueden interferir con la extracción de ADN y su amplificación, debido a las diferentes condiciones a las que se exponen los excrementos y a la aplicabilidad en diferentes especies. Todavía no hay un consenso para determinar la técnica de conservación más adecuada (Panasci, 2009).

1.4.4 Marcadores mitocondriales

En animales el ADN mitocondrial (ADNmt) es un genoma extracromosomal circular pequeño, de alrededor de 15-20 kb, compuesto por 37 genes en su mayoría y que carecen de intrones. Estos genes codifican para 22 ARNt, 2 ARNr y 13 ARNm que codifican para proteínas implicadas principalmente en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa de la mitocondrias (Boore, 1999; Larget Simon & Kadan, 2002).

Al utilizarse como marcador molecular el ADN mitocondrial, tiene muchas ventajas: evoluciona más rápido que el ADN nuclear, además distintas regiones del genoma mitocondrial evolucionan a ritmos diferentes permitiendo elegir las regiones adecuadas para los diversos análisis. Otra ventaja es que el ADN no se recombina por lo que permanece intacto en la población ya que es heredado por la madre en la mayoría de especies. Estas características hace que los individuos de la especie tengan una sola historia genealógica a través de los linajes maternos (Hurst & Jiggins, 2005). Además, cada célula tiene más copias del genoma mitocondrial que el ADN nuclear, se ha observado que una típica célula somática contiene entre 500 a 1000 mitocondrias (Jimeno & Hidalgo, 2006). Por último el ADNmt puede ser fácilmente amplificado a partir de una variedad de taxa debido a que la secuencia se puede obtener sin clonación. Todo esto ha hecho que se elija al ADNmt como el marcador molecular ideal en varias

poblaciones, para estudios filogenéticos, taxonómicos y biogeográficos (Hurst & Jiggins, 2005). En carnívoros se han utilizado algunas regiones del ADN mitocondrial en estudios filogenéticos, evolutivos y de identificación de especies (Tabla 1.4).

Tabla 1. 4. Regiones del ADN mitocondrial utilizadas en estudios poblacionales de carnívoros. (Chaves *et al.*, 2012).

Región	Descripción
<i>Cytb</i>	Gen citocromo b
<i>COI</i>	Gen citocromo oxidasa I
<i>ATP6</i>	Gen ATP sintetasa 6 (incluyendo una porción que se sobrepone con ATP8)
<i>CR</i>	Región control del ADNmt
<i>16S</i>	Gen 16S, rRNA

1.4.4.1 Citocromo b (*Cytb*)

El citocromo b es un gen que está implicado en el transporte de electrones de la cadena respiratoria de la mitocondria. La variabilidad de la secuencia de ADN del *Cytb* hace que sea de gran utilidad para la comparación de especies del mismo género o de la misma familia (Green *et al.* 1997; Irwin, 1991). Este gen (Figura 1.5) está ampliamente estudiado en los carnívoros, y se lo ha utilizado en numerosos estudios para identificarlos (Figura 1.6). En cánidos está ampliamente estudiado por lo que es considerado un marcador universal (Castresana, 2001; Chaves *et al.*, 2012).

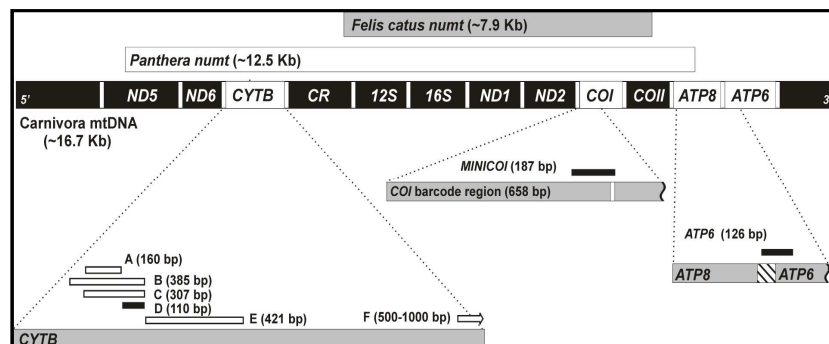


Figura 1. 5. Esquema del ADN mitocondrial en carnívoros. (Chaves *et al.*, 2012).

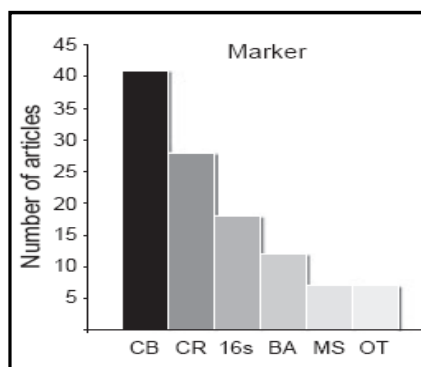


Figura 1. 6. Marcadores moleculares utilizados para la identificación de carnívoros descritos en la bibliografía empleados en diferentes artículos científicos.

El citocromo b (CB) es el marcador que más se ha utilizado para identificar a los carnívoros silvestres. CR = Región control, 16s = Gen 16S, BA = Ácidos biliares, MS = Microsatélites, OT = Otros. (Chaves *et al.*, 2012).

Las secuencias del gen del *Cytb* se han utilizado específicamente para establecer relaciones filogenéticas e identificar grupos taxonómicos en aves (Questiau *et al.*, 1998), en simios (Castresana, 2001), en felinos (Bhagavatula & Singh, 2006) y en cánidos, incluyendo también al lobo de páramo *Lycalopex culpaeus* (Wayne *et al.*, 1997; Wayne, Geffen y Vila, 2004). Este marcador ha sido amplificado con éxito a partir de ADN obtenido de muestras fecales. El alineamiento de estas secuencias ha permitido determinar las variaciones a nivel nucleotídico. De igual manera, esta información se ha utilizado para diseñar cebadores específicos de PCR que permitan identificar a las especies a través de muestreos no invasivos. Varios estudios demuestran la efectividad de estos métodos: Berry (2007) los utilizó para identificar al zorro rojo (*Vulpes vulpes*) especie invasora en Australia; Echegaray *et al.* (2008) usó ADN mitocondrial para identificar a lobos (*Canis lupus*) en el País Vasco; Farrel *et al.* (2000) los usaron en el zorro cangrejero (*Cerdocyon thous*). También se ha utilizado este marcador para identificar a carnívoros endémicos del Japón (Kurose, 2005) y Farrel, Roman & Sunquist (2000) también usó este marcador para identificar al puma (*Puma concolor*) y al jaguar (*Panthera onca*).

1.4.5 Marcadores microsatélites SSR

Son marcadores moleculares microsatélites, conocidos también como *SSR* “*simple sequence repeats*”. Los SSRs presentan segmentos cortos de ADN nuclear de 1 a 6 pares de bases (pb), los cuales se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma de los organismos eucariotas. Presentan algunas ventajas sobre otros marcadores (*RFLP*, *RAPD*) ya que: son altamente polimórficos, presentan herencia mendeliana simple, y son codominantes (pudiéndose diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos), además son fáciles de medir y analizar. Todas estas facultades han hecho que en la actualidad estén considerados, por la mayoría de investigadores como la más poderosa herramienta para los estudios de genética de poblaciones (Cheng & Crittenden, 1994; Guohao, 2003) (Figura 1.7).

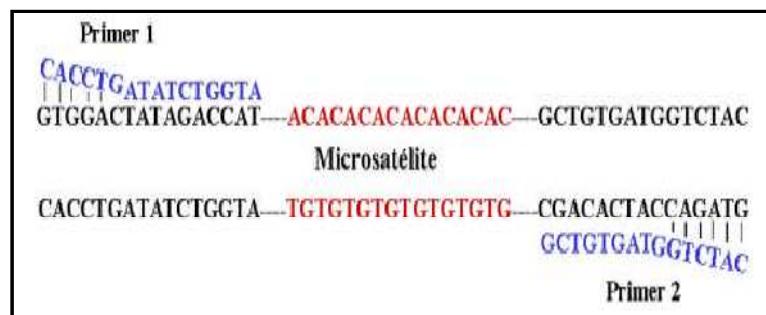


Figura 1. 7. Marcadores microsatélites SSR. Ejemplo de un di-nucleótido A-C(n). (Aranguren & Jordana, 2001).

El uso de microsatélites de ADN nuclear presenta dos ventajas importantes en cuanto a la amplificación de ADN de muestras fecales. La primera su elevada tasa de polimorfismo permite el estudio de la fauna silvestre a nivel individual y poblacional, sin tomar contacto directo con los animales (Gonzalez, 2003). A nivel individual, la identificación de alelos permite asignar a un individuo a un probable grupo de origen, permitiendo análisis de parentesco, paternidad y el análisis de estructura intrapoblacional. Mientras que a nivel poblacional se puede estudiar la pérdida de la variabilidad genética de las poblaciones, evaluando la pérdida de heterocigosidad, pérdida de alelos, cambios en la distribución alélica y variación en las frecuencias alélicas, causados por la reducción severa del tamaño de población debido a la fragmentación de su hábitat y aislamiento, formando cuellos de botella (Godoy, 2009;

González, 2003). La segunda ventaja es que el ADN a ser amplificado por PCR no necesita ser de alta calidad, puede estar en un avanzado estado de degradación y puede encontrarse en cantidades reducidas (González, 2003).

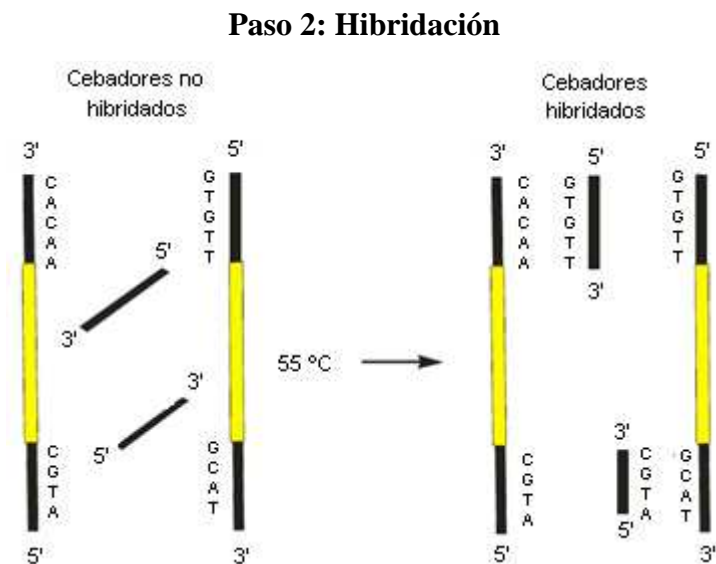
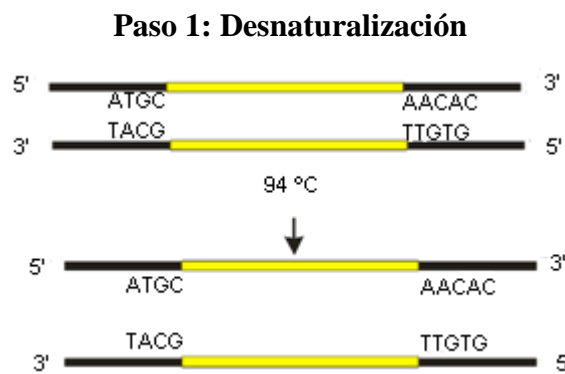
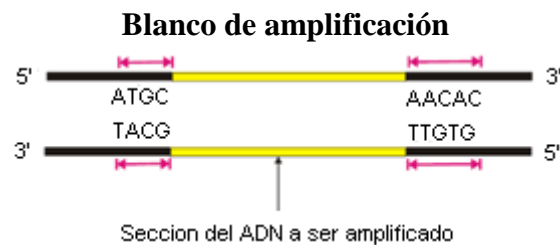
La amplificación ha sido exitosa a partir del ADN fecal en poblaciones de lobos (Echegaray *et al.*, 2007), en zorros de San Joaquín, *Vulpes macrotis mutica* (Smith *et al.*, 2006), y en coyotes (Prugh *et al.*, 2005). También se han identificado varios microsatélites para genotipificación del zorro ártico (*Alopex lagopus*) (Jakubczak, Knaga & Jeżewska, 2009) y para el zorro rojo (Moore, Brown & Sacks, 2010) que podrían ser utilizados en estudios poblacionales.

1.4.6 Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica innovadora de biología molecular desarrollada en 1983 por Kary Mullis que permite la síntesis “*in Vitro*” de ADN. Se puede obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo de ADN blanco. La técnica es tan eficaz que en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento de ADN, para poder amplificarlo (Surzycki, 2000). La PCR estándar se lleva a cabo en 3 pasos fundamentales: desnaturalización, alineamiento y extensión (Figura 1.8).

La desnaturalización consiste en separar la doble hélice de ADN en dos cadenas simples, ya que el sustrato de la Taq polimerasa es el ADN de simple cadena que actúa como molde para la síntesis de su nueva cadena complementaria, este paso se lo realiza calentando la muestra a 94-95°C durante 30 a 60 segundos. El alineamiento consiste en disminuir la temperatura para que los cebadores o primers se unan por complementariedad de bases al ADN molde, normalmente se trabaja con temperaturas de 50-55 °C durante 30 a 60 segundos, tomando en cuenta que un aumento de temperatura favorece la especificidad ya que disminuye las uniones incorrectas de los cebadores con la hebra molde. Finalmente la extensión consiste en la síntesis de una nueva cadena de ADN que va extendiéndose del extremo terminal 3' de los cebadores,

la polimerasa empieza a copiar la hebra, incorporando desoxiribonucleótidos trifosfato (*dNTPs*) en dirección 5'→3', esta etapa se la realiza a 72°C (Barrera *et al.*, 1993, Surzycki, 2000).



Paso 3 Extensión

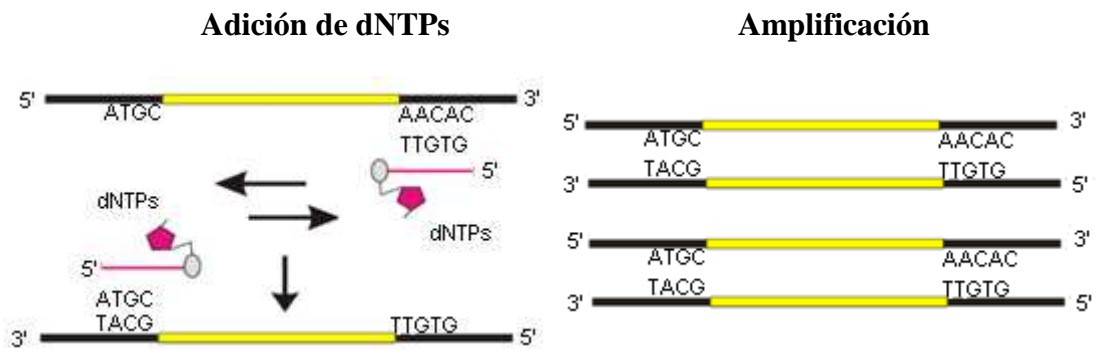


Figura 1. 8. Esquema de la amplificación de ADN por PCR. (Viljoen, Neland & Crowther, 2005)

1.4.7 Sistema de hipótesis o pregunta de investigación

La estandarización de un adecuado protocolo de extracción de ADN a partir de muestras fecales, permitirá obtener ADN de pureza y concentración adecuada para análisis molecular en el lobo de páramo.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

El proyecto fue posible gracias al financiamiento de la Escuela Politécnica del Ejército (ESPE); mediante el proyecto de iniciación científica 2011 titulado “ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA DE HECES DE LOBOS DE PÁRAMO (*LYCALOPEX CULPAEUS*)” y a los fondos internos para docencia de los laboratorios de Biotecnología de la ESPE.

Los ensayos de laboratorio fueron realizados en su totalidad en los Laboratorios de Biotecnología Humana y Animal de la ESPE.

Los controles positivos de lobo de páramo, fueron proporcionados por el Zoológico de Quito en Guayllabamba.

La recolección de muestras fecales se realizó en el Parque Nacional Cayambe-Coca, gracias al Ministerio del Ambiente (Dirección provincial de Pichincha) que facilitó la recolección, mediante la autorización de investigación científica N° 41-2011-IC-FAU-DPAP-MA.

2.2 Zona de Estudio

El proyecto se desarrolló en dos etapas: trabajo de campo y de laboratorio.

2.2.1 Trabajo de campo

Los muestreos se realizaron en el Parque Nacional Cayambe-Coca, que está ubicado al nororiente del país, aproximadamente a 100 km de Quito, ocupando cuatro provincias: Imbabura y Pichincha en la Sierra, Sucumbíos y Napo en la Amazonía. (MAE, 2011).

2.2.2 Trabajo de Laboratorio

Posteriormente las heces se analizaron en los Laboratorios de Biotecnología Animal y Biotecnología Humana de la Escuela Politécnica del Ejército (ESPE), que se encuentran ubicados en Sangolquí, Av. El Progreso, s/n, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha.

2.3 Período de tiempo de la investigación

La presente investigación fue iniciada en el mes de Agosto del año 2011 y finalizada en el mes de Julio del 2012.

2.4 Diseño

Se ha trabajado con un diseño cuasi-experimental planteado en función de los objetivos de la investigación:

- 1) Para la validación de los métodos de extracción de ADN fecal se utilizará una muestra fecal y se realizará por duplicado la extracción para garantizar la reproductibilidad de los métodos empleando además un control negativo para descartar contaminación.
- 2) En la determinación del mejor método de extracción de ADN se utilizara un diseño completamente al azar (DCA) con tres tratamientos que son los métodos de extracción de ADN (SDS/CAI, CTAB/CAI, 2CTAB/CAI) en 5 muestras fecales diferentes; evaluando concentración y pureza del ADN.
- 3) Para evaluar la amplificación del ADN mitocondrial se empleará cebadores específicos para el género *Lycalopex* y se obtendrán los porcentajes de amplificación e intensidad de banda en función de la edad de deposición de las muestras fecales recolectadas.

- 4) En la amplificación de microsatélites se obtendrá el porcentaje de amplificación e intensidad de banda para muestras fecales clasificadas en función de la edad de deposición.
- 5) Se determinará la sensibilidad y especificidad del ensayo.
- 6) Se determinará cual categoría de muestras fecales en función de la edad de deposición es la más adecuada para ser utilizada en estudios moleculares

2.5 Procedimiento

2.5.1 Obtención de controles positivos

Se tomaron dos muestras de sangre y tres de heces frescas de una pareja de lobos de páramo que se encuentran albergados en el Zoológico de Quito (Figura 2.1). El personal del zoológico fue el encargado de la toma de muestras. Se tomó en cuenta, además, la dieta de los lobos, que está basada en carnes rojas y sardina, ya que el tipo de alimento influyen en el método de conservación y extracción de ADN fecal (Jiménez, 2009). Para la recolección de las muestras fecales se utilizó una paleta de madera estéril, se recogió las heces más frescas encontradas en la jaula del zoológico y se las colocó en una caja plástica bien etiquetada. La toma de muestras sanguíneas se realizó de acuerdo al protocolo establecido por el zoológico, para ello primeramente se anestesió a los lobos macho y hembra, se desinfectó el área de la vena con alcohol antiséptico y mediante una punción en la vena cefálica se procedió a recolectar 2 ml de sangre a cada individuo, la sangre se depositó en tubos con anticoagulante EDTA. Las muestras tanto sanguínea como heces fueron transportadas en una nevera portátil y se almacenaron en el laboratorio de Biotecnología de la ESPE a -20°C hasta su posterior análisis.

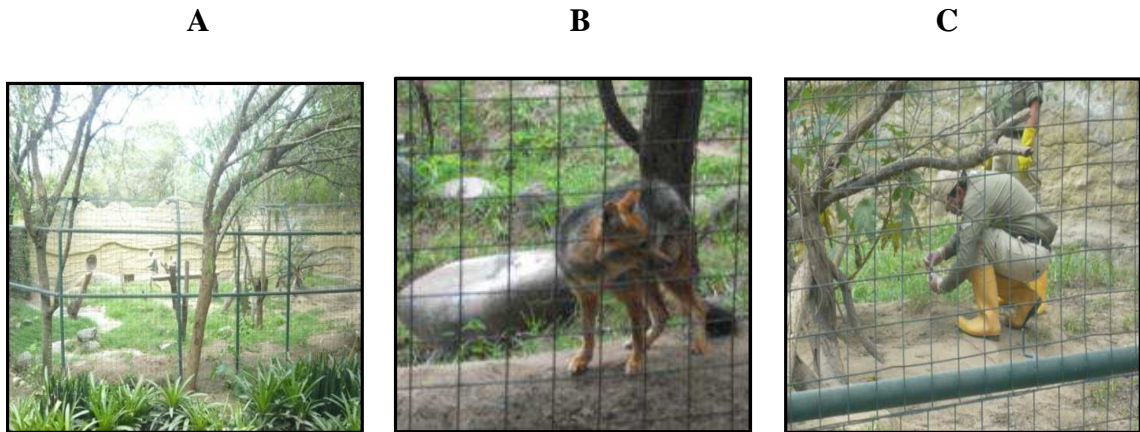


Figura 2. 1. Recolección de muestras sanguíneas y fecales de una pareja de lobos de páramo del zoológico de Quito en Guayllabamba.

(A) Jaula de los lobos. (B) Lobo de páramo. (C) Recolección de heces.

2.5.2 Obtención de controles negativos

Se procedió a recolectar una muestra sanguínea de los siguientes animales: perro (*Canis lupus familiaris*), pariente cercano al lobo de páramo (familia Canidae); conejo doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) pariente cercado del conejo de monte (*Sylvilagus brasiliensis*) y gallina doméstica (*Gallus gallus*), presas del lobo de páramo según Trujillo & Trujillo (2007), (familia Leporidae y Phasianidae respectivamente) y una muestra de pelo de gato (*Felis catus*), pariente cercano del puma (familia Felidae) para extraer su ADN y realizar los ensayos de especificidad de la amplificación por PCR del ADN de lobo de páramo.

2.5.3 Recolección de muestras fecales en los páramos del Parque Nacional Cayambe-Coca

La recolección de excretas se realizó durante los meses de octubre, noviembre de 2011 y febrero de 2012 en páramos del Parque Nacional Cayambe-Coca a partir de los 3.000 metros sobre el nivel del mar. En el proceso de colecta se utilizaron guantes de nitrilo para evitar contaminación. Las heces se colocaron en fundas de plástico ziploc © etiquetadas con la siguiente información: sitio de muestro, fecha, código de la muestra, coordenadas y categoría (Anexo A). Se reconoció a los excrementos en función de las

características que presentan las heces de los zorros (Anexo B), midiendo además su diámetro con un calibrador (Figura 2.3). Se realizó los muestreos en 6 sitios diferentes del área protegida y se probó dos métodos de muestreo para localizar a los excrementos; el conteo de heces en un transecto lineal de deposición de aproximadamente 2.5 km en carretera en una solo sitio (T) y el conteo de heces en distintos sitios (1,2,3,4,5) de aproximadamente 500 m² cada una, conocido este muestreo como conteo de heces en un área superficial (Gese, 2004), para lo cual se emplearon de 3 a 4 personas para localizar las heces (Figura 2.2 y Figura 2.3A y 2.3B). Adicionalmente, las heces fueron fotografiadas colocando una regla de 20 cm que sirvió de referencia del tamaño de las heces y georeferenciadas utilizando un GPS GARMIN eTrex® 12 Channel. Finalmente se las transportó en una nevera portátil para luego ser almacenadas a -20°C en el laboratorio de Biotecnología de la ESPE hasta que su posterior extracción de ADN.

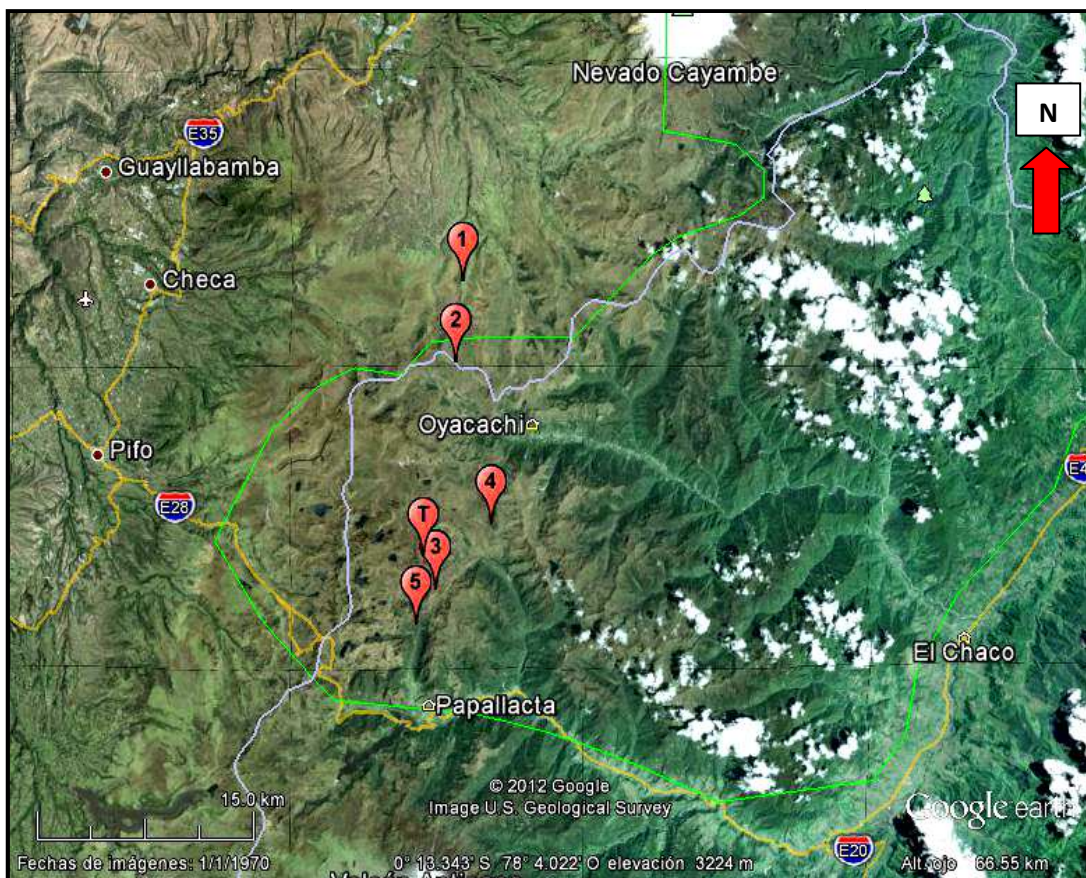


Figura 2. 2. Mapa de los sitios de muestreo en el Parque Nacional Cayambe-Coca.

(1) Área 1. (2) Área 2 (3) Área 3. (4) Área 4. (5) Área 5. (T) Área 6 = Transecto. Google earth. Versión 6.2. (Microsoft Windows, 2012).

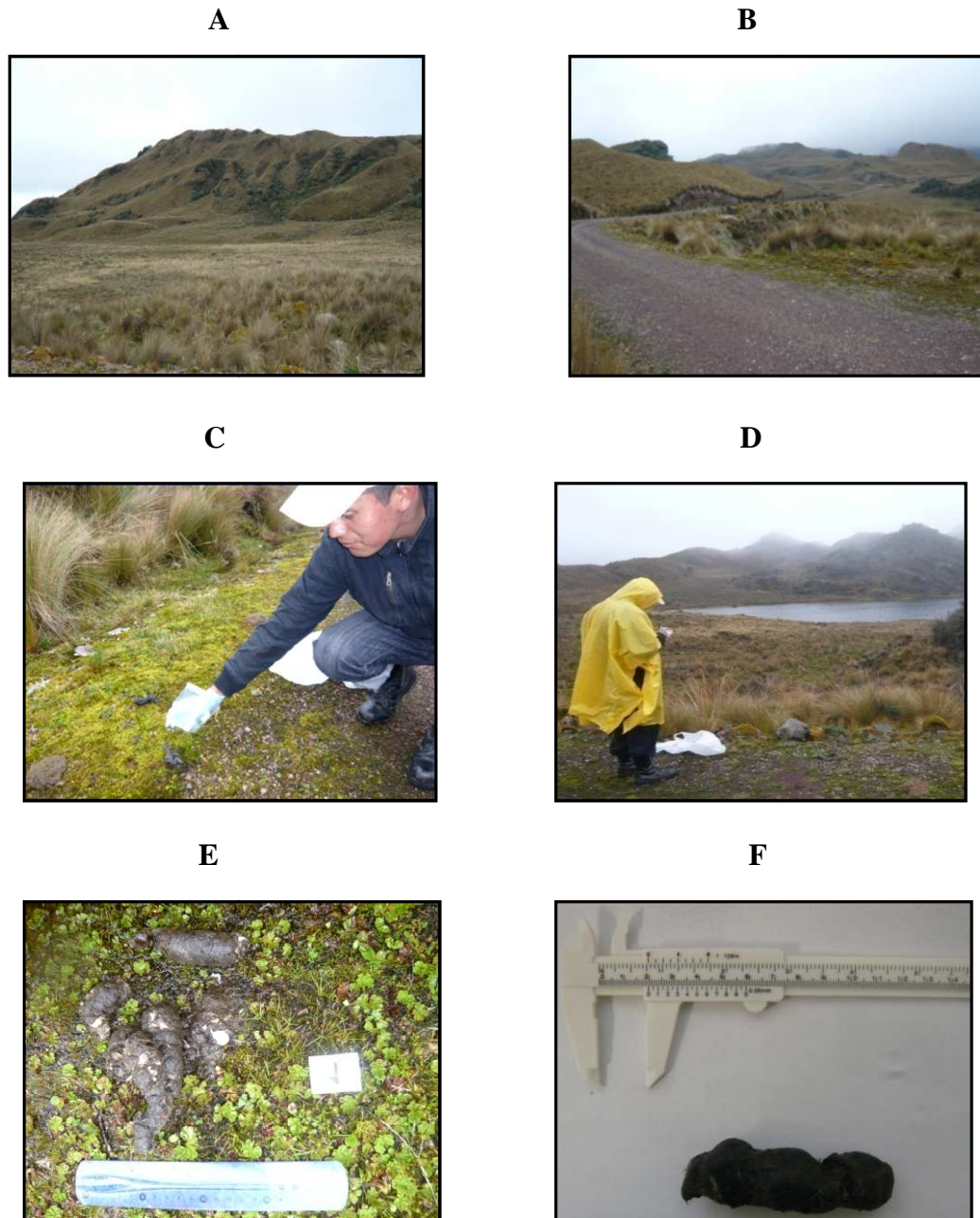


Figura 2. 3. Recolección de muestras fecales en los páramos del Parque Nacional Cayambe-Coca.

(A) Transecto lineal de deposición de 3 km. (B) Conteo de heces en un área superficial de aproximadamente 1 km². (C) Recolección de excrementos. (D) Etiquetado de la muestra. (E) Muestra fecal recolectada. (F) Medición del diámetro de una muestra fecal. El calibrador marca 2 cm.

La clasificación de las muestras fecales en función de la edad de deposición se basó en características externas que combinan el color y el brillo de la capa externa de la muestra fecal. Estas características son diferentes para muestras frescas y viejas

(Palacios, 2007). Dado que no se puede determinar el tiempo exacto que estuvo la muestra en el páramo después de la deposición; se estimó la edad de la muestra en 48 horas para muestras frescas y 7 días hasta 3 meses para muestras semifrescas y residuos (Mukherjee *et al.*, 2007) (Tabla 2.1).

Tabla 2. 1. Clasificación de las heces en función de la edad de deposición de la muestra fecal. Adaptado para muestras fecales de lobo de páramo. (Mukherjee *et al.*, 2007 & Palacios, 2007).

Categoría	Características	Edad de deposición estimada
Frescas ¹	Heces de zoológico	Recolectadas directamente de la jaula por lo que se asume que son frescas; y el tiempo de deposición de las mismas sería de pocas horas. Presentan una textura blanda, brillante e íntegra.
	Heces de páramo	Presentan una textura blanda, brillante e íntegra por lo que se asume que son frescas (se recolectó en días nublados).
Semifrescas húmedas ¹	Heces de páramo	Presentan una textura dura, húmeda y color opaco o gris (se recolectó en días nublados). No se podía saber el tiempo que estuvieron en el páramo después de la deposición; sin embargo se encontraban íntegras.
Semifrescas secas ¹	Heces de páramo	Presentan una textura dura, seca y color opaco o gris (se recolectó en días soleados). No se podía saber el tiempo que estuvieron en el páramo después de la deposición; sin embargo se encontraban íntegras.
Residuos ¹	Heces de páramo	Se observó solo pequeños residuos de las heces., y se desconoce el tiempo que han transcurrido en el páramo, pero se asumió que es mayor al tiempo de las anteriores clasificaciones por su grado de degradación (se recolectó en días nublados).

¹ La presencia de hueso y pelo se observó en todas las categorías de heces recolectadas en el páramo, puede tratarse de posibles presas como el conejo de monte (*Sylvilagus brasiliensis*) o roedores

2.5.4 Validación de los tres métodos de extracción de ADN fecal

En esta investigación, se emplearon tres técnicas manuales de extracción de ADN fecal aplicadas para otros mamíferos y que fueron encontradas en la bibliografía, por lo que no son específicas para muestras fecales de lobo de páramo. Por esta razón, se realizaron ensayos hasta obtener extracción positiva de ADN de las heces de lobo de páramo. En estos ensayos se probó de manera específica como varía la extracción, empleando o no un pretratamiento de las heces con suero fisiológico, aplicando de 1 a 3 lavados y cambiando las condiciones de conservación de la muestra fecal: con y sin etanol. En la validación además, se utilizó una muestra fecal recolectada en el páramo y que estuvo almacenada durante dos meses y medio a -20 °C en el laboratorio de

Biología de la ESPE. Cada extracción de ADN se realizó por duplicado para garantizar la consistencia y reproducibilidad del método, empleando además un control negativo (en lugar de heces se colocó agua), para evaluar contaminación.

2.5.4.1 Conservación de las muestras fecales

Todas las muestras fecales fueron conservadas en congelación a -20 °C sin la adición de ningún preservante para evitar la degradación del ADN (Tapir Specialist Group, 2006; Vargas, 2009). Para evaluar la influencia del etanol en la conservación de la muestra y en la posterior extracción de ADN, una muestra fecal fue conservada a -20°C adicionándole etanol, en una relación de 5ml etanol por 1 g excremento de (Wasser *et al.*, 1997) y sin la adición de etanol.

2.5.4.2 Pretratamiento de las muestras fecales antes de extraer su ADN

Se modificó el método empleado por Tang *et al.* (2008), el cual extrajo ADN de excrementos de cerdos realizando un lavado previo con la buffer salinas PBS. Para la extracción de ADN de muestras fecales de lobo de páramo, se utilizó para el lavado de las heces otra buffer salina; el suero fisiológico inyectable, utilizando la relación excremento/suero (1g:5ml) empleado anteriormente por (Wasser *et al.*, 1997). Se pesó 4 g de heces descongeladas y se homogenizó con 20 ml de suero fisiológico en tubos Falcon® de 50 ml. Posteriormente se colocó 600 µl de solución en un microtubo de 2 ml y se centrifugó a 10.000 rpm por 5 min, se repitió este paso y se almacenó a -4 °C por 12 horas. Finalmente, se homogenizó y se centrifugó a 10.000 rpm por 5 min, desechando el sobrenadante y dejando el pellet listo para iniciar la extracción de ADN.

2.5.4.3 Extracción manual de ADN fecal, método dodecil sulfato de sodio/cloroformo-álcool isoamílico (SDS/CAI)

Se utilizó el método empleado para la extracción de ADN fecal humano en células cancerosas del colon propuesto por Abbaszadegan *et al.* (2007). Se modificó la lisis

celular para muestras fecales del lobo de páramo de la siguiente manera: se adicionó 1ml de buffer de lisis (Tris-HCl 200 mM; EDTA 70 mM; NaCl 0.2M; SDS, 0.5 %; pH 9.0) y 10µl de proteinasa K, luego se incubó a 60 °C por 2 horas y a 95 °C por 15 min, removiendo el material contaminante por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un microtubo de 2 ml y se colocó 1 ml de etanol (100 %) frío, incubando a -20 °C por 30 min para precipitar el ADN. Posteriormente se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 500 µl de TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8) y se incubó a 67 °C por 15 min. También se modificó la extracción orgánica y purificación del ADN. Se colocó 700 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) a la solución y se homogenizó por 30 min. Finalmente se modificó la concentración del ADN de la siguiente manera: se precipitó con 1 ml de etanol absoluto frío por 12 horas, se realizó un lavado con 500 µl de etanol al 70% y se resuspendió el pellet de ADN en 50 µl de TE (pH 8) a 67 °C por 30 min. El ADN se almacenó a -80 °C para posteriores análisis.

2.5.4.4 Extracción manual de ADN fecal, método bromuro de cetiltrimetilamonio/cloroformo-alcohol isoamílico (CTAB/CAI)

Se utilizó el método empleado para la extracción de ADN de heces de monos aulladores del Brasil (*Alouatta caray*) propuesto por Oklander *et al.* (2004). Se modificó la lisis celular para muestras fecales del lobo de páramo de la siguiente manera: se adicionó 1 ml de buffer de lisis (CTAB 2%, Tris-HCL 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M; pH 7.5) y 10µl de proteinasa K, luego se incubó a 60 °C por 2 horas y a 95 °C por 15 min. Posteriormente se adicionó 5 µl de RNasa y se incubó por 1 hora a 37 °C, removiendo el material contaminante por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min. También se modificó la extracción orgánica y purificación del ADN. Se colocó 700 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) a la solución y se homogenizó por 30 min. Finalmente se modificó la concentración del ADN de la siguiente manera: se precipitó con 1 ml de etanol absoluto frío por 12 horas, se realizó un lavado con 500 µl de etanol al 70% y se resuspendió el pellet de ADN en 50 µl de TE (pH 8) a 67 °C por 30 min. El ADN se almacenó a -80 °C para posteriores análisis.

2.5.4.5 Extracción manual de ADN fecal, método 2 bromuro de cetiltrimetilamonio/cloroformo-álcohol isoamílico (2CTAB/CAI)

Se utilizó el método empleado para la extracción de ADN a partir de heces de primates del mediterráneo (*Macaca sylvanus*) y gorilas (*Gorilla g. gorilla*) propuesto por Vallet *et al.* (2008). Se modificó la lisis celular para muestras fecales del lobo de páramo de la siguiente manera; se adicionó 1 ml de buffer de lisis (CTAB 2%, Tris-HCL 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M; pH 7.5) y 10 µl de proteinasa K, luego se incubó a 60 °C por 2 horas y a 95 °C por 15 min. En seguida se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min y se colocó el sobrenadante en un nuevo microtubo de 2 ml. Se modificó la primera extracción orgánica y purificación del ADN; se colocó 700 µl de cloroformo/álcohol isoamílico (24:1) a la solución y se homogenizó por 30 min. Se colocó el sobrenadante en un nuevo microtubo de 2 ml, se adicionó 100 µl de buffer de lisis (CTAB 10%, NaCl 0.5M, pH 5.5) y se incubó a 60 °C por 30 min. Adicionalmente se colocó 5 µl de RNasa y se incubó a 37 °C por 1 hora. También se modificó la segunda extracción orgánica y purificación del ADN; se colocó 700 µl de cloroformo/álcohol isoamílico (24:1) a la solución y se homogenizó por 30 min. Finalmente se modificó la concentración del ADN de la siguiente manera: se precipitó con 1 ml de etanol absoluto frío por 12 horas, se realizó un lavado con 500 µl de etanol al 70% y se resuspendió el pellet de ADN en 50 µl de TE (pH 8) a 67 °C por 30 min. El ADN se almacenó a -80 °C para posteriores análisis.

2.5.5 Extracción de ADN de controles positivos y negativos

2.5.5.1 Extracción de ADN a partir de sangre total

El ADN de las muestras sanguíneas de lobo de páramo macho, hembra, que fueron los controles positivos y parte de los controles negativos: perro, conejo y gallina fue extraído utilizando el método cloroformo-álcohol isoamílico, utilizado rutinariamente en el Laboratorio de Biotecnología Humana, modificado por Grijalva (2006), del Centro de Terapia Génica, Brno, República Checa (datos sin publicar) para extraer ADN a partir de sangre total.

2.5.5.2 Extracción de ADN a partir de pelo

Debido a lo complicado que resulta la extracción de sangre a felinos, se optó por extraer el ADN de un gato doméstico a partir de una muestra de pelo. Se utilizó el método 2CTAB/CAI estandarizado para heces, realizando modificaciones en la lisis celular: utilizando 200 mg de pelo, aumentando a 1.5ml la buffer de lisis (CTAB 2%, Tris-HCL 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M, pH 7.5), la proteinasa K a 20 μ l en lugar de 10 μ l e incubando la buffer de lisis y el pelo a 100 °C en lugar de 95 °C. A partir de este paso se siguió el mismo procedimiento empleado en el método 2CTAB/CAI para muestras fecales.

2.5.6 Determinación del mejor método de extracción de ADN fecal

Se extrajo el ADN de 5 muestras fecales por duplicado y se analizó el mejor método de extracción de ADN; evaluando su integridad, concentración y pureza. Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) (Tabla 2.2). Los datos obtenidos fueron analizados en el software estadístico InfoStat versión 2010 (Di Rienzo *et al.*, 2010). A partir del programa se obtuvieron los resultados del análisis de varianza (ANOVA) y valores promedios de los métodos de extracción de ADN fecal empleados. En el caso de contar con valores significativos para el análisis de varianza, se aplicó la prueba de Tukey.

Tabla 2. 2. DCA, para elegir el método de extracción de ADN fecal.

Unidad experimental	Variables Independientes	Variables Dependientes (De respuesta)	Variables Intervinientes (Contaminadoras)
600 μ l de solución ADN y suero fisiológico.	Método de extracción de ADN: Tratamiento 1: SDS/CAI. Tratamiento 2: CTAB/CAI. Tratamiento 3: 2CTAB/CAI.	Concentración de ADN extraído en los tratamientos. Pureza del ADN, absorbancia a 260/2680 nm.	Temperatura, humedad, exposición al sol, factores a los que las heces están expuestas antes de la recolección.

2.5.7 Estandarización del método de extracción de ADN para muestras fecales recolectadas en el zoológico de Quito

Para la extracción de ADN en las tres muestras fecales del zoológico, se estandarizó nuevamente el método 2CTAB/CAI, para ser luego utilizado en la extracción de estas muestras. Se utilizó una muestra fecal fresca de lobo de páramo recolectada en el zoológico de Quito y que estuvo almacenada durante 6 meses a -20°C . Se realizaron 3 y 4 repeticiones para obtener más ADN para los ensayos de PCR. Por lo que se incrementó los lavados con suero fisiológico (5 en lugar de 3), se adicionó el doble de cantidad de proteinasa K (20 μl en vez de 10 μl) y RNasa (20 μl en vez de 10 μl), se dejó inmerso con el suero fisiológico las heces por 6 días en lugar de 12 horas para lavar mejor la muestra fecal y finalmente se precipitó el ADN con el etanol durante 12 horas.

2.5.8 Evaluación de la eficacia del protocolo de extracción de ADN fecal

Se utilizó el método 2CTAB/CAI para la extracción de ADN fecal de todas las muestras fecales recolectadas en el Zoológico de Quito y en el Parque Nacional Cayambe-Coca. Y se comparó la concentración y pureza del ADN extraído para las 4 categorías de heces recolectadas en función de su edad de deposición.

2.5.9 Determinación de integridad, pureza y concentración del ADN extraído

2.5.9.1 Electroforesis en geles de agarosa

Se utilizó la electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % para visualizar la presencia e integridad del ADN extraído. La visualización de resultados se realizó en un fotodocumentador UVP BioDoc-It™ System con luz ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 365 nm.

2.5.9.2 Cuantificación de ADN mediante fluorimetría

Para medir la concentración de ADN extraído se empleó el kit *Qubit™ dsDNA HS Assay Kits*, de la casa comercial Invitrogen™. Las mediciones se las realizó en el fluorómetro Qubit® 2.0 para una cuantificación rápida y precisa del ADN, se utilizó el procedimiento sugerido en el manual (Invitrogen Corp., 2010a).

2.5.9.3 Determinación de la pureza del ADN y cuantificación en espectrofotómetro

Para medir la pureza del ADN en relación a la contaminación con proteínas, se utilizó la relación de absorbancia a 260/280 nm, siendo un ADN puro el que más se aproxime al valor de 2 (Surzycki, 2000). También se realizó la medición de la concentración de ADN de las muestras fecales que no pudieron ser cuantificadas por el Kit de cuantificación *Qubit™ dsDNA HS Assay Kits*. Las mediciones se las realizó en el espectrofotómetro NanoVue™ Plus siguiendo el procedimiento sugerido en el manual (NanoVue™, 2010).

2.5.10 Amplificación del ADN mitocondrial por PCR

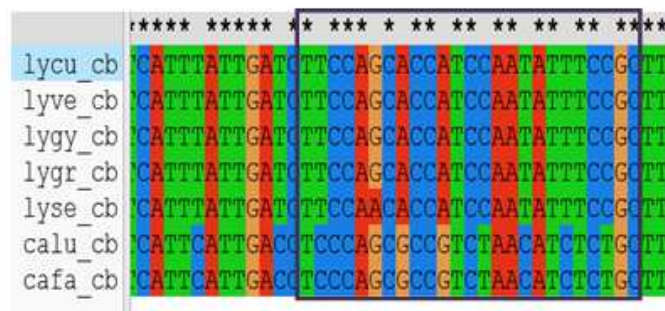
Para evaluar si el ADN mitocondrial extraído de las muestras fecales por el protocolo de extracción es apropiado para amplificarlo, se utilizó una PCR para amplificar un fragmento de 200 pb del citocromo b.

2.5.10.1 Diseño de cebadores (primers)

En la actualidad no se ha secuenciado completamente el genoma del lobo de páramo y no se ha podido detectar algún gen o secuencia de ADN conservada específica para esta especie, lo que dificulta realizar un ensayo de amplificación PCR para poder

identificar a la especie. Por tal motivo se recurrió a la búsqueda de secuencias del ADN mitocondrial del lobo de páramo y de otras especie relacionadas evolutivamente con la finalidad de hallar regiones conservadas para la especie, las secuencias de ADN fueron buscadas en la base genética del GenBank (NIH, 2012). Gracias a estudios filogenéticos de cánidos (Wayne *et al.*, 1997) se obtuvo la secuencia parcial de ADN del gen del citocromo b (*Cytb*) del lobo de páramo (GenBank: AF028151.1, Anexo N). Utilizando la herramienta bioinformática ClustalX versión 2.0 (Larkin, 2007), se realizó un alineamiento entre las secuencias del *Cytb* de las especies del género *Lycalopex* (*L. vetulus*, *L. gymnocercus*, *L. griseus* y *L. sechurae*) así como del lobo (*Canis lupus*) y para el perro doméstico (*Canis lupus familiaris*). Encontrando dos regiones conservadas solo para el género *Lycalopex* que no estaban presentes en el perro o el lobo (Figura 2.3), en base a esta información se diseñó 2 primers específicos para el género *Lycalopex*; LC-CYTB-F (5'-TTCCAGCACCATCCAATATTTCCGC-3') y LC-CYTB-R (5'- GGCGCCGTTTGCATGTATGTAACG-3') utilizando la herramienta bioinformática Primer BLAST versión 2009 (NCBI, 2012a), estos cebadores amplifican un fragmento de 200 pb de ADN mitocondrial (Tabla 2.4). Los primers diseñados fueron analizados en OligoAnalyzer 3.1 versión 2012 (Integrated DNA Technologies, 2012) para comprobar su diseño y además se analizó su homología en BLAST versión 2012 (NCBI, 2012b); estos análisis demostraron que los primers diseñados son específicos para el género *Lycalopex* (Anexo O, P, Q). Los primers fueron sintetizados por la casa comercial Invitrogen™.

A



Posteriormente se encontró la temperatura de hibridación o annealing de los primers (Ta), calculada con la siguiente fórmula:

$$Ta = Tm - 5$$

Y se realizó un ensayo con gradiente de temperaturas para encontrar a que temperatura hibridan mejor los primers (Tabla 2.4). El ensayo se realizó en un volumen de reacción de 50 µl, utilizando 5µl de ADN blanco, 1.0 µM por cada primer, 100 µM de cada dNTPs, 2.5 mM de MgCl₂, 1x Buffer PCR (Invitrogen™), 2.5 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen™) y agua PCR libre de nucleasas. El programa utilizado en el termociclador de gradiente Techne-TC-512 constó de una desnaturalización inicial de 96 °C por 4 minutos; 35 ciclos de: desnaturalización a 96 °C por 30 segundos, temperaturas de alineamiento por 30 segundos, extensión a 72 °C por 30 segundos; seguido de una extensión final de 72 °C por 4 minutos y un último paso para detener la reacción a 4 °C por 10 minutos.

Tabla 2. 4. Temperaturas de hibridación de los primers para amplificar el *Cytb* en el material genético el lobo de páramo.

Primer	Tm ¹ calculada [°C]	Tm promedio [°C]	Ta ² calculada [°C]	Gradiente de temperatura [°C]
LC-CYTB-F	74	74	69	60.8-62.1-66.6-68.3
LC-CYTB-R	74			

¹Tm: Temperatura de fusión o melting del ADN.

²Ta: Temperatura de hibridación o annealing de los primers.

2.5.10.2.2 Ensayo de adyuvantes en muestras fecales

Una vez encontrada la temperatura de alineamiento de los primers, se ensayó la PCR con el ADN obtenido de una muestra fecal de lobo de páramo recolectada en el zoológico. Se realizó este ensayo para determinar si es posible amplificar ADN mitocondrial de las muestras fecales y se utilizó como adyuvante albúmina sérica bovina (BSA) acetilada (BSA-acety) y sin acetilar (BSA-FV) a 0.1 µg/µl. La reacción de PCR estandarizada para muestras fecales utilizando Taq polimerasa (Invitrogen™) o Taq

polimerasa FLMNH¹, se realizó en un volumen de 50 µl a las siguientes concentraciones (Tabla 2.5). Para la amplificación se utilizó el termociclador Swift maxi modelo MX-BLC-4 (ESCO, Singapur) empleando un programa de amplificación específico para el ADN mitocondrial del lobo de páramo en muestras fecales (Tabla 2.6).

Tabla 2. 5. Concentración de reactivos en la PCR optimizada para la amplificación del *Cytb* en muestras fecales de lobo de páramo.

Reactivo	Concentraciones de Reactivos	Concentraciones Empleadas	Volumen por reacción, 1X (µl)
LC-CYTB-F	100 pmol/µl	20 pmol/50µl	0.2
LC-CYTB-R	100 pmol/µl	20 pmol/50µl	0.2
dNTPs	20 mM	0.4 mM	1
MgCl ₂	50 mM	2.5 mM	2.5
Buffer	10X	1X	5
BSA	2.5 µg/µl	0.1 µg/µl	2
Taq polimerasa (Invitrogen™),	5.0 U/µl	2.5 U/µl	0.5
Taq polimerasa FLMNH	5.0 U/µl	2.0 U/µl	0.4
H ₂ O (Grado PCR)	-	-	35.6
Volumen del master mix por reacción			45 µl
Volumen total de reacción (añadiendo 5 ul de ADN)			50 µl

Tabla 2. 6. Programación del termociclador para la amplificación del *Cytb* en muestras fecales de lobo de páramo.

No. de ciclos	Proceso	Temperatura [°C]	Tiempo
1	Desnaturalización Inicial	96	4 min
35	Desnaturalización	96	30 s
35	Alineamiento	66.6	30 s
35	Extensión	72	30 s
1	Extensión Final	72	4 min
1	Detener la reacción	4	10 min

2.5.10.3 Ensayo de Sensibilidad

Se realizó el ensayo de sensibilidad analítica para evaluar el límite de detección de ADN mitocondrial para la amplificación PCR de muestras fecales de lobo de páramo. Se realizaron diluciones seriadas de ADN, a 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶, 1:10⁷, partiendo de una concentración de ADN de 20 ng/µl. (Tabla 2.7). La reacción de PCR se realizó en un volumen de 50 µl utilizando 5µl de ADN fecal (Tabla 3.3).

¹ Taq polimerasa (FLMNH) fue producida en el laboratorio de Sistemática Molecular y Genética Evolutiva del Museo de Historia Natural de Florida (FLMNH) a través de cepas de *E.coli* que contienen el gen *Taq*.

Tabla 2. 7. Diluciones seriadas de ADN fecal, ensayo para amplificar el *Cytb*.

Diluciones	Concentración de ADN [ng/μl]	Masa de ADN ¹ [pg]
1	20	100000
1:10	2	10000
1:10 ²	0.2	1000
1:10 ³	0.02	100
1:10 ⁴	0.002	10
1:10 ⁵	0.0002	1.0
1:10 ⁶	0,00002	0.10
1:10 ⁷	0.000002	0.010

¹Se amplificó 5 μl de ADN a una concentración de 20 ng/μl, teniendo en la reacción PCR 100 ng de ADN equivalentes a 10000 pg.

2.5.10.4 Ensayo de Especificidad

Para evaluar la especificidad de los cebadores diseñados en este proyecto para el género *Lycalopex*, y de esta manera determinar que solo se amplifica el ADN de lobo de páramo y no amplifica ADN de otros cánidos, posibles presas o de otros depredadores como el puma (*Puma concolor*). Se realizó un ensayo de PCR con el ADN obtenido de la pareja de lobos del zoológico, versus los siguientes animales (controles negativos): (*Canis lupus familiaris*), pariente cercano al lobo de páramo (familia Canidae); conejo (*Oryctolagus cuniculus*) y gallina (*Gallus gallus*), presas del lobo de páramo (familia Leporidae y Phasianidae respectivamente) y gato (*Felis catus*), pariente cercano del puma (familia felidae). Para el ensayo se empleó el procedimiento usado para amplificar ADN de muestras sanguíneas de lobo empleando 2.5 U de Taq polimerasa FLMNH (Sección 2.5.10.2.1).

2.5.10.5 Amplificación de todas las muestras fecales recolectadas

Se probó la técnica estandarizada de PCR, empleando Taq polimerasa FLMNH (Sección 2.5.10.2.2), para la amplificación de todas las muestras fecales recolectadas en el zoológico de Quito y en el Parque Nacional Cayambe-Coca. Adicionalmente se utilizaron 17 muestras fecales para evaluar la amplificación de su ADN mitocondrial utilizando 1 U de Taq platinum (Invitrogen™). Se utilizó las concentraciones de reactivos estandarizados para muestras fecales (Tabla 2.5).

2.5.10.6 Visualización de Resultados

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2% mediante corrida electroforética durante 1 hora a 100 V y 300 mA. Se empleó un marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen™) que permitió determinar el tamaño de las bandas. Se tomaron fotos de los geles en un transiluminador UVP BioDoc-It™ System con luz UV.

2.5.11 Amplificación de microsatélites en ADN nuclear por PCR

Para evaluar si el ADN nuclear de lobo de páramo extraído por el protocolo a partir de heces, es apto para ser amplificado por PCR se realizaron ensayos con 5 microsatélites identificados en otros zorros.

2.5.11.1 Elección de microsatélites

Se utilizaron 3 microsatélites de los 31 utilizados por Moore *et al.*, (2010), en el estudio de genotipificación del zorro rojo (*Vulpes vulpes*) y 2 microsatélites de los 15 identificados por (Li *et al.*, 2011) en el zorro tibetano (*Vulpes ferrilata*) (Tabla 2.8). Se eligió a estos microsatélites por presentar mayor polimorfismo de acuerdo a los resultados observados en las investigaciones originales. Los primers utilizados para amplificar los microsatellites fueron sintetizados por la casa comercial Invitrogen™ y Eurotins mwg operon. La reconstitución de los primers se realizó añadiendo agua PCR libre de nucleasas hasta llegar a una concentración del primer de 100 pmol por μ l a una temperatura de 4 °C durante 24 horas. Después de este tiempo se almacenaron a -20 °C para evitar su degradación.

Tabla 2. 8. Microsatélites utilizados en el material genético del lobo de páramo.

Locus	Repetición	Secuencia de primer	Alelos	Tamaño
AHT121 ¹	(CA) ₂₂	F-TATTGCGAATGTCACTGCTT R-ATAGATACACTCTCTCTCCG	9	85-111
CPH8 ¹	(CA) ₂₁	F-TGCTCAATTGATTAGTCCGTCT R-TAGATTTGATACCTCCCTGAGTCC	8	168-188
CPH2 ¹	(GT) ₂₉	F-TTCTGTTGTTATTGGCACCA R-TTCTTGAGAACAGTGCCTTCG	8	93-111
P08 ²	(GT) ₁₇	F- ATTCTGGACCAATGAGGC R- GGAGGGGAGGAAGGATA	15	170-210
P01i ²	(GT) ₁₉	F- GGGGACCTCAAGAATGT R- TGTCTCATCAATGCCAAG	15	164-232

¹Fuente: Moore *et al.* (2010).

²Fuente: Li *et al.* (2011).

2.5.11.2 Optimización de la PCR

2.5.11.2.1 Temperatura de hibridación de los primers (Ta)

Se realizó los ensayos PCR con el ADN obtenido de la sangre del lobo macho del Zoológico de Quito. Se calculó la temperatura de fusión (Tm) de los primers y se ensayó realizando un gradiente de temperaturas para encontrar la temperatura óptima de hibridación (Ta) de los primers (Tabla 2.10). La amplificación de los microsatélites se realizó en un volumen de reacción de 25 µl, utilizando 5µl de ADN blanco con 1 U de Ta polimeras (FLMNH) en el primer ensayo y 2.5 U de ADN blanco con 1 U de Taq polimerasa platinum, (InvitrogenTM)² en el segundo ensayo, 1.0 µM por cada primer, 100 µM de cada dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 1x Buffer PCR (InvitrogenTM), y agua PCR libre de nucleasas. El programa utilizado en el termociclador de gradiente Techne-TC-512 fue el siguiente (Tabla 2.9):

² Taq polimerasa platinum (InvitrogenTM) posee una propiedad de anticuerpo que bloquea la actividad polimerasa a temperatura ambiente. Esta actividad es restaurada después de la denaturación a 94°C, proporcionando a la enzima una actividad “Hot Start” automática. La actividad Hot Start incrementa la sensibilidad, especificidad y rendimiento de la PCR, además reduce los requerimientos de optimización de la reacción (Invitrogen Corp., 2010b).

Tabla 2. 9. Programación del termociclador para la amplificación de cinco microsatélites en el material genético del lobo de páramo en muestras sanguíneas.

No. de ciclos	Proceso	Temperatura [°C]	Tiempo
1	Desnaturalización Inicial	94	5 min
35	Desnaturalización	94	30 s
35	Alineamiento	N ¹	40 s
35	Extensión	72	40 s
1	Extensión Final	72	5 min
1	Detener la reacción	4	10 min

¹Gradiente de temperatura específico para cada microsatélite.

Tabla 2. 10. Temperaturas de hibridación para cinco microsatélites de zorro, aplicados en el material genético del lobo de páramo.

Microsatélite	Primer	T _m ¹ calculada [°C]	T _m promedio [°C]	T _a ² calculada [°C]	Gradientes de temperatura [°C]	
AHT121	Forward	56	57	52	Taq FLMNH	A) 52.3-54.1-58.2
	Reverse	58			Taq platinum	B) 52.1-54.9-58.4
CPH8	Forward	62	66	61	Taq FLMNH	A) 58.1- 61.4-64.2
	Reverse	70			Taq platinum	B) 58.4-61.4-64.7
CPH2	Forward	56	57	51	Taq FLMNH	A) 51.1-54.1-57.4
	Reverse	58			Taq platinum	B) 52.1-54.9-58.4
P08	Forward	50	52	47	Taq FLMNH	A) 57.9-62.2-65.6
	Reverse	54			Taq platinum	B) 47.9-51.8-54.3
P01i	Forward	52	52	47	Taq FLMNH	A) 57.9-62.2-65.6
	Reverse	52			Taq platinum	B) 52.1-54.9-58.4

¹T_m: Temperatura de fusión o melting del ADN.

²T_a: Temperatura de hibridación o annealing de los primers.

2.5.11.2.2 Ensayo de Adyuvantes en muestras fecales

Se realizó el ensayo PCR con el ADN extraído de una muestra fecal de zoológico, para probar si es posible amplificar ADN nuclear de muestras fecales. Se empleó como adyuvante BSA sin acetilar a 0.1µg/µl. La PCR se realizó con los ciclos de amplificación ya utilizados (Tabla 2.9) en un volumen de reacción de 25 µl, utilizando 2.5µl de ADN blanco, 1U de Taq polimerasa platinum, (Invitrogen™), BSA sin acetilar a 0 µg/µl y 0.1µg/µl, 0.6 µM por cada primer, 100 µM de cada dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 1x Buffer PCR (Invitrogen™), y agua PCR libre de nucleasas.

2.5.11.3 Ensayo de Sensibilidad en muestra fecal

Se realizó un ensayo de sensibilidad analítica para evaluar el límite de detección de ADN en el ensayo de PCR para muestras fecales de lobo de páramo amplificando el microsatélite CPH2. Se realizó 5 diluciones seriadas del ADN extraído de una muestra fecal de lobo recolectada en el zoológico con un factor de dilución 1:2 (Tabla 2.11). Para el ensayo se empleó el procedimiento usado para amplificar ADN de muestras fecales empleando 1 U de Taq polimerasa platinum (Invitrogen™) (Sección 2.5.11.2.2).

Tabla 2. 11. Diluciones seriadas de ADN fecal, ensayo microsatélites.

Diluciones	Concentración de ADN [ng/μl]	Masa de ADN ¹ [ng]
1	20	140
1:2	10	70
1:4	5	35
1:6	3.33	17.5
1:8	2.5	8.75

¹Se amplificó 7 μl de ADN a una concentración de 20 ng/μl, teniendo en la reacción PCR 70 ng de ADN equivalentes a 70000 pg.

2.5.11.4 Ensayo de Especificidad

Se realizó este ensayo con el ADN obtenido del lobo macho del zoológico, para verificar la especificidad de los cinco microsatélites frente a los controles negativos de: perro, conejo, gallina y gato. Para el ensayo se empleó el procedimiento usado para amplificar ADN de muestras sanguíneas de lobo de páramo, empleando 1 U de Taq polimerasa platinum (Invitrogen™) (Sección 2.5.11.2.1).

2.5.11.5 Amplificación de todas las muestras fecales recolectadas

Se utilizó los microsatélites CPH8 y CPH2, que amplificaron de mejor manera el ADN de muestras sanguíneas. Para ello se empleó una PCR con la concentración de reactivos estandarizado para amplificar muestras fecales de lobo, utilizando 8 μl de ADN en un volumen de reacción de 25 μl con 1U de Taq platinum (Tabla 2.12). Y una

PCR con 35 ciclos y 45 ciclos de amplificación, terminado la optimización de la PCR para microsatélites en ADN fecal (Tabla 2.13).

Tabla 2. 12. Concentración de reactivos estandarizada para la amplificación PCR de los microsatélites CPH8 y CPH2 en muestras fecales de lobo de páramo, utilizando Taq polimerasa platinum (Invitrogen™).

Reactivo	Concentraciones de Reactivos	Concentraciones Empleadas	Volumen por reacción, 1X (µl)
Primer-F	100 pmol/µl	30 pmol/50µl	0.3
Primer-R	100 pmol/µl	30 pmol/50µl	0.3
dNTPs	20 mM	0.4 mM	0.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
Buffer	10X	1X	2.5
BSA	2.5 µg/µl	0.1 µg/µl	1
Taq platinum (Invitrogen™)	5.0 U/µl	1 U/µl	0.2
H ₂ O (Grado PCR)	-	-	11.45
Volumen del master mix por reacción			17 µl
Volumen total de reacción (añadiendo 8 µl de ADN)			25 µl

Tabla 2. 13. Programación del termociclador estandarizada para la amplificación de los microsatélites CPH8, CPH2 en el material genético del lobo de páramo en muestras fecales.

No. de ciclos	Proceso	Temperatura [°C]	Tiempo
1	Desnaturalización Inicial	94	5 min
45	Desnaturalización	94	30 s
45	Alineamiento	N ¹	40 s
45	Extensión	72	40 s
1	Extensión Final	72	5 min
1	Detener la reacción	4	10 min

¹Temperatura de alineamiento específica para cada microsatélite.

2.5.11.6 Visualización de Resultados

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2.5% mediante corrida electroforética durante 1.5 horas a 100 V y 300 mA. Se empleó un marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen™) que permitió determinar el tamaño de las bandas. Se tomaron fotos de los geles en un transiluminador UVP BioDoc-It™ System con luz UV.

2.5.12 Análisis de amplificación

Se evaluó el porcentaje de amplificación para las muestras fecales, tomando como amplificación positiva si presentó la banda de amplificación y como negativa si no la presentó (Tabla 2.14). Además se midió la intensidad de la banda, asignando 3 categorías y a cada una se le asignó un valor (Tabla 2.15).

Tabla 2. 14. Valores asignados para amplificación.

Amplificación	Valor asignado
Nula	0
Positiva	1

Tabla 2. 15. Valores asignados para intensidad de amplificación.

Intensidad de banda	Valor asignado
Nula	0
Media	0.5
Alta (Tomando como referencia la amplificación del control positivo)	1

2.5.13 Identificación de parásitos gastrointestinales

Adicionalmente se analizaron las muestras fecales mediante la técnica de sedimentación de *Ritchie* o Formol-Éter para la identificación de parásitos gastrointestinales (Bowman, Lynn & Eberhard, 2004). El procedimiento empleado fue el siguiente: Se colocó 1 g de heces en un vaso plástico y se añadió 10 ml de agua destilada, mezclando hasta homogenizar la muestra, posteriormente se filtró el contenido a través de una gasa a otro vaso plástico y se trasvaso el filtrado a un tubo de ensayo de vidrio de 10 ml, se añadió agua destilada hasta los 10 ml, luego se centrifugó a 3200 rpm por 2 min y se desechó el sobrenadante. Posteriormente se añadió 5 ml de formaldehído al 10 %, mezclando y dejando reposar la suspensión durante 10 min, luego se añadió 3ml de éter-diétilico, se tapó el tubo y se agitó con vigor por 1 min, posteriormente se centrifugó nuevamente a 3200 rpm por 2 min y se pasó con un hisopo

las paredes del tubo para liberar el material empaquetado y se desechó rápidamente el sobrenadante. Para observar los parásitos, se colocó una gota de sedimento en el portaobjetos, se añadió una gota de lugol y luego se colocó el cubreobjetos. Los huevos de los parásitos se observaron a 40 aumentos (40X) en un microscopio óptico.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Recolección de muestras fecales en los páramos del Parque Nacional Cayambe-Coca y Zoológico de Quito

En total se recolectaron 44 muestras fecales en el Parque Nacional Cayambe-Coca y 3 muestras fecales frescas en el zoológico de Quito. Dichas muestras fueron clasificadas en función de la edad de deposición para realizar los análisis de ADN (Tabla 3.1 y Figura 3.1).

Tabla 3. 1. Total de muestras fecales recolectadas y clasificadas en función de la edad de deposición de la muestra. (Datos obtenidos del Anexo C).

Edad de deposición	Muestras	Cantidad
Frescas	1Z, 2Z, 3Z, 1N ³ , 2N, 4F ⁴ , 6F, 24F	8
Semifrescas Húmedas	3N, 2T ² , 3T, 7N, 1F, 2F, 3F, 5F, 11F, 12F, 13F, 17F, 18F, 19F, 20F, 21F, 25F, 26F, 27F	19
Semifrescas Secas	1T, 7T, 8T, 4T, 5T, 4N	6
Residuos	9T, 10T, 6N, 5N, 6T, 7F, 8F, 9F, 10F, 14F, 15F, 16F, 22F, 23F	14
	TOTAL	47

¹Z: Muestras de zoológico recolectadas el mes de agosto de 2011.

²T: Muestras recolectadas en el páramo el mes de octubre de 2011.

³N: Muestras recolectadas en el páramo el mes de noviembre de 2011.

⁴F: Muestras recolectadas en el páramo el mes de febrero de 2012.

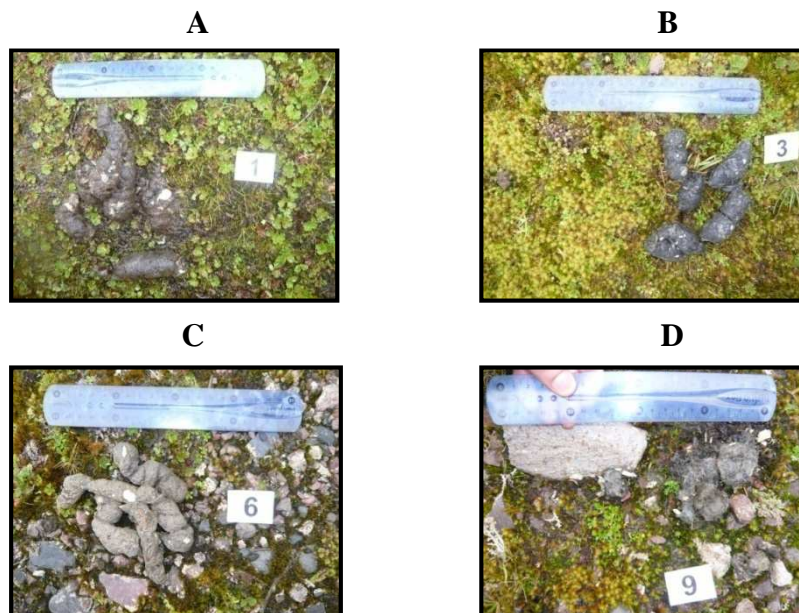


Figura 3. 1. Muestras fecales categorizadas en función de la edad de deposición.

(A) Frescas, (B) Semifrescas Húmedas, (C) Semifrescas Secas, (D) Residuos.

De acuerdo al tipo de muestreo, se recolectó un mayor número de muestras fecales mediante el método de conteo de heces en un transecto lineal de deposición de aproximadamente 2.5 km, realizado en un camino poco transitado del área protegida, en relación al método de conteo de heces en distintas áreas superficiales de aproximadamente 500 m² realizado dentro del pajonal (Figuras 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7 y 3.8.).

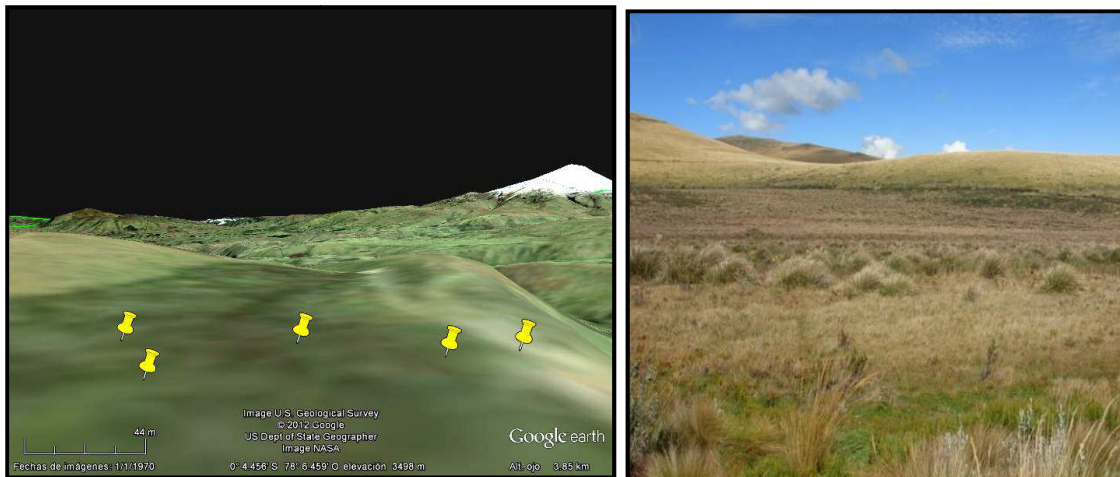


Figura 3. 2. Ubicación GPS de las muestras recolectas en el Área 1 (S0 07.557 W78 07.174).

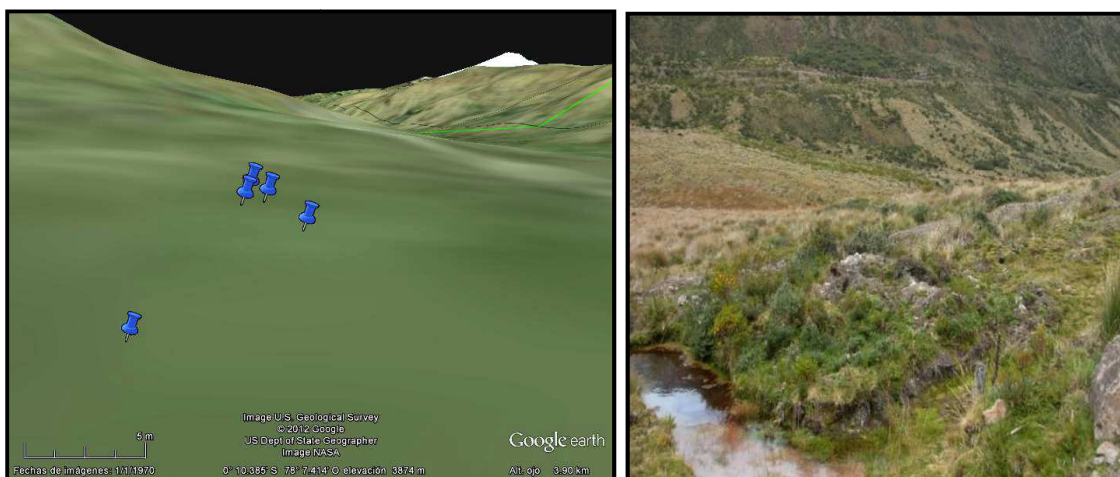


Figura 3. 3. Ubicación GPS de las muestras recolectas en el Área 2 (S0 10.404 W78 07.426).

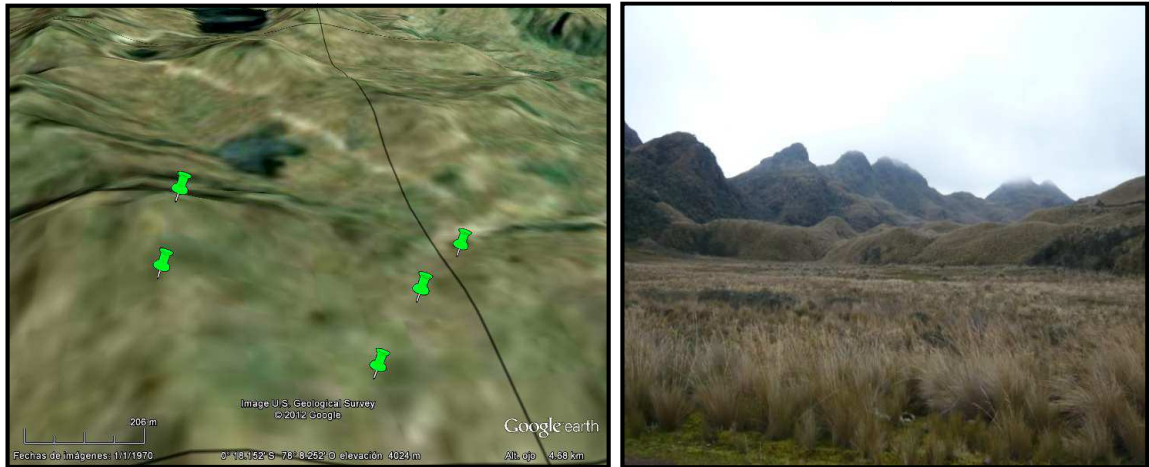


Figura 3. 4. Ubicación GPS de las muestras recolectas en el Área 3 (S0 18.264 W78 08.144).



Figura 3. 5. Ubicación GPS de las muestras recolectas en el Área 4 (S0 16.007 W78 6.146).

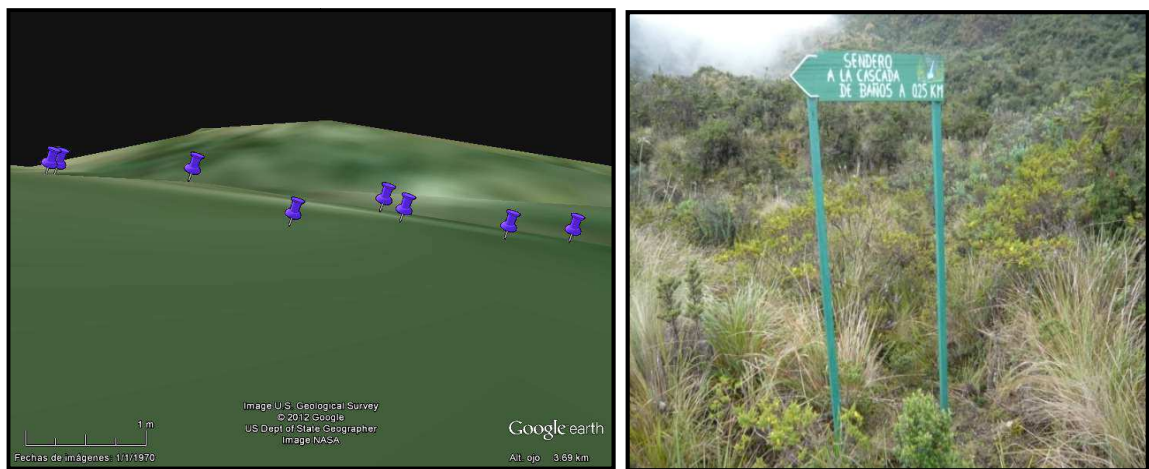


Figura 3. 6. Ubicación GPS de las muestras recolectas en el Área 5 (S0 19.511 W78 08.866).



Figura 3. 7. Ubicación GPS de las muestras recolectas en el Área 6, Transecto lineal. (S0 17.126 W78 08.576).

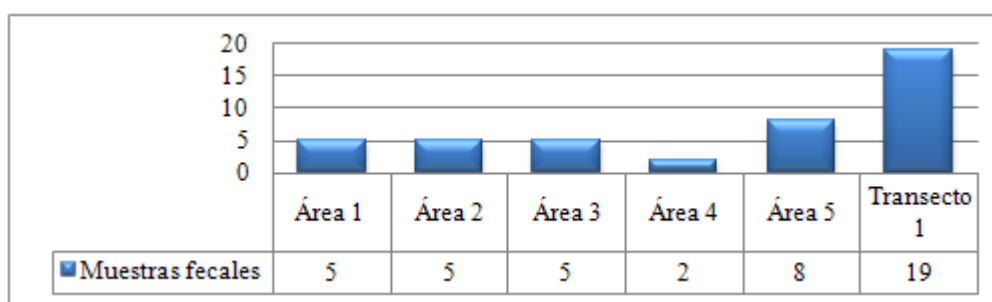


Figura 3. 8. Muestras fecales recolectadas según el tipo de muestreo. (Datos obtenidos del Anexo C).

3.2 Validación de tres métodos de extracción de ADN fecal (SDS/CAI, CTAB/CAI y 2CTAB/CAI)

Al realizar la validación de extracción del ADN en una muestra fecal recolectada en el páramo aplicando los métodos SDS/CAI, CTAB/CAI y 2CTAB/CAI, se determinó que solo se puede extraer ADN de las heces, sí se aplica en los tres métodos un pretratamiento de las heces con lavados de suero fisiológico (Figura 3.9A). También se determinó que existen diferencias al extraer ADN de un muestra fecal conservada con y sin etanol al 100 % a -20 °C, pues se observó una menor cantidad de ADN cuando la muestra fue conservada con etanol (Figuras 3.9B y 3.9C), además la alícuota de ADN obtenida presentó un color marrón, que es indicio de mayor contaminación (Figura 3.10). Finalmente se observó que al realizar más lavados con suero fisiológico, en este caso 3, se obtiene una banda más nítida de ADN fecal para los tres métodos y menor

cantidad de ARN, quedando estandarizados los tres métodos de extracción de ADN (Figura 3.9D).

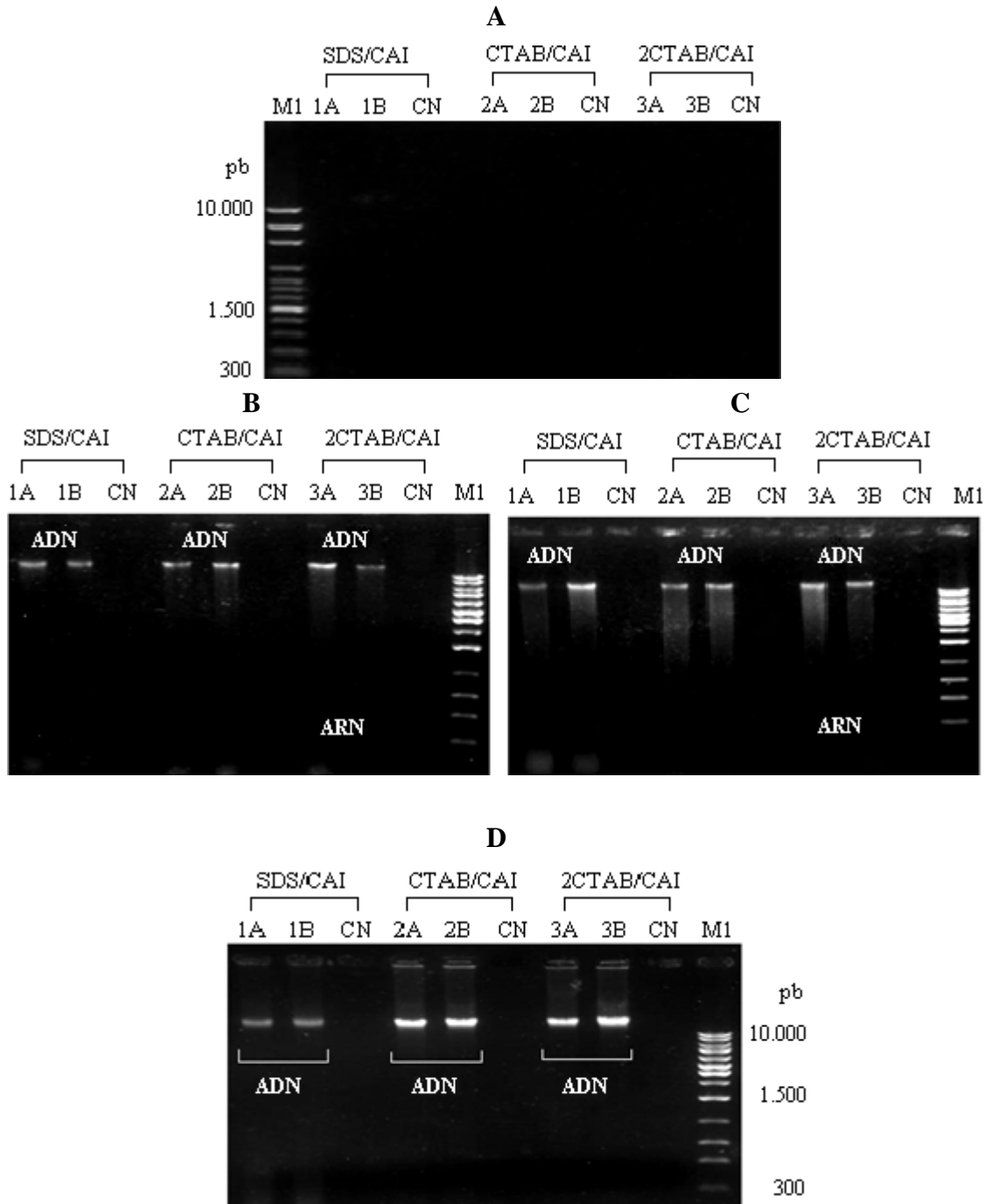


Figura 3. 9. Validación de tres métodos de extracción de ADN fecal.

Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % teñido con SYBR Safe (Invitrogen™) donde se observan los resultados de la extracción de ADN de una muestra fecal de lobo de páramo (1N), recolectada en el Parque Nacional Cayambe Coca. **(A)** Extracción de ADN fecal sin pretratamiento. **(B)** Extracción de ADN fecal aplicando 1 lavado con suero como pretratamiento, muestra conservada con etanol. **(C)** Extracción de ADN fecal aplicando 1 lavado con suero como pretratamiento, muestra conservada sin etanol. **(D)** Extracción de ADN fecal aplicando 3 lavados con suero como pretratamiento, muestra conservada sin etanol. M1= Marcador de peso molecular de 1 Kb; CN = Control negativo de la extracción.



Figura 3. 10. Alícuota de ADN fecal.

(A) Muestra fecal conservada en etanol. (B) Muestra fecal conservada sin etanol.

Los resultados de la cuantificación de ADN en el fluorómetro Qubit® 2.0 y la determinación de su pureza mediante espectrofotómetro NanoVue™ Plus; indicaron, que a medida que se aumenta el número de lavados con suero fisiológico, se mejora la extracción de ADN fecal al obtener más concentración de ADN y de mayor pureza (Figura 3.11).

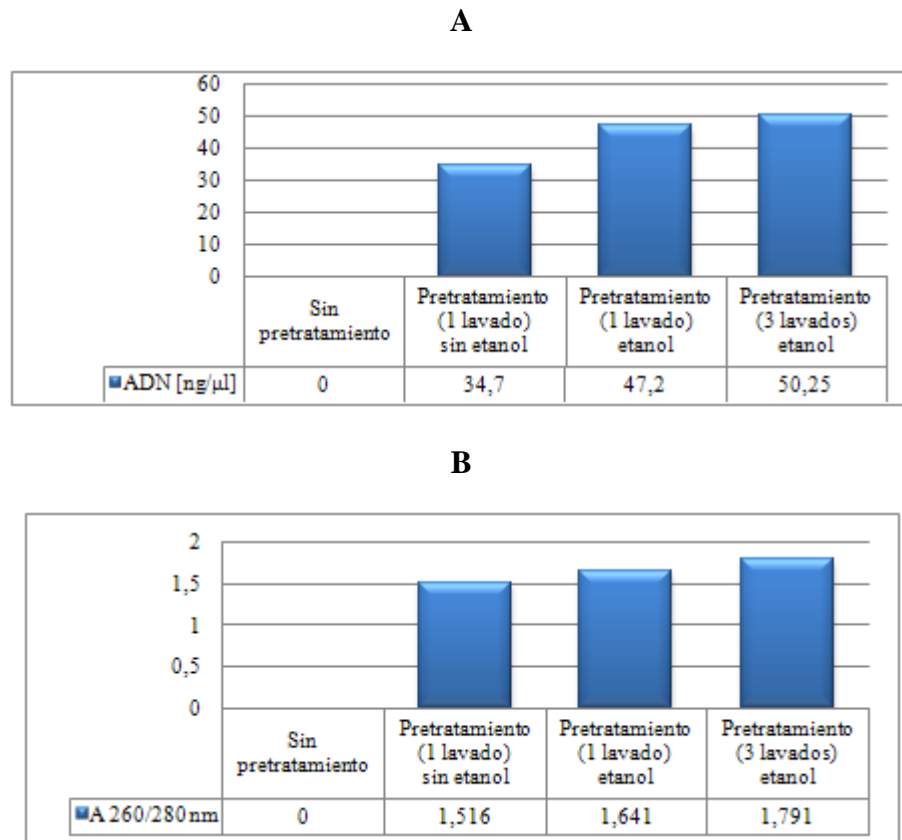


Figura 3. 11. Valores promedio de cuantificación y pureza de ADN.

(A) Concentración del ADN. (B) Pureza del ADN. (Datos obtenidos Anexo D)

3.3 Extracción de ADN de controles positivos y negativos

Se obtuvo un ADN puro y de alta concentración para la mayoría de muestras (Figura 3.12), sin embargo se observó una baja concentración de ADN para las muestras de ave y gato (Tabla 3.2), debido posiblemente a que el método de extracción en sangre está estandarizado para muestras sanguíneas de mamíferos y no para aves para el primer caso y debido a que el método de extracción de ADN de pelo de gato doméstico no estuvo completamente estandarizado para el segundo caso, pues el estudio se centró en la estandarización de un protocolo para la extracción de ADN fecal.

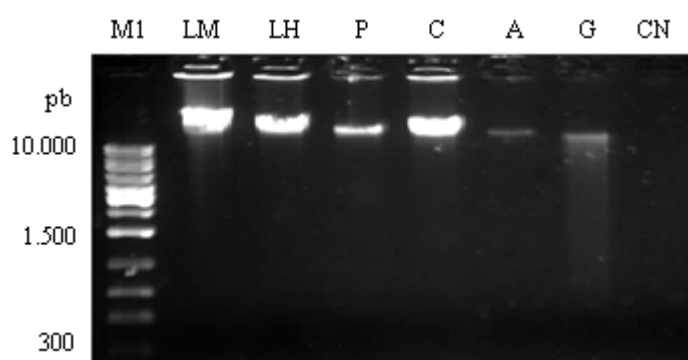


Figura 3. 12. Extracción de ADN de controles positivos y negativos.

Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % teñido con SYBR Safe (Invitrogen™) donde se observan los resultados de la extracción de ADN de los controles positivos y negativos de la amplificación PCR. M1 = Marcador de peso molecular de 1 Kb; LM = Lobo macho; LH = Lobo hembra; P = Perro; C = Conejo; A = Gallina (Ave); G = Gato doméstico; CN = Control negativo de la extracción.

Tabla 3. 2. Valores de cuantificación y pureza de ADN de controles positivos y negativos.

Muestra	ADN [ng/μl]	A 260/280 nm
LM (Lobo macho)	160	1.712
LH (Lobo hembra)	162.5	1.738
P (Perro doméstico)	20	1.786
C (Conejo)	224	1.771
A (Gallina)	20.5	1.671
G (Gato doméstico)	23.5	1.673

3.4 Determinación del mejor método de extracción de ADN fecal

Se extrajo de forma exitosa el ADN fecal por los tres métodos de extracción: SDS/CAI, CTAB/CAI y 2CTAB/CAI en las cinco muestras fecales escogidas para este ensayo, y que fueron recolectadas en el páramo y almacenadas durante dos meses a -20°C por los tres métodos de extracción (Figuras 3.13). En los geles de agarosa al 0.8 % se observó un ADN íntegro. Los valores de cuantificación del ADN en el fluorómetro Qubit® 2.0 y pureza mediante espectrofotómetro NanoVue™ Plus de las muestras fecales de lobo de páramo (Anexo E) fueron analizados utilizando InfoStat versión 2010 (Di Rienzo *et al.*, 2010). El análisis de varianza (ANOVA), previa normalización de datos, mostró que no existen diferencias significativas entre los tres tratamientos en función de la concentración de ADN ($p=0.6763$). Mientras que para la pureza se observó que si existe diferencia significativa entre los métodos de extracción ($p=0.0418$), por lo que se aplicó la prueba de significancia de Tukey para determinar estas diferencias. El análisis mostró que el tratamiento CTAB/CAI provoca un efecto diferente a la variable pureza de ADN que el tratamiento 2CTAB/CAI, mientras que el tratamiento SDS/CAI provoca un efecto combinado de los dos tratamientos en la variable pureza del ADN (Anexo F).

Los valores promedio de cuantificación y pureza para los 3 tratamientos (Figura 3.14) indican una mayor concentración de ADN para los métodos CTAB/CAI y 2CTAB/CAI, siendo el mejor método de extracción el método 2CTAB/CAI, debido a que extrae una buena cantidad de ADN (valor promedio de 51.16 ng/μl), y presenta una mayor pureza (absorbancia a 260/280 nm de 1.65).

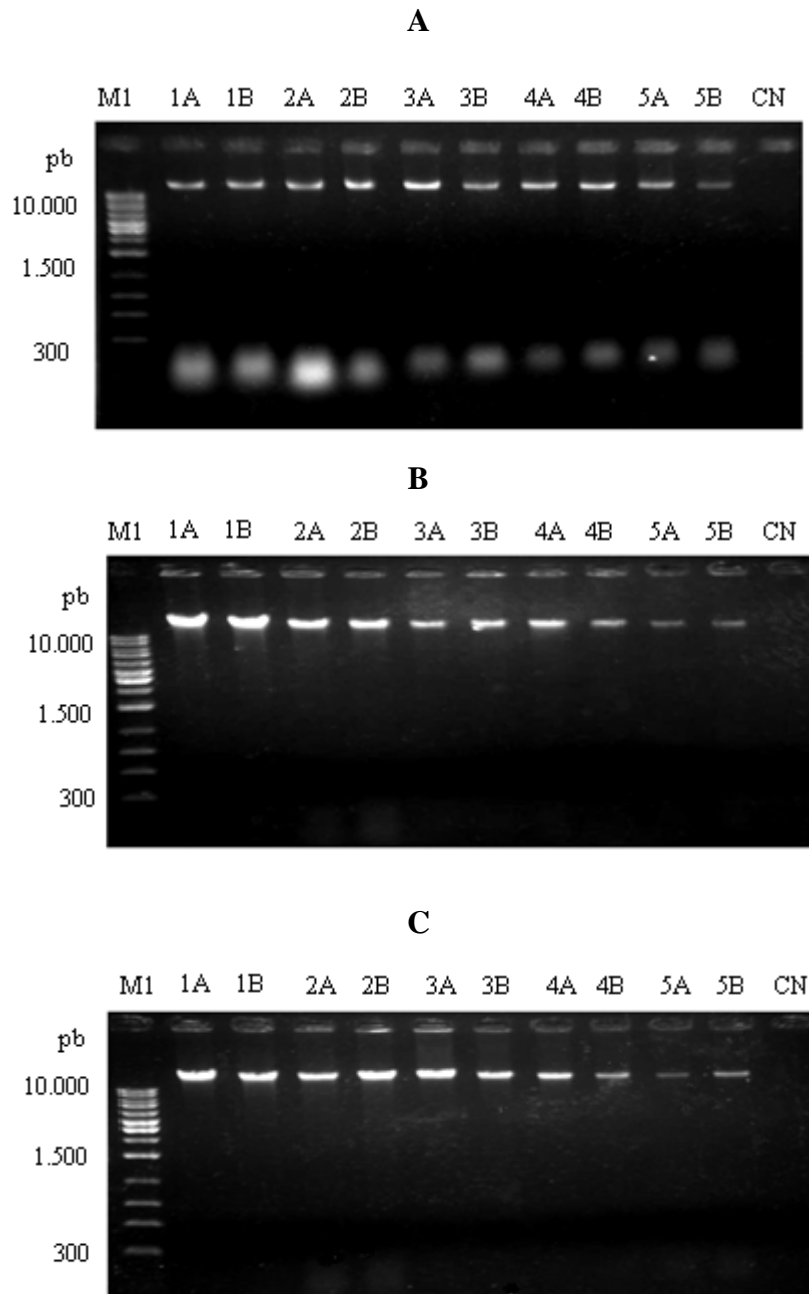


Figura 3. 13. Determinación del mejor método de extracción de ADN fecal.

Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % teñido con SYBR Safe (Invitrogen™) donde se observan los resultados de la extracción de ADN de 5 muestras fecales de lobo de páramo. **(A)** Extracción de ADN fecal, método SDS/CAI. **(B)** Extracción de ADN fecal, método CTAB/CAI y **(C)** Extracción de ADN fecal, método 2CTAB/CAI. 1A, 1B= Muestra 1N; 2A, 2B= Muestra 2N; 3A, 3B = Muestra 4N; 4A, 4B = Muestra 5N; 5A, 5B = Muestra 13N; M = Marcador de peso molecular de 1 Kb; CN = Control negativo de la extracción.

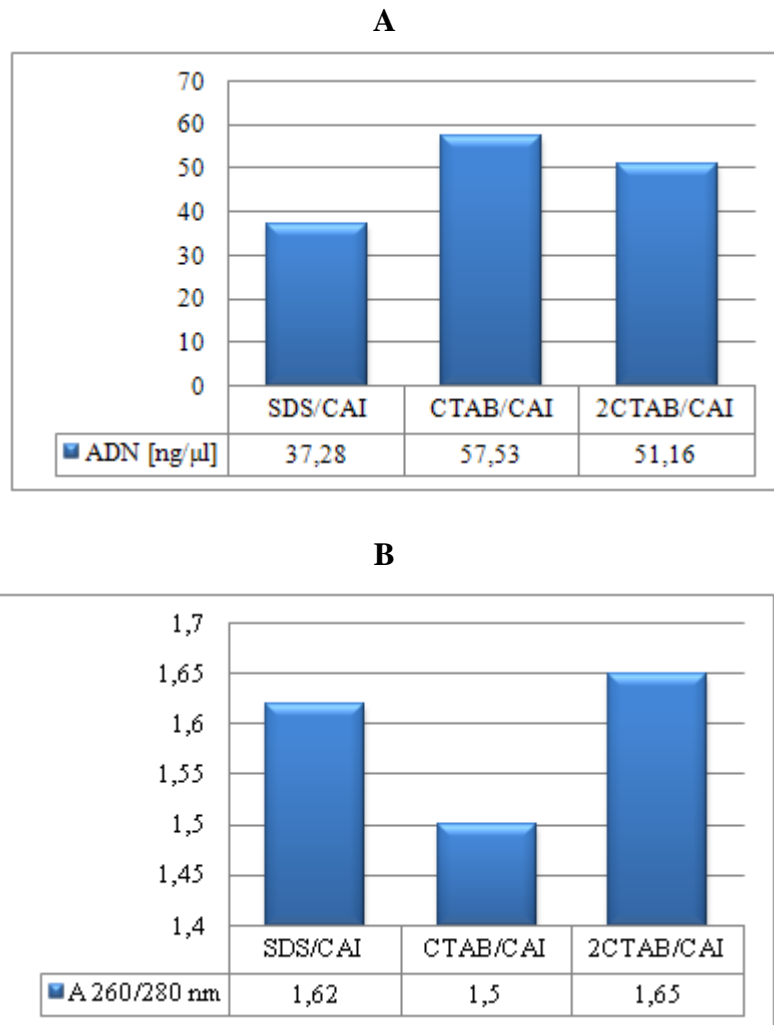


Figura 3. 14. Valores promedio de cuantificación y pureza en 5 muestras de ADN fecal.

Aplicando los métodos SDS/CAI, CTAB/CAI y 2CTAB/CAI. (A) Concentración de ADN ADN [ng/μl]. (B) Pureza del ADN (Absorbancia 260/280 nm).

3.5 Estandarización de la extracción de ADN a partir de muestras fecales recolectadas en el zoológico de Quito

Se observó que la muestra fecal de zoológico presenta una textura diferente y un olor más fuerte producto de una mayor presencia de microorganismos y probablemente debido a la alimentación que recibe (carnes rojas y sardinas), que aportan mayor cantidad de proteínas y carbohidratos. Estas características la convierten en una muestra muy contaminada y difícil de extraer su ADN. Aplicando el mismo procedimiento del método 2CTAB/CAI empleado para muestras de páramo, no se logró extraer una buena

cantidad ADN por lo que se aplicó las modificaciones planteadas anteriormente (Sección 2.5.7), obteniendo en este caso una mayor cantidad de ADN (Figura 3.15).

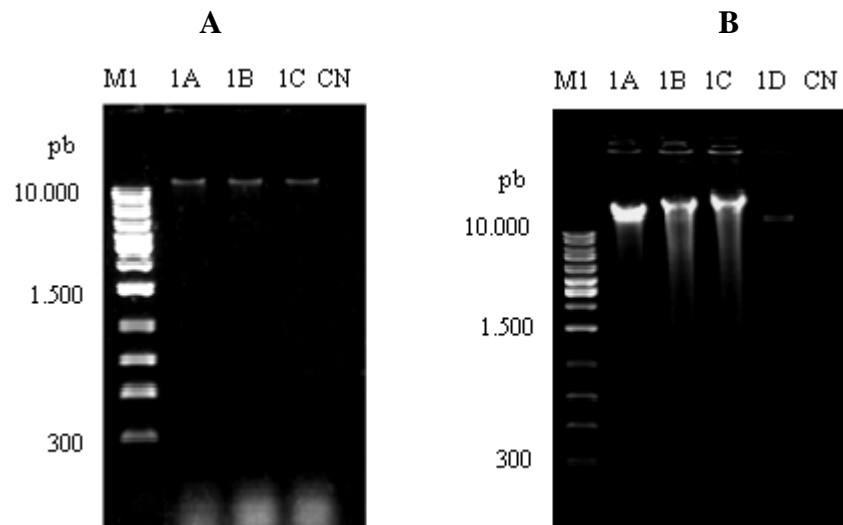


Figura 3. 15. Extracción de ADN de una muestra fecal del Zoológico.

Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % teñido con SYBR Safe (Invitrogen™) donde se observan los resultados de la extracción de ADN de una muestra fecal de lobo de páramo (3Z) por el método 2CTAB/CAI. (A) Aplicando el método 2CTAB/CAI estandarizado en muestras fecales recolectadas en páramo. (B) Aplicando el método 2CTAB/CAI con modificaciones en el pretratamiento con suero fisiológico, cantidad de proteinasa K, RNasa, y precipitación con etanol. 1A, 1B, 1C, 1D = repeticiones de la muestra; M = Marcador de peso molecular de 1 Kb; CN = Control negativo de la extracción.

3.6 Evaluación de la eficacia del protocolo de extracción de ADN fecal

Se utilizó el método estandarizado 2CTAB/CAI como el protocolo de extracción de ADN para muestras fecales de lobo de páramo, aplicándolo en la extracción de ADN de las 43 muestras totales recolectadas en el Parque Nacional Cayambe-Coca y en 3 muestras recolectadas en el Zoológico de Quito, obteniendo ADN en todas las muestras fecales (Figura 3.16).

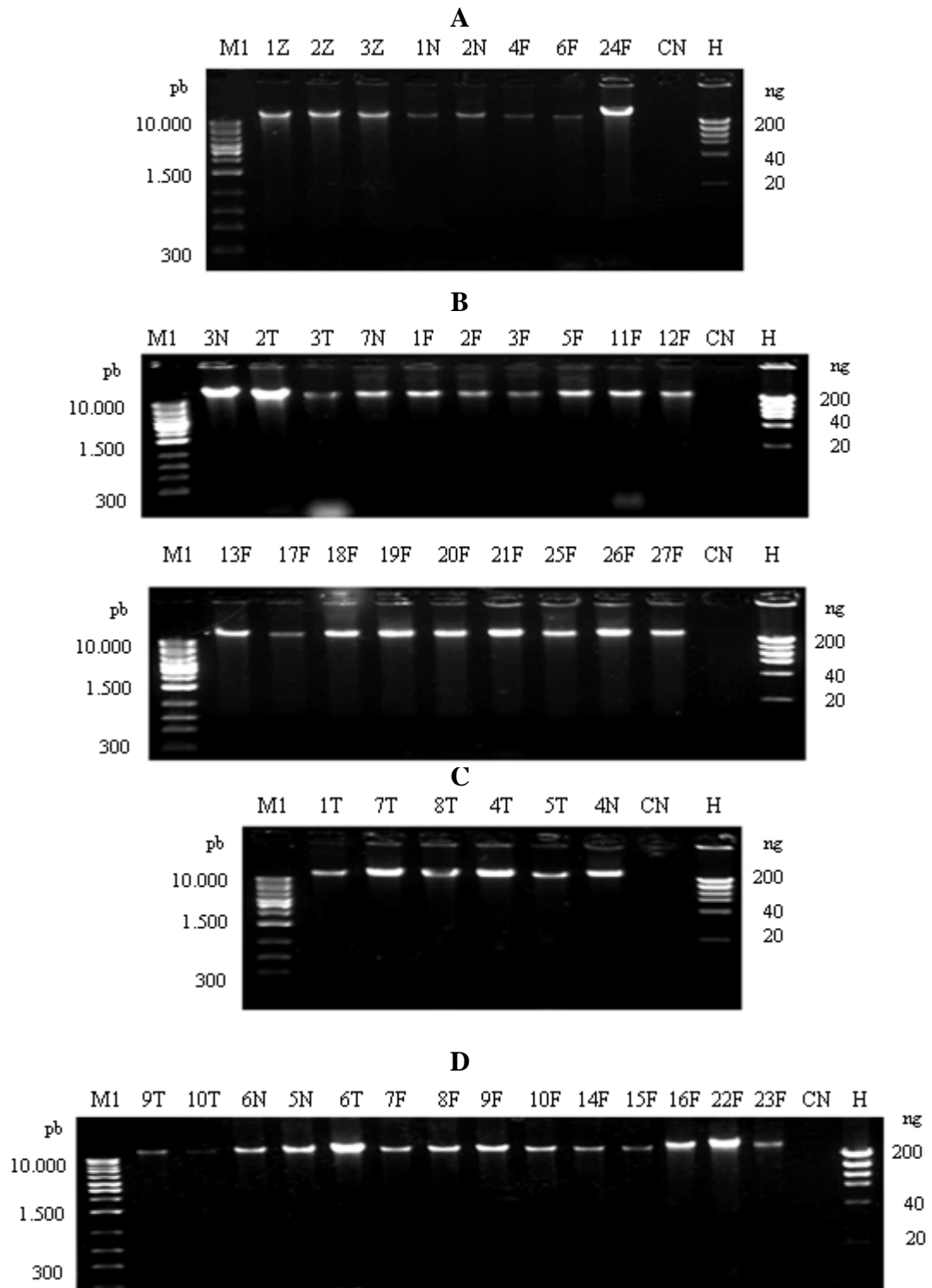
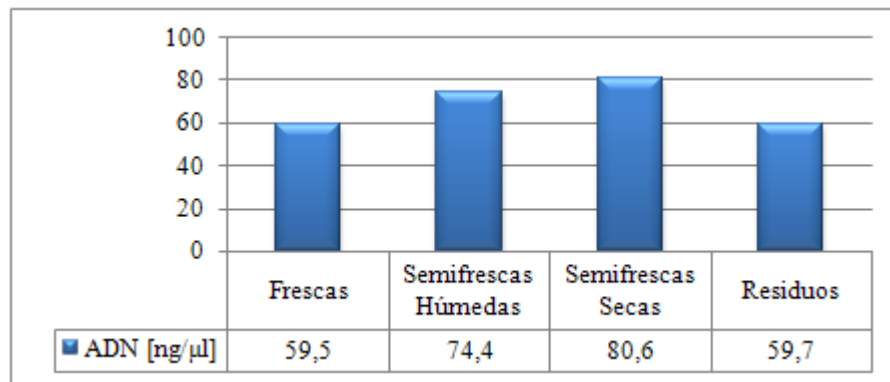


Figura 3. 16. Extracción de ADN en 47 muestras fecales recolectadas.

Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % teñido con SYBR Safe (Invitrogen™) donde se observan los resultados de la extracción de ADN de 3 muestras fecales recolectadas en el zoológico de Quito (1Z, 2Z, 3Z) y 44 muestras en el Parque Nacional Cayambe-Coca (#T, #N, #F). Empleando el protocolo estandarizado 2CTAB/CAI. (A) Muestras frescas, (B) Muestras semifrescas húmedas, (C) Muestras semifrescas secas, (D) Muestras residuos; ZM = Marcador de peso molecular de 1 Kb; CN = Control negativo de la extracción, H = Marcador cuantitativo de alto peso molecular.

Los resultados de la cuantificación de ADN y la determinación de su pureza mediante espectrofotómetro NanoVue™ Plus (Anexo G), indicaron que las muestras semifrescas húmedas y secas tuvieron una mayor cantidad de ADN en relación con muestras frescas y residuos en donde se obtuvo menor concentración de ADN (Figura 3.17A). En cuanto a pureza, las muestras frescas presentaron menor contaminación al obtener un valor más cercano a 2 (Figura 3.17B). Adicionalmente en base a la información recopilada se realizó la prueba de hipótesis χ^2 (Anexo H) utilizando el paquete estadístico de Excel versión 2007 (aplicación de Microsoft Office 2007) y se dedujo que la concentración y pureza del ADN es independiente de la edad de deposición de las muestras fecales ($p=0,175$ y $p=0,1$ respectivamente)

A



B

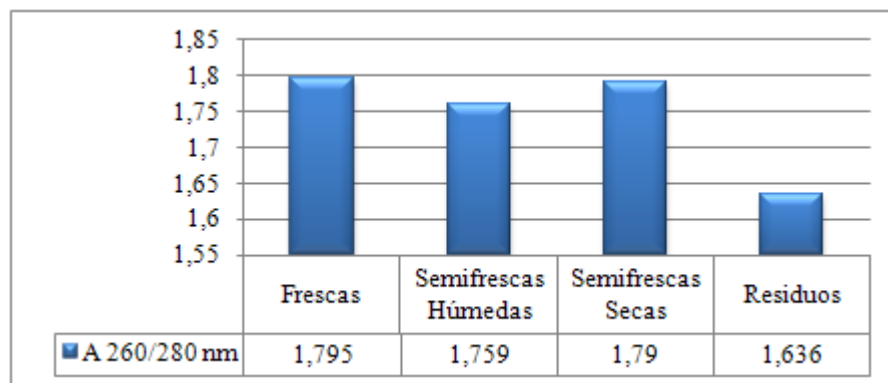


Figura 3. 17. Valores promedio de cuantificación y pureza de 47 muestras de ADN fecal, aplicando el método de extracción 2CTAB/CAI.

A) Concentración de ADN ADN [ng/μl]. (B) Pureza del ADN (Absorbancia 260/280 nm).
(Datos obtenidos Anexo G).

3.7 Amplificación del ADN mitocondrial por PCR

3.7.1 Optimización de la PCR

3.7.1.1 Temperatura de hibridación de los primers (Ta)

Se obtuvo como mejor temperatura de alineamiento, la temperatura a 66.6 °C, al obtenerse una perfecta dupleta de la amplificación, sin la presencia de productos inespecíficos o dímeros de primers. Se obtuvo un amplicón de 200 pb perteneciente al citocromo b (*Cytb*) del ADN mitocondrial del lobo de páramo en el ADN extraído de una muestra sanguínea (Figura 3.18).

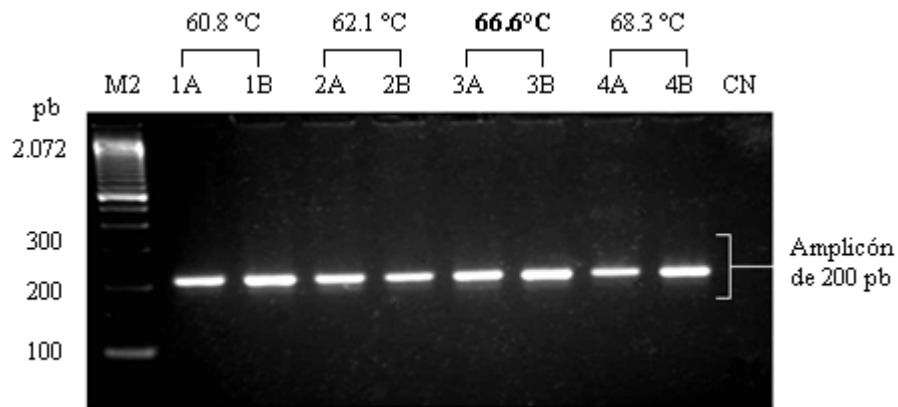


Figura 3. 18. Amplificación del *Cytb*, ensayo de temperaturas.

Electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con SYBR Safe (Invitrogen) donde se observan los resultados de la amplificación de un fragmento de 200 pb del citocromo b, en el ADN extraído de una muestra sanguínea del lobo hembra; M2 = Marcador de peso molecular de 100 pb; 1A, 1B = 60.8°C; 2A, 2B = 62.1°C; 3A, 3B = 66.6°C; 4A, 4B = 68.3°C; CN = Control negativo de la extracción.

3.7.1.2 Ensayo de adyuvantes en muestras fecales

En el primer ensayo de PCR se empleo (BSA) acetilada (BSA-acety) y sin acetilar (BSA-FV) a 0.1 µg/µl, se observó que al utilizar BSA acetilado se inhibió la reacción PCR, mientras que al utilizar BSA sin acetilar se mejora la reacción (Figura 3.19A). En base a esto se realizó otro ensayo solo con BSA sin acetilar a 0 µg/µl, 0.1µg/µl y 0.2 µg/µl para hallar la concentración adecuada de BSA que resultó ser la de 0.1µg/µl, la cual permitió obtener un fragmento de 200 pb del *Cytb*, sin la formación de productos inespecíficos o

dímeros de primer a partir del ADN obtenido de una muestra fecal, permitiendo determinar que es posible amplificar ADN mitocondrial de excrementos (Figura 3.19B).

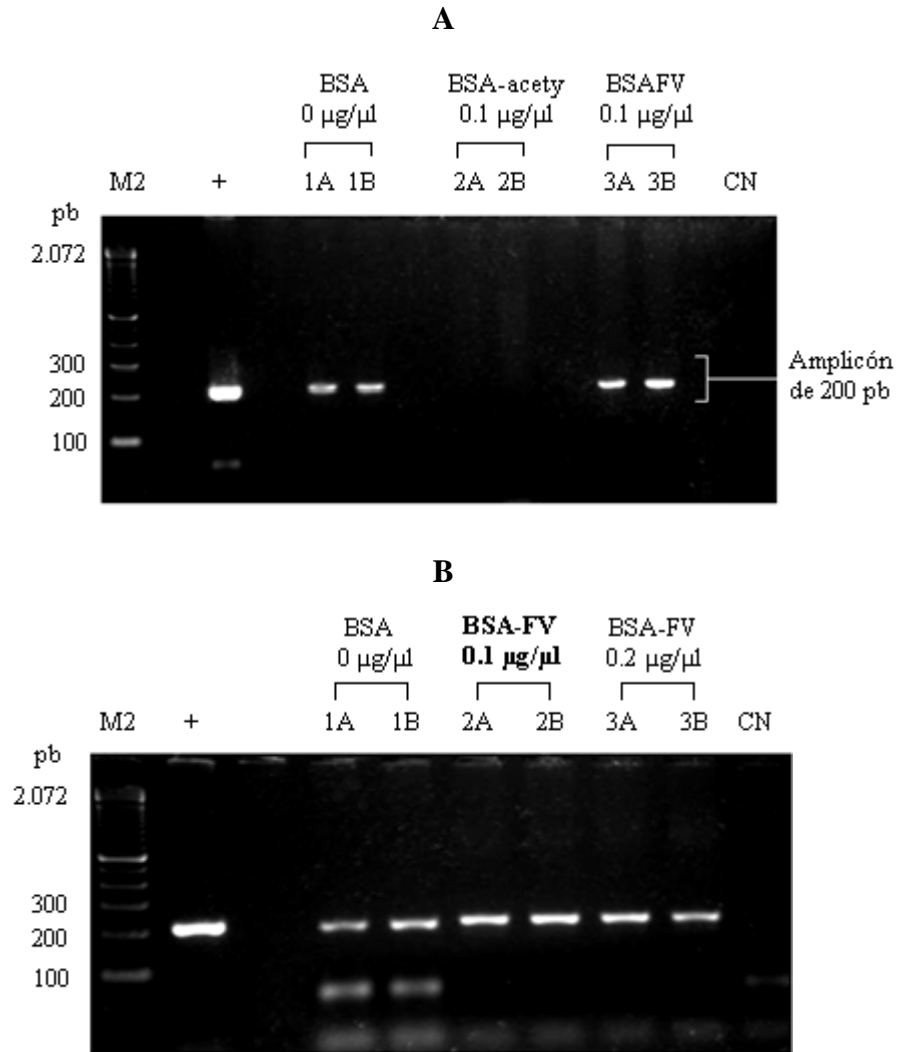


Figura 3. 19. Amplificación del *Cytb*, ensayo adyuvante BSA.

Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe (Invitrogen) donde se observan los resultados de la amplificación de un fragmento de 200 pb del citocromo b, en el ADN extraído de una muestra fecal de lobo recolectada en el zoológico; (A) Ensayo 1; (B) Ensayo 2; M2 = Marcador de peso molecular de 100 pb; 1A al 3B = repeticiones de la muestra fecal; + = Control positivo (ADN lobo macho del zoológico); CN = Control negativo de la extracción.

3.7.2 Ensayo de sensibilidad

El límite de detección empleando 2 U de Taq polimerasa FLMNH fue hasta la dilución $1:10^2$, a una concentración de ADN de 0.2 ng/µl que equivale a haber amplificado 1000 pg de ADN fecal (Figura 3.20).

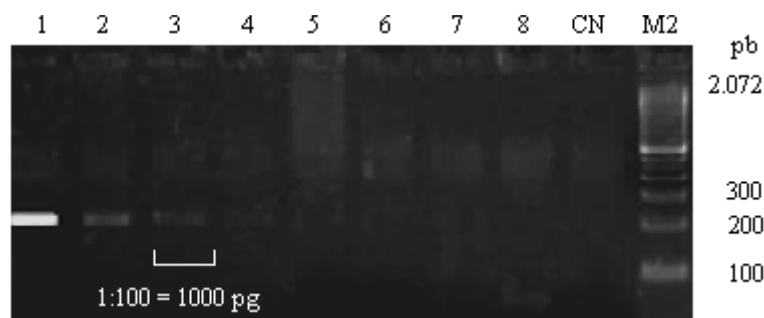


Figura 3. 20. Amplificación del *Cytb*, ensayo sensibilidad.

Electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con SYBR Safe (Invitrogen) donde se observan los resultados de la amplificación de un fragmento de 200 pb del citocromo b, en el ADN extraído de una muestra fecal de lobo recolectada en el páramo; M2 = Marcador de peso molecular de 100 pb; 1 = ADN a 20 ng/μl; 2 = 1:10, 3 = 1:10²; 4 = 1:10³; 5 = 1:10⁴; 6 = 1:10⁵; 7 = 1:10⁶; 8 = 1:10⁷; CN = Control negativo de la extracción.

3.7.3 Ensayo de especificidad

Se obtuvo como resultado que los primers diseñados para el género *Lycalopex* solo amplifican el ADN de lobo de páramo y no amplifica ADN de otros cánidos (perro), tampoco de posibles presas (conejo, gallina) o de felinos (gato) (Figura 3.21). Lo cual confirmó el diseño específico para este carnívoro.

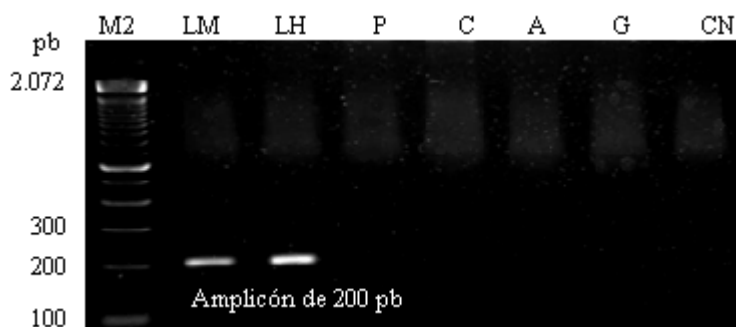


Figura 3. 21. Amplificación del *Cytb*, ensayo de especificidad.

Electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con SYBR Safe (Invitrogen) donde se observan los resultados de la amplificación de un fragmento de 200 pb del citocromo b de lobo de páramo LH = Lobo macho; LH = Lobo hembra; P = Perro; C = Conejo; A = Gallina, G = Gato; M2 = Marcador de peso molecular de 100 pb; CN = Control negativo de la extracción.

3.7.4 Amplificación de todas las muestras fecales recolectadas

La amplificación de ADN mitocondrial con Taq polimerasa convencional (FLMNH) en todas las muestras fecales recolectadas y clasificadas en función de la edad de disposición de la muestra, demostró que mediante la técnica es posible identificar heces pertenecientes al lobo de páramo en los páramos del Parque Nacional Cayambe-Coca (Figura 3.22).

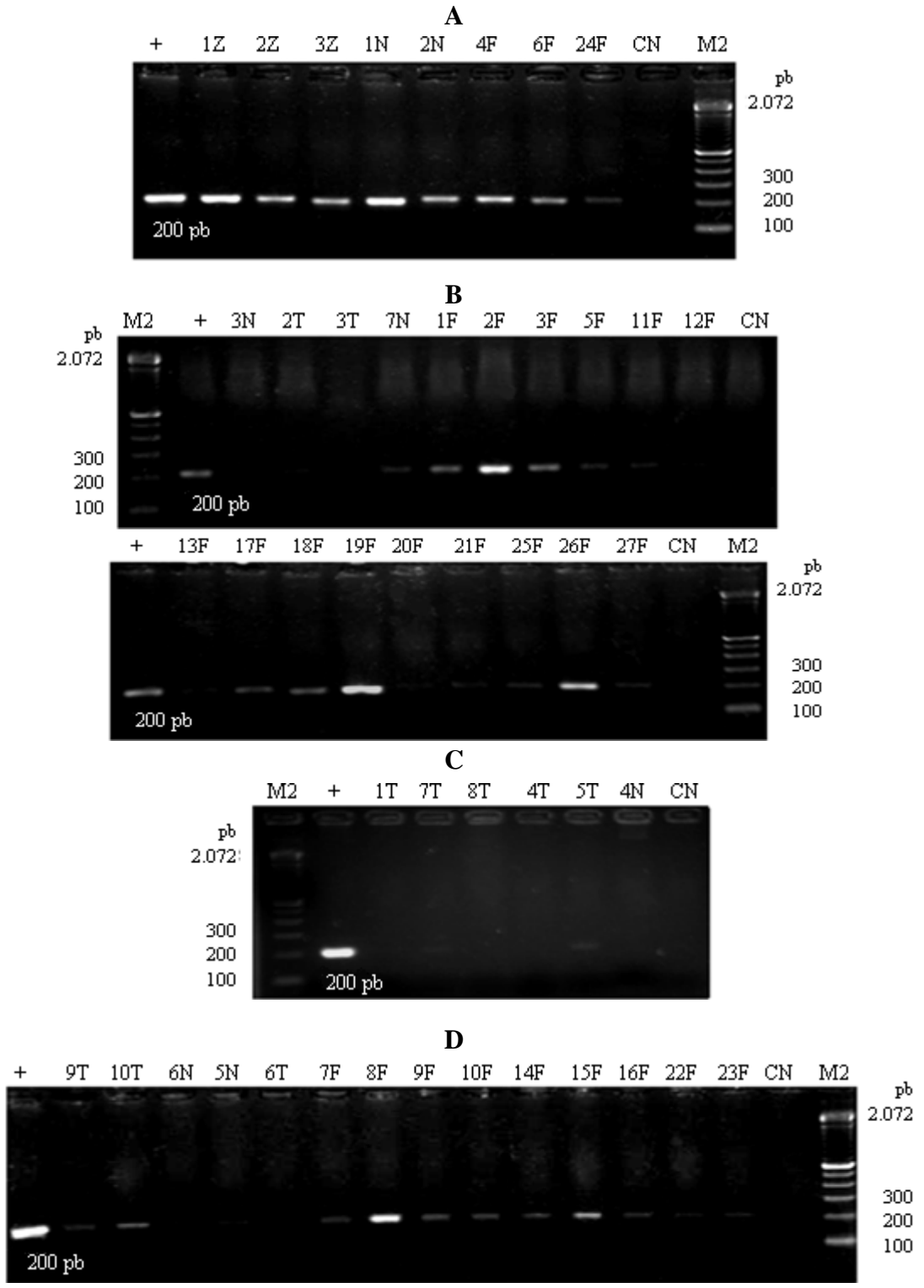


Figura 3. 22. Amplificación del *Cytb* en 47 muestras fecales.

Electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con SYBR Safe (Invitrogen™) donde se observan los resultados de la amplificación de un fragmento de 200 pb del *Cytb* (ADN mitocondrial) de 47 muestras fecales recolectadas en el zoológico de Quito (1Z, 2Z, 3Z) y en el Parque Nacional Cayambe- Coca (#T, #N, #F). (A) Frescas, (B) Semifrescas húmedas, (C) Semifrescas secas, (D) Residuos; + = Control positivo (ADN lobo macho del zoológico); M2 = Marcador de peso molecular de 100 pb; CN = Control negativo de la extracción.

Adicionalmente la amplificación del citocromo b en 17 muestras fecales, empleando Taq platinum, demostró que se mejora la amplificación del ADN mitocondrial si se emplea una Taq polimerasa de alta fidelidad (Figura 3.23).

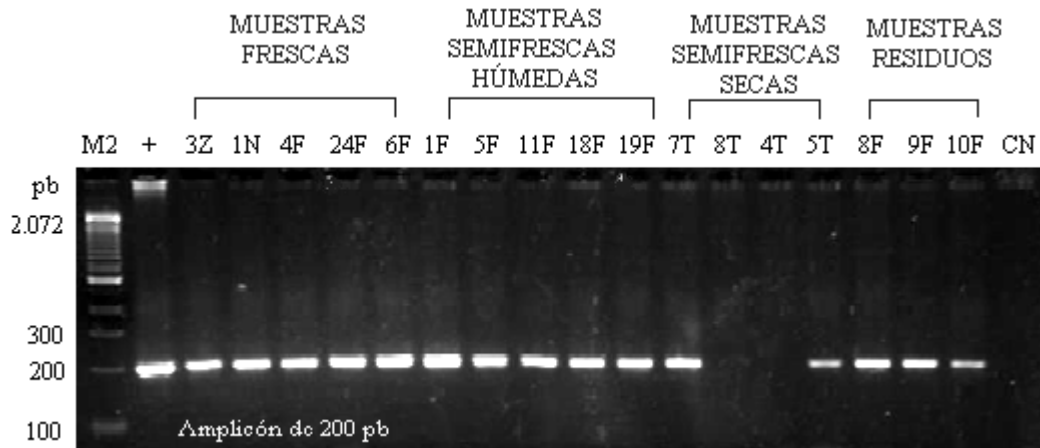


Figura 3. 23. Amplificación del *Cytb* empleando Taq platinum.

Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % teñido con SYBR Safe (Invitrogen™) donde se observa la amplificación del citocromo b, + = Control positivo; M2 = Marcador de peso molecular de 100 pb; CN = Control negativo de la extracción.

3.8 Amplificación de microsatélites por PCR

3.8.1 Optimización de la PCR

3.8.1.1 Temperatura de annealing (T_a)

Los resultados mostraron que la Taq polimerasa platinum (Invitrogen™) es más eficiente para amplificar microsatélites. Empleando Taq polimerasa convencional (FLMNH) se observó una amplificación de baja intensidad para CPH8 y CPH2 y nula amplificación para los restantes microsatélites (Figura 3.24). Con Taq platinum se pudo optimizar las temperaturas de alineamiento de los primers (Tabla 3.11). De los 5 microsatélites solo CPH8 y CPH2 amplifican perfectamente la banda de ADN perteneciente al microsatélite, sin la formación de productos inespecíficos o dímeros de primer, y en alta intensidad. Para PO8 se obtuvo la banda de ADN del microsatélite en alta intensidad pero también se obtuvo productos inespecíficos. Mientras que para AHT121 y PO1i se obtuvo la banda de ADN del microsatélite en baja intensidad y con la formación de productos inespecíficos y dímeros de primer (Figura 3.25).

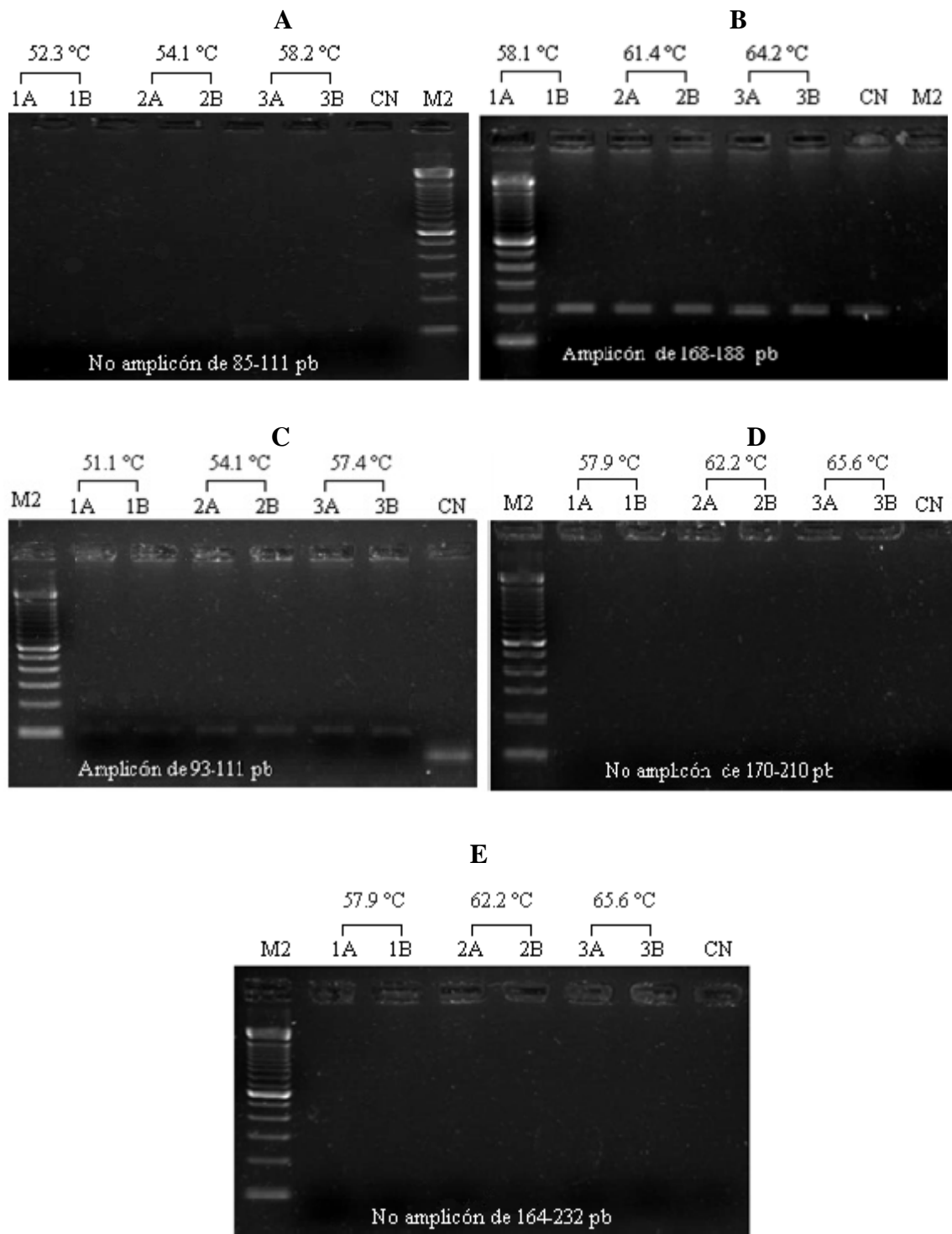


Figura 3. 24. Amplificación de 5 microsatélites en ADN nuclear de lobo de páramo empleando Taq polimerasa (FLMNH).

Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % teñido con SYBR Safe (Invitrogen™) donde se observan los resultados de la amplificación de 5 microsatélites en una muestra sanguínea de lobo de páramo. (A) AHT121, (B) CPH8, (C) CPH2, (D) PO8, (E) PO1i; M2 = Marcador de peso molecular de 100 pb; CN = Control negativo de la extracción.

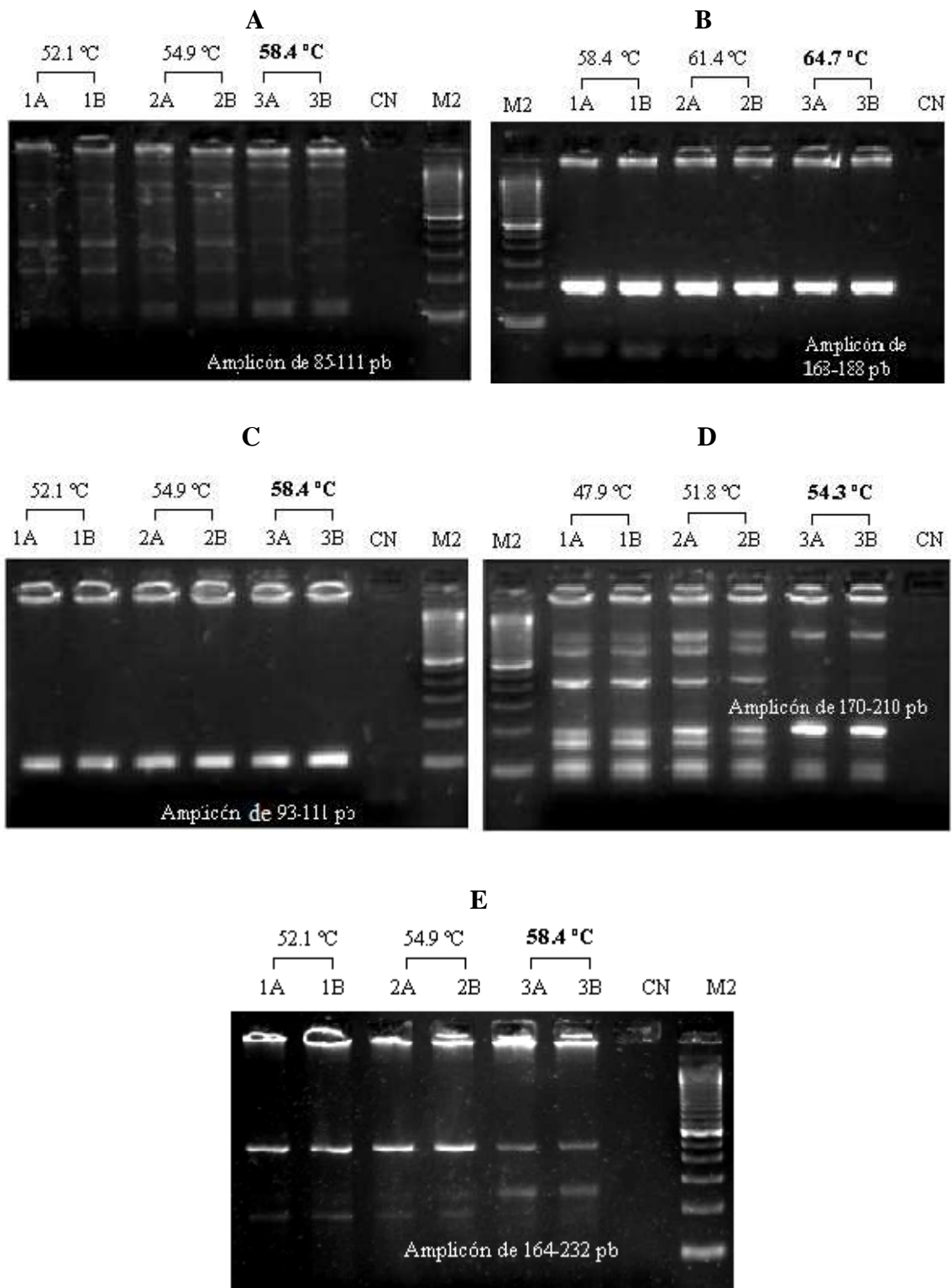


Figura 3. 25. Amplificación de 5 microsatélites en ADN nuclear de lobo de páramo empleando Taq polimerasa platinum (Invitrogen™).

Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % teñido con SYBR Safe (Invitrogen™) donde se observan los resultados de la amplificación de 5 microsatélites en una muestra sanguínea de lobo de páramo. (A) AHT121, (B) CPH8, (C) CPH2, (D) PO8, (E) PO1i; M2 = Marcador de peso molecular de 100 pb; CN = Control negativo de la extracción.

Tabla 3. 3. Temperatura de alineamiento óptima para la amplificación de 5 microsátélites en el material genético del lobo de páramo.

Microsátélites	(Ta) óptima
AHT121	58.4 °C
CPH8	64.7 °C
CPH2	58.4 °C
PO8	54.3 °C
PO1i	58.4 °C

3.8.1.2 Ensayo de Adyuvantes en muestras fecales

Se utilizó el ADN extraído de una muestra fecal de zoológico, empleando los microsátélites CPH8 y CPH2 que presentaron mayor amplificación en muestras sanguíneas. No se pudo amplificar el ADN fecal (Figura 3.26) por lo que se optó por realizar un ensayo de sensibilidad para determinar la concentración de ADN adecuada para amplificar los microsátélites.

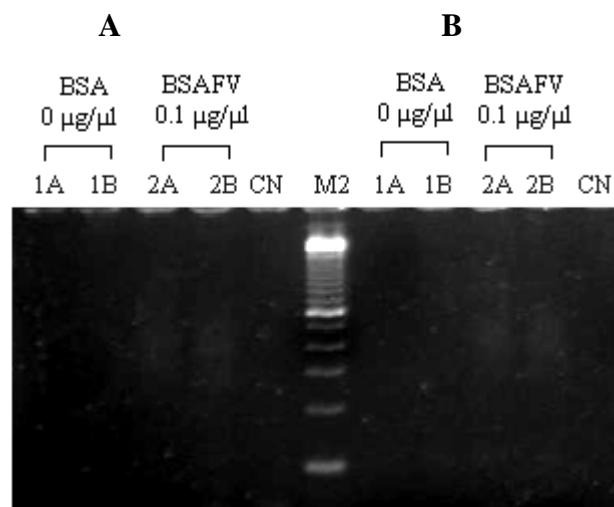


Figura 3. 26. Amplificación de los microsátélites (CPH8 y CPH2), ensayo con BSA.

Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % teñido con SYBR Safe (Invitrogen™) donde se observan los resultados de la amplificación de 3 microsátélites en una muestra fecal de lobo de páramo del zoológico. (A) CPH8, (B) CPH2; M2 = Marcador de peso molecular de 100 pb; CN = Control negativo de la extracción.

3.8.2 Ensayo de sensibilidad en muestra fecal

De las 5 diluciones realizadas con el ADN de una muestra fecal de zoológico a 20 ng/μl, el límite de detección fue la dilución 2, a una concentración de ADN de 10 ng/μl que equivale a haber amplificado 70 ng de ADN fecal, utilizando el microsatélite CHP2 (Figura 3.27).

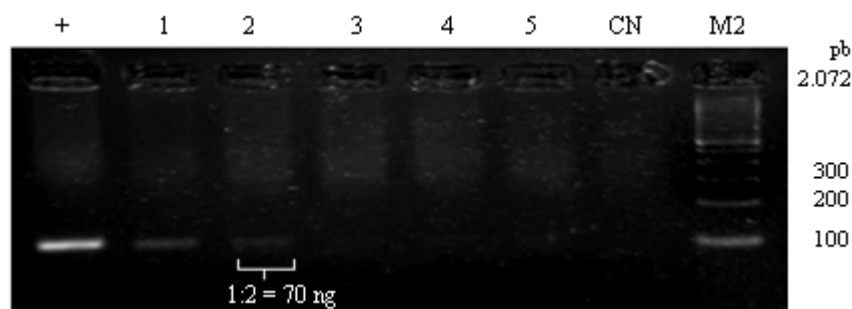


Figura 3. 27. Amplificación del microsatélites CPH2, ensayo sensibilidad.

Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % teñido con SYBR Safe (Invitrogen™) donde se observan los resultados de la amplificación del microsatélite CPH2 (93-111 pb) en una muestra fecal de lobo de páramo del zoológico; + = Control positivo; 1 = ADN 20 ng/μl; 2 = 10 ng/μl, 3 = 5 ng/μl; 4 = 2.5 ng/μl; 5 = 1.25 ng/μl ; M2 = Marcador de peso molecular de 100 pb; CN = Control negativo de la extracción.

3.8.3 Ensayo de especificidad

Se obtuvo como resultado que los primers utilizados son específicos para cánidos pero no específicos para amplificar solo microsatélites de lobo de páramo, CPH8 y CPH2 permitieron obtener un fragmento específico para lobo y perro, mientras que para AHT121, PO8 y PO1i se observó la formación de productos inespecíficos a parte del microsatélite (Figura 3.28).

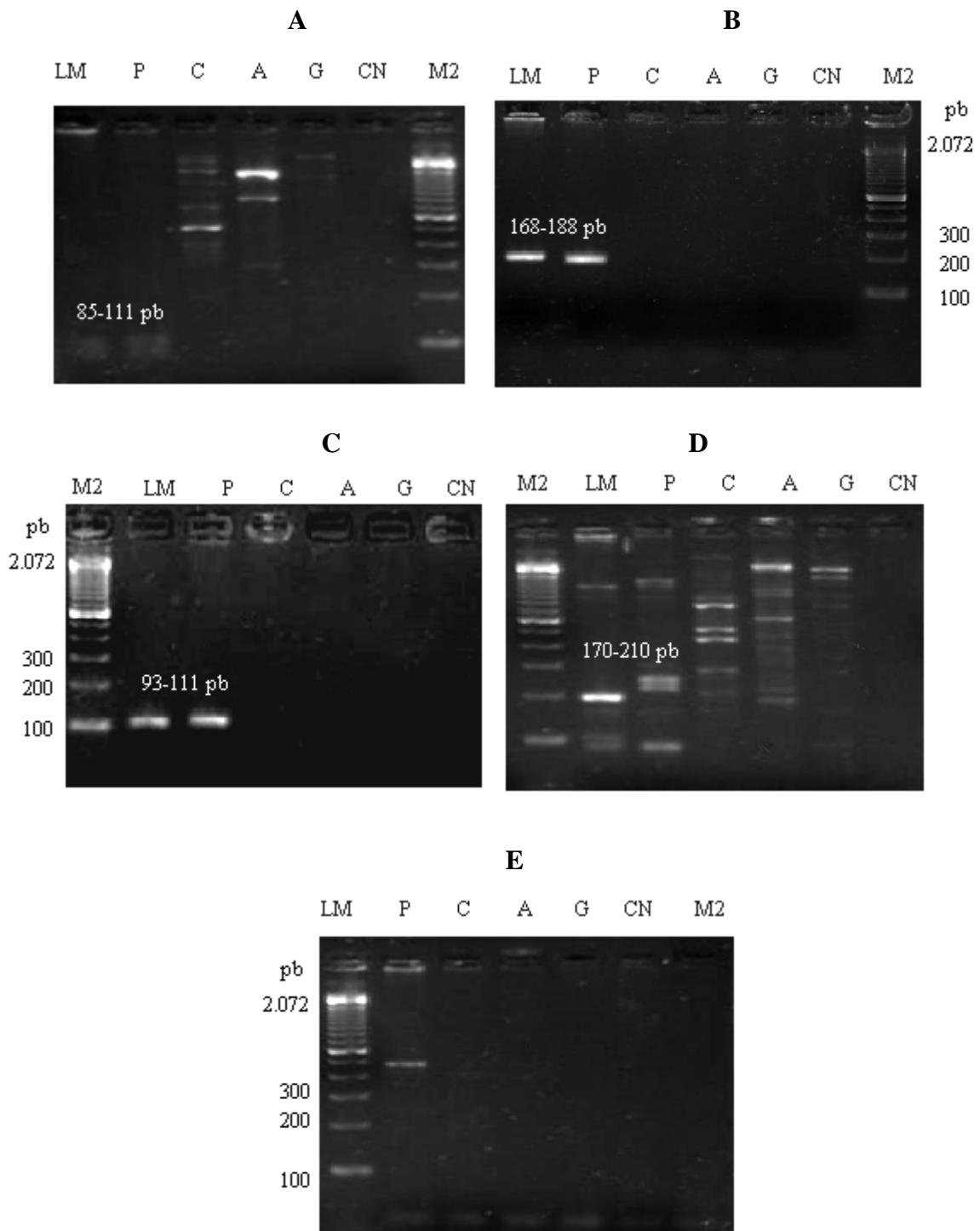


Figura 3. 28. Amplificación de 5 microsatélites en ADN nuclear de lobo de páramo, ensayo de especificidad.

Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % teñido con SYBR Safe (Invitrogen™) donde se observan los resultados del ensayo de especificidad para 5 microsatélites, (A) AHT121, (B) CPH8, (C) CPH2, (D) PO8, (E) PO1i; LM = Lobo de páramo macho, P = Perro, C = conejo, A = Gallina, G = Gato; M2 = Marcador de peso molecular de 100 pb; CN = Control negativo de la extracción.

3.8.4 Amplificación en todas las muestras fecales recolectadas

Se observó que en muestras fecales frescas amplificó de mejor manera los microsatélites CPH8 y CPH2 utilizando 45 ciclos de amplificación y Taq platinum, optimizando de esta manera la amplificación PCR para muestras fecales (Figura 3.29). Este protocolo se empleó en las demás muestras para verificar la eficiencia de amplificación de ADN nuclear a partir de muestras fecales semifrescas húmedas (Figura 3.30), semifrescas secas (Figura 3.31) y residuos (Figura 3.32).

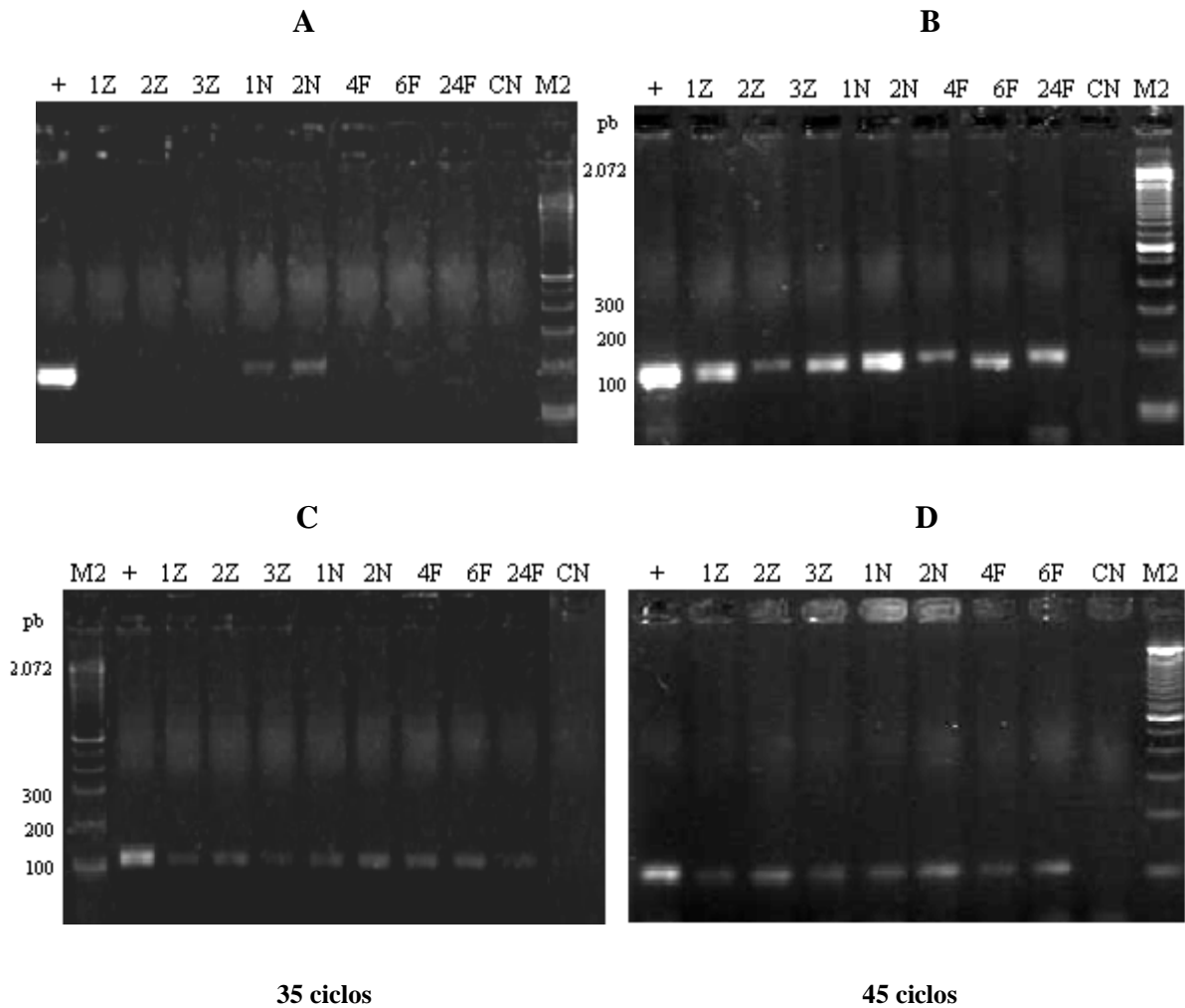


Figura 3. 29. Amplificación de 2 microsatélites en muestras fecales frescas.

Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % teñido con SYBR Safe (Invitrogen™) donde se observa la amplificación de los microsatélites CPH2, CPH8 a 35 y 45 ciclos de amplificación. (A) CPH8, 35 ciclos, (B) CPH8, 45ciclos, (C) CPH2, 35 ciclos, (D) CPH2, 45 ciclos; + = Control positivo; M2 = Marcador de peso molecular de 100 pb; CN = Control negativo de la extracción.

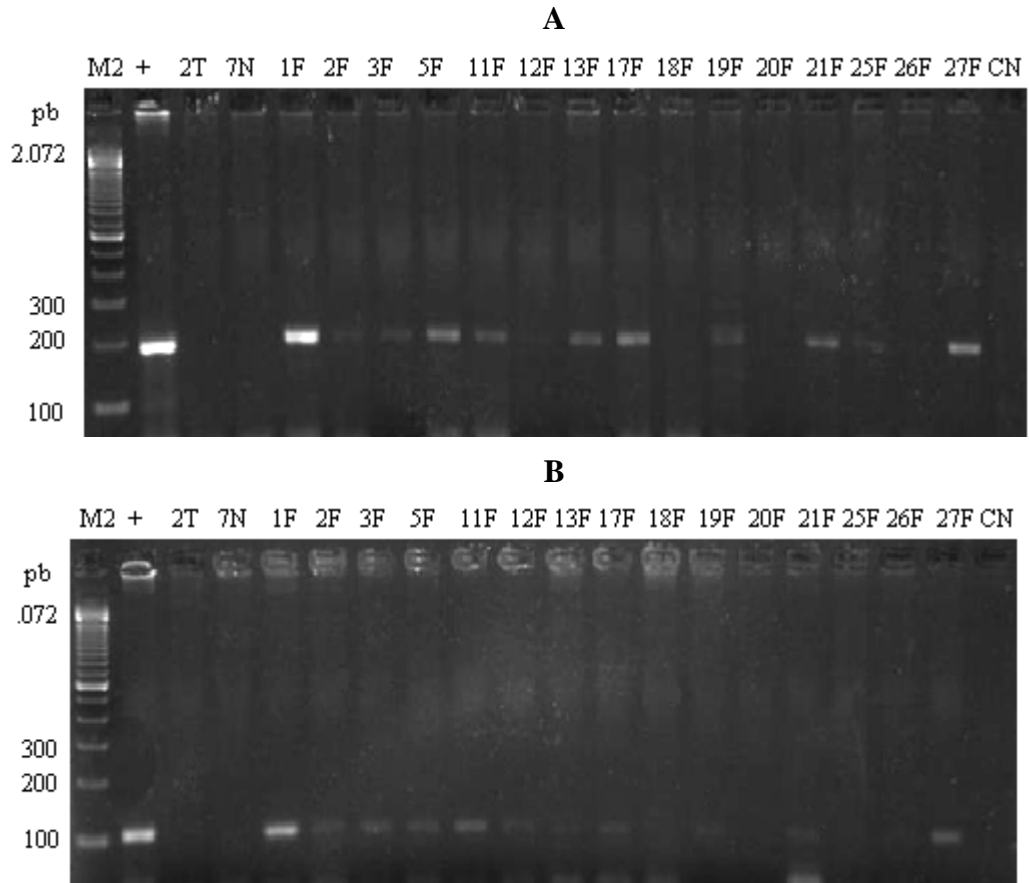


Figura 3. 30. Amplificación de microsatélites CPH8 y CPH2 en muestras fecales semifrescas húmedas.

Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % teñido con SYBR Safe (Invitrogen™) donde se observa la amplificación de microsatélites (A) CPH8 y (B) CPH2, en 45 ciclos de amplificación, + = Control positivo; M2 = Marcador de peso molecular de 100 pb; CN = Control negativo de la extracción.

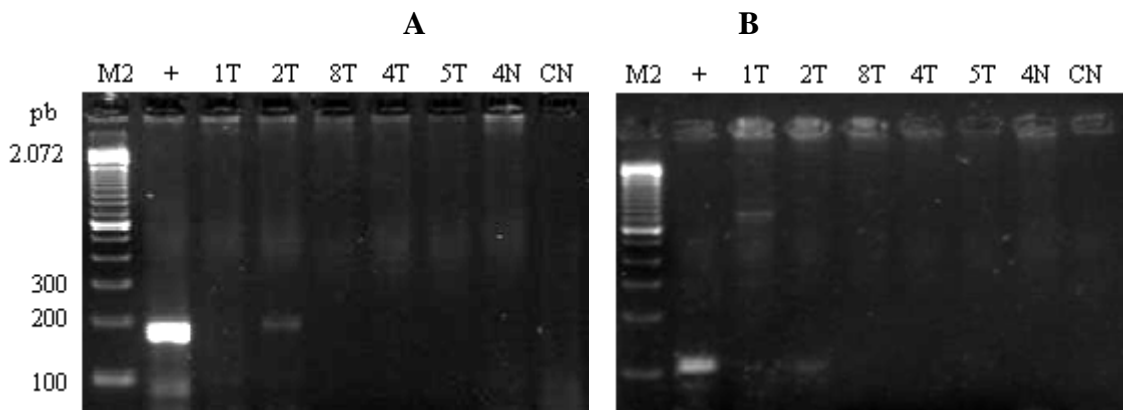


Figura 3. 31. Amplificación de microsatélites CPH8 y CPH2 en muestras fecales semifrescas secas.

Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % teñido con SYBR Safe (Invitrogen™) donde se observa la amplificación de microsatélites (A) CPH8 y (B) CPH2, en 45 ciclos de amplificación, + = Control positivo; M2 = Marcador de peso molecular de 100 pb; CN = Control negativo de la extracción.

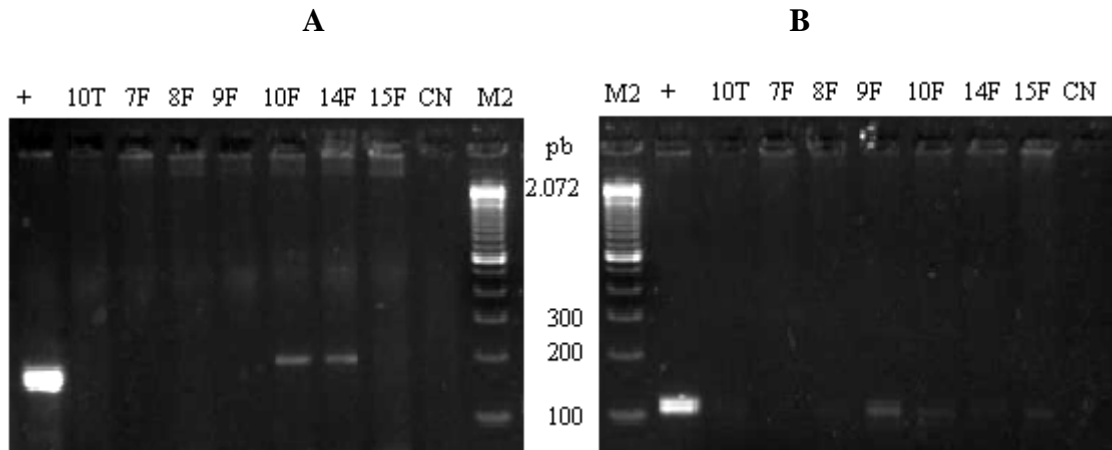


Figura 3. 32. Amplificación de los microsatélites CPH8 y CPH2 en muestras fecales residuos.

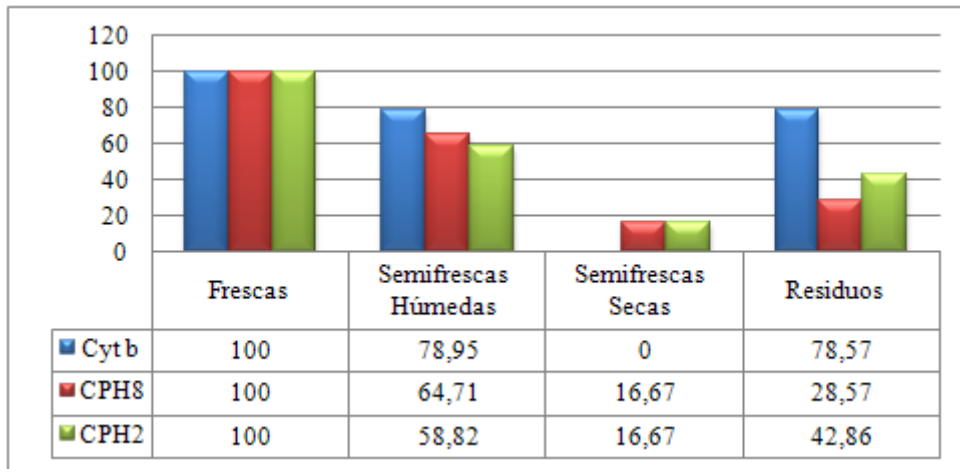
Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % teñido con SYBR Safe (Invitrogen™) donde se observa la amplificación de microsatélites (A) CPH8 y (B) CPH2, en 45 ciclos de amplificación, + = Control positivo; M2 = Marcador de peso molecular de 100 pb; CN = Control negativo de la extracción.

3.9 Análisis de amplificación

3.9.1 Amplificación de ADN mitocondrial y microsatélites en muestras fecales

Se comparó la amplificación e intensidad de banda para el amplicón de 200 pb del citocromo b y los microsatélites CPH8 y CPH2 en todas las muestras fecales categorizadas en función de la edad de la muestra. Los resultados mostraron que para muestras frescas y semifrescas húmedas se obtienen los mejores resultados. Para muestras semifrescas secas se da la más baja amplificación e intensidad de banda, pues no se amplificó el ADN mitocondrial, mientras que en muestras residuos se amplificó ADN mitocondrial y microsatélites en pequeñas proporciones (Figura 3.33)

A



B

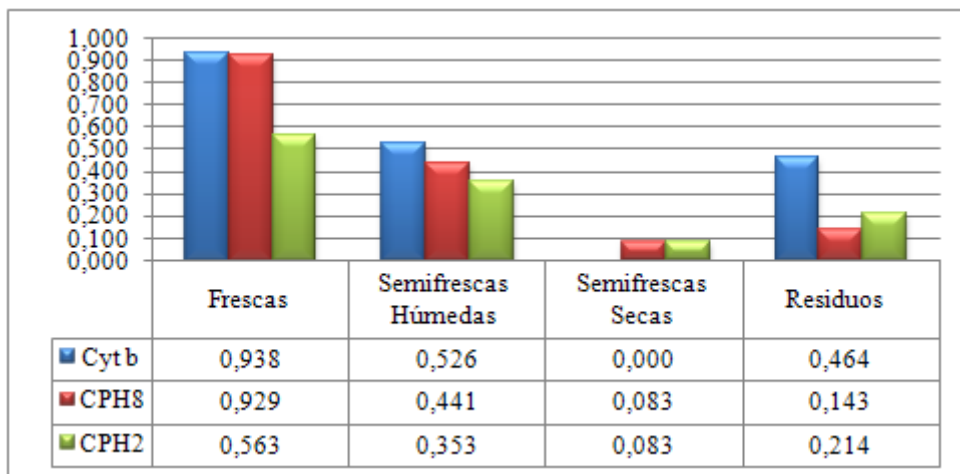


Figura 3. 33. Porcentajes de amplificación e intensidad de banda en muestras fecales.

(A) Porcentaje de amplificación, (B) Intensidad de banda. (Datos obtenidos Anexo I, J, K).

3.9.2 Evaluación de la amplificación del citocromo b en función del tiempo de almacenamiento de las muestras fecales

Se analizó la amplificación de las muestras fecales mediante la amplificación del citocromo b, tomando en cuenta que fueron almacenadas en diferentes fechas, observando que mediante el protocolo de extracción de ADN se puede amplificar

muestras que fueron recolectadas hace 6 meses, y se amplifica mejor si se extrae el ADN lo más rápido posible (Tabla 3.4 y Figura 3.34).

Tabla 3. 4. Amplificación del *Cytb* en muestras fecales de lobo de páramo en función del tiempo de almacenamiento.

Fecha de recolección	Tiempo de almacenamiento ¹	Total	Amplificados ²	% de amplificación
Sep-2011	6 meses	3	3	100
Oct-2011	5 meses	10	2	20
Nov-2011	4 meses	7	3	42.9
Feb-08-2012	1mes	27	27	100

¹Extracción de ADN en marzo 2012.

²Amplificación PCR en marzo 2012

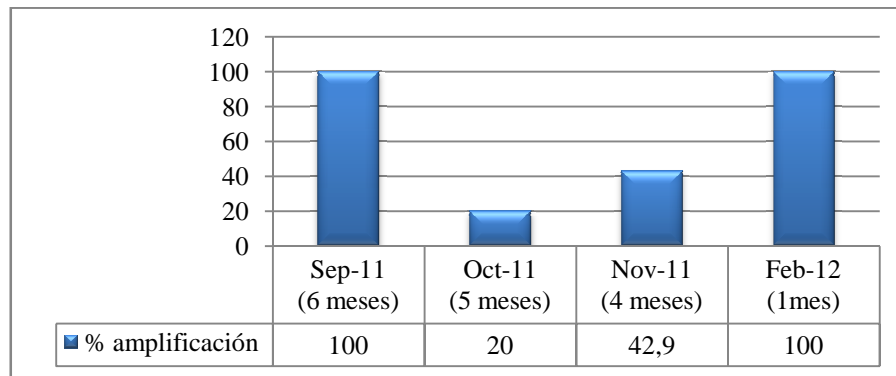


Figura 3. 34. Distribución de la amplificación de muestras fecales en función del tiempo de almacenamiento.

(Datos obtenidos Tabla 3.14).

3.9.3 Facilidad de la técnica para identificar muestras fecales

Además de las características típicas de las heces de lobo de páramo, el diámetro es una característica más que sirve para discriminarlas. El rango de 12 mm a 36 mm resultó ser el más seguro para identificar heces de lobo de páramo en el Parque Nacional Cayambe-Coca, pues se logró amplificar el *Cytb* en muestras fecales con este rango de diámetro de las heces (Anexo I). Del total de muestras analizadas, la técnica obtuvo los

siguientes rendimientos (Tabla 3.16) convirtiéndole en una técnica eficaz pese a las condiciones de conservación y almacenamiento de las muestras fecales.

Tabla 3. 5. Rendimiento del protocolo de extracción y amplificación de ADN estandarizado en muestras fecales de lobo de páramo.

Constantes	Extracción ADN	<i>Cytb</i>	CPH8	CPH2
Relación	47/47	37/ 47	21/ 37	22/ 37
% Amplificación	100	78,72	56,76	59,46

3.10 Identificación de Parásitos gastrointestinales en muestras fecales de lobo de páramo

De 43 muestras analizadas en el 23.26% (10/47) se evidenció la presencia de quistes de *Eimeria sp.* (Figura 3.35) y en el 4.65% (2/47) la presencia de huevos de *Áscaris spp.* (Figura 3.36). El estudio morfológico de los quistes y huevos se basó en el tamaño, forma y tipo de pared y permitió diferenciar en 2 fases evolutivas de *Eimeria spp.* y 2 fases de *Ascaris spp.*

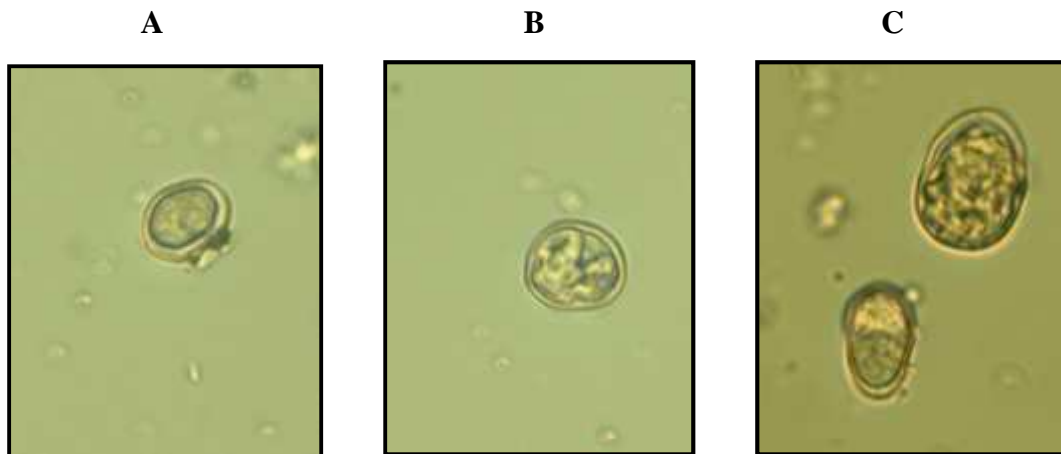
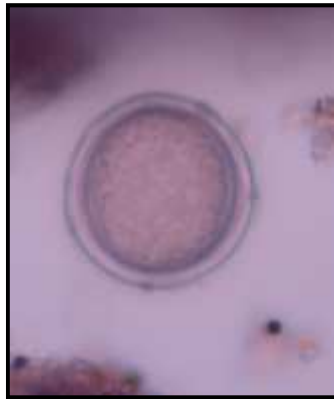


Figura 3. 35. Quistes de *Eimeria spp.*

(A) *Eimeria spp.* 1, fase de una célula. (B) *Eimeria spp.* 1, esporulado. (C) *Eimeria spp.* 2, fase de una célula.

A



B



C



D



Figura 3. 36. Huevos de *Ascaris spp.* 1 y 2
(A, C) Huevo fase celular (B, E) Huevo embrionado.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

El estudio de la fauna silvestre aplicando métodos no invasivos como la recolección de muestras fecales, su extracción de ADN y su posterior amplificación *in vitro* empleando la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se ha convertido en los últimos años en una alternativa eficaz para estudiar las poblaciones de carnívoros a través de indicios de su presencia (Paxinos *et al.*, 1997; Prugh *et al.*, 2005; Echegaray *et al.*, 2008; Berry, 2007; Smith *et al.*, 2005). Las ventajas de utilizar muestreos no invasivos se centran en la facilidad de obtener muestras sin capturar a los animales y por ende sin causarles estrés, o exponerlos a un peligro por los sedantes que se utilizan para capturarlos (Heymann *et al.*, 2006; Beja *et al.*, 2009). Y al menor despliegue de personal y recursos para localizar los excrementos de los animales; convirtiendo a la técnica en un método menos costoso para realizar un censo masivo de las poblaciones de cánidos (Echegaray *et al.*, 2008).

Estas características convierten al muestreo no invasivo a través de la recolección y análisis de las heces, en una técnica aplicable para estudiar al lobo de páramo del Ecuador, especie que enfrenta un alto riesgo de extinción en estado silvestre, y cuya conservación se mejoraría sí se existieran más estudios en torno a la especie, a fin de establecer planes de conservación (Zapata-Ríos *et al.*, 2011). La estandarización de un protocolo para la extracción de ADN a partir de muestras fecales es un proceso difícil, debido a que el ADN del individuo a extraer se encuentra en pequeñas cantidades, degradado o contaminado con material genético exógeno e inhibidores de la PCR como sales biliares, polisacáridos y bilirrubina presentes en las heces (Taberlet *et al.* 1999; Broquet *et al.* 2007). Actualmente existen métodos rápidos y eficaces para la extracción de ADN fecal, sin embargo la mayoría de estos utilizan kits de extracción de ADN, que son altamente costosos y no aplicables a la realidad nacional. La estandarización conlleva además a determinar cuáles muestras fecales recolectadas son aptas para ser utilizadas en estudios genéticos, como influye la edad de deposición de las heces, su conservación, el método empleado de extracción de ADN y si realmente este ADN obtenido puede ser amplificado por PCR (Panasci, 2009; Waits & Paetkau 2005; Taberlet *et al.* 1999; Frantzen *et al.* 1998).

En este contexto, se analizaron los resultados de los procedimientos realizados en esta investigación para garantizar la estandarización de un protocolo manual de extracción de ADN menos costoso y más accesible para aplicarlo a las muestras fecales de lobo de páramo.

4.1 Recolección de muestras

Los resultados de este muestreo preliminar (Ver Figura 3.8) muestran que el mejor método para obtener muestras fecales de lobo de páramo es aplicando el transecto lineal de deposición en carretera de 2.5 km, obteniendo una mayor cantidad de muestras fecales (19 muestras) en un camino poco transitado del área protegida, que por el método de conteo de heces en un área superficial de 500 m² (5 muestras en promedio por cada uno de los 5 sitios muestreados). La presencia de una mayor cantidad de muestras fecales en la carretera, puede darse debido al comportamiento general de los cánidos y en este caso del lobo de páramo de recorrer grandes distancias en busca de alimento, realizando estos desplazamientos mayoritariamente por la noche, ya que es una especie poco sensible a la perturbación humana, el desplazamiento de los lobos de páramo por carreteras sería la mejor opción tomada por los lobos para desplazarse dentro del área protegida (Jiménez & Navarro, 2004; Salvatori *et al.*, 1999). Otra de las causas de la diferencia en la cantidad de heces es que el muestreo aplicado es un muestreo preliminar que sirvió para ubicar la presencia de los lobos a través de las heces. Así que para obtener datos más correctos de la distribución real de los lobos en el área protegida, sería necesario realizar un muestreo más completo que incluya: la recolección de excrementos en más sitios, la evaluación de la influencia que causan las diferentes temporadas (invierno o verano) en la recolección, la repetición del análisis en los sitios de muestreo, entre los factores más importantes (Echegaray *et al.*, 2008).

4.2 Conservación de la muestra fecal

La conservación de la muestra fecal a -20 °C sin la adición de ningún conservante resultó ser el mejor método de conservación. Al adicionar etanol al 100% se obtuvo un ADN contaminado y de color marrón (Ver Figura 3.10). Esto se produce debido a que la

muestra fecal que está expuesta al etanol, puede solubilizar compuestos orgánicos como polifenoles (Antolovich *et al.*, 2000) que pueden co-precipitar con el ADN dándole esa tonalidad (Loomis, 1974). Según Porebski *et al.* (1997), el método manual de extracción de ADN no puede eliminar completamente estos compuestos, y pueden actuar estas sustancias como inhibidores de la PCR (Broquet *et al.* 2007). Investigaciones realizadas por Zhang *et al.* (2006) y Mukherjee *et al.* (2007), demostraron que se puede usar el etanol al 100 % para conservar las muestras fecales, sí se emplea un kit de extracción de ADN con columnas de purificación, el cual permite una separación selectiva del ADN (Frantz *et al.*, 2003; Bosch *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Este procedimiento no se realizó durante esta investigación.

4.3 Validación de tres métodos de extracción de ADN a partir de muestras fecales

Con los tres métodos manuales evaluados en esta investigación: SDS/CAI para extraer ADN de heces humanas (Abbaszadegan *et al.*, 2007), CTAB/CAI para extraer ADN de heces de monos aulladores del Brasil (*Alouatta caray*) (Oklander *et al.*, 2004) y 2CTAB/CAI para extraer ADN de heces de primates del mediterráneo (*Macaca sylvanus*) y gorilas (*Gorilla g. gorilla*) (Vallet *et al.*, 2008). Se demostró que se puede extraer un ADN puro y de buena cantidad a partir de muestras fecales de lobo de páramo, sin la necesidad de utilizar un kit específico para extracción de ADN a partir de excrementos (Ver Figura 3.9). Logrando este objetivo, si se modifican métodos manuales que no se han desarrollado específicamente para este carnívoro andino.

En cuanto a la aplicación de un tratamiento previo de las muestras fecales antes de la extracción de ADN, realizando múltiples lavados con suero fisiológico (Ver Figura 3.11), resultó fundamental para el éxito de los métodos de extracción en heces de lobo de páramo, ya que no se pudo extraer ADN fecal sin utilizar suero fisiológico. Resultados similares demostraron que al lavar previamente muestras fecales de cerdos con una buffer salina, se incrementó la cantidad de ADN en el proceso de extracción a partir de excrementos (Tang *et al.*, 2008). Además del pretratamiento, la forma de colocar la muestra fecal resultó ser importante al momento de estandarizar el método.

En los tres protocolos originales se usaron porciones de heces directamente en cada microtubo de extracción, lo cual no es adaptable para las heces del lobo de páramo, pues al tratarse de excrementos que están envueltos en pelo, son compactos y resulta difícil segmentarlos y tomar solo una pequeña porción de la parte externa de la muestra para cada microtubo. Por lo que se propuso tomar una mayor cantidad de muestra, homogenizarla en un tubo más grande y de aquí tomar una alícuota. Convirtiéndolo en un método útil para muestras fecales de lobo de páramo, porque garantiza que se tomen más células epiteliales del intestino que se encuentran mayoritariamente en la parte externa de las muestras fecales (Wasser *et al.*, 1997).

Adicionalmente, se observó que el rol de los lavados con cloroformo/alcohol isoamílico en los tres métodos utilizados en esta investigación es importante. Especialmente si tomamos en cuenta que estamos trabajando con un ADN sumamente contaminado. La eliminación de los contaminantes presentes en heces evitan que puedan interferir con la amplificación en la PCR (Surzycki, 2000). Finalmente precipitar el ADN con etanol a -20 °C por más de 30 minutos mejora su recuperación a través de la formación de un mejor precipitado de ADN (Surzycki, 2000).

4.4 Determinación del mejor método de extracción de ADN fecal

El tercer método 2CTAB/CAI resultó ser el más eficiente para la obtención de ADN con niveles altos de pureza (absorbancia a 260/280 nm. de 1.65), y una buena concentración (51.16 ng/μl). Una de las posibles razones de su mayor pureza puede centrarse en que solo en este método se realizó una segunda aplicación del buffer de lisis CTAB. Según Nishimura *et al.* (2010), este detergente ha sido empleado satisfactoriamente para extraer ADN de tejidos vegetales, y eliminar sustancias inhibitoras de la PCR como pigmentos, polisacáridos y compuestos fenólicos. Debido a que las heces presentan similares compuestos contaminantes (Loomis, 1974; Taberlet *et al.* 1999; Broquet *et al.* 2007), el CTAB estaría contribuyendo a la eliminación de estos contaminantes, aumentando la pureza del ADN extraído. Según Chaves *et al.* (2006), este factor es importante, ya que el ADN más puro puede amplificarse de mejor manera al contener menor cantidad de inhibidores de la PCR.

No se pudo extraer una buena cantidad de ADN de una muestra fecal fresca recolectada en el Zoológico de Quito aplicando el mejor método 2CTAB/CAI, por lo que se estandarizó nuevamente el método para muestras de zoológico (Ver Figura 3.15) Esto se pudo dar debido a la dieta diferente de un lobo de páramo de zoológico en comparación a la de un lobo de páramo silvestre (el lobo del zoológico consume un mayor cantidad de proteína y carbohidratos), lo que conlleva a que las heces difieran en composición y textura. Se observó que las muestras del zoológico son más difíciles de extraer su ADN, debido a una mayor cantidad de compuestos orgánicos en descomposición. Esto comprobó lo expuesto por Murphy *et al.* (2003) y Piggott (2004), en cuanto a la extracción de ADN de muestras fecales, en donde se hace énfasis en que la extracción y posterior amplificación del ADN se ven influenciada por la dieta de las especies, y que se debe estandarizar la extracción para un caso particular de muestra fecal.

4.5 Evaluación de la eficacia del protocolo de extracción de ADN fecal

Los resultados de la extracción de ADN en todas las muestras fecales recolectadas (Ver Figura 3.16), mostraron 100 % de extracción aplicando el método 2CTAB/CAI, sin importar la edad de deposición de las muestras fecales. Este resultado es superior al obtenido por Smith *et al.* (2006), que extrajo ADN de muestras fecales de zorro de San Joaquín (*Vulpes macrotis mutica*) en California con una eficiencia del 76 %, utilizando el kit de extracción QIAGEN DNeasy™.

Se observó además que la concentración y pureza del ADN extraído no guardan relación con la edad de deposición de las muestras fecales, siendo valores independientes. El promedio obtenido en cuanto a concentración y pureza (68.55 ng/μl y A 260/280 nm de 1.745, respectivamente), es superior a la obtenida por Stauffe *et al.* (2008), utilizando el kit *QIAamp DNA Stool Mini kit*, en la extracción de ADN de muestras fecales de felinos con valores de 38.3 ng/μl de concentración y A 260/280 nm de 1.2 de pureza. En el estudio realizado por Kays *et al.* (2008), se utilizó el mismo kit de extracción para muestras fecales de coyote (*Canis latrans*), obteniendo una

concentración promedio del ADN de 1.58 ng/μl que es un valor sumamente inferior que el obtenido mediante el método 2CTAB/CAI, estandarizado en esta investigación.

4.6 Amplificación del ADN mitocondrial fecal por PCR

El ADN obtenido de las muestras fecales recolectadas, no pertenece solo al lobo de páramo, sino que también puede estar incluido el ADN exógeno proveniente de: bacterias que se encuentran en el tracto digestivo, parásitos, ADN de presas que no son bien digeridas y posiblemente ADN de otros carnívoros cuyas heces presentan similares características y no pueden ser diferenciadas del lobo de páramo a simple vista (Broquet *et al.* 2007; Palacios, 2007; Murphy *et al.*, 2003; Taberlet *et al.* 1999). Para poder diferenciar el ADN de lobo de páramo, se diseñó primers específicos para el género *Lycalopex*, que amplifican un fragmento de 200 pb del citocromo b del ADN mitocondrial. El diseño de primers específicos para el género *Lycalopex*, realizando alineamientos con las secuencias parciales del citocromo b del lobo de páramo (*Lycalopex culpaeus*) y de 4 especies de zorros sudamericanos (*L. vetulus*, *L. gymnocercus*, *L. griseus* y *L. sechurae*) además de las secuencias del citocromo b del lobo (*Canis lupus*) y del perro doméstico (*Canis lupus familiaris*) mediante herramientas bioinformáticas (Ver Figura 2.3), resultaron ser una buena opción para identificar secuencias conservadas en el gen del citocromo b para la especie y de esta manera diseñar los primers de manera que no presenten regiones homólogas para otra especie de carnívoro u organismo. Las secuencias conservadas en el gen del citocromo b han resultado ser el marcador genético más útil para la identificación de mamíferos silvestres, y uno de los más utilizados actualmente en carnívoros (Castresana, 2001; Chaves *et al.*, 2012).

En cuanto a la estandarización de la amplificación por PCR del citocromo b, resultó importante empezar primero amplificando el ADN obtenido de una muestra sanguínea del Zoológico de Quito en Guayllabamba, para asegurarse de estar trabajando con un ADN óptimo, ya que el ADN fecal puede estar muy degradado o contaminado con ADN exógeno (Taberlet *et al.* 1999). La temperatura de alineamiento encontrada para la hibridación de los primers fue 66.6 °C, permitiendo obtener un fragmento de 200

pb sin la formación de productos inespecíficos o dímeros de primer (Ver Figura 3.18). El siguiente paso fue estandarizar la amplificación en muestras fecales recolectadas en el zoológico para asegurarse de estar trabajando con el material genético del lobo de páramo, si hubiese el error de haber recolectado en el páramo muestras fecales de otro carnívoro. El uso del BSA como adyuvante de la reacción PCR, fue fundamental, pues permitió que no se formen productos inespecíficos, favoreciendo la amplificación del ADN extraído de las heces. Según Kohn & Wayne (1997), el BSA actúa como una matriz que absorbe los inhibidores de la PCR como sales biliares y bilirrubina, presentes en las heces y que dificultan su amplificación. La concentración de 100 µg/ml de BSA resultó ser la óptima, menor concentración no ayuda en la reacción, mientras que una mayor concentración actúa como inhibidor de la Taq polimerasa (Chaves *et al.*, 2006).

Otros factores importantes para amplificar el ADN mitocondrial fueron los ensayos de sensibilidad y especificidad. El ensayo de sensibilidad permitió hallar la mínima cantidad de ADN mitocondrial que puede ser amplificado por el sistema, para lo cual se determinó la sensibilidad analítica, realizando diluciones sucesivas del ADN fecal de una muestra del zoológico; encontrando un límite de detección de 0.2 ng/ul, equivalente a amplificar 1000 pg de ADN PCR, sí se utiliza Taq polimerasa convencional. Mientras que el ensayo de especificidad realizado entre el ADN obtenido de una pareja de lobos del zoológico, frente a los controles negativos de perro (*Canis lupus familiaris*), pariente cercano al lobo de páramo, conejo (*Oryctolagus cuniculus*) y gallina (*Gallus gallus*), presas del lobo de páramo y de gato doméstico (*Felis catus*), pariente cercano del puma, permitieron comprobar que los primers diseñados son específicos para amplificar ADN del género *Lycalopex*, confirmando su especificidad.

La estandarización de la amplificación de un fragmento del citocromo b que es específico para el género *Lycalopex*, es sumamente importante, pues es un método eficaz para la identificación de lobos de páramo en el área protegida a través de indicios como son las muestras fecales, evitando la captura de los animales para los análisis genéticos. Además permite diferenciarlo de otros cánidos como el perro doméstico, siendo este un factor crucial para el manejo y protección de esta especie. Este método no invasivo de amplificación del citocromo b a partir de ADN obtenido de muestras

fecales ha sido utilizado con éxito por Berry (2007) para identificar al zorro rojo (*Vulpes vulpes*) especie invasora en Australia. Echegaray *et al.* (2008) uso este ADN mitocondrial para identificar a lobos (*Canis lupus L.*), en el País Vasco. Farrel *et al.* (2000) lo usaron para identificar al zorro cangrejero (*Cerdocyon thous*), al puma (*Puma concolor*) y al jaguar (*Panthera onca*) en Sudamérica.

La facilidad de utilizar el ADN mitocondrial en esta clase de estudios genéticos radica en tres características sumamente importantes. La primera es que el ADN no se replica por lo que permanece intacto en la población y es heredado por la madre, permitiendo de esta manera diseñar primers específicos para el género o la especie. La segunda es que al tratarse de un ADN pequeño (15-20 kb), es más fácil su clonación y posterior secuenciación, característica que ha facilitado su estudio, permitiendo que existe una mayor información de este ADN en las poblaciones silvestres (Hurst & Jiggins, 2005). Por último la tercera característica se centra en que una típica célula somática animal tiene más copias del genoma mitocondrial que el ADN nuclear, pues se ha observado de 500 a 1000 mitocondrias por célula (Jimeno & Hidalgo, 2006). Facilitando la amplificación de este ADN en muestras fecales, que generalmente poseen una baja cantidad y calidad de ADN.

4.7 Amplificación de microsatélites en el ADN fecal

Debido a que no se han diseñado primers específicos para amplificar microsatélites en el lobo de páramo, se utilizó primers que amplifican microsatélites en otros cánidos. El uso de microsatélites entre especies emparentadas, ya se ha utilizado en mamíferos (Gonzalez, 2003). Como ejemplo, la técnica ha sido utilizada para obtener datos genéticos del lobo (*Canis lupus*) de los Alpes italianos empleando microsatélites identificados en el perro doméstico (*Canis lupus familiaris*) con gran éxito (Lucchini *et al.*, 2002). Haciendo referencia a que el lobo de páramo en realidad es un zorro, se utilizó 3 microsatélites de los 31 utilizados por Moore *et al.* (2010), en el estudio de genotipificación del zorro rojo (*Vulpes vulpes*), estos microsatélites fueron identificados inicialmente en el perro doméstico. Y también se utilizó 2 microsatélites de los 15

identificados por Li *et al.* (2011), específicamente para el zorro tibetano (*Vulpes ferrilata*) (Ver Figura 2.8).

En relación a la estandarización de la amplificación PCR de los microsatélites, se utilizó el ADN obtenido de la sangre de un lobo de páramo del zoológico para asegurarnos de estar trabajando con un ADN óptimo. Al realizar los ensayos de gradiente de temperatura se observó una mejor amplificación con la Taq de alta fidelidad. Esto ya se observó en la amplificación del ADN mitocondrial en una muestra representativa de excrementos, en donde se mejoró la amplificación e intensidad de bandada al amplificar el citocromo b, obteniendo resultados positivos de amplificación en las muestras residuo que anteriormente con Taq polimerasa convencional no se pudo amplificar. Esto puede darse debido a que la Taq de alta fidelidad posee una actividad “Hot Start” automática que se activa durante la desnaturalización a 94 °C, incrementando la sensibilidad, especificidad y rendimiento de la PCR, además reduce los requerimientos de optimización de la reacción (Invitrogen Corp., 2010b).

De los cinco microsatélites amplificados en muestras sanguíneas de lobo de páramo, se observó que solo 2 amplifican el microsatélite esperado con alta intensidad (CPH8, amplicón entre 168-188 pb y CPH2, amplicón entre 93-111 pb), para los microsatélites AHT121 y PO1i se observó una baja amplificación y formación de productos inespecíficos. Mientras que para el microsatélite PO8 se observó un fragmento de alta intensidad pero también la formación de productos inespecíficos. Según González (2003), la utilización de primers de una especie, para amplificar por PCR microsatélites en especies cercanas, tiene como principal inconveniente la aparición de alelos nulos, debido a sustituciones, deleciones e inserciones en las secuencias que corresponden a los sitios de unión del primer y la aparición de amplificaciones inespecíficas debido a la unión no específica de los primers.

El ensayo de especificidad realizado entre el ADN de lobo y controles negativos empleados, reveló que los microsatélites CHP8 y CPH2 son específicos para cánidos, amplificando una banda claramente definida para la muestra de ADN de lobo y de perro. Para los microsatélites AHT121, PO8 y PO1i se observó bandas poco definidas, y

formación de productos inespecíficos. Estos resultados permitieron determinar que los microsatélites CPH8 y CPH2 están conservados en el perro doméstico (*Canis lupus familiaris*), en el zorro rojo (*Vulpes vulpes*) y según los resultados obtenidos también están conservados en el lobo de páramo (*Lycalopex culpaeus*). Por lo que esta clase de microsatélites inicialmente identificados en el perro doméstico, serían una buena opción para continuar con estudios genéticos, ya que todavía no se han identificado microsatélites específicos para el lobo de páramo. Siempre y cuando se utilice primero la amplificación específica del citocromo b diseñada en esta investigación para diferenciar si se trata de perro o lobo de páramo, y sí se utiliza un mayor número de microsatélites para identificar más polimorfismos que permitan identificar a los individuos. Aunque la mejor opción sería diseñar primers específicos para el lobo de páramo. De esta manera no se presentarían tantos problemas a la hora de la amplificación, y permitirían una discriminación completa de esta especie frente a otros cánidos.

El siguiente paso fue amplificar los microsatélites CPH8 y CPH2 en muestras fecales, probando de esta manera que también se puede amplificar ADN nuclear de las muestras fecales recolectadas. Se utilizó la misma concentración de BSA de 100 µg/ml para mejorar la amplificación. En un primer intento no se logró la amplificación, por lo que se realizó un ensayo de sensibilidad analítica, para determinar la concentración de ADN a la cual se puede amplificar el microsatélite CPH2 realizando diluciones sucesivas del ADN fecal de una muestra del zoológico; encontrando un límite de detección de 10 ng/ul de ADN, equivalente a amplificar 70000 pg de ADN. Esto significó que se necesita 70 veces más la cantidad de ADN fecal empleada para un microsatélite que para amplificar ADN mitocondrial, explicándose estos resultados debido a que existe una mayor cantidad de ADN mitocondrial que ADN nuclear en una célula animal (Jimeno & Hidalgo, 2006).

Finalmente, la importancia del uso de microsatélites de ADN nuclear radica en dos ventajas importantes en cuanto a la amplificación de ADN de muestras fecales. La primera su elevada tasa de polimorfismo permite el estudio de la fauna silvestres a nivel individual y poblacional, sin tomar contacto directo con los animales (Gonzalez, 2003).

A nivel individual, la identificación de alelos permite asignar a un individuo a un probable grupo de origen, permitiendo análisis de parentesco, paternidad y el análisis de estructuras intrapoblacionales. A nivel poblacional se puede estudiar la pérdida de la variabilidad genética de las poblaciones, causada por la reducción severa del tamaño de la población y fragmentación de su hábitat y aislamiento, formando posibles cuellos de botella en donde las especies corren el peligro de extinción (Godoy, 2009, González, 2003). La segunda ventaja hace referencia a que el ADN de muestras fecales puede ser amplificado por PCR, ya que el ADN de los microsatélites a utilizarse no necesita ser de alta calidad, puede estar en un avanzado estado de degradación y puede encontrarse en cantidades reducidas (González, 2003).

4.8 Eficiencia en la amplificación de ADN fecal en todas las muestras fecales recolectadas

Según Lucchini *et al.* (2002), las condiciones ambientales a las que están expuestas las muestras fecales antes de su recolección como temperatura, humedad, exposición al sol, dificultan la extracción y posterior amplificación del ADN, siendo también importante el tiempo que están expuestas a estas condiciones. Por lo que es necesario analizar la amplificación del ADN fecal en función de la edad de deposición de los excrementos, a fin de determinar cuáles son más aptas para ser usadas en estudios genéticos. Debido a que no se puede determinar el tiempo exacto que estuvo la muestra en el páramo después de la deposición, clasificar a las heces en función de características externas que combinan el color y el brillo de la capa externa de la muestra fue una buena alternativa para ubicar si se trataban de muestras frescas, semifrescas secas, semifrescas húmedas o residuos (Palacios, 2007).

Para muestras frescas se observó un 100 % de amplificación para todos los 3 marcadores, con una alta intensidad de banda, convirtiendo a estas muestras en las mejores para análisis genéticos, debido a que estas muestras se encontraban menos expuestas a las condiciones ambientales y por ende el ADN tiende a degradarse menos (Lucchini *et al.*, 2002). La segunda mejor amplificación se observó en muestras

semifrescas húmedas recolectadas en días nublados con poca radiación solar con valores de amplificación para el *Cytb* del 78.95%, CPH8 del 64.71 y CPH2 del 58.82 % con una intensidad de banda media, las bajas temperaturas del páramo y la poca radiación solar conservaron mejor el ADN (Luccihini *et al.*, 2002). Mientras que para muestras semifrescas secas recolectadas en días soleados se observó nula amplificación para ADN mitocondrial y valores bajos de amplificación para CHP8 y CPH2 del 16,67 % con una intensidad de banda sumamente baja, debido a que la elevada radiación y altas temperaturas degradan más rápidamente el ADN (Luccihini *et al.*, 2002). Por último en muestras residuos recolectadas en días nublados con poca radiación solar, se observó una amplificación del *Cytb* del 78.57 % similar a la obtenida en muestras semifrescas húmedas, y para microsatélites una amplificación baja, del 28.57 % para CPH8 y del 42.86% para CPH2, con una poca intensidad de banda, las bajas temperaturas del páramo conservaron el ADN, sin embargo el hecho de ser residuos significaría que las muestras son sumamente viejas, por ende el ADN esta degradado.

En cuanto al almacenamiento de las muestras fecales por largos períodos, se observó que mediante el protocolo de extracción de ADN se puede amplificar muestras que fueron recolectadas hace 6 meses si se tiene la certeza que son frescas, como las recolectadas en el zoológico. Para muestras recolectadas en el páramo debido a que no se tiene una estimación real de edad de deposición, la amplificación resulta mejor si se hace lo más rápido posible (Ver Figura 3.34). La conservación del ADN por largos períodos y posterior amplificación ya se ha utilizado anteriormente, por ejemplo Frantzen *et al.* (1998), amplificó con éxito muestras fecales de babuinos (*Papio cynocephalus ursinus*) que estuvieron almacenadas durante 4 meses en congelación a -20 °C.

En cuanto al análisis total de amplificación, se observó para el citocromo b una amplificación del 78.72 % para el total de las muestras fecales siendo un valor alto, tomando en cuenta el estado de conservación de las mismas y el método de extracción manual. Valores similares (78 %) obtuvo Berry *et al.* (2007), al amplificar el *Cytb* en muestras fecales de zorro rojo (*Vulpes vulpes*) en Australia utilizando un kit de extracción. Un valor más bajo (59 %) obtuvo Farrel *et al.* (2000), al amplificar el *Cytb*

en muestras fecales de zorro cangrejero (*Cerdocyon thous*), puma (*Puma concolor*) y jaguar (*Panthera onca*) en Sudamérica utilizando igualmente un kit de extracción. Para el caso de microsatélites la amplificación total fue del 56.76% para CPH8 y del 59.46 % para CPH2. Valores similares obtuvo Lucchini *et al.* (2002), en la genotipificación del lobo (*Canis lupus*), obteniendo una amplificación del 53 % con 6 microsatélites identificados en el perro en los Alpes Italianos, usando un Kit de extracción de ADN. Además en este estudio se obtuvo un valor más alto de amplificación de microsatélites con relaciona a la investigación realizado por Segovia (2006), en el mono lanudo del Ecuador (*Lagothrix lagotricha*) aplicando de igual manera un kit de extracción, en la cual no se pudo amplificar los 4 microsatélites empleados en ese estudio. En cuanto a la caracterización individual de los lobos de páramo aplicando estos microsatélites, la identificación de homocigotos, heterocigotos así como los polimorfismos resultó difícil ya que el gel de agarosa presentó poca resolución y no permitió diferenciar los tamaños de las bandas, por lo que una buena opción sería su posterior secuenciación y análisis.

Lo expuesto, convierte al protocolo de extracción de ADN fecal estandarizado en este estudio, en un método no invasivo eficaz y accesible para extraer y amplificar ADN mitocondrial y nuclear del lobo de páramo. Sin la necesidad de capturar a los animales o utilizar un kit de extracción de ADN fecal, que es menos accesible y más costoso. El protocolo estandarizado y el uso de marcadores mitocondriales y microsatélites, permitirán iniciar estudios genéticos en el lobo de páramo, enfocados en estimar el número real de individuos presentes en el área protegida y su distribución, además identificar poblaciones de lobos y el flujo génico entre ellas. Información genética puede proveer información fundamental sobre posibles cuellos de botella, en donde la variabilidad genética de los lobos de páramo podría estarse perdiendo, debido a los cruces endogámicos que se producen en poblaciones pequeñas con un hábitat reducido y fragmentado. El resultado de estos análisis permitiría hallar poblaciones donde la variabilidad genética este intacta y poblaciones donde exista mayor riesgo de extinción, llevando los esfuerzos de conservación hacia estos sitios, mediante la implementación de planes de manejo y conservación del lobo de páramo con el propósito de aumentar

las poblaciones genéticamente viables en el Parque Nacional Cayambe-Coca y en las demás áreas protegidas del país.

4.9 Identificación de parásitos gastrointestinales en muestras fecales de lobo de páramo

La presencia de parásitos que puedan afectar la salud de los animales silvestres ha sido un factor poco estudiado en nuestro país. A pesar de que muchos de estos organismos pueden convertirse en patógenos para los seres humanos (Arrojo, 2002). Debido a la importancia de realizar este tipo de análisis, y con el material fecal a disposición, se realizó adicional al estudio genético; un análisis copro-parasitario preliminar. Este análisis reveló que el 23.26 % de las muestras tenían quistes de *Eimeria spp.*, parásito que el lobo de páramo puede adquirirlo de forma accidental al consumir roedores y lagomorfos, la presencia de este parásito se ha reportado en el zorro gris (*Lycalopex griseus*) en Chile y no se observó que pueda ser patógeno (Dubey, 1976). En el 4.65 % de las muestras se encontró huevos de *Ascaris spp.* La especie de áscaris que comúnmente ataca a los cánidos son *Toxocara canis*, aunque la mayoría de infecciones son asintomáticas, las larvas pueden migrar y producir granulomas en hígado, pulmones, cerebro, ojos y ganglios. Los animales jóvenes están más expuestos a la infección por el parásito (Rodríguez *et al.*, 2006). La presencia de este parásito se ha reportado anteriormente en Chile para el lobo de páramo (Jiménez & Novaro, 2004).

El estudio morfológico para la identificación de los parásitos se basó en el tamaño, forma y tipo de pared y permitió diferenciar solamente el género de los parásitos, observando posiblemente 2 especies diferentes para *Eimeria* y 2 especies diferentes para *Áscaris*. La importancia de este estudio parasitológico radica en que se podría identificar de una manera más precisa las especies parasitarias que atacan al lobo de páramo, sí adicionalmente se diseñaran primers específicos para las especies parásitas, obteniendo su ADN mediante el protocolo de extracción estandarizado en este estudio para muestras fecales de lobo de páramo.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- El mejor método estandarizado para extraer ADN fecal a partir de muestras fecales de lobo de páramo fue el 2CTAB/CAI, que permite obtener un ADN fecal puro y de buena cantidad, apto para ser amplificado por PCR, adaptando y modificando métodos manuales que no se han desarrollado específicamente para este carnívoro andino y abaratando costos, ya que no es necesaria la utilización de un Kit de extracción de ADN fecal.
- El éxito en la extracción y amplificación del ADN obtenido de las muestras fecales de lobo se vieron influenciadas por múltiples factores que se evaluaron en esta investigación tales como: la dieta del animal, la edad de deposición, las condiciones ambientales a las que están expuestos los excrementos, la conservación de la muestra, el tiempo de almacenamiento de las heces, y los protocolos de extracción empleados.
- El diseño de primers específicos para el género *Lycalopex*, a través de la amplificación de un fragmento de 200 pb del gen del citocromo b en el ADN mitocondrial, permitió identificar a través de las heces la presencia de lobos de páramo en el Parque Nacional Cayambe-Coca sin la necesidad del contacto directo con el animal, facilitando de esta manera su muestreo, y permitiendo además diferenciar el ADN del lobo de otros cánidos como el perro, felinos o de posibles presas.
- El uso de microsatélites de otras especies emparentadas resultó ser aplicable en el material genético del lobo de páramo, siendo transferibles los microsatélites CPH8 y CPH2 conservados en el perro (*Canis lupus familiaris*) y en el zorro rojo (*Vulpes vulpes*), esto convierte a los microsatélites identificados en el perro en una buena opción para continuar con estudios genéticos si no se dispone de microsatélites específicos para el lobo de páramo, siempre y cuando se utilice adicional a los microsatélites, los primers específicos para el género *Lycalopex* diseñados en esta investigación.

- Amplificar microsatélites en ADN nuclear resultó ser más difícil que amplificar ADN mitocondrial debido a que existe un mayor número de copias de ADN mitocondrial en las células animales, por lo que utilizar en la amplificación una Taq polimerasa de alta fidelidad mejora significativamente la amplificación de microsatélites en ADN obtenido de muestras sanguíneas y en ADN obtenido de muestras fecales de lobo de páramo.
- Las muestras fecales frescas son la mejor opción para realizar análisis genéticos en ADN mitocondrial y nuclear, si no se pueden utilizar muestras frescas, las muestras semifrescas húmedas, son la segunda mejor opción pero como se observó en los resultados no existe un 100 % de amplificación, muestras semifrescas secas y residuos nos servirían para identificar si los excrementos pertenecen al lobo de páramo mediante la amplificación de ADN mitocondrial, pero no servirían para análisis poblacionales con microsatélites por su baja amplificación.
- El protocolo de extracción de ADN fecal estandarizado en este estudio permitirá iniciar estudios genéticos en el lobo de páramo, proporcionando información valiosa sobre su filogeografía, evolución, genotipificación y variabilidad genética a fin de establecer planes de manejo y conservación de las poblaciones de lobo de páramo en las áreas protegidas del Ecuador.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- Se recomienda para futuros análisis genéticos poblacionales en el lobo de páramo: realizar un muestreo más completo, aplicando transectos lineales de deposición por carreteras, recolectar muestras fecales frescas o semifrescas húmedas en días con poca radiación solar.
- Un buen protocolo de recolección de muestras fecales, facilita sus posteriores análisis, por tal motivo, se recomienda utilizar guantes para evitar contaminación entre muestras, utilizar una hielera para conservar las muestras hasta llegar al laboratorio, tomar puntos GPS para analizar la distribución de los animales y realizar un buen etiquetado de las muestras.
- Se recomienda utilizar Taq polimerasa de alta fidelidad para obtener mejores resultados en la amplificación de ADN mitocondrial y microsátélites en ADN nuclear, facilitando de esta manera la estandarización de la PCR.
- Para iniciar estudios evolutivos, y de filogeografía en el lobo de páramo, se recomienda analizar más regiones del ADN mitocondrial además del gen citocromo b, estas regiones podrían ser el gen del citocromo oxidasa I, el gen ATP sintetasa 6, la región control del ADNmt y el gen 16S de rRNA, utilizadas anteriormente en otros carnívoros silvestres.
- Para iniciar estudios de genotipificación, se recomienda diseñar primers específicos para el lobo de páramo, pero si no se puede realizar esto, la otra opción sería utilizar microsátélites identificados en el genoma del perro que pueden ser transferibles al lobo de páramo.
- En cuanto a la identificación de parásitos gastrointestinales, se recomienda diseñar primer específicos para las especies y utilizar el protocolo de extracción de ADN fecal optimizado, para obtener el ADN de dichos parásitos.

- Se recomienda iniciar estudios genéticos enfocados a la conservación de otras especies de mamíferos amenazadas, tales como: el tapir andino (*Tapirus pinchaque*), el puma (*Puma concolor*) y el oso de anteojos (*Tremarctos ornatus*) utilizando el protocolo de extracción de ADN fecal estandarizado en esta investigación.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- Abbaszadegan M., Velayati A., Tavasoli A. & Dadkhah E. (2007). Rapid DNA Extraction Protocol from Stool, Suitable for Molecular Genetic Diagnosis of Colon Cancer. Iranian Biomedical Journal, 11(3), 203-208.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., & Ryan, D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. Analyst, 125(5), 989-1009.
- Aranguren J. & Jordana J. (2001). Utilización de marcadores de ADN (microsatélites) en poblaciones de animales domésticos en peligro de extinción. Extraído el 22 de Junio, 2011, de http://avpa.ula.ve/articulos_libres/AVPAconservacion.pdf.
- Arrojo L. (2002). Parásitos de animales silvestres en cautiverio en Lima, Perú. Revista peruana de biología, 9(2): 118 – 120.
- Báez O. (2012). La diversidad biológica: recurso estratégico para el desarrollo sustentable del Ecuador. Extraído el 25 de Junio, 2012, de <http://safiqy.org/perspectivas/economia/8191-la-diversidad-biologica-recurso-estrategico-para-el-desarrollo-sustentable-del-ecuador-.html>.
- Barrera Saldaña HA, Ortiz López R, Rojas Martínez A Reséndez Pérez D. (1993). Reacción en cadena de la polimerasa: Una nueva época dorada en la biología molecular. Ciencia y Desarrollo, Conacyt, 18 (108): 50-60.
- Bartlett J. M. & Stirling D. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. Methods in Molecular Biology, 226, 3-6
- Beja A., Oliveira R., Alves P. C., Schwartz M. K. & Luikart G. (2009). Advancing ecological understandings through technological transformations in non-invasive genetics. Molecular Ecology Resources, 9, 1279-1301.
- Berry O., Sarre S., Farrington L. & Aitken N. (2007). Faecal DNA detection of invasive species: the case of feral foxes in Tasmania. The University of Adelaide. Extraído el 25 de abril, 2011, de http://www.foxdna.animals.uwa.edu.au/data/page/87330/Berry_Tasmanian_fox_detection_pre-publication_MS.pdf.

- Bhagavatula J. & Singh I. (2006). Genotificación de las muestras fecales tigre de Bengala *Panthera tigris tigris* estimación de la población: un estudio piloto. *BMC Genetics* [Versión electrónica], 7, 48-48. Extraído el 25 de abril, 2011, de http://viaclinica.com/article.php?pmc_id=1636336.
- Boore J. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(8), 1767-1780.
- Bosch M., Marmi J., Ferrando A., López F., Andrés O., García E., Ponsà M., Kellermann T., Guallar B., Bisbal F. & Domingo X. (2005) Genotipar sin capturar. *Galemys*, 17, 81-102.
- Bowman D. D., Lynn R. C. & Eberhard M. L. (2004). *Georgis Parasitología para Veterinarios*. Madrid, España: Elsevier.
- Broquet T., Menard N. & Petit E. (2007). Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. *Conservation Genetics* 8, 249-260.
- Castresana J. (2001). Cytochrome b Phylogeny and the Taxonomy of Great Apes and Mammals. *The Society for Molecular Biology and Evolution*, 18(4), 465–471.
- Chaves P. B., Graeff V. G., Lion M. B., Oliveira L. R. & Eizirik E. (2012). DNA barcoding meets molecular scatology: short mtDNA sequences for standardized species assignment of carnivore noninvasive samples. *Molecular Ecology Resources* 12, 18–35.
- Chaves P. B., Paes M. F., Mendes S. L, Strier K. B., Louro I. D. & Fagundes V. (2006). Noninvasive genetic sampling of endangered muriqui (Primates, Atelidae): Efficiency of fecal DNA extraction. *Genetics and Molecular Biology*, 29(4), 750-754.
- Cheng H. H. & Crittenden, L. B. (1994). Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Science*, 73, 539-546.
- Corach D., Penacino G. & Sala A. (1995). Cadaveric DNA extraction protocol based on Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB). In: *Acta Medicinae Legalis*, Vol. XLIV, P. Mangin and B. Ludes (eds.). 35–36. Springer-Verlag, New York.

- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M. & Robledo C.W. (2010). InfoStat versión 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. [Online]. Disponible: <http://www.infostat.com.ar>.
- Dubey J. (1976). A review of *Sarcocystis* of domestic animals and other coccidia of cat and dog. Journal of the American Veterinary Medical Association, 169, 1061-1078.
- Duque D. (2009). Electroforesis del ADN en geles de agarosa. Protocolos de laboratorio UEG. Extraído el 5 de Julio, 2011, de <http://www.ivic.gob.ve/ecologia/ueg/formatos/Electroforesis%20de%20ADN%20en%20geles%20de%20agarosa.pdf>.
- Echegaray J., De Lecea F., Hernando A., De la Torre J., Illana A. & Paniagua D. (2008). Informe sobre el seguimiento de las poblaciones de lobos en la comunidad autónoma del país Vasco. Mediante el uso de Técnicas genéticas no invasivas. Extraído el 25 de abril, 2011, de http://www.ingurumena.ejgv.euskadi.net/r49-3074/es/contenidos/informe_estudio/lobo_genetica_no_invasiva/es_doc/adjuntos/genetica_no_invasiva2.pdf.
- Echegaray J., Illana A., Hernando A., De Lecea F., Bayona J., Covela I., De la Torre J., Illana A., Paniagua D. & Vilà C. (2007). Uso de técnicas genéticas no invasivas para estimar el tamaño y la distribución del lobo (*Canis lupus linnaeus*, 1758) en el país Vasco (España). Galemys, 19 (2), 3-18. Extraído el 27 de abril, 2011, de <http://www.secem.es/GALEMYS/PDF%20de%20Galemys/19%20%282%29/19.201.Echegaray%20%283-18%29.pdf>.
- Eggert L. S., Eggert J. A. & Woodruff D. S. (2003). Estimating population sizes for elusive animals: The forest elephants of Kakum National Park, Ghana. Molecular Ecology, 12, 1389–140.
- Ernest H. B., Penedo, M. C., May B. P., Syvanen, M., & Boyce W. M. (2000). Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite valley region in California: Genetic analysis using microsatellites and fecal DNA. Molecular Ecology, 9, 433–441.
- Farrel L. F. Roman, J. & M. Sunquist. (2000). Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. Molecular Ecology, 9, 1583-1590.

- Francisco L. V., Langston A. A., Mellersh C. S., Neal C. L. & Ostrander E. A. (1996). A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. Mammalian Genome, *7*, 359-362.
- Frantz A. (2004). Non-Invasive Genetic Typing in the Study of Badger (*Meles meles*) Ecology. Tesis. University of Sussex United Kingdom. Extraído el 15 de junio, 2011, de http://www.mnf.uni-greifswald.de/fileadmin/naturschutz/thesis_frantz.pdf.
- Frantz A. C., Pope L. C., Carpenter P. J., Roper T. J., Wilson G. J., Delahay, R. J., & Burke T. (2003). Reliable microsatellite genotyping of the Eurasian badger *Meles meles* using fecal DNA. Molecular Ecology, *12*, 1649–1661.
- Frantzen M., Silk J., Ferguson J. Wayne R. & Kohn M. (1998). Empirical evaluation of preservation methods for fecal DNA. Molecular Ecology, *7*, 1423-1428.
- Fuchs L., Baldone V., Rojas M., Fort M., Giménez H. & Kin M. (2006). Endoparásitos hallados en el zorro gris pampeano (*Pseudalopex gymnocercus*) en la provincia de la Pampa, Argentina. Sitio Argentino de Producción Animal. 190-194. Extraído el 1 de Junio, 2011, de <http://www.produccion-animal.com.ar/fauna/105-zorro.pdf>.
- García F. J. (1991). Administrando para conservar: el caso de los zorros autóctonos de la Argentina. 25-36. En: M. C. Funes y A. J. Novaro (eds.) Actas de la Tercera Reunión Patagónica sobre Manejo de Poblaciones de Zorros. Neuquén.
- Gerloff U., Hartung B., Fruth B., Hohmann G. & Tautz D. (1999). Intracommunity relationships dispersal pattern and paternity success in a wild living community of bonobos (*Pan paniscus*) determined from DNA analysis of faecal samples. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, *266*, 1189-1195.
- Gese E. M. (2004). Chapter 15. Survey and Census Techniques for Canids. En Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. Status Survey and Conservation Action Plan. (eds. M. Hoffmann, C. Sillero-Zubiriand D. W. Macdonald). IUCN/SSC Canid Specialist Group.
- Godoy J. A. (2009). La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. Ecosistemas, *18* (1), 23-33.

- González D. (1998). Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología y sistemática. Revista Mexicana de Micología, 14,1-2.
- González E. G. (2003). Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. Graellsia, 59(2-3): 377-388.
- Green E., Birren B., Klapholz S., Myers R. & Hieter P. (1997). Genome Analysis. A Laboratory Manual. Vol 1. Analyzing DNA. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Guohao H., Meng R., Newman M., Gao G., Pittman R. & Prakash C. (2003). Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) BMC Plant Biology 3:3. Extraído el 5 de Junio, 2011, de <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/3/3>.
- Guzmán J., D'Elía G. & Ortiz J. (2009). Variación geográfica del zorro *Lycalopex culpaeus* (Mammalia, Canidae) en Chile: implicaciones taxonómicas. Extraído el 3 de mayo, 2011, de <http://www.ots.ac.cr/tropiweb/attachments/volumes/vol57-1-2/37-Guzman-Lycalopex%20culpaeus.pdf>.
- Heymann E. W., Heistermann M., Löttker P., Huck M. & Böhle U. (2006). Monitoreo no-invasivo de animales silvestres -análisis genéticos y endocrinológicos a base de muestras fecales en 'Pichicos barba blanca' (*Saguinus mystax*, Callitrichidae, Primates) en la Estación Biológica Quebrada Blanco (EBQB). Perú. Extraído el 4 de mayo, 2011, de <http://www.revistafauna.com.pe/memo/78-84.pdf>.
- Hurst G. & Jiggins F. (2005). Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. En Proceedings of Royal Society. B 272, 1525–1534. Extraído el 10 de Junio, 2011, de <http://www.gen.cam.ac.uk/research/Jiggins/pdfs/mtDNAreview.pdf>.
- Integrated DNA Technologies. (2012). OligoAnalyzer 3.1. Versión 2012. [Online]. Disponible: <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>.
- Invitrogen Corp. (2010). Qubit™ dsDNA HS Assay Kits .Extraído el 5 de Julio, 2011, de <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp32851.pdf>.

- Invitrogen Corp. (2010). Platinum® *Taq* DNA Polymerase. Extraído el 9 de Marzo, 2012, de http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/platinumtaq_pps.pdf.
- Irwin D., Kocher T. & Wilson A. (1991). Evolution of the cytochrome b genes of mammals. Journal of Molecular Evolution, 32, 128-144.
- Jakubczak A., Knaga S. & Jeżewska G. (2009). Genetic variation of microsatellite sequences and its relationship with some productive traits of arctic foxes. Annals of Animal Science, 9(2), 133–142.
- Jiménez A. (2009). Optimización de los Métodos de Recolección, Conservación y Extracción de DNA Nuclear a partir de Muestras de Excremento de Oso de Anteojos (*Tremarctos ornatus*). Tesis. Universidad Técnica Particular de Loja. Extraído el 20 de mayo, 2011, de <http://repositorio.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/3374/1/573X52.pdf>.
- Jiménez J. E., Lucherini M. & Novaro A. J. (2008). *Pseudalopex culpaeus*. En: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2011.1. Extraído el 25 de marzo, 2011, de <http://www.redlist.org/details/6929>.
- Jiménez J. E. & A. Novaro J. (2004). Culpeo. *Pseudalopex culpaeus*. En Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. Status Survey and Conservation Action Plan. (eds. M. Hoffmann, C. Sillero-Zubiriand D. W. Macdonald). IUCN/SSC Canid Specialist Group.
- Jimeno A. & Hidalgo M. (2006). Molecular biomarkers: their increasing role in the diagnosis, characterization, and therapy guidance in pancreatic cancer. Molecular Cancer Therapeutics, 5, 787-796.
- Kays R. W., Gompper M. E. & Ray J. C. (2008). Landscape ecology of eastern coyotes based on large-scale estimates of abundance. Ecological Applications, 18(4), 1014–1027.
- Kohn M. H. & Wayne R. K. (1997). Facts from feces revisited. Trends in Ecology and Evolution, 12, 223-227.
- Kurose N., Masuda R. & Tataru M. (2005). Fecal DNA Analysis for Identifying Species and Sex of Sympatric Carnivores: A Noninvasive Method for

- Conservation on the Tsushima Islands, Japan. Journal of Heredity, 96(6), 688-697.
- Larget B., Simon D. & Kadan J. (2002). Bayesian Phylogenetic Inference from Animal Mitochondrial Genome Arrangements. Dept. of Mathematics and Computer Science Duquesne University. Extraído el 5 de Junio, 2011, de <http://www.stat.cmu.edu/tr/tr763/tr763.pdf>.
- Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J. & Higgins D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 23:2947-2948.
- Li M., Wang X. M., Jiang W. B., Hua P. Y. & Wang Z. H. (2011). Isolation and characterization of fifteen microsatellite loci in the Tibetan fox (*Vulpes ferrilata*). Journal of Genetics. 90, e82–e85. Extraído el 13 de febrero, 2012, de <http://www.ias.ac.in/jgenet/OnlineResources/90/e82.pdf>.
- Linn S. (1981). Deoxyribonucleases: a survey and perspectives. In: Enzymes. Vol. 14. (ed. Boyer PD). Academic Press, New York. 121-135.
- Loomis, W.D. (1974). Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. Methods in Enzymology 31(Pt A): 528-544.
- Lucchini V., Fabbri E., Marucco F., Ricci S., Boitani L., & Randi E. (2002). Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps. Molecular Ecology, 11, 857-868.
- Luikart G., Zundel S., Rioux D., Miquel C., Keating K., Hogg J., Steele B., Foresman K. & Taberlet P. (2008). Low Genotyping Error Rates and Noninvasive Sampling in Bighorn Sheep. The Journal of Wildlife Management, 72(1), 299–304.
- MAE. (2011). Parque Nacional Cayambe-Coca. Ministerio del Ambiente. Ecuador. Extraído el 4 de noviembre, 2011, de <http://www.ambiente.gob.ec/?q=node/62>.
- Molina G. A. (1782). Saggio sulla storia naturale del Chili. Stamperia di S. Tommaso d' Aquino, Bologna, Italia. 367 p.

- Monteiro L., Bonnemaïson D., Vekris A., Petry K., Bonnet J., Vidal R., Cabrita J. & Mégraud F. (1997). Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. Journal of Clinical Microbiology, 35, 995-998.
- Moore M., Brown S. & Sacks B. (2010). Thirty-one short red fox (*Vulpes vulpes*) microsatellite markers. Molecular Ecology Resources. Extraído el 20 mayo, 2011, de <http://www.vgl.ucdavis.edu/cdcg/documents/Mooreetal2010.pdf>.
- Mukherjee N. Mondol S., Andheria A. & Ramakrishnan U. (2007). Rapid multiplex PCR based species identification of wild tigers using non-invasive samples. Conservation Genetics, 8, 1465–1470.
- Murphy M. A., Waits L., Kendall K., Wasser S., Higbee J. & Bogden R. (2002). An evaluation of long-term preservation methods for brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA samples. Conservation Genetics, 3, 435–440.
- NanoVue™. (2010). NanoVue™ Plus Spectrophotometer. Manual. [Online]. Disponible: [http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/DCE8B60DE8122421C1257628001D4B49/\\$file/28930169AC.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/DCE8B60DE8122421C1257628001D4B49/$file/28930169AC.pdf).
- NCBI. (2012a). Primer BLAST. Versión 2009. [Online]. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.
- NCBI. (2012b). Basic local alignment search tool. (BLAST). Versión 2012. [Online]. Disponible: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- NIH. (2012). GenBank. [Online]. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
- Nishimura T., Yamauchi K., Saitoh Y., Deguchi Y., Aoi T., Tsujimoto T. & Matsubara K. (2010). Sex Determination of the Japanese Serow (*Capricornis crispus*) by Fecal DNA Analysis. Japanese Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 15(2), 73-78.
- Novaro A. J. & Funes M. C. (1994). Impact of hunting on Argentinean foxes. Canid News 2:19–20.

- Oklander L., Marino M., Zunino G. & Corach D. (2004). Preservation and extraction of DNA from Feces in howler monkeys (*Alouatta caraya*). Neotropical Primates, 12(2), 59-63.
- Palacios R. (2007). Manual para identificación de carnívoros andinos. Córdoba, Argentina: Alianza Gato Andino. Extraído el 15 de noviembre, 2011, de <http://www.gatoandino.org/archivos/ManualIDcarnivorosRP-AGA.pdf>.
- Panasci M. (2009). An evaluation of fecal DNA preservation techniques and effects of sample age and diet on genotyping success. Tesis. Texas Tech University. Extraído el 11 de junio, 2011, de <http://dspace.lib.ttu.edu/etd/bitstream/handle/2346/ETD-TTU-2009-12-331/PANASCI-THESIS.pdf?sequence=4>.
- Paxinos E. C., McIntosh, Ralls K. & Fleischer R. (1997). A noninvasive method for distinguishing among canid species: amplification and enzyme restriction DNA from dung. Molecular Ecology, 6, 483-486.
- Phillip D. P., Krueger C.C., Thorgaard G. H., Wattendorf R. J. & Claussen J. E. (1986). "Fisheries genetics: Where should we be going?". Fisheries, 11(3), 14-17.
- Piggott M. & Taylor A. (2003). Extensive evaluation of faecal preservation and DNA extraction methods in Australian native and introduced species. Australian Journal of Zoology, 51, 341-355.
- Porebski, S.L., G. Bailey and R.B. Baum, (1997). Modification of CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molecular Biology Reporter, 15: 8-15.
- Prugh L. R., Ritland C. E., Arthur S. M. & Krebs C. J. (2005). Monitoring coyote population dynamics by genotyping faeces. Molecular Ecology 14, 1585-1596.
- Pumarola A. (1995). Microbiología y parasitología médica. Elsevier España. 805-806.
- Questiau S., Eybert C. & Taberlet P. (1998). Recent divergence between two morphologically differentiated subspecies of bluethroat (Aves: Muscicapidae: *Luscinia svecica*) inferred from mitochondrial DNA sequence variation. Molecular Ecology, 7(2), 239-245.

- Reed J., Tollit D., Thompson P. & Awos W. (1997). Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces. Molecular Ecology, 6, 225-234.
- Rodríguez P., Duménigo B., Brito E. & Aguiar J. (2006). *Toxocara canis* y Síndrome Larva Migrans Visceralis (*Toxocara canis* and Syndrome Larva Migrans Visceralis). [Versión electrónica] Vol. VII, N° 04. Extraído el 20 de mayo, 2012, de <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040406.html>.
- Salvatori V., G. Vaglio-Laurin, P. Meserve, L. Boitani & A. Campanella. (1999). Spatial organization, activity and social interactions of culpeo foxes (*Pseudalopex culpaeus*) in North-Central Chile. Journal of Mammalogy, 80(3), 980-985.
- Sargeant G. A., Johnson D. H. & Berg W. E. (1998). Interpreting carnivore scent-station surveys. Journal of Wildlife Management, 62, 1235-1245.
- Segovia R. (2006). Escatología Molecular en *Lagothrix lagotricha* (Primates: Platyrrhini): Un método no invasivo de amplificación de ADN. Tesis. Universidad San Francisco de Quito. Extraído el 4 de noviembre, 2011, de, <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/588>.
- Smith D. A., Ralls K., Hurt A., Adams B., Parkerl M. & Maldonado J. (2006). Assessing reliability of microsatellite genotypes from kit fox faecal samples using genetic and GIS analyses. Molecular Ecology, 10.1111/j.1365-294X.2005.02841.x. Extraído el 23 de mayo, 2011, de <http://si-pddr.si.edu/jspui/bitstream/10088/4415/1/Smith2006.pdf>.
- Somasundaram S. T. & Kalaiselvam M. (2008). Molecular Tools for Assessing Genetic Diversity. Centre of Advanced Study in Marine Biology Annamalai University. 82- 91. Extraído el 4 de Junio, 2011, de <http://ocw.unu.edu/international-network-on-water-environment-and-health/unu-inweh-course-1-mangroves/Molecular Tools for Assessing Genetic Diversity.pdf>.
- Stauffer S. H., Birkenheuer A. J., Levy M. G., Marr H. & Gookin J. L. (2008). Evaluation of Four DNA Extraction Methods for the Detection of *Trichostrongylus axei* in Feline Stool Specimens by Polymerase Chain Reaction. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 20, 639. [Versión electrónica]. Extraído el 5 de Junio, 2012, de <http://vdi.sagepub.com/content/20/5/639>.

- Surzycki S. (2000). Basic techniques in Molecular Biology. Heidenberg: Springer-Verlag Berlín.
- Taberlet P., Waits L. & Luikart G. (1999). Noninvasive genetic sampling: look before you leap. Trends in Ecology and Evolution, 14, 323-327.
- Tang J., Zeng Z., Wang H., Yang T., Zhang P., Li Y., Zhang A., Fan W., Zhang Y., Yang X., Zhao S., Tian G. & Zou L. (2008). An effective method for aislation of DNA from pig faeces and comparison of five different methods. Journal of Microbiological Methods, 75,432-436.
- Tapir Specialist Group. (2006). Sampling Techniques for Genetic Analysis. Extraído el 4 de noviembre, 2011, de <http://www.tapirs.org/Downloads/committees/genetics/TSG%20International%20Genetics%20Project%20-%20SAMPLE%20TECHNIQUES%20-%20English.pdf>.
- Terio K. A., Brown J. L., Moreland R. & Munson L. (2002). Comparison of different drying and storage methods on quantifiable concentrations of fecal steroids in the cheetah. ZooBiology, 21, 215-222.
- Tirira D. G. & Burneo S. F. (2011). Diversidad y Endemismo. Análisis, evoluciones y comparaciones. En: Libro Rojo de los mamíferos del Ecuador (D. G. Tirira, ed), 2ª. Edición. Fundación Mamíferos y Conservación, Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Ministerio del Ambiente del Ecuador. [Versión on line]. Extraído el 2 de mayo, 2012, de <http://www.librorojo.mamiferosdeecuador.com/home.html>.
- Tirira D. G. (2007). Mamíferos del Ecuador: diversidad. Página en internet. Versión 3.1. Extraído el 15 de mayo, 2011, de <http://www.mamiferosdeecuador.com/diversidad/carnivora/canidae/73-lycalopex-culpaesus-molina-1782.html>.
- Torres J. C., Castro S. & Oliva D. (2009). Capítulo III. Conservación de la biodiversidad. En Biodiversidad de Chile, Patrimonio y Desafíos. 2ª Edición, Ocho Libros Ed. Santiago de Chile. 413-427.
- Trujillo F. G. & Trujillo J. (2007). Alimentación del lobo (*Lycalopex culpaeus*), en el bosque protector Jerusalén, Guayllabamba-Ecuador. Politécnica 27 (4) Biología 7: 68-75. Extraído el 20 de Octubre, 2011 de,

<http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/3838/1/Alimentaci%20del%20Lobo.pdf>.

- Vallet D., Petit E. J., Gatti S., Levréro S. & Ménard N. (2008). A new 2CTAB/PCI method improves DNA amplification success from faeces of Mediterranean (Barbary macaques) and tropical (lowland gorillas) primates. Conservation Genetics, 9(3), 677–680.
- Vargas G. (2009). Niveles séricos de hormonas gonadales en el lobo gris mexicano (*Canis lupus baileyi*) en la época no reproductiva. Tesis Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Extraído el 10 de octubre, 2011, de <http://148.206.53.231/UAMI14791.pdf>.
- Viljoen G., Neland L. y Crowther J. (2005). Molecular Diagnostic PCR Handbook. IAEA-FAO, Springer, Dordrecht, The Netherlands. Pp 6-8.
- Waits L. P., & Paetkau D. (2005). Noninvasive genetic sampling tools for Wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. Journal of Wildlife Management, 69, 1419-1433.
- Walsh P. S., Metzger D. A. & Higuchi R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques, 10, 506–513.
- Wasser S. K., Houston C. S., Koehler G. M., Cadd G. G. & Fain S. R. (1997). Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. Molecular Ecology, 6, 1091–1097.
- Wayne R. K., Geffen E., Girman D. J., Koepfli K. P., Lau L. M. & Marshall C. R. (1997). Molecular systematics of the Canidae. Systematic Biology, 46:622–653. Extraído el 10 de marzo, 2011, de <http://sysbio.oxfordjournals.org/content/46/4/622.full.pdf>.
- Wayne R. K., Geffen E. & Vilà C. (2004). Conservation Genetics of Canids. En Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. 2004 Status Survey and Conservation Action Plan. (eds. M. Hoffmann, C. Sillero-Zubiriand D. W. Macdonald).UICN/SSC Canid Specialist Group. Extraído el 14 de marzo, 2011, de <http://www.carnivoreconservation.org/files/actionplans/canids.pdf>.

- Webbon CH. C., Baker P. J. & Harris S. (2004). Faecal density counts for monitoring changes in red fox numbers in rural Britain. Journal of Applied Ecology, 41, 768–779.
- Zapata-Ríos G. (2010). Los Paisajes Cambiantes de los Andes: consecuencias ecológicas e implicaciones para la conservación de los mamíferos carnívoros de los páramos ecuatorianos. En Programa de Becas para Investigación, Páramo Andino. Extraído el 25 de abril, 2011, de http://www.condesan.org/ppa/documentos/investigacion/Informe_Galo_Zapata.pdf.
- Zapata-Ríos G., Tirira D. G., Armijos J. & Cisneros R. (2011). Lobo de páramo (*Lycalopex culpaeus*). En: Libro Rojo de los mamíferos del Ecuador (D. G. Tirira, ed), 2ª. Edición. Fundación Mamíferos y Conservación, Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Ministerio del Ambiente del Ecuador. Publicación especial sobre los mamíferos del Ecuador 8. Quito. Pp 215-216.
- Zapata-Ríos G. & Suárez E. (2005). Evaluación del hábitat del lobo de páramo (*Pseudalopex culpaeus*) en los Andes ecuatorianos: integración de modelos espaciales y registros de campo. III Congreso de Conservación de la Biodiversidad en los Andes y la Amazonía. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja. Extraído el 21 de Octubre, 2011, de http://www.darwinnet.org/docs/memorias_IICBS.pdf.
- Zhang B., Li M., Ma L. & Wei F. (2006). A Widely Applicable Protocol for DNA Isolation from Fecal Samples. Biochemical Genetics, (44)11/12, 494-503.